

CHARAKTERYSTYKA KANAŁÓW POTASOWYCH W TONOPLAŚCIE KOMÓREK ROŚLINNYCH

KAZIMIERZ TRĘBACZ

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

Three types of potassium-transporting ion channels in the tonoplast of plant cells are characterized: slow vacuolar channels, SV, fast vacuolar channels, FV, and K-selective vacuolar channels, VK. Basic parameters, such as selectivity, current density, calcium dependence, and ways of gating are presented. Special attention is paid to participation of these channels in regulation of physiological processes. Role of ion channels in regulation of stomata aperture, calcium induced calcium release, and action potentials is discussed.

WSTĘP

W dojrzałych komórkach roślinnych do ok. 90% objętości zajmuje centralna wakuola. Jej rolą jest utrzymywanie wysokiego ciśnienia (turgoru) wewnątrz komórki, dzięki czemu rośliny mogą zachowywać odpowiedni kształt i odpowiednie własności mechaniczne. Wakuole to również magazyny substancji zapasowych, a także miejsca, gdzie gromadzą się substancje toksyczne dla komórki. Można ponadto stwierdzić, że w przypadku roślin lądowych wakuole pełnią rolę "zbiorników retencyjnych" umożliwiających funkcjonowanie komórek w warunkach zmiennego zaopatrzenia w wodę i substancje mineralne. Ostatnio zwraca się coraz większą uwagę na rolę wakuoli, a zwłaszcza błony, która ją otacza - tonoplastu w przekaźnictwie sygnałów między otoczeniem a komórką. Funkcje regulacyjne wakuoli są bodaj najsilniej zaznaczone w komórkach przyszparkowych aparatów szparkowych. Zmiany turgoru tych komórek powodują zmiany apertury, czyli stopnia rozwarcia szparek, a to z kolei reguluje tempo transpiracji i wymiany gazowej.

Zmiany turgoru są ściśle związane z przepływem jonów K^+ i Cl^- i towarzyszącym im przepływem wody na drodze osmozy. W otwartych komórkach przyszparkowych stężenie jonów K^+ w wakuoli wynosi ok. 200 mM i ok. 20 mM w cytozolu. Potencjał cytoplazmy w stosunku do wnętrza wakuoli wynosi od 0 do ok. -40 mV, a jego wielkość wynika z funkcjonowania specyficznej wakuolarniej H^+ ATPazy i pirofosfatazy katalizujących transport jonów H^+ z cytoplazmy do wnętrza wakuoli. W spoczynku stężenie wolnych jonów wapnia, $[Ca^{2+}]_{cyt}$ w cytozolu jest rzędu 100 nM, tymczasem w wakuoli i w apoplastacie jest o 3-4 rzędy wielkości wyższe. Wśród sygnałów do zamknięcia

szparek jest wzrost stężenia wolnych jonów wapnia w cytozolu do ok. 1 μ M. Powoduje to uruchomienie mechanizmów przepływu jonów K^+ i towarzyszących im jonów Cl^- i innych anionów z wakuoli poprzez cytozol do apoplastu. Rejestruje się wówczas zmiany stężenia K^+ w wakuoli o ok. 32 mM na 1 μ M zmniejszenia apertury szparki (Allen, Amtmann & Sanders, 1998). Tak samo skierowane przepływy jonowe i o podobnym natężeniu towarzyszą potencjałom czynnościowym, zwłaszcza u roślin, takich jak *Mimosa* czy *Dionaea*, u których pobudzeniu towarzyszy nagła utrata turgoru przez komórki motoryczne (Trębacz, Stolarz, Dziubińska & Zawadzki, 1997).

W ciągu ostatnich kilku lat udało się scharakteryzować, stosując głównie technikę patch-clamp, kanały jonowe w tonoplastacie, z udziałem których następują przepływy jonowe odpowiedzialne m.in. za zmianę apertury szparek. Badania wykonywane techniką patch-clamp prowadzi się na izolowanych wakuolach uzyskiwanych bądź przez przecięcie splazmolizowanej tkanki (Trębacz & Schönknecht, 2000), bądź w rezultacie rozbicia osmotycznego protoplastów uzyskanych w wyniku enzymatycznego trawienia ściany komórkowej (Schulz-Lessdorf & Hedrich, 1995). W obu przypadkach izolowane wakuole są pozbawione składników cytozolu odpowiedzialnych za prawidłowe funkcjonowanie, a zwłaszcza regulację kanałów jonowych i innych transporterów występujących w tonoplastacie. Usiłowania badaczy idą więc w kierunku symulowania warunków panujących w cytozolu poprzez odpowiedni dobór mediów, w których zanurzone są izolowane wakuole, bądź skrawki (łatki) tonoplastu oraz roztworów wypełniających mikroelektrodę pomiarową. W zależności od składu medium, a także gatunku rośliny i

rodzaju komórek rejestruje się prądy, które można przypisać kanałom jonowym odpowiednich typów.

W tonoplaście komórek roślinnych dominują trzy typy kanałów transportujących kationy, a zwłaszcza jony potasu (Allen & Sanders, 1997; Król & Trębacz, 2000). Są to wolno aktywowane kanały wakuolarne (SV), wakuolarne kanały potasowe swoiste dla komórek szparkowych (VK) i szybko aktywowane kanały wakuolarne (FV). Aktywność wszystkich tych typów kanałów zależy od $[Ca^{2+}]_{cyt}$. W submikromolarnym $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dominują prądy niesione przez FV. Przy $[Ca^{2+}]_{cyt}$ ok. 1 μM aktywacji ulegają kanały VK, natomiast powyżej 1 μM , a u wielu gatunków roślin dopiero przy ok. 100 μM $[Ca^{2+}]_{cyt}$ następuje otwieranie kanałów typu SV (Allen & Sanders, 1996).

Kanały typu FV ulegają aktywacji w czasie krótszym niż 1 ms w odpowiedzi na nagłe zmiany potencjału. Wykazują własności prostujące. Przy jednakowych stężeniach K^+ po obu stronach tonoplastu przeważa prąd do wnętrza wakuoli. Przewodnictwo pojedynczych kanałów wynosi ok. 30 pS w symetrycznym 200 mM roztworze KCl po obu stronach tonoplastu (Allen & Sanders, 1997). Aktywność kanałów typu FV zależy wyraźnie od pH medium i osiąga maksimum przy ok. 7,3 (Allen *et al.*, 1998). Rola fizjologiczna kanałów FV była do niedawna niejasna. Uważano, że główną funkcją kanałów FV jest kontrola potencjału tonoplastu poprzez zwieranie przewodnictwa elektrogenicznych pomp jonowych (Allen & Sanders, 1997). Znaczne gęstości prądu niesionego przez kanały FV rzędu 0,5 A/m² mogłyby w ułamku sekundy zmienić polaryzację tonoplastu z ok. -40 mV do ok. 50 mV (w komórkach przysparkowych). Tak drastyczne zmiany potencjału nie były obserwowane. Ostatnio udowodniono, że kanały typu FV są silnie blokowane przez jony Mg^{2+} w stężeniu rzędu kilku mM (Brüggemann, Potossin & Schönknecht, 1999; Pei, Ward & Schroeder, 1999). Obecność jonów magnezu w cytozolu komórek roślinnych (Leigh & Wyn Jones, 1986) gwarantuje, że kanały typu FV pozostają zamknięte w spoczynkowych warunkach. Dodatkowym czynnikiem hamującym kanały FV są występujące w cytozolu roślin poliaminy, takie jak: spermina, spermidyna i putrescyna (Dobrovinskaya, Muniz, & Pottosin, 1999).

W odróżnieniu od kanałów typu FV, kanały typu VK zdają się brać udział w procesie zamykania szparek. Otwierają się przy $[Ca^{2+}]_{cyt}$ rzędu μM , a więc w warunkach jakie przejściowo występują w komórkach przysparkowych po zadziałaniu czynników powodujących szybkie zamykanie szparek (Blatt, 1999; McAinsh, Brownlee & Hetherington, 1997; MacRobbie, 1997). Kanały VK

są wysoce selektywne dla jonów K^+ . Nie wykazują właściwości prostujących. Są stosunkowo słabo zależne od pH. Wykazują optimum aktywacji przy pH ok. 6,5 (Allen *et al.*, 1998). Przewodnictwo pojedynczych kanałów VK w symetrycznym 100 mM roztworze KCl wynosi 70 pS (Ward & Schroeder, 1994).

Kanały typu SV należą do najczęściej badanych i przez to do najlepiej poznanych kanałów jonowych w tonoplaście. Występują u niemal każdej z badanych dotąd komórek roślinnych, z wyjątkiem glonów. Charakteryzują się stosunkowo długim czasem aktywacji (200-100 ms) — stąd ich nazwa. Przewodnictwo jednostkowe w 100 mM KCl zawiera się w przedziale 50-250 pS. Całkowity prąd niesiony przez kanały typu SV mierzony w układzie "whole-vacuole" (analogicznym do "whole-cell") wynosi od 1 do 5 A/m² (przy potencjale +100 mV). W warunkach fizjologicznych przenoszą głównie prąd potasowy, chociaż ich przepuszczalność dla jonów Ca^{2+} jest niemniejsza niż dla K^+ (Ward & Schroeder, 1994). Kanały typu SV mają silne właściwości prostujące. Otwierają się niemal wyłącznie przy dodatnich potencjałach (zgodnie z konwencją, że różnica potencjałów w poprzek tonoplastu określana jest między cytozolem a wnętrzem wakuoli). To sprawia, że w fizjologicznym zakresie potencjałów tonoplastu przy założeniu jednakowych stężeń jonów K^+ po obu stronach błony, kanały typu SV powinny być zamknięte. Wyjątkiem są komórki przysparkowe, gdzie wspomniany już gradient potencjału elektrochemicznego dla potasu pozwala na otwieranie kanałów SV i niewielki prąd nawet przy potencjale spoczynkowym. Wspomniano też o aktywacji kanałów SV przez jony Ca^{2+} od strony cytozolu w stężeniu znacznie przekraczającym fizjologiczne granice. Pomimo tych własności kanałów SV uznano je za odpowiedzialne za tzw. indukowane wapniem wyrzucanie wapnia (ang. calcium induced calcium release, CICR). Ilość jonów Ca^{2+} przedostających się przez plazmalemmę do cytozolu po zadziałaniu odpowiednich bodźców jest niewystarczająca do wywołania reakcji fizjologicznych rejestrowanych po stymulacji. Mogłaby jednak wystarczyć do wyrzucenia na drodze CICR jonów Ca^{2+} z wakuoli i innych wewnątrz-komórkowych zasobów, a tym samym do wzmocnienia sygnału wapniowego w cytozolu (Ward & Schroeder, 1994). Postulowany udział kanałów SV w CICR został zakwestionowany na gruncie ilościowym (Pottosin, Tikhonova, Hedrich & Schönknecht, 1997). Ostatnio problem ten powrócił, kiedy stwierdzono, że jony Mg^{2+} w stężeniu 1-10 mM zwiększają podatność kanałów SV na wapń. W obecności Mg^{2+} kanały te otwierały się już przy

$[Ca^{2+}]_{cvt}$ ok. $1 \mu M$ (Pei et al., 1999). Otwartym pozostaje jednak wciąż pytanie: czy bez CICR, w którym mogą wziąć udział kanały SV dopiero po aktywacji, stężenie wolnych jonów Ca^{2+} w cytozolu może osiągnąć wartość rzędu $1 \mu M$. Ponadto kanały SV są nie tylko w komórkach przyspawkowych mających znaczny gradient jonów K^+ w poprzek tonoplastu, ale niemal we wszystkich tkankach, u których takiego gradientu się nie stwierdza (Trębacz, Simonis & Schönknecht, 1994). Czyżby więc ewolucja pozostawiła kanały SV o bodaj największej gęstości powierzchniowej w tonoplaście sięgającej $1/\mu m^2$ nie "powierzając" im żadnej funkcji fizjologicznej? Odpowiedzi na to pytanie należy szukać sprawdzając wpływ innych czynników obecnych zwykle w cytozolu na funkcjonowanie kanałów SV. Wiele takich czynników już przebadano. Stwierdzono m.in., że obecność MgATP po stronie cytozolowej zwiększa prawie dwukrotnie stałą czasową aktywacji (Trębacz & Schönknecht, 2001). Aktywność kanałów SV zależy również od stopnia ich ufosforylowania. Są one aktywowane zarówno przez zależne od kalmoduliny kinazy (CDPK) jak i fosfatazy wrażliwe na kwas okadajowy, zaś inhibowane przez zależne od Ca^{2+} fosfatazy białkowe (Allen & Sanders, 1995; Bethke & Jones, 1997). Przypuszcza się, że kanały SV mają co najmniej dwa miejsca regulatorowe ulegające odwracalnej fosforylacji (Bethke & Jones, 1997). Kanały SV są ponadto regulowane za pośrednictwem białek 14-3-3 (van der Wijngaard i in. 2001). Dodatek białka 14-3-3 po stronie cytozolowej zmniejsza o prawie 80% prąd przewodzony przez kanały SV. Poliaminy silnie inhibują kanały SV, podobnie jak to ma miejsce w przypadku kanałów FV (Dobrovinskaya et al., 1999). Inaczej niż w przypadku kanałów FV, poliaminy mogą przechodzić przez kanały SV przy wysokich dodatnich potencjałach, co czyni je dobrym narzędziem badawczym do określenia struktury kanału. Stosując poliaminy o różnej długości stwierdzono, że filtr selektywny kanału SV ma ok. 20 \AA długości i ok. $7,5 \text{ \AA}$ średnicy (Dobrovinskaya et al., 1999).

Mimo dość intensywne badania kanałów jonowych w tonoplaście komórek roślinnych wiele problemów pozostało jeszcze do rozwiązania. Jest wśród nich wskazanie i scharakteryzowanie kanałów odpowiedzialnych za potencjały czynnościowe na tonoplaście i określenie sposobów sprzężenia potencjałów czynnościowych plazmalemy i tonoplastu. Ponadto wciąż niejasnym pozostaje, w jaki sposób regulacja kanałów jonowych w tonoplaście przekłada się na zmiany apertury aparatów szparkowych i inne rytmiczne procesy u roślin.

LITERATURA

- Allen G. J., Amtmann A., Sanders D. (1998). Calcium-dependent and calcium-independent K^+ mobilization channels in *Vicia faba* guard cell vacuoles. *J. Exp. Bot.* **49**, 305-318.
- Allen G. J., Sanders D. (1995). Calcineurin, a type 2B protein phosphatase, modulates the Ca^{2+} -permeable slow vacuolar ion channel of stomatal guard cells. *Plant Cell* **7**, 1473-1483.
- Allen G. J., Sanders D. (1996). Control of ionic currents in guard cells vacuoles by cytosolic and luminal calcium. *Plant J.* **10**, 1055-1069.
- Allen G. J. & Sanders D. (1997). Vacuolar ion channels of higher plants. *Adv. Bot. Res.* **39**, 14-217-252.
- Bethke P. C. & Jones R. L. (1997). Reversible protein phosphorylation regulates the activity of the slow-vacuolar channel. *Plant J.* **11**, 1227-1235.
- Blatt M. R. (1999). Reassessing roles for Ca^{2+} in guard cell signalling. *J. Exp. Bot.* **50**, 989-999.
- Brüggemann L. I., Pottosin I. I., Schönknecht G. (1999). Cytoplasmic magnesium regulates the fast activating vacuolar cation channel. *J. Exp. Bot.* **50**, 1547-1552.
- Dobrovinskaya O. R., Muniz J., Pottosin I. I. (1999). Inhibition of vacuolar ion channels by polyamines. *J. Membrane Biol.* **167**, 127-140.
- Król E., Trębacz K. (2000). Ways of ion channel gating in plant cells. *Ann. Bot.* **86**, 449-469.
- Leigh R. A., Wyn Jones R. G. (1986). Cellular compartmentation in plant nutrition: the selective cytoplasm and promiscuous vacuole. [w:] B. Trinker, A. Läuchli eds. *Advances in Plant Nutrition 2*. Praeger Scientific, New York, s. 249 - 279.
- MacRobbie E. A. C. (1997). Signal transduction and ion channels in guard cells. *J. Exp. Bot.* **48**, 515-528.
- McAinsh M. R., Brownlee C., Hetherington A. M. (1997). Calcium ions as second messengers in guard cell signal transduction. *Physiol. Plant.* **100**, 16-29.
- Pei Z. M., Ward J. M., Schroeder J. I. (1999). Magnesium sensitizes slow vacuolar channels to physiological cytosolic calcium and inhibits fast vacuolar channels in fava bean guard cell vacuoles. *Plant Physiol.* **121**, 977-986.
- Pottosin I. I., Tikhonova L. I., Hedrich R., Schönknecht G. (1997). Slowly activating vacuolar channels can not mediate Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release. *Plant J.* **12**, 1387-1398.
- Schulz-Lessdorf B., Hedrich R. (1995). Protons and calcium modulate SV-type channels in the vacuolar-lysosomal compartment - channel interaction with calmodulin inhibitors. *Planta* **197**, 655-671.
- Trębacz K., Schönknecht G. (2000). Simple method to isolate vacuoles and protoplasts for patch-clamp experiments. *Protoplasma* **213**, 39-45.
- Trębacz K., Schönknecht G. (2001). Ion channels in the tonoplast of the liverwort *Conocephalum conicum*. *Proceedings of the 12th International Workshop on Plant Membrane Biology*. Madison WI, USA (w druku).
- Trębacz K., Simonis W., Schönknecht G. (1994). Cytoplasmic Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , and NO_3^- activities in the

- liverwort *Conocephalum conicum* L. at rest and during action potentials. *Plant Physiol.* **106**, 1073-1084.
- Trębacz K., Stolarz M., Dziubińska H., Zawadzki T. (1997). Electrical control of plant development. [w:] *Travelling Shot on Plant Development*. H. Greppin, C. Pennel & P. Simon (eds.). University of Geneva. pp. 163 - 179.
- Ward J. M, Schroeder J. I. (1994). Calcium-activated K⁺ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure. *Plant Cell* **6**, 669-683.