

GIAMPIERO CAI*, STEFANO DEL DUCA**,
DONATELLA SERAFINI-FRACASSINI**, MAURO CRESTI*

Deposizione della parete e citoscheletro, crescita del tubetto pollinico e successo riproduttivo

IL TUBETTO POLLINICO È UNA CELLULA A CRESCITA APICALE

Il ruolo del tubetto pollinico è fondamentale durante la riproduzione sessuale nelle piante superiori (gimnosperme e angiosperme) poiché trasporta le cellule spermatiche fino all'oosfera nell'ovulo per consentire il processo di fecondazione. Il tubetto pollinico si forma quando un granulo di polline è deposto sulla superficie di uno stigma ricettivo. Dopo l'attivazione, il tubetto pollinico germina e comincia a crescere all'interno del pistillo con un tasso di crescita considerevolmente alto in alcune specie (0,5-0,7 mm/h in giglio). Sia la crescita del tubetto sia il trasporto delle cellule spermatiche si basano sulla presenza e sull'attività di un apparato citoscheletrico che, come in altre cellule vegetali, è composto da filamenti di actina e microtubuli. Le dinamiche dei filamenti di actina e dei microtubuli, assieme a specifiche proteine associate (motrici e non), rendono il citoscheletro una rete proteica capace di regolare l'intero processo di crescita del tubetto (Cheung e Wu, 2008). La crescita dei tubetti pollinici è caratterizzata dalla sinergia tra la pressione di turgore e la deposizione (apicale) di componenti della parete cellulare (inizialmente rappresentata da pectine) a cui segue la stabilizzazione della parete stessa attraverso la sintesi di callosio e cellulosa (Winship et al., 2010). Mentre i filamenti di actina probabilmente promuovono la crescita e l'accumulo di vescicole contenenti pectina, regolando il loro tasso di fusione, i microtubuli sono ipoteticamente coinvolti nel determinare la direzione di crescita del tubetto pollinico (Gossot e Geitmann, 2007). Entrambe queste funzioni (tasso e direzione di

* Dipartimento Scienze Ambientali, Università di Siena

** Dipartimento di Biologia Evoluzionistica Sperimentale, Università di Bologna

crescita) sono sotto il controllo di segnali esterni (provenienti dalla parte femminile del fiore). Il tubetto pollinico è un modello eccellente per studiare vari aspetti della fisiologia cellulare. Oltre a essere una cellula aploide, il polline può essere raccolto in grandi quantità (almeno per alcune specie), l'estrazione delle sue proteine è relativamente semplice da eseguire, i componenti interni possono essere osservati e monitorati senza sforzo e il polline può essere trasformato geneticamente in modo transitorio con protocolli standard per marcare selettivamente i compartimenti intracellulari. Un'altra peculiarità dei tubetti pollinici è il loro tipo di crescita, denominata apicale, che avviene in un dominio distinto, l'apice del tubetto stesso, dove molte vescicole secretorie si fondono con la membrana plasmatica (Parton et al., 2001). Le vescicole di Golgi presumibilmente contengono componenti pectici della parete cellulare e gli enzimi necessari a sintetizzare callosio e cellulosa (Ketelaar et al., 2008). L'accumulo continuo di entrambi i tipi di materiale promuove la crescita e l'allungamento dei tubetti pollinici. Pertanto, il numero delle vescicole secretorie deve essere mantenuto a livelli costanti all'apice del tubetto al fine di sostenerne la crescita. Le vescicole secretorie sono essenzialmente prodotte dagli apparati di Golgi che presumibilmente si spostano verso l'apice e in direzione opposta lungo l'asse principale del tubetto pollinico. Al pari degli apparati di Golgi, le altre classi di organelli si muovono rapidamente nei tubetti pollinici in modo da distribuirsi uniformemente seguendo il tasso di crescita del tubetto. Anche se il trasporto delle vescicole potrebbe avvenire tramite diffusione, l'attività di focalizzazione dovuta al cosiddetto "collare di actina" nella regione subapicale spinge le vescicole verso l'apice del tubetto (Lovy-Wheeler et al., 2005). Inoltre, i filamenti di actina regolano l'inversione del movimento degli organelli (Cardenas et al., 2005) ed estendono progressivamente il collare di actina. D'altra parte, il ruolo dei microtubuli nella crescita del tubetto pollinico è ancora poco chiaro, anche se i microtubuli sono probabilmente coinvolti nel trasporto/localizzazione *in vitro* di organelli e vescicole (Cai e Cresti, 2009; Cai e Cresti, 2010).

I MICROTUBULI PARTECIPANO ALLA LOCALIZZAZIONE DEI MITOCONDRI

I microtubuli sono una componente fondamentale del citoscheletro delle cellule vegetali e svolgono un certo numero di funzioni critiche durante il ciclo cellulare, dalla modellazione della parete cellulare durante l'interfase all'assemblaggio della banda preprofasica, del fuso mitotico e del fragmoplasto durante la divisione cellulare (Brown e Lemmon, 2001). Nel tubetto pollinico,

i microtubuli sono organizzati in fasci lungo l'asse principale del tubetto ma, a differenza dei filamenti di actina, si trovano principalmente nella regione corticale dei tubetti (Del Casino et al., 1993). I microtubuli sono presenti cospicuamente lungo tutto il tubetto pollinico ma sono spesso assenti all'apice del tubetto. Dato che la visualizzazione dei microtubuli nei tubetti pollinici attualmente si basa sull'uso di anticorpi, un'esauriente osservazione dei microtubuli nei tubetti *in vivo* non è ancora stata effettuata e di conseguenza l'organizzazione precisa dei microtubuli è ancora in discussione. L'uso di coloranti fluorescenti non si è dimostrato vantaggioso nel rivelare la struttura dei microtubuli nei tubetti pollinici *in vivo*. D'altra parte, la proteina AtEB1 è stata usata con successo per marcare *in vivo* i microtubuli in tubetti pollinici di tabacco (Cheung et al., 2008). Gli autori del suddetto articolo hanno descritto filamenti di microtubuli più lunghi e stabili nel tubetto e filamenti di microtubuli più brevi nel citoplasma della regione subapicale paralleli all'asse di crescita e in grado di penetrare la regione apicale (Cheung et al., 2008). Questi risultati suggeriscono che ancor più dati sono necessari per descrivere ampiamente l'organizzazione dei microtubuli nel tubetto pollinico, un pre-requisito per comprenderne appieno il ruolo. Il rapporto tra dinamica degli organelli e microtubuli non è ancora chiaro. Poiché l'uso di inibitori dei microtubuli non causa effetti chiari sul moto degli organelli, è opinione generale che i microtubuli hanno ben poco a che fare con il movimento degli organelli stessi. Tuttavia, diverse osservazioni (di natura biochimica, citologica e molecolare) mettono in discussione la validità di tale affermazione.

Un possibile ruolo dei microtubuli del tubetto pollinico è legato alla motilità dei mitocondri. Il movimento dei mitocondri è solitamente filamenti di actina-dipendente. D'altro canto, i microtubuli sono coinvolti (direttamente o indirettamente) nel posizionamento dei mitocondri nel cortex delle cellule vegetali (Van Gestel et al., 2002). Le proteine coinvolte nel posizionamento dei mitocondri lungo i microtubuli sono ancora sconosciute. Tuttavia, un membro della superfamiglia delle kinesine di *Arabidopsis* (AtKP1) è stato localizzato su organelli probabilmente simili ai mitocondri (Ni et al., 2005). Nel tubetto pollinico, sia il reticolo endoplasmatico sia i mitocondri mostrano un movimento "oscillatorio" mentre si muovono verso l'apice del tubetto per poi invertire la direzione di spostamento (Wang et al., 2010b). I mitocondri sono stati localizzati maggiormente nella regione subapicale del tubetto (Lovy-Wheeler et al., 2007), con una distribuzione che dipende dai filamenti di actina ma apparentemente non dai microtubuli. Il coinvolgimento di microtubuli e motori dei microtubuli nel movimento dei mitocondri del tubetto pollinico è dunque poco chiaro. Una proteina di 90-kD simile alla kinesina

è stata localizzata sui mitocondri dei tubetti pollinici di tabacco mediante immunoelettromicroscopia (Romagnoli et al., 2007). Poiché la kinesina di 90-kD è in grado di muoversi lungo i microtubuli (Cai et al., 2000), questi dati suggeriscono che i mitocondri possono usare tale kinesina per spostarsi nel tubetto pollinico. Tuttavia, la velocità della kinesina di 90-kD è di circa 0,040 $\mu\text{m/s}$ mentre la velocità *in vitro* dei mitocondri lungo i microtubuli è 0,17 $\mu\text{m/s}$ (Romagnoli et al., 2007); anche se tale discrepanza potrebbe riflettere una non ottimale condizione sperimentale, i dati indicano che i microtubuli possono promuovere un movimento lento oppure una fase di sospensione del moto dei mitocondri. D'altra parte, una miosina di 170-kD è stata localizzata in associazione con i mitocondri del tubetto pollinico (Romagnoli et al., 2007), così come in associazione con altri tipi di organelli (Yokota et al., 1995). A quanto pare, la miosina di 170-kD non è specificamente associata con una sola classe di organelli del tubetto pollinico ma eventualmente promuove il movimento di molti differenti tipi di organelli. Al contrario, la kinesina di 90-kD sembra specificamente associata con i mitocondri (Romagnoli et al., 2007), suggerendo una sorta di specificità nell'utilizzo dei motori dei microtubuli. Questa prova non è sorprendente perché diversi membri della superfamiglia delle kinesine sono ipoteticamente associate a componenti specifici nelle cellule animali; ad esempio, la KIF1B β si lega alle vescicole sinaptiche, la KIF3 si lega a vescicole associate alle fodrine, mentre la KIF5 trasporta le vescicole con GRIP1 e la KIF1A trasporta le vescicole contenenti il recettore AMPA (Seog et al., 2004). Nelle piante, alcune kinesine sono specificamente associate a strutture definite, come il fragmoplasto, che è organizzato da due kinesine omologhe (la kinesina-12A PAKRP1 e la kinesina-12B PAKRP1L) che si localizzano esclusivamente nella regione mediana (Lee et al., 2007). Inoltre, la kinesina-13A sembra specificamente localizzata sulle membrane dei Golgi (Lu et al., 2005; Wei et al., 2005; Wei et al., 2009) e la kinesina AtKP1 si trova principalmente in associazione con i mitocondri delle cellule vegetali (Ni et al., 2005). Di conseguenza, l'associazione di kinesine specifiche con particolari organelli non è sorprendente.

Perché i mitocondri avrebbero bisogno di motori appartenenti a diverse famiglie (kinesina e miosina)? Nelle cellule animali, il trasporto dei mitocondri dipende principalmente dai microtubuli e dai loro motori (kinesina e dineina) ma le miosine probabilmente si oppongono al movimento basato sui microtubuli per facilitare l'attracco dei mitocondri in siti specifici (Pathak et al., 2010). Questa constatazione esemplifica l'attuale modello di cooperazione funzionale tra proteine motrici mediante il quale i motori dei microtubuli e dei filamenti di actina coordinano il trasporto di vescicole e organelli nelle

cellule eucariotiche. Anche se il movimento degli organelli nelle cellule vegetali usa regole diverse, le tracce di questo meccanismo di coordinamento potrebbero essere state conservate per regolare la posizione finale degli organelli. Nel tubetto pollinico, il movimento dei mitocondri mostra una distribuzione di velocità caratterizzata da valori medio-bassi mentre la distribuzione delle velocità dei mitocondri nei tubetti pollinici trattati con orizalina è caratterizzata dalla scomparsa delle velocità più basse e dal simultaneo aumento delle frequenze più alte (Romagnoli et al., 2007). Questa evidenza suggerisce che i microtubuli hanno la funzione di rallentare il moto dei mitocondri in luoghi specifici del tubetto pollinico, molto probabilmente nella regione corticale. Questa funzione è probabilmente da mettere in rapporto con il bisogno di maggiori quantità di energia (ATP) in siti specifici del tubetto.

I MICROTUBULI CONTROLLANO LA POSIZIONE DEI GOLGI?

Gli apparati di Golgi sono una classe di organelli fondamentale, la cui funzione consiste nell'indirizzare le proteine alla loro destinazione finale nella cellula. Nel tubetto pollinico, i Golgi sono i principali produttori di vescicole secretorie che, dopo essersi accumulate all'apice del tubetto ed essersi fuse con la membrana plasmatica, forniscono nuovi componenti per la crescita del tubetto (cioè molecole della membrana plasmatica e della parete cellulare). La localizzazione dei Golgi nel tubetto pollinico non è completamente chiara. Coloranti come il BODIPY TR-ceramide hanno identificato gli apparati di Golgi nel citoplasma e, maggiormente, in una struttura a forma di collare vicino all'apice del tubetto che circonda l'area arricchita in vescicole (Moscatelli et al., 2007). Tuttavia, in studi effettuati con tubetti pollinici marcati con GFP-Lat52-NtRab2, i Golgi sono stati osservati essere distribuiti in modo uniforme con l'eccezione del dominio apicale (Cheung et al., 2002). I Golgi sono stati localizzati in modo uniforme in tubetti pollinici anche usando un anticorpo contro la proteina 58K (Li e Yan, 2000). Di conseguenza, la precisa localizzazione dei Golgi è ancora da stabilire. Quando i Golgi sono stati localizzati in cellule fogliari mediante espressione di proteine tipiche del Golgi (α -1,2 mannosidasi) fuse alle GFP (Nebenführ et al., 1999), essi hanno mostrato un movimento descritto come "stop-and-go", consistente in uno scambio tra moto rapido diretto e moto casuale. Il movimento diretto è prevalentemente a carico dei filamenti di actina e delle miosine, mentre i microtubuli sembrano avere una funzione di controllo, dal momento che i farmaci anti-microtubuli inducono un effetto stimolante sul movimento delle membrane.

Anche se il contributo ipotetico dei microtubuli e dei motori dei microtubuli nel movimento dei Golgi non è chiaro, si possono proporre alcuni modelli. L'interazione delle kinesine con i Golgi è stata postulata grazie all'identificazione di una kinesina (la kinesina-13A) sia in cotone sia in *Arabidopsis* (Lu et al., 2005). La proteina motrice è stata co-localizzata con i Golgi, i quali sono stati osservati frequentemente nelle strette vicinanze dei microtubuli, il che suggerisce che la kinesina-13A potrebbe essere coinvolta nell'associazione tra Golgi e microtubuli. L'obiettivo di tale associazione potrebbe essere la regolazione della distribuzione locale dei Golgi nel cortex cellulare; in alternativa, la kinesina-13A potrebbe essere utilizzata per ridistribuire le vescicole rilasciate dalle cisterne del Golgi. È interessante notare che un omologo di questa proteina è stato identificato anche nel tubetto pollinico di tabacco (Wei et al., 2005). Questa proteina co-localizza parzialmente con l'apparato di Golgi e con le vescicole, suggerendo che la kinesina-13A probabilmente controlla il trasporto delle cisterne del Golgi e/o di vescicole derivate dal Golgi nel tubetto pollinico. Allo stesso modo, la AtKinesin-13A è distribuita su vescicole di Golgi nelle cellule della radice di *Arabidopsis* (Wei et al., 2009). Ciò dimostra che membri della famiglia della kinesina-13A possono regolare la posizione dei Golgi nelle cellule vegetali e quindi partecipare al traffico delle vescicole derivate dal Golgi. In questo contesto, è interessante notare che vescicole provenienti da una frazione arricchita di Golgi sono state osservate muoversi lungo i microtubuli, grazie ad analisi di motilità *in vitro*. Inoltre, le membrane di Golgi possono passare da microtubuli a filamenti di actina (e viceversa) suggerendo che i due filamenti citoscheletrici sono necessari per le diverse fasi del moto complessivo dei Golgi (Romagnoli et al., 2007). A causa del protocollo di estrazione utilizzato, le analisi di motilità potrebbero non discriminare tra apparati di Golgi o vescicole di Golgi; tuttavia, le analisi hanno suggerito che il movimento delle membrane del Golgi lungo i microtubuli è piuttosto lento in confronto allo streaming citoplasmatico dei tubetti pollinici e, di conseguenza, che i microtubuli e i motori dei microtubuli non partecipano al traffico generale delle membrane di Golgi. Ipoteticamente, i microtubuli e i loro motori potrebbero invece ottimizzare il posizionamento finale dei Golgi, dopo che questi sono stati trasportati rapidamente lungo i filamenti di actina. Non è noto se i motori dei microtubuli guidano anche il movimento delle vescicole di Golgi, ma questa ipotesi è suggestiva. Infatti, la velocità media *in vitro* delle vescicole di Golgi è di circa 1,78 $\mu\text{m/s}$ lungo i filamenti di actina e di 0,22 $\mu\text{m/s}$ lungo i microtubuli, mentre è di circa 0,75 $\mu\text{m/s}$ in presenza di microtubuli e filamenti di actina (Romagnoli et al., 2007); questi ultimi valori sono paragonabili a quelli misurati nei tubetti pollinici di giglio (Bove

et al., 2008). Inoltre, un anticorpo diretto contro la catena pesante della kinesina di cervello bovino ha identificato una proteina cross-reagente nella regione del tubetto arricchita in vescicole secretorie (Tiezzi et al., 1992); in aggiunta a ciò, le membrane di Golgi estratte da polline di nocciolo sono state osservate in associazione ai microtubuli in condizioni che stimolano il legame tra kinesina e microtubuli (Liu et al., 1994).

Qual è lo scopo delle interazioni tra i Golgi e i microtubuli? Sulla base dei risultati, è possibile proporre un modello in cui i Golgi dei tubetti pollinici migrano rapidamente (e probabilmente per lunghe distanze) lungo i filamenti di actina utilizzando le miosine. Anche se le analisi di motilità *in vitro* hanno indicato che le interazioni tra microtubuli e vescicole di Golgi possono persistere per periodi lunghi (Romagnoli et al., 2007), la velocità del movimento è di 0,1-0,2 $\mu\text{m/s}$, suggerendo che la distanza coperta dai Golgi lungo i microtubuli potrebbe essere al massimo dell'ordine di pochi micrometri. Si evince pertanto che in siti specifici (ad esempio all'interfaccia tra apice e subapice), i microtubuli potrebbero rallentare localmente il traffico dei Golgi utilizzando i motori kinesina-13A per regolarne finemente la posizione nel tubetto pollinico. Dal momento che la maggior parte dei microtubuli nel tubetto pollinico è distribuita nel cortex cellulare (Del Casino et al., 1993; Lancelle et al., 1987), la decelerazione del movimento dei Golgi è pertanto fondamentale a quel livello. Il movimento iniziale delle vescicole di Golgi potrebbe anche essere guidato dai motori dei microtubuli, che servirebbe di conseguenza per focalizzare le vescicole all'apice del tubetto pollinico.

Un ruolo ipotetico ma interessante delle interazioni tra microtubuli e vescicole di Golgi potrebbe interessare il trasporto locale degli enzimi che sintetizzano la parete cellulare. Infatti, è curioso notare che la cellulosa sintasi CesA3 è stata localizzata nei Golgi e in un compartimento particolare associato ai microtubuli (il cosiddetto MASC) (Crowell et al., 2009). L'inserimento di CesA3 nella membrana plasmatica si verifica quando i Golgi sostano lungo i microtubuli, un passaggio probabilmente necessario per rifornire CesA3 ai MASC, che fungerebbe quindi da stazione di transito per la consegna finale di CesA3 al plasmalemma. Anche se le kinesine sono state ipotizzate non essere utili per bloccare i Golgi lungo i microtubuli (Crowell et al., 2009), l'uso di kinesine per regolare la sintesi di cellulosa mediante la sospensione locale dei Golgi è un'ipotesi affascinante (Szymanski, 2009). Nel tubetto pollinico, la regione dove inizia la sintesi di cellulosa non è nota ma la cellulosa è stata evidenziata intorno a 5-15 μm dall'apice del tubetto (Ferguson et al., 1998). Ipoteticamente, i microtubuli potrebbero bloccare i Golgi nella regione subapicale dei tubetti pollinici e poi guidare le vescicole di Golgi trasportanti

CesA verso il corretto inserimento. Dal momento che la cellulosa è apparentemente necessaria per stabilizzare la direzione di crescita dei tubetti pollinici (Aouar et al., 2010), la depolimerizzazione dei microtubuli potrebbe inibire sia il corretto posizionamento dei Golgi sia la distribuzione delle vescicole che trasportano CesA, alterando così la direzione di crescita dei tubetti (Gossot e Geitmann, 2007).

IL CITOSCHELETRO TRASPORTA ANCHE GLI ENZIMI PER LA SINTESI DI CALLOSIO E CELLULOSA

Qual è il rapporto tra citoscheletro e deposizione della parete cellulare nel tubetto pollinico? Come tutte le cellule vegetali, la parete cellulare svolge un ruolo importante nella crescita del tubetto pollinico e in ultima analisi nel favorire la funzione corretta del tubetto stesso. Come descritto in precedenza, il tubetto pollinico deve seguire una serie di segnali durante la sua crescita all'interno del pistillo. Il processo di crescita necessita del trasporto specifico di vescicole secretorie prodotte dal Golgi verso l'apice del tubetto. La fusione delle vescicole produce la prima parete (composta quasi esclusivamente di pectine) a cui fa seguito la deposizione di una parete ulteriore composta di callosio (per la maggior parte) e di cellulosa. Questi due componenti hanno ruoli forse diversi. Mentre il callosio stabilizza la struttura della parete cellulare e le fornisce resistenza, la cellulosa potrebbe essere coinvolta nel favorire la crescita corretta del tubetto pollinico, stabilizzando la sua direzione di crescita (Aouar et al., 2010). Anche se la cellulosa è presente in quantità relativamente basse, la sua presenza determina il diametro dei tubetti pollinici, suggerendo che la cellulosa possa influenzare la struttura complessiva della parete cellulare del tubetto pollinico in crescita. Inoltre, mutanti di *Arabidopsis* difettivi nel gene AtCSLA7 (che codifica per una proteina simile alla cellulosa sintasi) indicano che il prodotto del gene è importante per la crescita del tubetto pollinico (Goubet et al., 2003). Piante mutanti nei geni codificanti altre proteine simili alla cellulosa sintasi (CSLD1 e CSLD4) sono difettosi nella produzione di tubetti pollinici (Wang et al., 2011). Di conseguenza, la cellulosa è probabilmente importante per lo sviluppo normale dei tubetti. D'altro canto, i microtubuli sono storicamente considerati non essenziali per la corretta crescita dei tubetti, mentre i filamenti di actina avrebbero un ruolo importante in questo processo. Tuttavia, i microtubuli possono influenzare la direzionalità di crescita. Infatti, l'applicazione di inibitori dei microtubuli sulla superficie di fiori ricettivi induce forti alterazioni nella crescita dei tubetti pollinici

(Joos et al., 1995). In secondo luogo, gli inibitori dei microtubuli non hanno effetti sulla capacità dei tubetti pollinici di penetrare una barriera fisica *in vitro* ma possono alterare la loro capacità di mantenere una crescita direzionale (Gossot e Geitmann, 2007). In terzo luogo, anche se i microtubuli sono generalmente assenti all'apice di tubetti pollinici in crescita, possono essere rintracciati in tale zona quando i tubetti pollinici si curvano suggerendo che i microtubuli possano essere richiesti per la curvatura o per mantenere la curvatura (Foissner et al., 2002).

Il trasporto degli enzimi coinvolti nella sintesi di parete è un possibile esempio della cooperazione che potrebbe esistere tra filamenti di actina e microtubuli nel tubetto pollinico (ma non solo). Sebbene i filamenti di actina probabilmente guidano l'inserimento di Cesa nella membrana plasmatica apicale, i microtubuli potrebbero regolare l'attività di Cesa quando questa già si trova nella membrana plasmatica (Crowell et al., 2010). Questa funzione potrebbe essere realizzata a due diversi livelli. In primo luogo, i microtubuli potrebbero definire sottodomini specifici della membrana plasmatica in cui l'attività di Cesa è rafforzata. In secondo luogo, i microtubuli potrebbero localmente regolare l'inserimento o la rimozione di Cesa attraverso il controllo del traffico delle membrane contenenti Cesa. In questo contesto, le interrelazioni dinamiche tra microtubuli e organelli del tubetto sono progressivamente in fase di chiarificazione. I microtubuli sono coinvolti nel trasporto a corto raggio di vescicole di Golgi, con una velocità media che è notevolmente inferiore rispetto allo streaming citoplasmatico e quindi adatta a regolare tale meccanismo (Romagnoli et al., 2007). Ovviamente ignoriamo se proteine simili a kinesine trasportino oppure ancorino le vescicole contenenti Cesa lungo i microtubuli, ma questa ipotesi è affascinante e anche supportata da altre testimonianze. Come già descritto, infatti, la kinesina-13A è un motore che si lega ai Golgi e probabilmente li sposta lungo i microtubuli favorendo la corretta distribuzione dei Golgi e/o quella delle vescicole che da esso derivano (Wei et al., 2009). È interessante notare che la kinesina-13A interagisce anche con RIP3, che a sua volta coopera con proteine ROP, una classe di regolatori della crescita polarizzata dei tubetti pollinici (Mucha et al., 2010). Lo scenario descritto da questi risultati suggerisce che segnali esterni, attraverso il complesso ROP/RIP3, potrebbero influenzare l'attività della kinesina-13A, la quale spinge le membrane di Golgi contenenti Cesa verso siti specifici. Anche se il movimento dei compartimenti MASC è stato ipotizzato avvenire grazie all'attività di "treadmilling" dei microtubuli, alcuni membri della famiglia delle kinesine 13 e delle kinesine 8 possono depolimerizzare i microtubuli promuovendo il trasporto di componenti specifici (Grissom et

al., 2009); questo dato suggerisce che il traffico di CesA lungo i microtubuli possa richiedere anche l'attività destabilizzante delle kinesine. Le informazioni di direzionalità percepite dal sistema ROP sarebbero passate ai microtubuli dalla kinesina-13A in modo da regolare l'inserimento di CesA nella membrana plasmatica e la corretta sintesi di cellulosa. Prove di un ipotetico ruolo delle kinesine nell'organizzazione delle fibrille di cellulosa sono state ottenute constatando che la mutazione nel gene *FRA1* (che codifica per una proteina simile alla kinesina) causa alterazione nell'orientamento delle fibrille di cellulosa (Zhong et al., 2002). Poiché i Golgi non sono stati specificamente rintracciati all'apice del tubetto pollinico, è probabile che il trasporto finale di CesA avvenga attraverso le vescicole secretorie.

L'associazione tra i microtubuli e la callosio sintasi (CalS) nel tubetto pollinico è basata su un meccanismo diverso. Sebbene CalS sia probabilmente trasportata attraverso le vescicole secretorie verso l'apice del tubetto, i microtubuli non prenderebbero parte nella consegna delle vescicole contenenti CalS nella regione apicale (Cai et al., 2011). Al contrario, i microtubuli sono probabilmente critici nell'accumulare CalS nelle regioni distali del tubetto pollinico. In quelle regioni, CalS è necessaria per la sintesi dei tappi di callosio, strutture che separano il tubetto pollinico vivente dalla regione vacuolare. Analisi biochimiche mediante Blu-Native PAGE hanno dimostrato che CalS si lega alla tubulina, suggerendo che i microtubuli potrebbero interagire direttamente con CalS e non tramite vescicole membranose (Cai et al., 2011). Se così fosse, come riescono i microtubuli a controllare la distribuzione di CalS nella membrana plasmatica? Alcune informazioni provengono da studi recenti sulla distribuzione del callosio nelle pareti periclinali delle cellule di guardia della felce *Asplenium nidus*, dove il callosio si allinea con i sottostanti microtubuli corticali (Apostolakos et al., 2009). Poiché l'orizalina danneggia il pattern di deposizione del callosio, è probabile che l'orientamento del callosio nelle pareti periclinali sia controllato dai microtubuli. L'orizalina inibisce anche l'attività della callosio sintasi nelle cellule di *Arabidopsis* e di tabacco, suggerendo che microtubuli intatti siano necessari per la appropriata sintesi quantitativa del callosio (Aidemark et al., 2009). Queste poche testimonianze indicano che il modello di organizzazione dei microtubuli corticali è fondamentale per la corretta attività di CalS e suggerisce che i microtubuli potrebbero influenzare la deposizione corretta di callosio regolando l'attività enzimatica di CalS. L'associazione tra proteine motrici dei microtubuli e CalS non è chiara anche se il trasporto, mediato da kinesine, di vescicole contenenti CalS è stato ipotizzato durante la formazione della piastra cellulare (Julie Lee et al., 2001). Per quanto riguarda il tubetto pollinico, non abbiamo anco-

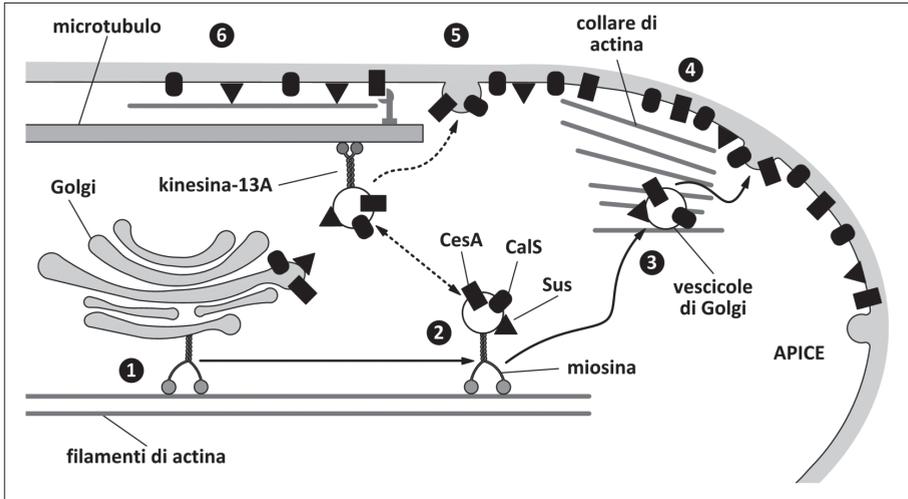


Fig. 1 *Modello ipotetico illustrante i rapporti tra trasporto di membrane, citoscheletro e inserzione degli enzimi sintetizzanti la parete cellulare del tubetto pollinico. Secondo lo schema, una volta sintetizzati, gli enzimi cellulosa sintasi (CesA) e callosio sintasi (CalS) sarebbero veicolati nei Golgi, i quali si muoverebbero attivamente lungo i filamenti di actina (1) grazie alle miosine. I Golgi produrrebbero vescicole secretorie che trasportano gli enzimi fino alla regione apicale grazie a un trasporto lungo i filamenti di actina mediato dalle miosine (2). Le vescicole sarebbero rilasciate nell'apice del tubetto dove interagirebbero con il collare di actina (3) che facilita la loro fusione (4). In alternativa, le vescicole potrebbero anche localmente associarsi con i microtubuli ed essere secrete dopo tale associazione (5). In tal caso, le kinesine-13A potrebbero favorire questo trasporto o ancoraggio locale. Una volta inserite nella membrana plasmatica, gli enzimi CalS e CesA inizierebbero a produrre rispettivamente callosio e cellulosa (6). Nel disegno è anche illustrato il probabile percorso seguito dalla saccarosio sintasi (Sus), l'enzima che fornisce metaboliti sia a CesA sia a CalS*

ra ottenuto prove per uno specifico accumulo di proteine simili alla kinesina nei pressi dei tappi di callosio. Uno schema plausibile delle interazioni tra citoscheletro e deposizione di callosio e cellulosa è illustrato in figura 1.

IL CITOSCHELETRO È BERSAGLIO DELL'ATTIVITÀ DELLE TRANSGLUTAMINASI

Il citoscheletro delle cellule eucariotiche è comunemente un bersaglio di vari enzimi che catalizzano modificazioni post-traduzionali allo scopo di regolare le varie attività del citoscheletro (Rosenbaum, 2000). Studi pionieristici dimostrarono che le transglutaminasi (TGasi), enzimi Ca^{2+} -dipendenti, sono capaci di catalizzare la coniugazione di poliammine con tubulina animale, generando prodotti con elevato peso molecolare (Maccioni e Arechaga, 1986).

Nelle piante, esistono pochi dati su questo argomento ma è stato comunque dimostrato che la tubulina del polline può essere modificata dalle poliammine dopo incubazione con estratto pollinico, suggerendo il verificarsi di un'attività TGasica (Del Duca et al., 1997). Altri risultati hanno documentato che la TGasi del polline può modificare il tasso di polimerizzazione della tubulina in presenza di poliammine (Del Duca et al., 2009). La tubulina trattata con TGasi assembla solo in piccola parte a costruire microtubuli e, contemporaneamente, si formano aggregati di alto peso molecolare. Inoltre, il tasso di depolimerizzazione dei microtubuli è ridotto, suggerendo che la coniugazione con poliammine possa generare microtubuli più stabili. Questi aggregati sono probabilmente dimeri o trimeri covalenti di tubulina prodotti dall'attività TGasica e, quando osservati in microscopia ottica, hanno l'aspetto di strutture amorfe con aspetto filamentoso (Del Duca et al., 2009). L'aggiunta di poliammine a più bassa concentrazione (più vicina a quella fisiologica presunta) genera strutture filamentose più simili ai microtubuli. Un'ipotesi ragionevole è che la TGasi del polline formi aggregati di monomeri che possono rallentare il tasso di polimerizzazione della tubulina. Anziché formare dei veri e propri microtubuli, gli aggregati potrebbero indurre la formazione di fasci di microtubuli, non necessariamente formati soltanto da aggregati covalenti di tubulina ma anche da tubulina monomericamente "intrappolata" negli aggregati stessi.

La TGasi ha anche effetto sulla dinamica dell'actina. Infatti, la TGasi del polline può coniugare poliammine ai filamenti di actina generando strutture con una dinamica alterata (Del Duca et al., 2009). L'azione della TGasi sui filamenti di actina non è nuova perché diversi dati in letteratura indicano che l'actina è un bersaglio dell'attività enzimatica della TGasi (Del Duca et al., 1997; Eli-Berchoer et al., 2000; Eligula et al., 1998). La funzione esatta di tale modifiche post-traduzionali non è nota ma possiamo ipotizzare che la TGasi regoli la dinamica dei filamenti di actina generando strutture meno dinamiche e quindi più resistenti. L'attività enzimatica della TGasi si esplica non solo a livello delle strutture filamentose del citoscheletro ma anche sui rispettivi motori. Anche se un'azione diretta della TGasi è stata ipotizzata sia per la miosina (Kakugo et al., 2005) sia per la kinesina (Esposito et al., 2001), un'azione inibitoria della TGasi può ottenersi anche dopo modificazioni dei rispettivi filamenti citoscheletrici, come dimostrato da test di legame, analisi di attività enzimatica e test di motilità *in vitro* usando TGasi pollinica purificata (Del Duca et al., 2009). Pertanto è evidente che la TGasi può esercitare un ruolo di regolatore dell'attività dinamica del citoscheletro modulando i fenomeni dinamici che dipendono dalle proteine motrici, quali il trasporto degli organelli. L'azione regolatoria esercitata dalla TGasi nei confronti del

citoscheletro apre la porta ad alcune interessanti ipotesi sul rapporto tra citoscheletro e risposta di auto-incompatibilità, come descritto qui di seguito.

INCOMPATIBILITÀ, TGASI, CITOSCHELETRO, PARETE

Come già accennato in precedenza, il tubetto pollinico cresce all'interno del pistillo, seguendo una serie di segnali che si trovano in posizioni diverse lungo l'itinerario di crescita (Higashiyama, 2010). Questi segnali guidano il processo di crescita per permettere al tubetto pollinico di trovare la strada per gli ovuli e di trasportare correttamente le cellule spermatiche. La maggior parte dei segnali sono specie-specifici e possono essere considerati come stimolatori di crescita. Segnali di tipo diverso sono utilizzati nella cosiddetta risposta di auto-incompatibilità (SI, *self-incompatibility*). Il meccanismo SI è un complesso sistema di eventi che si è evoluto per prevenire l'autofecondazione in alcune specie. Esistono tre diversi tipi di SI nelle piante. Nelle Brassicaceae, il sistema di auto-incompatibilità che impedisce l'autoimpollinazione è basato su determinanti S maschili associati alla parete cellulare che interagiscono con recettori tirosinici nello stigma (Luu et al., 1999). Il riconoscimento specifico tra determinanti S maschili e femminili avvia il processo di rigetto del polline. In *Papaver rhoeas* (il papavero di campo), la risposta SI necessita di un riconoscimento specifico tra proteine S stigmatiche e il polline, che si traduce nell'inibizione del polline incompatibile. La risposta SI in questa specie pollinica innesca cambiamenti drammatici nella morfologia degli organelli, suggerendo che un processo di "morte cellulare programmata" (PCD) faccia parte del meccanismo di rigetto (Geitmann et al., 2004). In papavero, la SI innesca una serie di segnali Ca^{2+} -dipendenti, che a loro volta promuovono l'inibizione della crescita apicale, depolimerizzano i filamenti di actina e inducono di conseguenza la PCD. Le dinamiche dei filamenti di actina sono una componente cruciale del controllo della PCD, come dimostrato da test di stabilizzazione e depolimerizzazione dei filamenti di actina (Thomas et al., 2006). I cambiamenti nella dinamica dei filamenti di actina innescano un'attività proteasica simile alle caspasi, che probabilmente induce la PCD. I microtubuli sono un secondo obiettivo della risposta SI perché la SI innesca una rapida depolimerizzazione dei microtubuli, mentre la PCD può essere ridotta stabilizzando i microtubuli con taxolo (Poulter et al., 2008). Di conseguenza, il citoscheletro dei tubetti pollinici fa parte del complesso meccanismo che regola l'avanzamento della PCD durante la risposta SI. Il meccanismo molecolare e le proteine coinvolte nel comunicare la PCD dai determinanti S

fino ai filamenti di actina e ai microtubuli sono sconosciuti, anche se recenti studi proteomici stanno iniziando a fare luce (Poulter et al., 2011). Nelle Solanacee, Rosaceae e Plantaginaceae, la risposta SI è invece basata su meccanismi mediati da S-RNasi attraverso i quali i pistilli riconoscono e rigettano il polline (Wang et al., 2003). Le S-RNasi probabilmente degradano l'RNA del polline incompatibile, impedendo così la fecondazione. È probabile che la degradazione dell'RNA non sia il solo meccanismo attraverso cui il polline è rigettato. Altri processi, comprese le modifiche alla concentrazione di Ca^{2+} , così come la modifica dei filamenti di actina, sono forse coinvolti (Liu et al., 2007). Pertanto, i meccanismi molecolari del rigetto del polline auto-incompatibile nelle Papaveraceae e Solanaceae/Rosaceae/Plantaginaceae potrebbero condividere alcune caratteristiche comuni.

Un interessante collegamento tra risposta SI e citoscheletro è anche suggerito dal possibile ruolo svolto dalla TGasi nel mediare questa interazione. Infatti, durante la risposta di auto-incompatibilità in pero sia i livelli di poliammine sia l'attività della TGasi aumentano (Del Duca et al., 2010), suggerendo che l'attività della TGasi sia innescata dalla presenza delle S-RNasi. L'osservazione di tubetti pollinici in pero ha mostrato che la TGasi è distribuita nella porzione attiva (in crescita) dei tubetti pollinici. Questo effetto potrebbe essere forse ottenuto mediante associazione della TGasi con determinate membrane intracellulari. Infatti, analisi mediante immunoelettromicroscopia hanno spesso mostrato un'associazione della TGasi con la membrana plasmatica dei tubetti pollinici, indicando che l'enzima potrebbe essere secreto o depositato in modo da interessare localmente la struttura della parete cellulare. L'associazione della TGasi con la membrana plasmatica e con la parete cellulare è stata confermata anche biochimicamente (manoscritto in preparazione). La distribuzione della TGasi nel tubetto pollinico di pero sembra essere piuttosto simile a quella trovata nei tubetti pollinici di melo (Di Sandro et al., 2010), nel quale la TGasi è probabilmente associata alla parete cellulare. In pero, quando la distribuzione della TGasi è stata analizzata durante l'impollinazione incompatibile, l'enzima si dispone come patch distribuite più o meno irregolarmente lungo il tubetto pollinico (Di Sandro et al., 2010), mostrando un livello di organizzazione che è apparentemente influenzato dalla risposta SI. Inoltre, dati attualmente in fase di verifica indicano che la dinamica delle membrane intracellulari è critica per la distribuzione della TGasi extracellulare. I risultati per adesso ottenuti suggeriscono che gli inibitori del citoscheletro (Latrunculina B per l'actina, orizalina/taxolo per la tubulina) influenzano sensibilmente la localizzazione della TGasi nei tubetti pollinici di pero, riducendo l'accumulo di TGasi nel dominio apicale. Con-

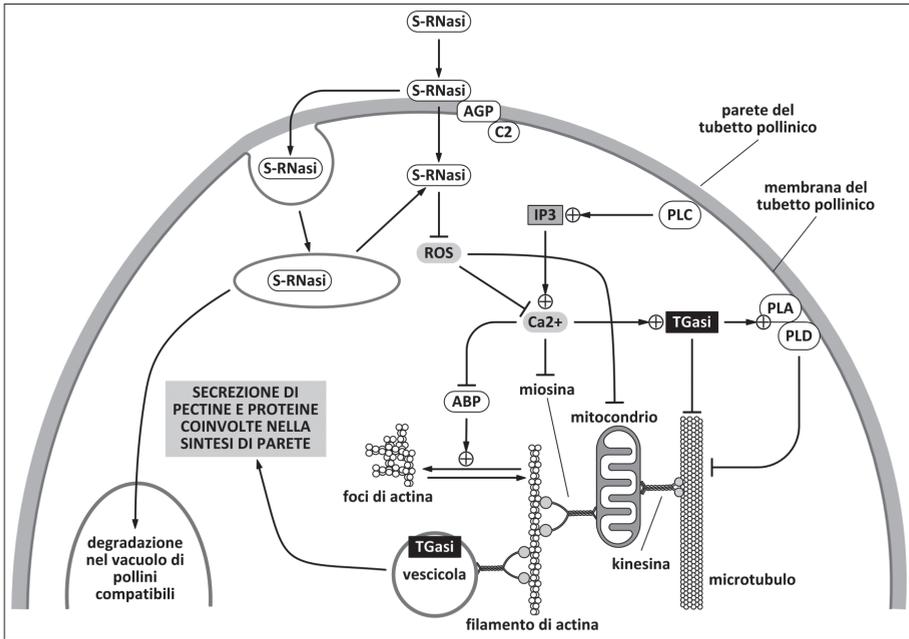


Fig. 2 Schema delle possibili relazioni tra risposta di auto-incompatibilità mediata da S-RNasi, attività delle transglutaminasi (TGasi) e citoscheletro. Nelle risposte di auto-incompatibilità mediate da S-RNasi, queste ultime sarebbero recepite dal tubetto pollinico e riconosciute tramite un legame specifico con arabinogalattano-proteine (AGP) e proteine con dominio C2. Una volta internalizzata (direttamente o indirettamente tramite endocitosi) le S-RNasi ridurrebbero i livelli di ROS (reactive oxygen species) che a loro volta influenzerebbero negativamente i livelli di ioni Ca. Questi ultimi potrebbero agire su diverse molecole. Gli ioni Ca possono influenzare proteine leganti l'actina (ABP, actin binding protein), le quali sarebbero responsabili della trasformazione dei filamenti di actina nei foci di actina. Gli ioni Ca possono anche regolare l'attività enzimatica della miosina e possono modulare l'attività della TGasi. Oltre ad agire direttamente sugli elementi citoscheletrici, la TGasi può regolare le attività delle fosfolipasi A e D (PLA e PLD), le quali sono note controllare la dinamica dei microtubuli. Un'altra classe di fosfolipasi (PLC) può intervenire nella regolazione dei livelli di ioni Ca. Complessivamente, l'effetto della risposta SI potrebbe anche consistere nell'alterazione della secrezione di materiale (pectine) e proteine utili alla costruzione della parete del tubetto pollinico (per chiarezza dell'immagine, non è mostrata l'attività diretta della TGasi sull'actina)

temporaneamente, l'applicazione di Brefeldina A (un inibitore della dinamica delle membrane) o di Latrunculina B determina l'accumulo di TGasi nelle membrane dei tubetti pollinici riducendone la presenza nella parete cellulare.

I dati raccolti nei nostri laboratori suggeriscono l'esistenza di una relazione tra risposta SI, attività della TGasi e dinamiche del citoscheletro/membrane dei tubetti pollinici di pero. Poiché sia l'attività TGasica sia il contenuto di

poliammine cambiano durante l'impollinazione incompatibile (Del Duca et al., 2010), è probabile che i determinanti S possano influire sull'attività della TGasi. L'aumento della concentrazione di Ca^{2+} intracellulare, così come osservato durante la risposta SI in pero (Wang et al., 2010a) potrebbe essere legata all'attività TGasica nei tubetti pollinici. Una volta attivata, la TGasi potrebbe disorganizzare i filamenti di actina e i microtubuli tramite modificazioni post-traduzionali, così come fa *in vitro* (Del Duca et al., 2009), conducendo agli effetti osservati in pero (Liu et al., 2007). La riorganizzazione anormale dei filamenti di actina indotta dalla TGasi potrebbe generare anche i cosiddetti "foci di actina" (Poulter et al., 2011), strutture atipiche indotte dalla risposta SI e a cui proteine specifiche dei filamenti di actina prendono parte. La disorganizzazione dei filamenti di actina ovviamente modifica il tasso di crescita dei tubetti pollinici; inoltre, disturbi del traffico vescicolare possono essere responsabili dei cambiamenti nella deposizione/secrezione di TGasi extracellulare. Anche se i dati attuali non ci permettono di discriminare tra modifiche del processo esocitotico o endocitotico, è plausibile supporre che la risposta SI potrebbe impedire la rimozione della TGasi extracellulare o consentire un'eccessiva secrezione di TGasi. Dal momento che livelli precisi di TGasi nella parete cellulare sono necessari per la corretta crescita dei tubetti pollinici (Di Sandro et al., 2010), le modifiche a tali livelli rischierebbero di compromettere il processo di crescita portando così alla PCD. Il percorso ipotetico che collegherebbe la risposta SI all'attività TGasica è schematizzato in figura 2. In sintesi, i dati attuali suggeriscono che la risposta SI possa essere mediata da un cambiamento nella regolazione dell'attività TGasica, che a sua volta può influenzare l'organizzazione e la funzione del citoscheletro e di conseguenza la deposizione della TGasi nella parete cellulare, eleggendo questo enzima a un ruolo chiave durante la risposta SI.

RIASSUNTO

Il tubetto pollinico è una cellula a crescita apicale fondamentale nella riproduzione delle piante superiori ed è caratterizzata da un intenso traffico di organelli e vescicole, a sua volta dipendente da un esteso apparato citoscheletrico formato da filamenti di actina e microtubuli. Mentre il ruolo dei filamenti di actina è abbastanza noto, la funzione specifica dei microtubuli è incerta, anche se i microtubuli potrebbero essere coinvolti nella localizzazione dei mitocondri e nel posizionamento degli apparati di Golgi. Attraverso il controllo della posizione dei Golgi, i microtubuli trasporterebbero anche gli enzimi per la sintesi di callosio e cellulosa, indispensabili per la costruzione finale della parete cellulare. Essendo una struttura così importante, il citoscheletro è oggetto di diversi meccanismi di regolazione, tra cui quello collegato all'attività delle transglutaminasi. Questi enzimi sono

importanti per vari processi cellulari, tra cui quello legato alla risposta di auto-incompatibilità. Questo legame mette in relazione la funzione del citoscheletro e la struttura della parete cellulare con i meccanismi molecolari coinvolti nel rigetto del polline self.

ABSTRACT

The pollen tube is a tip growing cell that is crucial for reproduction of higher plants and is characterized by an intense traffic of vesicles and organelles, which in turn depends on an extended cytoskeletal apparatus consisting of actin filaments and microtubules. While the role of actin filaments is relatively known, the specific function of microtubules is uncertain, although microtubules might be involved in the localization of mitochondria and in the positioning of Golgi apparatus. By controlling the position of Golgi, microtubules might also transport the enzymes for the synthesis of callose and cellulose, which are essential for the construction of the cell wall. Being an important structure, the cytoskeleton is subject to different regulatory mechanisms, including the one related to transglutaminase activity. These enzymes are important for several cellular processes, including the response to auto-incompatibility. This association puts in relation the function of cytoskeleton and cell wall structure with the molecular mechanisms involved in the rejection of self-pollen.

BIBLIOGRAFIA

- AIDEMARK M., ANDERSSON C.J., RASMUSSEN A.G., WIDELL S. (2009): *Regulation of callose synthase activity in situ in alamethicin-permeabilized Arabidopsis and tobacco suspension cells*, «BMC Plant Biology», 9, pp. 27.
- AOUAR L., CHEBLI Y., GEITMANN A. (2010): *Morphogenesis of complex plant cell shapes: the mechanical role of crystalline cellulose in growing pollen tubes*, «Sexual Plant Reproduction», 23, pp. 15-27.
- APOSTOLAKOS P., LIVANOS P., GALATIS B. (2009): *Microtubule involvement in the deposition of radial fibrillar callose arrays in stomata of the fern Asplenium nidus L.*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 66, pp. 342-349.
- BOVE J., VAILLANCOURT B., KROEGER J., HEPLER P.K., WISEMAN P.W., GEITMANN A. (2008): *Magnitude and direction of vesicle dynamics in growing pollen tubes using spatiotemporal image correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching*, «Plant Physiology», 147, pp. 1646-1658.
- BROWN R.C., LEMMON B.E. (2001): *The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle*, «Protoplasma», 215, pp. 35-49.
- CAI G., FALERI C., DEL CASINO C., EMONS A.M.C., CRESTI M. (2011): *Distribution of callose synthase, cellulose synthase and sucrose synthase in tobacco pollen tube is controlled in dissimilar ways by actin filaments and microtubules*, «Plant Physiology», 155, pp. 1169-1190.
- CAI G., ROMAGNOLI S., MOSCATELLI A., OVIDI E., GAMBELLINI G., TIEZZI A., CRESTI M. (2000): *Identification and characterization of a novel microtubule-based motor associated with membranous organelles in tobacco pollen tubes*, «The Plant Cell», 12, pp. 1719-1736.

- CAI G., CRESTI M. (2009): *Organelle motility in the pollen tube: a tale of 20 years*, «Journal of Experimental Botany», 60, pp. 495-508.
- CAI G., CRESTI M. (2010): *Microtubule motors and pollen tube growth - still an open question*, «Protoplasma», 247, pp. 131-143.
- CARDENAS L., LOVY-WHEELER A., WILSEN K.L., HEPLER P.K. (2005): *Actin polymerization promotes the reversal of streaming in the apex of pollen tubes*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 61, pp. 112-127.
- CHEUNG A.Y., CHEN C.Y., GLAVEN R.H., DE GRAAF B.H.J., VIDALI L., HEPLER P.K., WU H.M. (2002): *Rab2 GTPase regulates vesicle trafficking between the endoplasmic reticulum and the Golgi bodies and is important to pollen tube growth*, «The Plant Cell», 14, pp. 945-962.
- CHEUNG A.Y., DUAN Q.h., COSTA S.S., DE GRAAF B.H.J., DI STILIO V.S., FEIJO J., WU H.m. (2008): *The dynamic pollen tube cytoskeleton: live cell studies using actin-binding and microtubule-binding reporter proteins*, «Molecular Plant», 1, pp. 686-702.
- CHEUNG A.Y., WU H.M. (2008): *Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes*, «Annual Review of Plant Biology», 59, pp. 547-572.
- CROWELL E.F., GONNEAU M., STIERHOF Y.D., HÖFTE H., VERNHETTES S. (2010): *Regulated trafficking of cellulose synthases*, «Current Opinion in Plant Biology», 13, pp. 700-705.
- CROWELL E.F., BISCHOFF V., DESPREZ T., ROLLAND A., STIERHOF Y.D., SCHUMACHER K., GONNEAU M., HOFTE H., VERNHETTES S. (2009): *Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in Arabidopsis*, «The Plant Cell», 21, pp. 1141-1154.
- DEL CASINO C., LI Y., MOSCATELLI A., SCALI M., TIEZZI A., CRESTI M. (1993): *Distribution of microtubules during the growth of tobacco pollen tubes*, «Biology of the Cell», 79, pp. 125-132.
- DEL DUCA S., BREGOLI A.M., BERGAMINI C., SERAFINI-FRACASSINI D. (1997): *Transglutaminase-catalyzed modification of cytoskeletal proteins by polyamines during the germination of Malus domestica pollen*, «Sexual Plant Reproduction», 10, pp. 89-95.
- DEL DUCA S., CAI G., DI SANDRO A., SERAFINI-FRACASSINI D. (2010): *Compatible and self-incompatible pollination in Pyrus communis displays different polyamine levels and transglutaminase activity*, «Amino Acids», 38, pp. 659-667.
- DEL DUCA S., SERAFINI-FRACASSINI D., BONNER P.L., CRESTI M., CAI G. (2009): *Effects of post-translational modifications catalyzed by pollen transglutaminase on the functional properties of microtubules and actin filaments*, «Biochemical Journal», 418, pp. 651-664.
- DI SANDRO A., DEL DUCA S., VERDERIO E., HARGREAVES A.J., SCARPELLINI A., CAI G., CRESTI M., FALERI C., IORIO R.A., SHIGEHISA H., FURUTANI Y., COUTTS I.G.C., GRIFFIN M., BONNER P.L., SERAFINI-FRACASSINI D. (2010): *An extracellular transglutaminase is required for apple pollen tube growth*, «Biochemical Journal», 429, pp. 261-271.
- ELI-BERCHOER L., HEGYI G., PATTY A., REISLER E., MUHLRAD A. (2000): *Effect of intramolecular cross-linking between glutamine-41 and lysine-50 on actin structure and function*, «Journal of Muscle Research and Cell Motility», 21, pp. 405-414.
- ELIGULA L., CHUANG L., PHILLIPS M.L., MOTOKI M., SEGURO K., MUHLRAD A. (1998): *Transglutaminase-induced cross-linking between subdomain 2 of G-actin and the 636-642 lysine-rich loop of myosin subfragment 1*, «Biophysical Journal», 74, pp. 953-963.
- ESPOSITO C., MARINIELLO L., COZZOLINO A., AMORESANO A., ORRU S., PORTA R. (2001): *Rat coagulating gland secretion contains a kinesin heavy chain-like protein acting as a type IV transglutaminase substrate*, «Biochemistry», 40, pp. 4966-4971.

- FERGUSON C., TEERI T.T., SIIKA-AHO M., READ S.M., BACIC A. (1998): *Location of cellulose and callose in pollen tubes and grains of Nicotiana tabacum*, «Planta», 206, pp. 452-460.
- FOISSNER I., GROLIG F., OBERMEYER G. (2002): *Reversible protein phosphorylation regulates the dynamic organization of the pollen tube cytoskeleton: effects of calyculin A and okadaic acid*, «Protoplasma», 220, pp. 1-15.
- GEITMANN A., FRANKLIN-TONG V.E., EMONS A.C. (2004): *The self-incompatibility response in Papaver rhoeas pollen causes early and striking alterations to organelles*, «Cell Death and Differentiation», 11, pp. 812-822.
- GOSSOT O., GEITMANN A. (2007): *Pollen tube growth: coping with mechanical obstacles involves the cytoskeleton*, «Planta», 226, pp. 405-416.
- GOUBET F., MISRAHI A., PARK S.K., ZHANG Z., TWELL D., DUPREE P. (2003): *AtCSLA7, a cellulose synthase-like putative glycosyltransferase, is important for pollen tube growth and embryogenesis in Arabidopsis*, «Plant Physiology», 131, pp. 547-557.
- GRISSOM P.M., FIEDLER T., GRISHCHUK E.L., NICASTRO D., WEST R.R., RICHARD MCINTOSH J. (2009): *Kinesin-8 from fission yeast: a heterodimeric, plus-end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo movement*, «Molecular Biology of the Cell», 20, pp. 963-972.
- HIGASHIYAMA T. (2010): *Peptide signaling in pollen-pistil interactions*, «Plant and Cell Physiology», 51, pp. 177-189.
- JOOS U., VAN AKEN J., KRISTEN U. (1995): *The anti-microtubule drug carbetamide stops Nicotiana sylvestris pollen tube growth in the style*, «Protoplasma», 187, pp. 182-191.
- JULIE LEE Y.R., GIANG H.M., LIU B. (2001): *A novel plant kinesin-related protein specifically associates with the phragmoplast organelles*, «The Plant Cell», 13, pp. 2427-2439.
- KAKUGO A., SUGIMOTO S., SHIKINAKA K., GONG J.P., OSADA Y. (2005): *Characteristics of chemically cross-linked myosin gels*, «Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition», 16, pp. 203-218.
- KETELAAR T., GALWAY M.E., MULDER B.M., EMONS A.M.C. (2008): *Rates of exocytosis and endocytosis in Arabidopsis root hairs and pollen tubes*, «Journal of Microscopy», 231, pp. 265-273.
- LANCELLE S.A., CRESTI M., HEPLER P.K. (1987): *Ultrastructure of cytoskeleton in freeze-substituted pollen tubes of Nicotiana tabacum*, «Protoplasma», 140, pp. 141-150.
- LEE Y.R.J., LI Y., LIU B. (2007): *Two Arabidopsis phragmoplast-associated kinesins play a critical role in cytokinesis during male gametogenesis*, «The Plant Cell», 19, pp. 2595-2605.
- LI Y., YAN L. (2000): *Golgi 58K-like protein in pollens and pollen tubes of Lilium davidii*, «Science in China Series C: Life Sciences», 43, pp. 402-408.
- LIU G.Q., CAI G., DEL CASINO C., TIEZZI A., CRESTI M. (1994): *Kinesin-related polypeptide is associated with vesicles from Corylus avellana pollen*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 29, pp. 155-166.
- LIU Z.q., XU G.h., ZHANG S.I. (2007): *Pyrus pyrifolia stylar S-RNase induces alterations in the actin cytoskeleton in self-pollen and tubes in vitro*, «Protoplasma», 232, pp. 61-67.
- LOVY-WHEELER A., CARDENAS L., KUNKEL J.G., HEPLER P.K. (2007): *Differential organelle movement on the actin cytoskeleton in lily pollen tubes*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 64, pp. 217-232.
- LOVY-WHEELER A., WILSEN K.L., BASKIN T.I., HEPLER P.K. (2005): *Enhanced fixation reveals the apical cortical fringe of actin filaments as a consistent feature of the pollen tube*, «Planta», 221, pp. 95-104.

- LU L., LEE Y.R.J., PAN R., MALOOF J.N., LIU B. (2005): *An internal motor kinesin is associated with the Golgi apparatus and plays a role in trichome morphogenesis in Arabidopsis*, «Molecular Biology of the Cell», 16, pp. 811-823.
- LUU D.T., MARTY-MAZARS D., TRICK M., DUMAS C., HEIZMANN P. (1999): *Pollen-stigma adhesion in Brassica spp involves SLG and SLR1 glycoproteins*, «The Plant Cell», 11, pp. 251-262.
- MACCIONI R.B., ARECHAGA J. (1986): *Transglutaminase (TG) involvement in early embryogenesis*, «Experimental Cell Research», 167, pp. 266-270.
- MOSCATELLI A., CIAMPOLINI F., RODIGHIERO S., ONELLI E., CRESTI M., SANTO N., IDILLI A. (2007): *Distinct endocytic pathways identified in tobacco pollen tubes using charged nanogold*, «Journal of Cell Science», 120, pp. 3804-3819.
- MUCHA E., HOEFLE C., HÜCKELHOVEN R., BERKEN A. (2010): *RIP3 and AtKinesin-13A - A novel interaction linking Rho proteins of plants to microtubules*, «European Journal of Cell Biology», 89, pp. 906-916.
- NEBENFÜHR A., GALLAGHER L.A., DUNAHAY T.G., FROHLICK J.A., MAZURKIEWICZ A.M., MEEHL J.B., STAEHELIN L.A. (1999): *Stop-and-go movements of plant golgi stacks are mediated by the acto-myosin system*, «Plant Physiology», 121, pp. 1127-1142.
- NI C.Z., WANG H.Q., XU T., QU Z., LIU G.Q. (2005): *AtKPI1, a kinesin-like protein, mainly localizes to mitochondria in Arabidopsis thaliana*, «Cell Research», 15, pp. 725-733.
- PARTON R.M., FISCHER-PARTON S., WATAHIKI M.K., TREWAVAS A.J. (2001): *Dynamics of the apical vesicle accumulation and the rate of growth are related in individual pollen tubes*, «Journal of Cell Science», 114, pp. 2685-2695.
- PATHAK D., SEPP K.J., HOLLENBECK P.J. (2010): *Evidence that myosin activity opposes microtubule-based axonal transport of mitochondria*, «Journal of Neuroscience», 30, pp. 8984-8992.
- POULTER N.S., BOSCH M., FRANKLIN-TONG V. (2011): *Proteins implicated in mediating self-incompatibility-induced alterations to the actin cytoskeleton of Papaver pollen*, «Annals of Botany», 108, pp. 659-675.
- POULTER N.S., VÁTOVEC S., FRANKLIN-TONG V.E. (2008): *Microtubules are a target for self-incompatibility signaling in Papaver pollen*, «Plant Physiology», 146, pp. 1358-1367.
- ROMAGNOLI S., CAI G., FALERI C., YOKOTA E., SHIMMEN T., CRESTI M. (2007): *Microtubule- and actin filament-dependent motors are distributed on pollen tube mitochondria and contribute differently to their movement*, «Plant Cell Physiology», 48, pp. 345-361.
- ROSENBAUM J. (2000): *Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last*, «Current Biology», 10, pp. R801-R803.
- SEOG D.H., LEE D.H., LEE S.K. (2004): *Molecular motor proteins of the kinesin superfamily proteins (KIFs): structure, cargo and disease*, «Journal of Korean Medical Science», 19, pp. 1-7.
- SZYMANSKI D.B. (2009): *Plant cells taking shape: new insights into cytoplasmic control*, «Current Opinion in Plant Biology», 12, pp. 735-744.
- THOMAS S.G., HUANG S., LI S., STAIGER C.J., FRANKLIN-TONG V.E. (2006): *Actin depolymerization is sufficient to induce programmed cell death in self-incompatible pollen*, «Journal of Cell Biology», 174, pp. 221-229.
- TIEZZI A., MOSCATELLI A., CAI G., BARTALESI A., CRESTI M. (1992): *An immunoreactive homolog of mammalian kinesin in Nicotiana tabacum pollen tubes*, «Cell Motility and the Cytoskeleton», 21, pp. 132-137.
- VAN GESTEL K., KOHLER R.H., VERBELEN J.P. (2002): *Plant mitochondria move on F-actin, but their positioning in the cortical cytoplasm depends on both F-actin and microtubules*, «Journal of Experimental Botany», 53, pp. 659-667.

- WANG C.L., WU J., XU G.H., GAO Y., CHEN G., WU J.Y., WU H., ZHANG S.L. (2010a): *S-RNase disrupts tip-localized reactive oxygen species and induces nuclear DNA degradation in incompatible pollen tubes of *Pyrus pyrifolia**, «Journal of Cell Science», 123, pp. 4301-4309.
- WANG H., TSE Y.C., LAW A.H., SUN S.S., SUN Y.B., XU Z.F., HILLMER S., ROBINSON D.G., JIANG L. (2010b): *Vacuolar sorting receptors (VSRs) and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) are essential for pollen tube growth*, «Plant Journal», 61, pp. 826-838.
- WANG W., WANG L., CHEN C., XIONG G., TAN X.Y., YANG K.Z., WANG Z.C., ZHOU Y., YE D., CHEN L.Q. (2011): *Arabidopsis CSLD1 and CSLD4 are required for cellulose deposition and normal growth of pollen tubes*, «Journal of Experimental Botany», 62, pp. 5161-5177.
- WANG Y., WANG X., SKIRPAN A.L., KAO T.h. (2003): *S-RNase-mediated self-incompatibility*, «Journal of Experimental Botany», 54, pp. 115-122.
- WEI L., LIU B., LI Y. (2005): *Distribution of a kinesin-related protein on Golgi apparatus of tobacco pollen tubes*, «Chinese Science Bulletin», 50, pp. 2175-2181.
- WEI L., ZHANG W., LIU Z., LI Y. (2009): *AtKinesin-13A is located on Golgi-associated vesicle and involved in vesicle formation/budding in Arabidopsis root-cap peripheral cells*, «BMC Plant Biology», 9, pp. 138-
- WINSHIP L.J., OBERMEYER G., GEITMANN A., HEPLER P.K. (2010): *Under pressure, cell walls set the pace*, «Trends in Plant Science», 15, pp. 363-369.
- YOKOTA E., McDONALD A.R., LIU B., SHIMMEN T., PALEVITZ B.A. (1995): *Localization of a 170 kDa myosin heavy chain in plant cells*, «Protoplasma», 185, pp. 178-187.
- ZHONG R., BURK D.H., MORRISON W.H., III, YE Z.H. (2002): *A kinesin-Like protein is essential for oriented deposition of cellulose microfibrils and cell wall strength*, «The Plant Cell», 14, pp. 3101-3117.

