

Received: 2016.06.08
Accepted: 2017.03.07
Published: 2017.06.19

Białka zapasowe roślin – główny surowiec odżywczy – droga od biosyntezy do wewnątrzkomórkowych struktur spichrzowych

Plant storage proteins – the main nourishing products – from biosynthesis to cellular storage depots

Agnieszka Chmielnicka, Aneta Żabka, Konrad Winnicki, Justyna Teresa Polit

Katedra Cytofizjologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

Białka zapasowe roślin strączkowych są jednym z głównych składników diety człowieka i zwierząt. Zgromadzone w ich nasionach składniki mają przy tym walory prozdrowotne, wspomagające zapobieganie wielu chorobom cywilizacyjnym. Jednak nadal istnieje wiele niejasności na temat mechanizmów wytwarzania pełnowartościowych nasion. Trudno też wskazać, który ze składników nasion i w jakiej ostatecznej postaci jest odpowiedzialny za zaobserwowane działania ochronne *in vivo*. W artykule, na tle różnych rodzajów białek zapasowych, przedstawiono te, odkładane głównie u strączkowych. Scharakteryzowano je na przykładzie białek grochu (*Pisum sativum*); przedstawiono mechanizmy towarzyszące ich biosyntezie oraz transportowi do poszczególnych przedziałów komórkowych. Omówiono sposoby ich potranslacyjnego przetwarzania, proces segregacji i składowania w przeznaczonych do tego celu wakuolach. Zebrano dotychczasową wiedzę na temat procesu, w wyniku którego zgromadzone w nasionach depozyty białkowe stają się gotowe do wykorzystania.

Słowa kluczowe:

strączkowe • leguminy • wiciliny • konwiciliny • ciała białkowe • wakuole lityczne • wakuole magazynujące białka • transport pęcherzykowy

Summary

Storage proteins of legumes are one of the main components of the human and animal diet. The substances collected in their seeds have the pro-health values, supporting the prevention of many civilization diseases. However, there are still many uncertainties about the mechanisms leading to the production of nutritious seeds. It is also difficult to identify which of their constituents and in what final form are responsible for the observed protective effects *in vivo*. In this work, on the background of different types of storage proteins, these deposited mainly in legumes were in the focus of interest. They were characterized on the example of pea (*Pisum sativum*) proteins. Mechanisms associated with their biosynthesis and transport to specific cellular compartments was presented. Ways of their post-translational processing, segregation and storage in the specific vacuoles were also discussed. Therefore, the paper presents the state-of-the-art knowledge concerning the processes making the accumulated protein deposits ready to use by plants, animals and humans.

Keywords:

legumes • legumin • vicilin • convicilin • protein bodies • lytic vacuole • protein storage vacuole • vesicular transport

Full-text PDF:	http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1240660
DOI:	10.5604/01.3001.0010.3834
Word count:	6396
Tables:	–
Figures:	3
References:	64

Adres autorki: dr hab. Justyna Teresa Polit, prof. nadzw. UŁ, Katedra Cytofizjologii, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Łódzki, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: justyna.polit@biol.uni.lodz.pl

WSTĘP

W prawidłowo funkcjonujących organizmach żywych, komórkowy poziom każdego białka utrzymywany jest w stanie równowagi dynamicznej, będącej wypadkową procesów ich biosyntezy i rozpadu. Ciągłe przemiany białek, odbywające się podczas życia każdego organizmu, pozwalają na utrzymanie w komórkach kompletnego zestawu enzymów, białek strukturalnych i regulatorowych, a także na formowanie niezbędnych do realizacji programów rozwojowych nowych białek, w odpowiedzi na sygnały środowiska, zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowego. Każde białko stanowi pewnego rodzaju rezerwę aminokwasów, która po jego degradacji, może zostać w pełni lub częściowo wykorzystana do biosyntezy nowych białek. Jednak w czasie ontogenezy roślin, dostępność wolnych aminokwasów często nie pokrywa się czasowo i przestrzennie z zapotrzebowaniem na te substraty. W trakcie ewolucji pojawiły się więc swoiste białka zapasowe, przystosowane do długoterminowego przechowywania aminokwasów w nasionach [38].

Rośliny odkładają białka w zarodku i komórkach wegetatywnych, aby zapewnić rezerwy węgla, azotu i siarki, potrzebne do późniejszego wzrostu i rozwoju [24]. Formowanie i akumulacja białek zapasowych pozwala na wykorzystywanie wcześniej zgromadzonych rezerw w odpowiednim dla rośliny czasie [38]. Białka zapasowe mają wysoki stosunek N/C, co wynika ze znacznego udziału amidów i argininy w ich składzie aminokwasowym i ma związek z funkcją magazynowania azotu. Polimeryzacja podczas biosyntezy pozwala składować aminokwasy w stanie osmotycznie nieaktywnym. W czasie formowania, białka zapasowe są chronione przed przedwczesną degradacją przez kilka mechanizmów. Głównym mechanizmem jest oddzielenie ich od cytoplazmy w wyspecjalizowanych, otoczonych błoną organelach, nazywanych ciałami białkowymi [38].

BIAŁKA ZAPASOWE

Zmagazynowane w nasionach białka zapasowe, ze względu na dużą wartość odżywczą, stały się zarówno istotnym składnikiem diety człowieka, jak i ważnym składnikiem pasz zwierzęcych, mających wpływ na jakość uzyskiwanych produktów mięsnych. Spożywane alternatywnie do białek pochodzenia zwierzęcego są

nie tylko źródłem związków strukturalnych czy energetycznych, ale również mogą pełnić rolę bioaktywną, będąc prekursorami biologicznie aktywnych peptydów, mających różnorodne fizjologiczne funkcje [50,53]. Najbogatszym źródłem białek roślinnych są nasiona roślin strączkowych np.: soi, fasoli, grochu, łubinu, soczewicy itp. Zainteresowanie roślinami strączkowymi stale rośnie, zarówno ze względu na wzrost liczby ludności na świecie, jak i wzrost cen rynkowych surowców sojowych, w całości importowanych z rynków pozaeuropejskich oraz konieczność stosowania w rolnictwie ekologicznym organizmów wolnych od modyfikacji genetycznych [10,53]. Powszechnie uznaje się, że rośliny strączkowe przyczyniają się skutecznie zarówno do zrównoważenia diety, jak i działają prozdrowotnie, zapobiegając chorobom sercowo-naczyniowym czy cukrzycy typu 2. Zwracają również uwagę właściwości antynowotworowe, hipocholesterolemiczne i hipotensyjne białek pochodzących z roślin strączkowych. Przypisuje się im również udział w kontroli homeostazy lipidów i glukozy oraz w zapobieganiu otyłości [7,10,30,53]. Jednak nadal nie jest wyjaśnione, które składniki nasion są odpowiedzialne za zaobserwowane działanie ochronne *in vivo*, dlatego niezmiernie ważna jest ich szczegółowa analiza.

Białka w nasionach roślin strączkowych stanowią od około 200 g/kg suchej masy u grochu i fasoli do 380-400 g/kg u soi i łubinu. Białka zapasowe, ze względu na różnice w rozpuszczalności, podzielono na 4 kategorie: albuminy – rozpuszczalne w wodzie i buforach wodnych o neutralnym pH, globuliny – rozpuszczalne w roztworach soli, prolamininy – rozpuszczalne w alkoholach oraz gluteliny – rozpuszczalne w roztworach kwaśnych lub zasadowych [43,53].

Albuminy są akumulowane w wielu nasionach, szczególnie oleistych, często oprócz innych białek zapasowych np. u słonecznika *Helianthus annuus* (SFAs, Sun Flower Albumins), a napiny u rzepaku *Brassica napus*. Dobrze poznano również albuminy występujące u *Bertholletia exelsa* (białko Ber e1), u *Ricinus communis* (białka RicC1 i RicC3) oraz u soi *Glycine max* (białka AL1 i AL3) i grochu *Pisum sativum* (białka PA2). Albuminopodobne białka zapasowe odkładają również paprocie, np. matteucina w zarodnikach *Matteucia struthiopteris* [8,51,53].

Najbardziej rozpowszechnione w roślinach są globuliny, np. wicilina, konwicilina i legumina u *Vicia faba* i *Pisum*

sativum, konglicynina i glicynina u *Glycine max*, faseolina u *Phaseolus vulgaris*, krucyferyna u *Brassica napus*, alfina i medykalina u *Medicago sativa*, kanawalina i konkanawalina A u *Cannavalia* sp. oraz heliantynina u *Helianthus annuus* [51].

Prolaminy są charakterystyczne dla roślin jednoliściennych. Typową cechą prolamin jest duża zawartość proliny i glutaminy (30-70%). Są jednak znaczne różnice w strukturze pierwszorzędowej prolamin występujących u *Triticeae* (pszenica, jęczmień i żyto) oraz u *Panicoideae* (kukurydza, sorgo i proso). W obu grupach występują prolaminy bogate w siarkę i prolaminy ubogie w siarkę. Do najlepiej poznanych prolamin należą: α -, β -, γ - i δ -zeiny u *Zea mays*, β -, γ -hordeiny u *Hordeum* sp. i α -, γ -gliadyny u *Triticum* sp. [24].

Gluteliny, razem z prolaminami, są główną grupą białek zapasowych w bielmie roślin jednoliściennych. Do najbardziej poznanych należą m.in.: hordenina u *Hordeum vulgare*, glutenina u *Triticum aestivum* czy oryzeina u *Oryza sativa* [51].

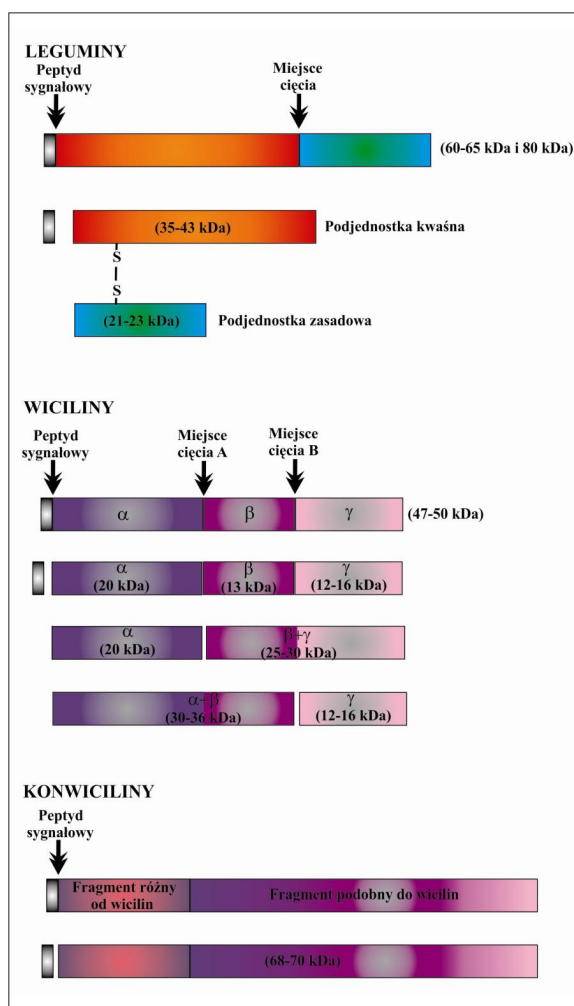
GLOBULINY STRĄCZKOWYCH NA PRZYKŁADZIE *PISUM SATIVUM*

Białka magazynowane w liścieniach grochu (*Pisum sativum*) charakteryzują się dużą zawartością izoleucyny, leucyny, fenyloalaniny i lizyny, której niewielkie ilości znajdują się w innych białkach pochodzenia roślinnego, występujących np. w zbożach [32,53]. Białka zapasowe u *Pisum sativum* należą głównie do globulin i dzielą się na dwie grupy różniące się stałą sedimentacji: 11S leguminy oraz 7S wiciliny i konwiciliny (ryc. 1). Są syntetyzowane jako propolipeptydy o różnych masach cząsteczkowych. Ich proteolityczna obróbka następuje w wakuolach magazynujących białka – PSV (protein storage vacuole) [27,58]. Proporcje legumin i wicilin są determinowane genetycznie i środowiskowo [6,35]. U grochu, stosunek 7S/11S globulin mieści się w zakresie 1,2-8,0, w zależności od odmiany, a nasiona mogą zawierać średnio 14-31% białek [19].

Wszystkie leguminy składają się z dwóch polipeptydów o różnych rozmiarach nazywanych łańcuchami α (około 40 kDa) i β (około 22 kDa), połączonych mostkiem dwusiarczkowym (ryc. 1). Obydwa polipeptydy są kodowane przez wspólne mRNA. Powstały w wyniku translacji wspólny prepolipeptyd jest następnie transformowany w ER do odpowiednich propolipeptydów. Propolipeptydy są cięte na dojrzałe łańcuchy α i β przez limitowaną proteolizę w PSV [58].

Wiciliny i konwiciliny składają się z pojedynczych łańcuchów [38]. Wiciliny stanowią około 35% całkowitej zawartości białek w dojrzałych nasionach *Pisum sativum*. Globuliny te są trimerami o masie 150-170 kDa, składającymi się z trzech podjednostek o masach około 50 kDa (ryc. 1) [16,41,45,58]. Wiciliny są heterogeniczne, ponieważ każda z trzech podjednostek może wykazywać wysoki stopień polimorfizmu u poszczególnych gatun-

ków. Heterogeniczność wywodzi się z kombinacji wielu czynników. Jest wynikiem m.in. ekspresji kilku niewielkich wielogenowych rodzin, których indywidualne geny są blisko spokrewnione i kodują różne sekwencje pierwotne. Innymi czynnikami są modyfikacje posttranskrypcyjne, proteolityczne procesy różnicujące i glikozylacja [16,41]. Niektóre podjednostki wicilin są cięte wskutek potranslacyjnej proteolizy zaraz po biosyntezie, dając w rezultacie peptydy o masach cząsteczkowych 12,5-33 kDa [20,21,45]. Wielkość powstałych fragmentów zależy od tego, czy podjednostka wiciliny rozszczepiana była w jednym, czy w dwóch miejscach potencjalnej obróbki: w miejscu α : β i/lub miejscu β : γ



Ryc. 1. Przetwarzanie globulin u grochu (wg [58], zmodyfikowano). Wszystkie globuliny mają peptyd sygnałowy kierujący do wnętrza ER, który jest usuwany współtranslacyjnie podczas wchodzenia białka do światła ER. Leguminy cięte są przez enzymy wakuolarne na dwie podjednostki (kwasową i zasadową), które zostają następnie połączone mostkiem dwusiarczkowym. Wiciliny mają dwa miejsca potencjalnego cięcia (A i B) w zależności od izoformy. Rozszczepienie w obu miejscach daje fragmenty α , β , γ , rozszczepienie w miejscu A daje fragmenty α i $\beta+\gamma$, natomiast rozszczepienie w miejscu B daje fragmenty $\alpha+\beta$ i γ . Nie wykazano czy konwiciliny przechodzą jakieś modyfikacje post- lub współtranslacyjne, inne niż usunięcie peptydu sygnałowego

(ryc. 1). W wyniku rozszczepienia powstają odpowiednio polipeptydy o masach: 33 kDa ($\alpha\beta$), 30 kDa ($\beta\gamma$), 19 kDa (α), 13,5 kDa (β) i 16 lub 12,5 kDa (γ) [41]. Powstałe polipeptydy pozostają związane z niezmienionymi podjednostkami w natywnym oligomerze 150 kDa [5,45].

Konwicyliny (około 70 kDa), są bardzo podobne budową do wicilin. Wyodrębnianie tych białek jako trzeciej grupy globulin u *Pisum sativum* wydaje się wątpliwe. Według niektórych autorów, powinny być uważane raczej za α -wicyliny (ryc. 1) [5,41,58].

BIOSYNTETA BIAŁEK W ER

Proces translacji rozpoczyna się od syntezy sekwencji aminokwasów zwanej peptydem sygnałowym, która jest odpowiedzialna za współtranslacyjny transport prekursorów białek zapasowych z cytoplazmatycznej strony ER do jego światła. Peptyd sygnałowy jest początkowym (N-terminalnym) fragmentem łańcucha o długości 15-29 aminokwasów. Wyróżnia się w nim: region h – zbudowany z aminokwasów hydrofobowych, region n – zbudowany z 2-5 aminokwasów, mający ładunek dodatni oraz region c – zbudowany z około 7 aminokwasów polarnych. Nie wykryto homologii peptydów sygnałowych działających w różnych komórkach, a ponadto odmienne peptydy mogą kierować różne białka do światła ER w tej samej komórce. Możliwe jest, że zróżnicowanie odcinków sygnałowych umożliwi skierowanie różnych białek do odmiennych obszarów ER [26,40].

Podczas translacji białka, peptyd sygnałowy jest początkowo ukryty w kanale dużej podjednostki rybosomu. Gdy długość syntetyzowanego łańcucha peptydowego przekroczy 30-40 aminokwasów, koniec NH_2 i następujące po nim aminokwasy zaczynają wysuwać się do cytoplazmy. Rezydujące w cytoplazmie cząsteczki rozpoznające sygnał – SRP (Signal Recognizing Particle) przyłączają się, każda do jednego odcinka sygnałowego, blokując jednocześnie miejsce A w rybosomie i wstrzymując biosyntezę białka. Utworzony kompleks SRP-rybosom wiąże się z receptorem SRP w błonie siateczki endoplazmatycznej. Cząsteczka SRP pozostaje związana ze swoim receptorem przez krótki czas, pozwalający jednak peptydowi sygnałowemu na odnalezienie i otwarcie kanału translokacyjnego w błonie ER. Po odłączeniu i uwolnieniu SRP do cytoplazmy, rybosom pozostaje związany z błoną siateczki endoplazmatycznej, synteza białka zostaje wznowiona, a syntetyzowany polipeptyd przeciska się kanałem translokacyjnym, utworzonym przez zgrupowane białka, do wnętrza siateczki śródplazmatycznej. Gdy łańcuch białkowy ma długość około 70-90 aminokwasów, peptyd sygnałowy jest odcinany przez peptydazę sygnałową. Proteolityczne usunięcie odcinka sygnałowego powoduje uwolnienie peptydu do światła siateczki i jest jednym z warunków zachodzących później modyfikacji potranslacyjnych [13,38,49]. Przed opuszczeniem ER prekursor białek zapasowych mogą być obiektem potranslacyjnej obróbki, polegającej na glikozylacji, tworzeniu mostków dwusiarczkowych, składaniu przez chaperony i oligomeryzacji [38,62].

W miarę przesuwania się łańcuchów polipeptydowych do wnętrza siateczki, podlegają one fałdowaniu i przybierają charakterystyczną dla siebie konformację przestrzenną. Nad prawidłowym fałdowaniem polipeptydów czuwają białka opiekuńcze – chaperony, np. białko wiążące – BiP (Binding Protein) [18,47]. Białka BiP otaczają na pewien czas nowo powstałe polipeptydy białek zapasowych w świetle ER, a po spełnieniu swojej roli są uwalniane w sposób zależny od ATP [38]. W świetle ER białka są poddawane ścisłej kontroli jakości. Nieprawidłowo uformowane białka pozostają związane z BiP w świetle ER, gdzie następuje próba przywrócenia im natywnej struktury. Białka, których nie udało się odpowiednio złożyć, ulegają degradacji określonej jako ERAD (ER-associated protein degradation). W procesie dyslokacji białka te są transportowane do cytosolu, a tam ostatecznie degradowane przez system proteasomów [36,47,63].

W przyjęciu prawidłowej struktury niektórych białek, bardzo ważną rolę odgrywa tworzenie mostków dwusiarczkowych, które kowalencyjnie łączą reszty cysteiny w łańcuchach białka. Połączenia te pozwalają nadać cząsteczkom białka termodynamicznej i mechanicznej stabilności oraz kontrolować właściwe fałdowanie i aktywność. Wprowadzenie mostków dwusiarczkowych do polipeptydu wymaga współpracy pary enzymów: oksydoreduktazy (np. ER oksydoreduktazy 1 – ERO1) i izomerazy disiarczkowej białek PDI (protein disulfide isomerase). ERO1 generuje mostki dwusiarczkowe *de novo*, natomiast PDI – występująca tylko w ER, może zmienić układ mostków dwusiarczkowych w syntetyzowanym białku, dzięki oddziaływaniu swojej reszty cysteiny z mostkiem dwusiarczkowym białka. Oprócz mostków międzylańcuchowych mogą występować również wewnątrzłańcuchowe dwusiarczkowe połączenia, które przyczyniają się do utrzymania struktury tetramerycznej [43]. Mostki dwusiarczkowe tworzone są między łańcuchami α i β leguminy, natomiast w wicilinach nie występują [38].

Glikozylacja polega na dodaniu do prekursorów białek zapasowych reszt cukrowych bogatych w mannozę [51]. Proces ten może zachodzić już podczas translokacji białka do światła ER lub dopiero w aparacie Golgiego. Glikozylacja niektórych białek warunkuje ich aktywność, a innym jedynie ułatwia dojrzewanie i chroni przed degradacją proteolityczną. Glikozylacja może być również istotna dla ochrony białek w czasie wysychania nasion [51]. Leguminy na ogół nie ulegają glikozylacji, z wyjątkiem polipeptydu leguminy łubinu. U *Pisum sativum* glikozylowana jest niewielka część wicilin [38].

Oligomeryzacja polega na łączeniu kilku łańcuchów białek w jedną cząsteczkę. Proces ten może zachodzić współtranslacyjnie, potranslacyjnie lub następować po fałdowaniu poszczególnych jednostek. Jeżeli fałdowanie następuje z udziałem chaperonów, to do oligomeryzacji może dojść dopiero po odłączeniu białek opiekuńczych. Oligomeryzacja może zachodzić w świetle ER lub w diktyosomie. Białka oligomeryczne mogą się składać z takich

samych podjednostek – homooligomerów lub z różnych podjednostek – heterooligomerów. Proleguminy i wiciliny ulegają trimeryzacji w świetle ER i w tej postaci są transportowane z ER do PSV [2,38].

TRANSPORT BIAŁEK Z ER DO APARATU GOLGIEGO

U roślin transport białek z ER do strefy *cis* aparatu Golgiego – czyli transport anterogradowy, zachodzi z udziałem powstających na błonie ER, opłaszczonych pęcherzyków COPII (coat protein complex II). Pęcherzyki powstają w miejscach eksportu z ER określanych jako ERES (ER, export sites), które są rejonami błony niezawierającymi rybosomów. Obszary te, rozciągają się zazwyczaj na długości około 40 nm. Przekazanie ładunku (cargo) z ER do aparatu Golgiego może nastąpić wtedy, gdy strefa *cis* diktiosomu znajduje się naprzeciwko ERES [4,23,31]. Ponieważ diktiosomy poruszają się w komórce wzdłuż włókien mikrofilamentów aktynowych z dużą prędkością, wynoszącą do 4 $\mu\text{m/s}$ [31], powstawanie pęcherzyków COPII również musi przebiegać bardzo szybko. Nie można jednak wykluczyć istnienia innego niż pęcherzyk połączenia między ER i diktiosomem. Badania Martiego i wsp. [31] wykazały, że diktiosomy mogą być połączone z ER, nie wiadomo jednak, jakie białka biorą w tym udział oraz czy połączenie takie zachodzi na całej powierzchni cysterny *cis*, czy tylko w specjalnych miejscach. Dynamiczne połączenie powstawałoby w czasie odpłaszczania pęcherzyka z udziałem GTPazy Sar1, zapewniając czasowe połączenie między organellami [31].

Ważną funkcję w transporcie z ER do cysterny *cis* diktiosomu odgrywają GTPazy. Regulują rekrutację białek płaszczu do błony oraz ich późniejszą dysocjację, np. GTPaza Sec16 wyznacza miejsce powstania pęcherzyka na błonie ER. Białka płaszczu błony – heterodimery Sec23/24 oraz Sec13/31 polimeryzują na powierzchni błony formując kompleksy, które ją stopniowo deformują na kształt opłaszczonego pęcherzyka COPII. Natomiast GTPaza Sar1 bierze udział w selekcji cargo do pęcherzyka. Tworząc kompleks z Sec23/24 różnicuje białka wydzielnicze od rezydujących w ER. Sar1 odgrywa też ważną rolę w odpłaszczeniu pęcherzyka i ekspozycji błony podczas fuzji z aparatem Golgiego [4,14,31]. Główną rolę na wielu etapach ruchu pęcherzyków odgrywają również małe GTPazy z rodziny białek Rab. Białka Rab uczestniczą w procesie formowania pęcherzyków, w transporcie za pośrednictwem cytoszkieletu oraz w zakotwiczeniu do błony docelowej, gdyż wchodzi w interakcje z białkami SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor). SNARE to klasa białek błonowych niezbędnych do fuzji błon pęcherzyków z błoną organelli docelowych. Wyróżnia się dwa typy receptorów SNARE: v-SNARE (*vesicular-SNARE*), występujące w błonie pęcherzyka transportującego, oraz t-SNARE (*target-SNARE*) będące elementem błony organelli docelowej. Białka v-SNARE wiążą się z białkami t-SNARE tworząc kompleks, a wiązanie to prowadzi do fuzji błon. Białka SNARE występują

w bardzo wielu odmianach, a w różnych szlakach transportu biorą udział różne kompleksy SNARE. Kompleksy SNARE odgrywają ważną rolę w transporcie wakuolarnym i biogenezie wakuol. Są zaangażowane w fuzję błon PVC i wakuol, co odgrywa kluczową rolę w rozwoju i dojrzewaniu nasion [11,12,23].

Między aparatem Golgiego a ER odbywa się również transport retrogradowy, prowadzony z udziałem pęcherzyków opłaszczonych zwanych COPI (coat protein complex I). Pęcherzyki COPI prowadzą zwrotny transport białek do ER (np. białek błędnie skierowanych do diktiosomu), jak również transport substancji między cysternami aparatu Golgiego, najczęściej od strony *trans* do *cis*. Ukształtowanie pęcherzyków COPI inicjuje GTPaza ARF1, która gromadzi heptameryczne kompleksy białek płaszczu. Kompleksy składają się z dwóch podjednostek: trimery złożonego z α -COP, β ' ϵ -COP i ϵ -COP oraz tetramery złożonego z β -COP, γ -COP, δ -COP, and ζ -COP. Przy tworzeniu pęcherzyka zachodzi selekcja białek stanowiących jego cargo, m.in. przez łączenie się z transbłonowym białkiem receptorowym. Aby wypełniony białkami pęcherzyk COPI mógł się połączyć z błoną organelli docelowej, musi dojść do odpłaszczania, co zachodzi przy aktywnym udziale ARF1. Odpłaszczanie umożliwia interakcję v-SNARE obecnych w błonie pęcherzyka oraz t-SNARE w błonie docelowej [14,23,48,55].

WAKUOLE ROŚLINNE

Wakuola jest przestrzenią zawierającą sok wakuolarny, odgraniczoną od cytoplazmy błoną, zwaną tonoplastem. Głównym składnikiem soku wakuolarnego jest woda, w której są rozpuszczone składniki nieorganiczne i organiczne. Wśród składników nieorganicznych występują jony K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , H_2PO_4^- i HCO_3^- , natomiast wśród organicznych wyróżnia się wolne aminokwasy, kwasy z cyklu kwasów trójkarboksylowych, sacharozę, maltozę i fruktozę. Składnikami soku mogą być również metabolity wtórne, takie jak glikozydy antocyjanowe, glikozydy flawonowe, alkaloidy i garbniki. W wakuolach są magazynowane również składniki zapasowe w postaci białek, polisacharydów i tłuszczów [15,17,64].

Przyjmuje się trzy różne sposoby powstawania wakuol. Mogą być wynikiem wytwarzania pęcherzyków przez siateczkę śródplazmatyczną bądź wynikiem jej lokalnego rozszczepienia. Wakuole mogą też powstawać z pęcherzyków wytwarzanych przez aparat Golgiego lub z rozpadu dużych wakuol na mniejsze [15,59].

W komórkach roślinnych występują co najmniej dwa różne typy wakuol: wakuole lityczne – LV (*lytic vacuole*), które są spokrewnione z lizosomami ssaków oraz wakuole magazynujące białka – PSV (*protein storage vacuole*) charakterystyczne dla roślin. Wakuole lityczne są typowe dla komórek wegetatywnych, a wakuole magazynujące są głównie w tkankach magazynujących nasion. Wyjątek stanowią wegetatywne wakuole magazynujące, które są formowane w warunkach stresowych [15,62].

Wakuole można rozróżnić na podstawie specyficznych integralnych białek błonowych, pełniących funkcje markerów. Są to swoiste białka błonowe – TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins), które należą do superrodziny akwaporyn i występują w różnych izoformach. U *Arabidopsis* zidentyfikowano 10 izoform, które sklasyfikowano w 5 podgrup: trzy γ -TIP (TIP1), trzy δ -TIP (TIP2), α - i β -TIP (odpowiednio TIP3;1 i TIP3;2), e-TIP (TIP4;1), z-TIP (TIP5;1) [22]. PSV w nasionach mają izoformę α -TIP i δ -TIP, dodatkowo mogą zawierać γ -TIP. PSV w tkankach wegetatywnych zawierają δ -TIP. W przeciwieństwie do nich, wakuole lityczne mają tylko γ -TIP, a autolizosomy indukowane głodem tylko α -TIP. e-TIP obserwuje się głównie w korzeniach i organach kwiatowych [42,62,63].

Początkowo uważano, że różne typy wakuol mają takie samo pochodzenie, natomiast różna ich zawartość i inne występowanie zależy od warunków fizjologicznych lub typu tkanki. Jednak jednocześnie występowanie wakuol magazynujących i litycznych w tych samych komórkach, wykazane z użyciem markerów błonowych, podważa powyższą teorię. Ponadto, duża różnorodność wakuolarnych sygnałów sortujących opisanych u roślin i różne szlaki transportu białek sugerują, że różne typy wakuol mogą mieć różne pochodzenie [57,62].

W cyklu życiowym rośliny, obydwa typy wakuol wzajemnie się zastępują. Podczas embriogenezy, w zygocie formuje się duża LV, która przyczynia się do polaryzacji komórki. W dalszych etapach rozwoju zarodka, LV powstają w każdej komórce. Podczas dojrzewania zarodka, LV zostają zastąpione przez PSV, które odkładają substancje zapasowe dla zarodka. W czasie kiełkowania, zmagazynowane materiały są mobilizowane, aby zapewnić substancje odżywcze i energię dla rosnącego zarodka. Gdy zapasy białek zostaną uwolnione, PSV jest zastąpione przez LV. LV stopniowo zwiększają objętość, aby wytworzyć turgor i wspomagać wzrost i ekspansję komórek. Przejście od PSV do LV jest dobrze widoczne w korzeniach zarodkowych. PSV są obecne w korzeniu, gdy opuszcza on okrywą nasienną. Podczas gdy korzeń się wydłuża, PSV utrzymują się w regionie merystematycznym, a w regionie dystalnym pojawia się coraz więcej LV. W jaki sposób tak różne morfologicznie typy wakuol zastępują się w rozwoju embrionalnym i wegetatywnym, nie jest wyjaśnione. Istnieją hipotezy, że nowy typ wakuol powstaje przez przemodelowanie istniejącej wcześniej wakuoli lub formuje się *de novo* i gwałtownie wypiera istniejący wcześniej typ. Przemodelowanie oznacza, że różne typy wakuol mogą się zastępować przez pewnego rodzaju przeprogramowanie wakuoli już istniejącej w komórce. Proces taki obserwowano w korzeniach zarodkowych kiełkujących nasion *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum* i *Hordeum vulgare*, gdzie po uwolnieniu większości białek zapasowych, PSV łączyły się z sobą tworząc LV, a w miarę rozwoju, hybrydy PSV–LV nabierały coraz więcej cech LV, łącznie ze stopniową zamianą swoistych akwaporyn [15,64]. Hipotezę o powstawaniu wakuol *de novo* popierają obserwacje formowania tubularnych (początkowo) PSV, które rozra-

stają się i stopniowo wypierają LV w liścieniach *Pisum sativum* [15,17]. Przemawia za nią również regeneracja wakuol w ewakuolizowanych protoplastach. Tonoplasty nowo powstających wakuol pochodzą z ER lub powstają w cytoplazmie w postaci autofagosomów, które następnie się łączą [15].

Główną funkcją LV jest trawienie białek i innych związków, jak również odzyskiwanie z nich cennych dla komórki składników oraz utrzymywanie turgoru, w związku z akumulacją większości wody i minerałów w komórce [39]. LV służą również jako miejsca składowania ksenobiotycznych i toksycznych składników, mogących zaburzać przebiegające w cytoplazmie procesy biochemiczne. W LV przetrzymywane są również, zaangażowane w obronę przed patogenami i roślinożercami, białka oraz metabolity wtórne, które są uwalniane w odpowiedzi na atak i uszkodzenia komórki [29]. LV zawierają liczne enzymy hydrolytyczne, takie jak proteazy, glikozydazy, lipazy, nukleazy i peroksydazy. Wewnątrz wakuoli utrzymywane jest pH na poziomie 5,5–6,0. W utrzymaniu wewnętrznego środowiska, główną rolę odgrywa tonoplast oraz wakuolarna ATPaza (vacuolar ATPase, V-ATPase) i wakuolarna pyrofosfataza (pyrophosphatase V-PPase), które katalizują zależny od ATP transfer protonów przez tonoplast. Ich aktywność tworzy gradient protonów i potencjał błonowy, dzięki czemu możliwy jest aktywny transport przez błonę. Tonoplast jest selektywną błoną zawierającą liczne kanały oraz białka transportowe, które prowadzą przepływ substancji organicznych i jonów między cytoplazmą i wakuolą. Przepływ metabolitów nieorganicznych jest prowadzony przez specyficzne kanały jonowe lub transportery, podczas gdy substancje organiczne są przemieszczane za pomocą tzw. transporterów ABC (ATP – binding cassette transporters). Ruch wody przez tonoplast jest ułatwiony przez kanały wodne tzw. akwaporyny [15,29].

Funkcją PSV jest magazynowanie minerałów i białek, które są kluczowe dla rozwoju zarodków przed i w czasie kiełkowania [29]. Do mniej poznanych funkcji należy składowanie fosforu i innych minerałów, składników ochronnych, takich jak lektyny i chitynazy oraz enzymów proteolitycznych. Nieliczne PSV, których obecność stwierdzono w komórkach liści, funkcjonują najprawdopodobniej jako tymczasowy magazyn azotu (na czas wzrostu wegetatywnego) lub przechowują białka obronne, związane z odpowiedzią na patogen [44]. PSV są dużo mniejsze niż LV, występują licznie i są często umiejscowione w centrum komórki. Budowa ich tonoplastu nie jest tak dobrze poznana jak LV, wiadomo jednak, że mają podobny skład białek. Wewnątrz PSV pH waha się w granicach 4,9–5,5. Podobnie jak LV, PSV są zdolne do autofagii, która jest wykorzystywana przy pobieraniu magazynowanych w nich substancji zapasowych [15,62].

TRANSPORT BIAŁEK DO WAKUOL

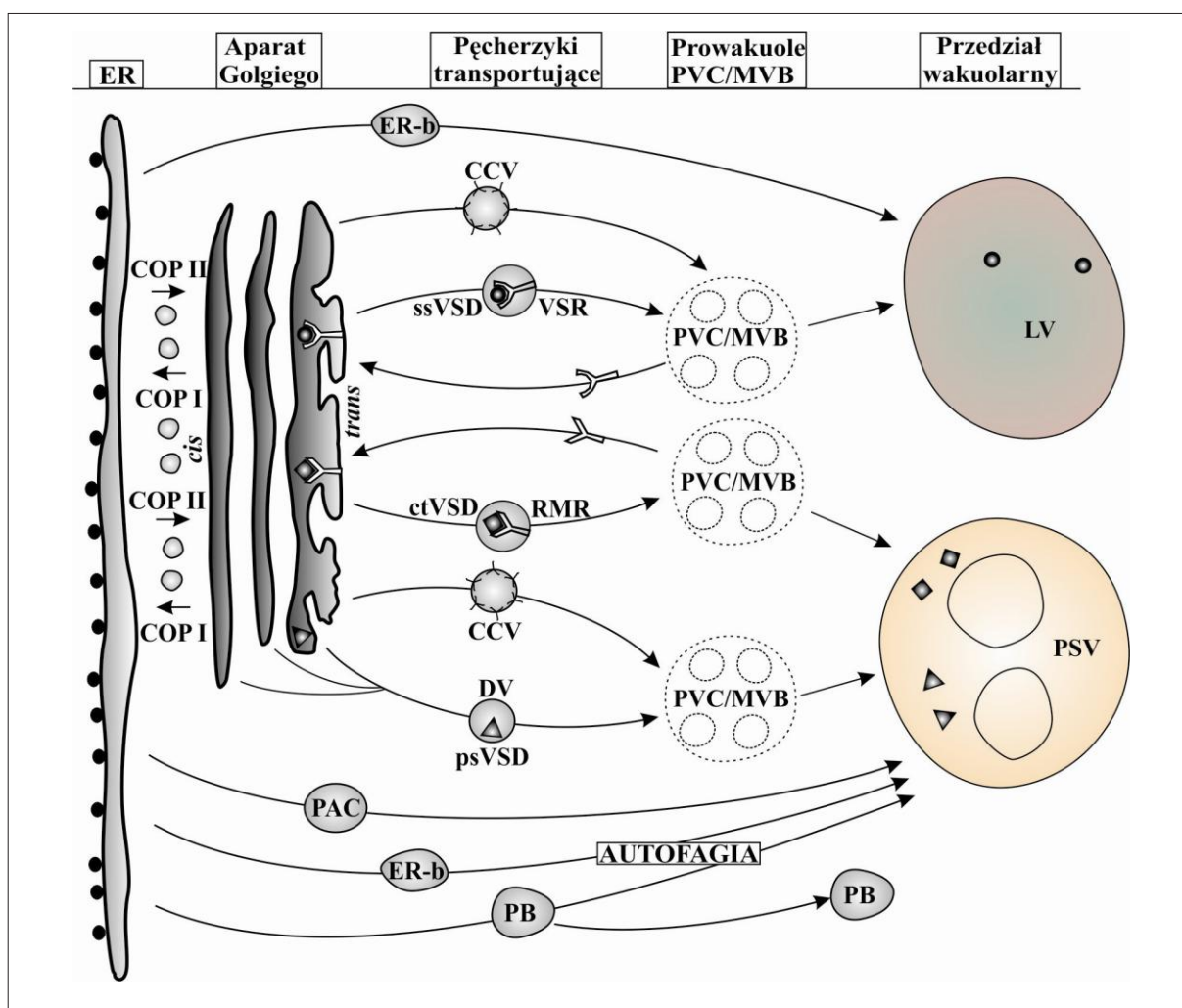
Zarówno LV jak i PSV są częścią systemu wydzielniczego komórki i białka wakuolarnie są do nich dostarczane przez szlaki wydzielnicze. Istnienie dwóch typów

wakuol roślinnych, o różnych zawartościach i funkcjach wymaga osobnych szlaków, jak również odpowiedniej separacji poszczególnych substancji w aparacie Golgiego (ryc. 2). Aby białka mogły zostać przetransportowane do odpowiednich wakuol, muszą zawierać wakuolarnie determinanty sortujące – VSD (vacuolar sorting determinant). Wyróżnia się trzy typy VSD: ssVSD (sequence-specific VSD), ctVSD (c-terminal VSD) i psVSD (physical structure VSD). Białka niemające VSD są wydzielane na powierzchnię komórki. Przeważnie ssVSD i ctVSD są usuwane przez proteazy wakuolarnie podczas dojrzewania białek w wakuolach [33,46,62,63].

Determinanty ssVSD wymagają występowania swoistej sekwencji aminokwasowej Asn-Pro-Ile-Arg (asparagina, prolina, izoleucyna, arginina) lub jej podobnej i funkcjo-

nują niezależnie od ich pozycji molekularnej w łańcuchu polipeptydowym. Najczęściej znajdują się w obszarze N-końcowym białka, choć mogą występować również na końcu C lub bardziej wewnątrz. Za pośrednictwem wysoce konserwatywnych interakcji ssVSD z wakuolarnym receptorem sortującym VSR (vacuolar sorting receptor) zlokalizowanym w błonie cystern *trans* aparatu Golgiego (zwanym BP-80), powstałe kompleksy ligand – receptor kierowane są głównie do wakuol litycznych [46,60,63].

Determinanty ctVSD są charakterystyczne dla roślin i znajdują się na C-końcu łańcucha białkowego. Wiele różnych C-końcowych peptydów może pełnić rolę sygnału sortującego i kierować białko do wakuoli. Sygnały te nie mają sekwencji homologicznej lub ustalonego rozmiaru,



Ryc. 2. Drogi transportu białek do wakuol (wg [39], zmodyfikowano); CCV – pęcherzyki oplaszczone klatryną (clathrin-coated vesicles); ctVSD – wakuolarna domena sortująca C-końca (C-terminal vacuolar sorting determinant); DV – pęcherzyki gęste (dense vesicles); ER – siateczka wewnątrzplazmatyczna (endoplasmic reticulum); ER-b – pęcherzyki ER (ER-bodies); LV – wakuola lityczna (lytic vacuole); MVB – ciała wielopęcherzykowe (multi-vesicular bodies); PB – ciała białkowe (protein bodies); PSV – wakuola magazynująca białka (protein storage vacuole); PVC – składnik prowakuolarny (pre-vacuolar compartment); PAC - pęcherzyki akumulujące prekursor (precursor accumulating vesicles); psVSD – wakuolarna domena sortująca zależna od struktury przestrzennej (physical structure vacuolar sorting determinant); ssVSD – sekwencyjnie swoista wakuolarna domena sortująca (sequence-specific vacuolar sorting determinant)

natomiast charakteryzują się dużą zawartością aminokwasów hydrofobowych, które aby spełniły swoją funkcję muszą być wyeksponowane na C-końcu łańcucha białkowego. Minimalna długość sekwencji sygnałowej wynosi cztery aminokwasy, a najmniejsza zmiana w jej obrębie, np. glikozylacja C-końca, prowadzi do wydzielania białka na powierzchnię komórki. Receptorami dla ctVSD są białka RMR (receptor membrane ring), które kierują białka głównie do PSV [46,61,63].

Determinanty psVSD są oparte o strukturę przestrzenną białka i można je podzielić na dwa typy. Pierwszy typ może być złożony z wielu wewnętrznych domen tworzących wyżej uporządkowaną strukturę, która funkcjonuje jako VSD. Drugi typ jest formowany przez agregację białek zapasowych, zachodzącą najprawdopodobniej w aparacie Golgiego. Proproteiny są często bardziej hydrofobowe niż ich postaci dojrzałe, stąd formują one agregaty. Ten mechanizm sortowania nie wymaga receptorów i występuje przy kierowaniu białek zapasowych do elektronowo gęstych pęcherzyków DV (Dense Vesicles), a następnie PSV [37,52,63].

Sortowanie białek do LV

Na drodze z aparatu Goldiego do LV, białka z determinantami sortującymi są zamykane w pęcherzykach transferowych i w CCV (clathrin-coated vesicles), które uwalniają swoją zawartość do endosomalnych składników prewakuolarnych – PVC (pre-vacuolar compartments) lub do ciał wielopęcherzykowych MVB (multi-vesicular bodies). Możliwe jest, że na skutek łączenia się z różnymi pęcherzykami transferowymi, MVB przekształcają się w PVC, które łączą się z wakuolą [34,39,63]. Istnieją również szlaki alternatywne, z pominięciem aparatu Golgiego. Bezpośrednio do wakuoli, za pomocą pęcherzyków określanych jako ER-b (ER-bodies) są transportowane białka błonowe i niektóre enzymy [9].

Sortowanie białek do PSV

Białka, które w czasie translacji trafiły do światła ER, a przeznaczone są do PSV, kierowane są do wakuoli poprzez szlaki zależne lub niezależne od aparatu Golgiego.

W szlaku zależnym białka są transportowane do aparatu Golgiego za pomocą opłaszczonych pęcherzyków COPII. W aparacie Golgiego białka tworzą agregaty, które stają się zawartością gęstych pęcherzyków DV. DV są transportowane do ciał wielopęcherzykowych – MVB, które następnie łączą się z PSV. Tą drogą są transportowane białka zapasowe w rozwijających się liściach grochu [25,60].

W szlaku niezależnym od aparatu Golgiego, białka docierają do PSV bezpośrednio z ER, za pomocą pęcherzyków akumulujących prekursora – PAC (precursor accumulating vesicles). PAC zawierają nieglikozylowane

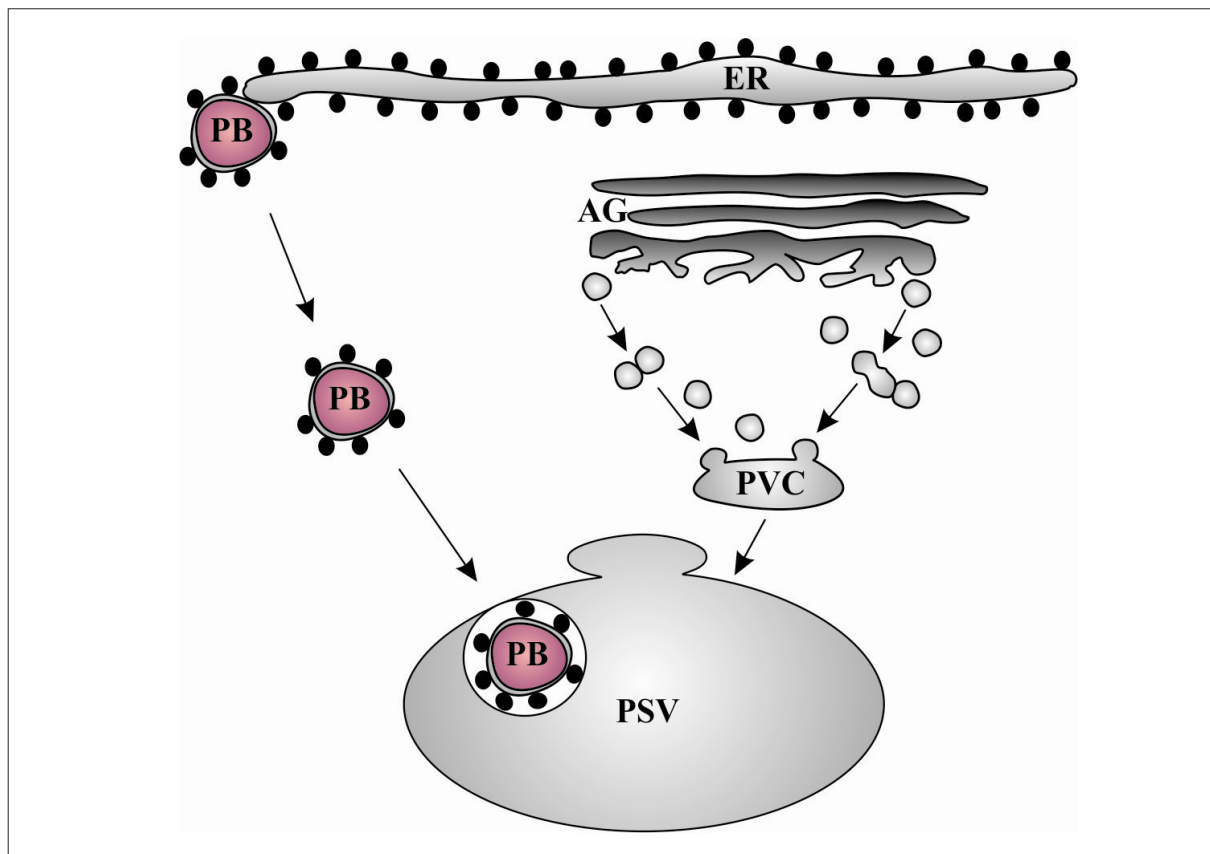
prekursory białek zapasowych i uważa się, że podczas transportu do PSV, mogą przyjmować również glikozylowane białka dostarczane z aparatu Golgiego. Oprócz PAC, w szlaku tym funkcjonują również wytworzone przez ER pęcherzyki określane jako ER-b i PB (ER-bodies i protein bodies). Tą drogą są transportowane np. białka tonoplastu [9,39,63].

CIAŁA BIAŁKOWE

Ostateczną postacią magazynowania białek zapasowych u roślin są ciała białkowe – PB. Powstają na dwa sposoby – bezpośrednio z ER, które wypukla się tworząc pęcherzyki wypełnione białkami zapasowymi lub w wyniku fragmentacji PSV (ryc. 3). Ciała białkowe powstałe z ER mogą być ostateczną postacią magazynowania białek lub mogą być włączane do PSV w procesie autofagii [18]. W bielmie zbóż ciała białkowe są tworzone na obydwa sposoby. Na przykład, główne białka zapasowe (gluteniny) u owsa i ryżu są transportowane z ER, poprzez aparat Golgiego do PSV, z której powstają PB. Natomiast prolaminy u ryżu i kukurydzy są zatrzymywane w ER, a następnie zamykane w tworzących się przez wypuklenie PB. W komórkach bielma ryżu występują zatem dwie populacje ciał białkowych, jedna pochodzenia wakuolarnego (zawierająca gluteniny), a druga pochodząca z ER (zawierająca prolaminy). Prolaminy u jęczmienia, pszenicy i żyta są obecne w obydwu typach ciał białkowych, a gluteniny u pszenicy są gromadzone głównie w PB powstających z ER. Gliadyny są obecne w obydwu typach ciał. Ciała pochodzące z ER mogą się łączyć z PSV pomijając aparat Golgiego [28,54,56]. U roślin strączkowych (grochu, soi, fasoli, lucerny) ciała białkowe powstają głównie w wyniku transportu białek zapasowych (globulin) wykorzystując gęste pęcherzyki aparatu Golgiego (DV), jednak mechanizm oparty na autofagii oraz bezpośrednim tworzeniu ich z ER został również stwierdzony [1,24]. U roślin dwuliściennych PB powstają przeważnie na skutek fragmentacji PSV. Jednak nie jest to regułą i powstawanie oraz struktura ciał białkowych jest specyficzna gatunkowo. Przy formowaniu PB pochodzących z PSV, białka zapasowe są poddawane obróbce enzymatycznej [24,54].

PRZETWARZANIE BIAŁEK PRZEZ LIMITOWANĄ PROTEOLIZĘ W PSV

Większość białek zapasowych, po dotarciu do PSV, jest poddawana procesom przetwarzania. Pozwalają one zmienić konformację protein z odpowiedniej do celów transportowych na odpowiednią do efektywnego składowania w ciałach białkowych. Prokonkanawalina A jest np. obiektem deglikozylacji, wycięcia peptydu łączącego podjednostki oraz przekształcenia w cząstkę kolistą. Prekursory 2S albumin tracą swoje determinanty sortujące (ctVSD) oraz niewielki fragment łączący łańcuchy α i β , w celu uformowania dojrzałej postaci białka. Proleguminy występujące w trimerach, są rozcinane na dwa łańcuchy połączone wiązaniem disiarczkowym, a następnie przekształcane w heksamery i w tej postaci magazynowane. Natomiast w wicilinach zachodzi osta-



Ryc. 3. Droga powstawania ciał białkowych; ciała białkowe mogą powstawać bezpośrednio z ER bądź w wyniku fragmentacji PSV, w której gromadzą się białka zapasowe. Ciała pochodzące z ER są deponowane bezpośrednio w cytoplazmie lub łączą się z PSV w procesie autofagii. ER – retikulum endoplazmatyczne, AG – aparat Golgiego, PSV – wakuola magazynująca białka, PVC – składnik prewakuolarny/ciało wielopęcherzykowe, PB – ciało białkowe pochodzące z ER (według [24] zmodyfikowano)

teczne skrócenie łańcuchów glikonowych. Do niektórych podjednostek białek zapasowych mogą być dołączane niewielkie peptydy terminalne lub pojedyncze reszty aminokwasowe [24,54].

W procesach limitowanej proteolizy główną rolę odgrywa enzym VPE (vacuolar processing enzyme), a produkty powstałe na skutek jego aktywności nie są już narażone na jego działanie. VPE są dostarczane do PSV przez pęcherzyki opłaszczone klatryną CCV. Na drodze do wakuoli CCV często łączą się z DV w składniku prewakuolarnym PVC lub w ciele wielopęcherzykowym MVB. W strukturach tych może zachodzić przetwarzanie prekursorów białkowych dostarczonych przez DV, a zatem do PSV mogą docierać zarówno dojrzałe holoproteiny, jak również ich prekursory [38].

W komórkach mięksiszu liścieni PSV dzielą się i przekształcają w liczne ciała białkowe, które stopniowo wypełniają cytoplazmę. U grochu na wczesnym etapie wypełniania nasion, w komórkach liścieni występują liczne małe wakuole. Taka modyfikacja składnika wakuolarnego jest wskaźnikiem inicjacji magazynowania białek [37]. Dojrzałe nasiona zawierają gęsto upa-

kowane depozyty białek zapasowych, które całkowicie wypełniają PSV. Depozyty białkowe mogą być jednorodnie amorficzne lub zróżnicowane na subdomeny, które zawierają różne rodzaje białek. Wśród subdomen wyróżniamy bezpostaciową białkową matriks, białkowe kryształoidy i fitynowe globoidy (sól wapniowo-magnezowa kwasu inozyto-6-fosforowego) [24].

U roślin dwuliściennych, np. u dyni, słonecznika, kapustowatych czy rącznika, 2S albuminy są składowane razem z 11S globulinami, jednak ich organizacja w PB nie jest dokładnie poznana. Ogólnie, u *Cucurbitaceae* obserwuje się białkowe kryształoidy, natomiast nie występują one u *Compositae* i *Cruciferae*. U roślin strączkowych 7S i 11S globuliny znajdują się w tych samych PB bez wyraźnej przestrzennej separacji [24,54].

W bielmach zbóż również występuje przestrzenna separacja różnych typów białek, co jest dobrze widoczne u kukurydzy. W bielmie *Z. mays* ciała białkowe pochodzące z ER są wypełnione prolaminami – zeinami. Rdzeń PB tworzą δ -zeina i α -zeina, w następnej warstwie znajduje się β -zeina, a najbardziej zewnętrzna jest zbudowana z γ -zeiny [3,28]. Separacja różnych białek w ciałach

białkowych może wynikać z właściwości samych białek (np. z ich zdolności do rozdzielania na osobne fazy) lub z różnych sposobów ich odkładania podczas biogenezy [24].

PODSUMOWANIE

Mimo intensywnych badań prowadzonych na licznych modelach eksperymentalnych nadal struktura jak i mechanizmy potrasyacyjnej modyfikacji, sortowania, transportu i składowania białek zapasowych u roślin pozostają problemem otwartym. Utrudnienia w rozszy-

frowaniu i opracowaniu poszczególnych zagadnień są związane zarówno z różnicami międzygatunkowymi jak i modyfikacjami wynikającymi ze stadium rozwojowego lub rodzaju tkanki. Precyzyjne poznanie omawianych mechanizmów jest niezwykle ważne w kontekście rozwijającej się inżynierii genetycznej, ukierunkowanej nie tylko na udoskonalanie właściwości odżywczych zbóż czy roślin strączkowych, ale również na wykorzystanie roślin do wytwarzania rekombinowanych produktów farmaceutycznych. Szczegółowe zrozumienie problemu wskaże stopień do jakiego można manipulować strukturą białek nie tracąc ich właściwości biologicznych.

PIŚMIENICTWO

- [1] Abirached-Darmency M., Dessaint F., Benlicha E., Schneider C.: Biogenesis of protein bodies during vicilin accumulation in *Medicago truncatula* immature seeds. *BMC Res. Notes*, 2012; 5: 409
- [2] Ali M.H., Imperiali B.: Protein oligomerization: how and why. *Bioorg. Med. Chem.*, 2005; 13: 5013-5020
- [3] Anderson T.J., Lamsal B.P.: Zein extraction from corn, corn products, and coproducts and modifications for various applications: a review. *Cereal Chem.*, 2011; 88: 159-173
- [4] Barac M., Cabrilo S., Pesic M., Stanojevic S., Zilic S., Macej O., Ristic N.: Profile and functional properties of seed proteins from six pea (*Pisum sativum*) genotypes. *Int. J. Mol. Sci.*, 2010; 11: 4973-4990
- [5] Basińska A., Krzesłowska M., Woźny A.: Nowe fakty dotyczące transportu pęcherzykowego w komórkach roślinnych. *Kosmos*, 2012; 61: 363-370
- [6] Casey R., Christou P., Domoney C., Hedley C., Hitchin E., Parker M., Stoger E., Wang T., Zasiura C.: Expression of legumin and vicilin genes in pea mutants and the production of legumin in transgenic plants. *Nahrung*, 2001; 45: 385-387
- [7] Clemente A., Marín-Manzano M.C., Jiménez E., Arqués M.C., Domoney C.: The anti-proliferative effect of T11B, a major Bowman-Birk isoinhibitor from pea (*Pisum sativum* L.), on HT29 colon cancer cells is mediated through protease inhibition. *Br. J. Nutr.*, 2012; 108 (Suppl. 1): S135-S144
- [8] Czarnačka J., Koziółkiewicz M.: Albuminy 2S - roślinne białka zapasowe o właściwościach alergennych. *Biotechnologia*, 2007; 2: 114-127
- [9] De Marchis F., Bellucci M., Pompa A.: Unconventional pathways of secretory plant proteins from the endoplasmic reticulum to the vacuole bypassing the Golgi complex. *Plant Signal. Behav.*, 2013; 8: e25129
- [10] Duranti M.: Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 2006; 77: 67-82
- [11] Ebine K., Okatani Y., Uemura T., Goh T., Shoda K., Niihama M., Morita M.T., Spitzer C., Otegui M.S., Nakano A., Ueda T.: A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 2008; 20: 3006-3021
- [12] Ebine K., Ueda T.: Unique mechanism of plant endocytic/vacuolar transport pathways. *J. Plant Res.*, 2009; 122: 21-30
- [13] Egea P.F., Stroud R.M., Walter P.: Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2005; 15: 213-220
- [14] Faso C., Boulaflois A., Brandizzi F.: The plant Golgi apparatus: last 10 years of answered and open questions. *FEBS Lett.*, 2009; 583: 3752-3757
- [15] Feeney M., Frigerio L., Kohalmi S.E., Cui Y., Menassa R.: Reprogramming cells to study vacuolar development. *Front. Plant Sci.*, 2013; 4: 493
- [16] Freitas R.L., Teixeira A.R., Ferreira R.B.: Vicilin-type globulins follow distinct patterns of degradation in different species of germinating legume seeds. *Food Chem.*, 2007; 102: 323-329
- [17] Frigerio L., Hinz G., Robinson D.G.: Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? *Traffic*, 2008; 9: 1564-1570
- [18] Galili G.: ER-derived compartments are formed by highly regulated processes and have special functions in plants. *Plant Physiol.*, 2004; 136: 3411-3413
- [19] Gallardo K., Thompson R., Burstin J.: Reserve accumulation in legume seeds. *C.R. Biol.*, 2008; 331: 755-762
- [20] Gatehouse J.A., Croy R.R., Morton H., Tyler M., Boulter D.: Characterisation and subunit structures of the vicilin storage proteins of pea (*Pisum sativum* L.). *Eur. J. Biochem.*, 1981; 118: 627-633
- [21] Gatehouse J.A., Evans I.M., Bown D., Croy R.R., Boulter D.: Control of storage-protein synthesis during seed development in pea (*Pisum sativum* L.). *Biochem. J.*, 1982; 208: 119-127
- [22] Gattolin S., Sorieul M., Hunter P.R., Khonsari R.H., Frigerio L.: *In vivo* imaging of the tonoplast intrinsic protein family in *Arabidopsis* roots. *BMC Plant Biol.*, 2009; 9: 133
- [23] Hanton S.L., Matheson L.A., Brandizzi F.: Seeking a way out: export of proteins from the plant endoplasmic reticulum. *Trends Plant Sci.*, 2006; 11: 335-343
- [24] Herman E.M., Larkins B.A.: Protein storage bodies and vacuoles. *Plant Cell*, 1999; 11: 601-613
- [25] Hillmer S., Movafeghi A., Robinson D.G., Hinz G.: Vacuolar storage proteins are sorted in the cis-cisternae of the pea cotyledon Golgi apparatus. *J. Cell Biol.*, 2001; 152: 41-50
- [26] Hiss J.A., Schneider G.: Architecture, function and prediction of long signal peptides. *Brief. Bioinform.*, 2009; 10: 569-578
- [27] Hohl I., Robinson D.G., Chrispeels M.J., Hinz G.: Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J. Cell Sci.*, 1996; 109: 2539-2550
- [28] Holding D.R., Larkins B.A.: The development and importance of zein protein bodies in maize endosperm. *Maydica*, 2006; 51: 243-254
- [29] Isayenkov S., Isner J.C., Maathuis F.J.: Vacuolar ion channels: Roles in plant nutrition and signalling. *FEBS Lett.*, 2010; 584: 1982-1988
- [30] Leterme P.: Recommendations by health organizations for pulse consumption. *Br. J. Nutr.*, 2002; 88 (Suppl. 3): S239-S242

- [31] Marti L., Fornaciari S., Renna L., Stefano G., Brandizzi F.: COPII-mediated traffic in plants. *Trends Plant Sci.*, 2010; 15: 522-528
- [32] Martínez-Villaluenga C., Gulewicz P., Frias J., Gulewicz K., Vidal-Valverde C.: Assessment of protein fractions of three cultivars of *Pisum sativum* L.: Effect of germination. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008; 226:1465-1478
- [33] Maruyama N., Mun L.C., Tatsuhara M., Sawada M., Ishimoto M., Utsumi S.: Multiple vacuolar sorting determinants exist in soybean 11S globulin. *Plant Cell*, 2006; 18: 1253-1273
- [34] Masclaux F.G., Galaud J.P., Pont-Lezica R.: The riddle of the plant vacuolar sorting receptors. *Protoplasma*, 2005; 226: 103-108
- [35] Mertens C., Dehon L., Bourgeois A., Verhaeghe-Cartrysse C., Blecker C.: Agronomical factors influencing the legumin/vicilin ratio in pea (*Pisum sativum* L.) seeds. *J. Sci. Food Agric.*, 2012; 92: 1591-1596
- [36] Meusser B., Hirsch C., Jarosch E., Sommer T.: ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.*, 2005; 7: 766-772
- [37] Mori T., Saruta Y., Fukuda T., Prak K., Ishimoto M., Maruyama N., Utsumi S.: Vacuolar sorting behaviors of 11S globulins in plant cells. *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, 2009; 73: 53-60
- [38] Müntz K.: Deposition of storage proteins. *Plant Mol. Biol.*, 1998; 38: 77-99
- [39] Müntz K.: Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *J. Exp. Bot.*, 2007; 580: 2391-2407
- [40] Nielsen H., Krogh A.: Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.*, 1998; 6: 122-130
- [41] O'kane F.E., Happe R. P., Vereijken J. M., Gruppen H., van Boekel M.A.: Characterization of pea vicilin. 1. Denoting convicilin as the α -subunit of the *Pisum* vicilin family. *J. Agric. Food Chem.*, 2004; 52: 3141-3148
- [42] Olbrich A., Hillmer S., Hinz G., Olviusson P., Robinson D.G.: Newly formed vacuoles in root meristems of barley and pea seedlings have characteristics of both protein storage and lytic vacuoles. *Plant Physiol.*, 2007; 145: 1383-1394
- [43] Onda Y.: Oxidative protein-folding systems in plant cells. *Int. J. Cell Biol.*, 2013; 2013: 585431
- [44] Park M., Kim S.J., Vitale A., Hwang I.: Identification of the protein storage vacuole and protein targeting to the vacuole in leaf cells of three plant species. *Plant Physiol.*, 2004; 134: 625-639
- [45] Pedrosa C., De Felice F.G., Trisciuzzi C., Ferreira S.T.: Selective neoglycosylation increases the structural stability of vicilin, the 7S storage globulin from pea seeds. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000; 382: 203-210
- [46] Pereira C., Pereira S., Pissarra J.: Delivering of proteins to the plant vacuole - an update. *Int. J. Mol. Sci.*, 2014; 15: 7611-7623
- [47] Pimpl P., Taylor J.P., Snowden C., Hillmer S., Robinson D.G., Denecke J.: Golgi-mediated vacuolar sorting of the endoplasmic reticulum chaperone BiP may play an active role in quality control within the secretory pathway. *Plant Cell*, 2006; 18: 198-211
- [48] Pool M.R., Stumm J., Fulga T.A., Sinning I., Dobberstein B.: Distinct modes of signal recognition particle interaction with the ribosome. *Science*, 2002; 297: 1345-1348
- [49] Popoff V., Adolf F., Brügger B., Wieland F.: COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2011; 3: a005231
- [50] Prandini A., Sigolo S., Morlacchini M., Cerioli C., Masoero F.: Pea (*Pisum sativum*) and faba bean (*Vicia faba* L.) seeds as protein sources in growing-finishing heavy pig diets: effect on growth performance, carcass characteristics and on fresh and seasoned Parma ham quality. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2011; 10: e45
- [51] Raghavan V.: *Molecular embryology of flowering plants*. Cambridge University Press, 1997
- [52] Robinson D.G., Olviusson P., Hinz G.: Protein sorting to the storage vacuoles of plants: a critical appraisal. *Traffic*, 2005; 6: 615-625
- [53] Rubio L.A., Pérez A., Ruiz R., Guzmán M.Á., Aranda-Olmedo A., Clemente A.: Characterization of pea (*Pisum sativum*) seed protein fractions. *J. Sci. Food Agric.*, 2014; 94: 280-287
- [54] Shewry P.R., Napier J.A., Tatham A.S.: Seed storage proteins: structures and biosynthesis. *Plant Cell*, 1995; 7: 945-956
- [55] Strating J.R., Martens G.J.: The p24 family and selective transport processes at the ER-Golgi interface. *Biol. Cell*, 2009; 101: 495-509
- [56] Tosi P., Parker M., Gritsch C.S., Carzaniga R., Martin B., Shewry P.R.: Trafficking of storage proteins in developing grain of wheat. *J. Exp. Bot.*, 2009; 60: 979-991
- [57] Törmäkangas K., Hadlington J.L., Pimpl P., Hillmer S., Brandizzi F., Teeri T.H., Denecke J.: A vacuolar sorting domain may also influence the way in which proteins leave the endoplasmic reticulum. *Plant Cell*, 2001; 13: 2021-2032
- [58] Tzitzikas E.N., Vincken J.P., de Groot J., Gruppen H., Visser R.G.: Genetic variation in pea seed globulin composition. *J. Agric. Food Chem.*, 2006; 54: 425-433
- [59] Viotti C.: ER and vacuoles: never been closer. *Front. Plant Sci.*, 2014; 5: 20
- [60] von Lüpke A., Schauer mann G., Feussner I., Hinz G.: Peripheral membrane proteins mediate binding of vacuolar storage proteins to membranes of the secretory pathway of developing pea cotyledons. *J. Exp. Bot.*, 2008; 59: 1327-1340
- [61] Wang H., Rogers J.C., Jiang L.: Plant RMR proteins: unique vacuolar sorting receptors that couple ligand sorting with membrane internalization. *FEBS J.*, 2011; 278: 59-68
- [62] Woźny A., Jackowski G., Jarmuszkiewicz W., Ratajczak L., Szwejkowska-Kulińska Z.: Sortowanie i transport białek. W: *Biologia komórki roślinnej*, t. 2, red.: P. Wojtaszek, A. Woźny, L. Ratajczak. Wydawnictwo Naukowe PWN SA, Warszawa 2007
- [63] Xiang L., Etxeberria E., Van den Ende W.: Vacuolar protein sorting mechanisms in plants. *FEBS J.*, 2013; 280: 979-993
- [64] Zheng H., Staehelin L.A.: Protein storage vacuoles are transformed into lytic vacuoles in root meristematic cells of germinating seedlings by multiple, cell type-specific mechanisms. *Plant Physiol.*, 2011; 155: 2023-2035

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.