

POMPY PROTONOWE PLAZMOLEMY I ICH REGULACJA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

THE PLASMA MEMBRANE PROTON PUMPS AND THEIR REGULATION IN PLANT CELLS

Ewa MŁODZIŃSKA, Grażyna KŁOBUS

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie: Stężenie jonów wodorowych jest wielokrotnie wyższe na zewnątrz komórki niż w jej wnętrzu. Ta różnica utrzymywana jest dzięki obecności w plazmolemie pierwotnych pomp protonowych (H^+), które sprzęgają transport protonów z procesem uwalniania energii. Źródłem energii jest hydroliza ATP i dlatego białka te traktowane są jako enzymy mające właściwości ATP-az. Pompa protonowa wykorzystuje ATP jako substrat i wyrzuca H^+ z komórki, a to powoduje ich asymetryczne rozmieszczenie i powstanie gradientu elektrochemicznego, który wykorzystywany jest w wielu procesach fizjologicznych m.in. we wzroście komórek, osmoregulacji i transporcie substancji do wnętrza komórki. W ciągu ostatnich 15 lat poświęcono wiele uwagi zagadnieniom związanym z regulacją potranslacyjną H^+ ATP-az przez różne bodźce egzo- i endogenne o charakterze chemicznym (hormony, NaCl) i fizycznym (temperatura, uszkodzenia mechaniczne). A dynamiczny rozwój badań w dziedzinie biologii molekularnej pozwolił na odkrycie wielu nowych informacji na temat ich genetyki. H^+ ATP-aza jest kodowana przez złożoną rodzinę genów sklasyfikowanych w 5 podrodzinach, z których dwie (I i II) ulegają ekspresji w wielu organach i tkankach, a trzy pozostałe tylko w określonych warunkach, np. w niektórych stadiach rozwoju roślin. Z uwagi na kluczową rolę pomp protonowych w utrzymaniu wielu procesów fizjologicznych w komórce, niezbędna jest ich precyzyjna regulacja na poziomie transkrypcyjnym i posttranslacyjnym, ale mechanizmy tej regulacji nie są do końca poznane. Niniejszy artykuł jest próbą syntezy wiedzy o obu poziomach kontroli i funkcjonowaniu plazmolemowych pomp protonowych w komórkach roślinnych.

Słowa kluczowe: H^+ ATP-aza, plazmolema, izoformy, ekspresja genów, regulacja.

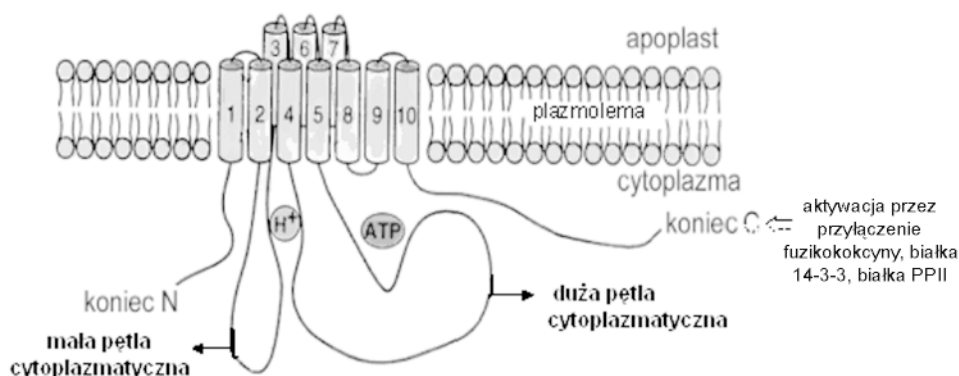
Summary: The extracellular concentration of protons is much higher than intracellular its level. Responsible for generation and maintaining this difference is the proton pump (H^+) present in the outer cell membrane. A proton pump uses ATP as a substrate and expels H^+ from the cell; consequently, the ions are asymmetrically located and the electrochemical gradient appears, which is used in many physiological processes such as cellular growth, osmoregulation and transport of substances into the cell. During the last 15 years much attention was drawn to the issues related to post-translational regulation of H^+ ATPases by different exogenic and endogenic stimuli of chemical nature (hormones, NaCl) and physical nature (temperature, mechanical damage). A dynamic development of research in the field of molecular biology allowed

to learn much more about their genetics. H^+ ATPase is encoded by a complex family of genes classified into 5 subfamilies, two of which (I and II) are widely expressed in many organs and tissues, whereas remaining three only in specified conditions such as some stages of plant development. Taking into account a key role of proton pumps in maintaining many physiological processes in the cell, their precise regulation at the transcriptional and post-translation levels is indispensable; however, the mechanisms of such regulation are not fully known. This article is an attempt to synthesise the knowledge regarding both levels of control as well as functions of plasmalemma proton pumps in plant cells physiology.

Key words: H^+ ATPase, plasma membrane, isoforms, gene expression, regulation.

WSTĘP

O ile w komórkach zwierząt za utrzymanie gradientu elektrochemicznego błony komórkowej jest odpowiedzialna Na^+-K^+ ATP-aza, o tyle w komórkach zarówno roślin, jak i bakterii i grzybów (w tym drożdży) gradient ten jest tworzony zazwyczaj przez H^+ ATP-azę, należącą do rodziny pierwotnych transporterów typu P [57,59]. Wykorzystując energię z hydrolizy trifosforanu adenozy (ATP) pompa protonowa prowadzi do jednokierunkowej translokacji H^+ na zewnątrz komórki. Takie przemieszczenie jonów wodorowych powoduje ich asymetryczne rozmieszczenie i generuje gradient elektrochemiczny, który jest wykorzystywany w komórce w podstawowych procesach fizjologicznych, takich jak: regulacja wewnątrzkomórkowego pH, utrzymanie turgoru i związane z nim procesy (otwieranie aparatów szparkowych, ruchy organów), kiełkowanie (szczególnie w fazie imbibicji), „kwaśny” wzrost komórek oraz transport składników odżywczych w drodze symportu i antyportu [4, 5, 17, 49]. H^+ ATP-aza uczestniczy ponadto w adaptacjach do warunków stresowych, pojawiających się podczas całego życia rośliny (zasolenie, uszkodzenia mechaniczne, atak patogenów, wysoka i niska temperatura, stres związany z niedoborem składników mineralnych w środowisku) [35, 40, 52, 65, 72].



RYCINA 1. Struktura plazmolemowej pompy protonowej występującej w komórkach roślinnych (wg Portillo [2000] zmodyfikowane)

Roślinna H^+ ATP-aza jest białkiem monomerycznym o masie cząsteczkowej ok. 100 kDa, którego skład aminokwasowy został określony na podstawie poznanych sekwencji nukleotydowych genów kodujących ten enzym. Stosując badania krystalograficzne ujawniono, że strukturę białka pompy protonowej stanowi łańcuch polipeptydowy, którego 10–12 fragmentów w formie α -helis przenika przez plazmolemę, a rozbudowana część hydrofilowa z dużą i małą pętlą znajduje się po stronie cytoplazmatycznej [49, 68]. Duża pętla cytoplazmatyczna zawiera miejsce wiązania i hydrolizowania ATP, a mała stanowi miejsce sprzężenia pomiędzy transportem protonów a domeną hydrolityczną. Koniec łańcucha C i N również znajdują się po stronie cytoplazmatycznej (ryc. 1). Terminalny fragment łańcucha stanowi region autoinhibitorowy białka, który poprzez interakcję z regionem katalitycznym, zasłaniając miejsce wiązania ATP i kanał protonowy, prowadzi do inaktywacji pompy protonowej.

Aktywność H^+ ATP-azy jest hamowana przez ortowanadan, który jest inhibitorem kompetencyjnym ATP-az typu P, ponieważ łączy się z ufosforylowaną formą enzymu i blokuje jego aktywność. Podobne działanie inhibitorowe wykazują dietylostilbesterol, dicykloheksylokarbodiimid i erytrozyna B [45].

Z uwagi na udział w podstawowych procesach metabolicznych tego enzymu określanego przez badaczy anglosaskich jako „*master*” podlega on bardzo czułej regulacji na poziomie transkrypcyjnym i postranslacyjnym. Obydwa poziomy kontroli są obiektem nieustannych badań, które mają przybliżyć mechanizmy działania pomp protonowych w komórkach roślinnych.

REGULACJA EKSPRESJI GENÓW PLAZMOLEMOWEJ POMPY PROTONOWEJ

Roślinna H^+ ATP-aza jest kodowana przez złożoną rodzinę genów (rodzina multigenowa). Jakkolwiek funkcje fizjologiczne wielu izoform H^+ ATPazy nie są jeszcze wyjaśnione, to jednak powszechnie uważa się, iż odpowiadają one za utrzymanie prawidłowego, podstawowego metabolizmu komórkowego (ang. *housekeeping enzymes*). Multigenowe rodziny jednostek dziedziczenia z indywidualnymi promotorami umożliwiają różną ekspresję każdej izoformy H^+ ATP-azy w zależności od funkcji, miejsca występowania, stanu fizjologicznego i stadium rozwojowego komórki roślinnej [2, 3]. Różnorodny poziom ekspresji genów kodujących H^+ ATP-azę może być regulowany zarówno przez sygnały środowiska, jak i hormony. Być może więc takie bogactwo genów umożliwia indywidualne dopasowanie enzymu do każdego typu komórki lub/i do funkcji, jakie ma w niej pełnić pompa protonowa. Szczegółowe przeszukiwanie cDNA i bibliotek genomowych pozwoliło na dokładną identyfikację następujących genów plazmolemowej pompy protonowej (tab. 1) Wszystkie zidentyfikowane geny plazmolemowej pompy protonowej zostały sklasyfikowane w 5 podrodzin (I, II, III, IV, V) na podstawie filogenetycznych podobieństw i analiz porównawczych sekwencji nukleotydowych [2]. Geny, których ekspresja zachodzi na wysokim poziomie w wielu

TABELA 1. Tkankowa i organowa ekspresja zidentyfikowanych genów H⁺ATP-azy u wybranych gatunków roślin, numer dostępu wg *National Center for Biotechnology Information* – NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Gen	Numer dostępu NCBI	Lokalizacja produktu białkowego w organach/tkankach	Literatura
<i>Arabidopsis thaliana</i>			
<i>AHA1</i> <i>AHA2</i> <i>AHA3</i> <i>AHA4</i> <i>AHA5</i> <i>AHA6</i> <i>AHA7</i> <i>AHA8</i> <i>AHA9</i> <i>AHA10</i> <i>AHA11</i>	J05570 X73676 S74033	korzenie/łodygi korzenie /epiderma komórki towarzyszące floemu korzenie/kwiaty worki pyłkowe pręcików rozwijające się nasiona	[2] [2] [30] [2] [16] [30] [2] [2] [7] [7]
<i>Oryza sativa</i>			
<i>OSA1</i> <i>OSA2</i> <i>OSA3</i> <i>OSA4</i> <i>OSA5</i> <i>OSA6</i> <i>OSA7</i> <i>OSA8</i> <i>OSA9</i> <i>OSA10</i>	D10207 D31843 AF110268 AJ440001 AJ440216 AJ440217 AJ440219 AJ440219 AJ440219 AJ440220 AJ440221		[2] [2] [2] [2] [2] [2] [2] [2] [2] [2]
<i>Nicotiana glauca</i>			
<i>PMA1</i> <i>PMA2</i> <i>PMA3</i> <i>PMA4</i> <i>PMA5</i> <i>PMA6</i> <i>PMA7</i> <i>PMA8</i> <i>PMA9</i>	M80489 M80492 M80490-1 X66737 	korzenie/łodygi/liście/kwiaty/komórki szparkowe korzenie/liście/kwiaty/floem/komórki szparkowe kwiaty /komórki szparkowe kwiaty /korzenie/floem/komórki szparkowe floem liście/kwiaty /w mechanicznie uszkodzonych tkankach łodygi /liście floem	[2] [56] [2] [58] [48] [55] [2] [53] [53] [53]

TABELA 1 cd.

Gen	Nr dostępu NCBI	Lokalizacja produktu białkowego w organach/tkankach	Literatura
Lycopersicon esculentum			
LHA1	M60166	korzenie/kodygi/liście/kwiaty/owoce	[2] [19] [20]
LHA2	AF179442	korzenie/kodygi/liście/kwiaty/owoce/ symbioza z grzybem	[2] [20] [22]
LHA3	U263917	korzenie/kodygi/liście/kwiaty/owoce	[19]
LHA4		korzenie/liście	[2]
LHA5		korzenie/liście	[19]
LHA6		korzenie/liście	[19]
LHA7	AF263917	korzenie/liście/ po traktowaniu NaCl	[31]
LHA8			
Vicia faba			
VHA1	U38965	liście/komórki szparkowe, mezofil	[2] [50]
VHA2		liście/komórki szparkowe, mezofil	[2] [50]
VHA3			
VHA4			
VHA5			
Zea mays			
MHA1	U09989	korzenie	[66]
MHA2	X85805	korzenie/kodygi/liście	[66]
MHA3	AJ441084	korzenie/wrażliwe na NO ₃ ⁻	[66] [67]
MHA4	AJ539534	korzenie/wrażliwe na NO ₃ ⁻	[66] [67]
Cucumis sativus			
CsHA1	AJ703810	korzenie/wrażliwe na niedobór Fe ²⁺	[dane niepublikowane]
CsHA2	AJ703811	korzenie/liście	
	AF289025	korzenie/wrażliwe na odżywianie azotowe	
Solanum tuberosum			
PHA1	X76536	liście/korzenie/bulwy	[29]
PHA2	X76535	liście/korzenie/bulwy	[29]

organach, bez względu na miejsce występowania, stan fizjologiczny i rozwojowy komórki roślinnej, zaliczono do I i II podrodziny. Natomiast geny, których ekspresja jest tkankowo specyficzna, czy też ograniczona do określonego stadium rozwoju bądź indukowana określonymi bodźcami endogennymi (czynniki transkrypcyjne, hormony) lub egzogennymi (stres solny, uszkodzenia mechaniczne) zostały przyporządkowane trzem pozostałym podrodzinom (III, IV, V). Genowa kompozycja (wzór ułożenia intronów) i analiza ekspresji różni się między gatunkami roślin w obrębie tych pięciu podrodzin. Ponadto heterologiczna ekspresja w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* ujawniła,

że różne izoformy należące do jednej podrodziny mają odmienne właściwości biochemiczne i regulatorowe, ale mogą współistnieć w jednym typie komórek. I tak, produkty genów *AHA1*, 2 należące do II podrodziny wykazują różnice w parametrach K_m i V_{max} , ale mają zbliżone powinowactwo do ATP i wanadanu, podczas gdy podobne do nich w 88% białko kodowane przez geny *AHA3*, charakteryzuje się niższym powinowactwem do obu tych substancji [2].

Biochemiczna charakterystyka izoform PMA2 i PMA4 (II podrodzina), które ulegają ekspresji w komórkach drożdży, ujawniła znaczne różnice w optimum pH, a także różną wrażliwość na lizofosfatydylocholinę [32]. PMA4 wykazywał wyższą aktywność przy niskim pH. Hipotetyczne wyjaśnienie tego zjawiska opiera się na mniejszej kontroli PMA4 przez domenę autoinhibitorową, niż ma to miejsce dla PMA2, co przyczynia się do wyższej aktywności w wypompowywaniu H^+ . Pojedynczo regulowane enzymy, które wykazują odmienne właściwości kinetyczne, mogą łatwiej przystosować komórki do zmiennych warunków środowiska.

Wysoka ekspresja *PMA1*, 2 i 3, zachodząca tylko w komórkach szparkowych i w kwiatach [48, 58], wydaje się być uwarunkowana wiekiem i czynnikami zewnętrznymi. W komórkach szparkowych *Nicotiana plumbaginifolia* podczas optymalnych warunków wzrostu ekspresja genu *PMA1* jest często niewykrywalna, natomiast gdy młode liście zostaną zanurzone na kilka godzin w wodzie lub w pożywce o bogatym składzie mineralnym, poziom ekspresji tego genu gwałtownie rośnie [45]. Wysoki poziom transkryptu tych trzech izoform w kwiatach można z kolei tłumaczyć specyfiką organu, bowiem w trakcie rozwoju kwiatów wzrasta zapotrzebowanie na metabolity, czerpane przecież z innych tkanek w drodze wtórnego, aktywnego transportu z udziałem H^+ ATP-azy.

Jeden z genów tytoniowych (*PMA6*) charakteryzował się podwyższoną ekspresją w warunkach stresu mechanicznego, sugerując udział tej izoformy w tkankach narażonych na uszkodzenie mechaniczne [55]. Udowodniono także, że ekspresja genów pompy protonowej była wyższa podczas stresu solnego [51]. NaCl indukował wzrost mRNA H^+ ATP-azy zarówno u glikofitów (podczas stresu solnego w korzeniach *Nicotiana plumbaginifolia* aktywowana jest ekspresja genów *PMA2*, *pma4*, *pma5*), jak i u halofitów [51, 58]. U tych ostatnich podwyższony poziom mRNA i synteza *de novo* H^+ ATP-azy może stanowić mechanizm adaptacyjny i decydować o tolerancji tej grupy roślin na zasolenie.

Scharakteryzowano także jedną z izoform plazmolemowych pomp protonowych, która może odgrywać rolę w odpowiedzi pomidorów na stres solny. Obserwowano akumulację transkryptu *LHA8* w liściach i w korzeniach, po ekspozycji roślin na NaCl. Indukcja ta wydawała się być specyficznie wywoływana raczej przez komponent jonowy, a nie stres osmotyczny, ponieważ zastąpienie soli polietylenoglikolem nie wpływało na poziom ekspresji tego genu [31]. Transport Na^+ i Cl^- przez błony jest zależny od gradientu elektrochemicznego wytworzonego przez pompę protonową. W ten sposób regulacja ekspresji genów kodujących H^+ ATP-azy i kontrola jej aktywności na poziomie białka może stanowić ważny element komórkowy, warunkujący tolerancję na zasolenie. Ta tolerancja wydaje się być związana z gatunkiem roślin, a nawet z indywidualnymi cechami odmianowymi w obrębie tego samego gatunku. Badano dwie odmiany

pszenicy YJ24 i LH20 różniące się między sobą wrażliwością na traktowanie NaCl. Przy 150 mM NaCl zauważono dużo silniejsze zahamowanie wzrostu odmiany YJ24 niż odmiany LH20. W dodatku, w odpowiedzi na działanie soli zanotowano wyższy stopień przepuszczalności błon komórkowych u odmiany YJ24 w porównaniu z LH20. Analiza peroksydacji lipidów w pęcherzykach plazmolemowych wskazywała, że traktowanie chlorkiem sodu powoduje znacznie większe uszkodzenia lipidów w błonach odmiany YJ24 niż u LH20. Z kolei analizy Western-blot ujawniły mniejszą ilość białka H^+ ATP-azy w korzeniach YJ24 eksponowanych przez 72 h na 100 mM NaCl, co mogło być efektem degradacji białka enzymatycznego lub zahamowania jego syntezy. Natomiast wzrost aktywności tego enzymu w korzeniach LH20 mógł być związany ze zmianą w ekspresji genów kodujących ten enzym podczas stresu solnego [77].

Sklonowano również inne geny kodujące plazmolemową pompę protonową u pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.) (tab. 1). Analizy Northern-blot wykazały, że transkrypty *LHA1*, *LHA2*, *LHA4* były widoczne we wszystkich badanych organach (korzenie, łodygi, liścienie, liście, zielone i dojrzałe, czerwone owoce), jednak ich ilość różniła się w zależności od rodzaju tkanki. I tak, najwyższy poziom transkryptu *LHA1* znajdowano w dojrzałych owocach, a najniższy w korzeniach. Ekspresja *LHA2* w przeważającej części dotyczyła liścieni i liści i była prawie niewykrywalna w łodygach i korzeniach. W przeciwieństwie do *LHA2*, mRNA *LHA4* był obecny głównie w korzeniach [19, 20]. Natomiast analizy izoform *LHA3*, 5, 6, 7 ujawniły, że izoformy te są bardzo słabo wykrywalne, co hipotetycznie może być związane z regulowaniem ich przez do tej pory niezidentyfikowane czynniki środowiska bądź bodźce endogenne [20]. Interesujące są również wyniki eksperymentów genetycznych dotyczące wpływu światła i cukrów na ekspresję genu *LHA4*. Ilość transkryptu była 2,5-krotnie wyższa w hypocotylach roślin uprawianych w ciemności w porównaniu z roślinami poddanymi optymalnemu oświetleniu. Poza tym akumulacja mRNA *LHA2* i *LHA4* była indukowana po dodaniu do pożywek 100 mM cukrów (glukozy, fruktozy i sacharozy) i ta indukcja wydawała się być uzależniona od pobierania i metabolizmu węglowodanów, ponieważ mannitol i 3-O-metyloglukoza nie zmieniały kumulacji transkryptu tych trzech genów. Można, więc przyjąć, że w aktywacji genów przez światło pośredniczą cukry [46].

Z kolei badania na korzeniach pomidora, żyjących w symbiozie z grzybem *Glomus mosseae*, wykazały, że o aktywności plazmolemowych pomp protonowych decyduje obecność partnera grzybowego. W korzeniach pomidorów zainfekowanych grzybem obserwowano spadek ekspresji genu *LHA1*, natomiast wzrost poziomu mRNA genu *LHA2*. Nie zanotowano natomiast żadnych zmian w poziomie ekspresji genu *LHA4*. Selektywną indukcję *LHA2* można tłumaczyć tym, że białko LHA2 odpowiada prawdopodobnie za generowanie gradientu potencjału elektrochemicznego w błonach przylegających do strzępek grzyba, co jest niezbędne dla aktywnego transportu fosforanów (symport H^+ /fosforan) do symbiotycznej przestrzeni komórek kortykalnych korzeni [22]. Symbioza mikoryzowa zmieniała również wzór ekspresji jednej z izoform genu u *Glomus mosseae* (*GmPMA5*), która osiągała 12-krotnie wyższy poziom w trakcie kontaktu z gospodarzem roślinnym [62]. Analiza białek błonowych metodą Western-blot, z użyciem przeciwciał skierowanych przeciwko H^+ ATP-azie *Arabidopsis*

thaliana ujawniła, że w komórkach korzeni żyjących w układzie symbiotycznym ilość tego białka była większa. W dodatku pęcherzyki błonowe izolowane z korzeni mikoryzowych wykazywały wyższą aktywność H^+ ATP-azy wrażliwej na wanadan niż błony pochodzące z roślin niezwiązanych z komponentem grzybowym. Niektórzy autorzy sugerują jednak, że mikoryza może regulować aktywność H^+ ATP-azy także poprzez lepsze sprzężenie transportu protonów z hydrolizą ATP. Obserwowano bowiem, że mikoryza indukowała prawie 2-krotny wzrost w tempie pompowania H^+ bez istotnych zmian w szybkości hydrolizy ATP. Nie wyjaśniono do tej pory mechanizmu tego zjawiska [8].

Zostało również udowodnione, że aktywacja i hamowanie H^+ ATP-azy w kulturach komórkowych pomidora w drodze transkrypcyjnej i potranslacyjnej może być skutkiem reakcji roślin na infekcje przez patogenów czy zranienia [69]. Podobne wyniki otrzymano z doświadczeń na buraku cukrowym, wykazano bowiem, że zmiany aktywności plazmolekowej pompy protonowej zachodzą na poziomie genu i gotowego białkowego produktu w trakcie stresu mechanicznego [52].

Badania molekularne na różnych gatunkach roślin ilustrowały zmiany w poziomach mRNA w zależności od warunków zewnętrznych. Obserwowano zwiększony poziom transkryptów w odpowiedzi na traktowanie auksyną [33, 34, 38], niski potencjał wodny [10] i niskie pH [14]. Dość dokładnie opisano wpływ niskiego zewnątrzkomórkowego pH na wzrost poziomu ekspresji genów u dwóch gatunków glonów *Dunaliella acidifolia* i *D. salina*. W obu przypadkach niskie wartości pH prowadziły do nadekspresji genów kodujących plazmolekowe pompy protonowe, przy czym odpowiedź kwasolubnego glonu *D. acidifolia* wydaje się konstytutywna, natomiast u *D. salina* ma charakter indukcyjny. Wysoki wzrost poziomu ekspresji genu kodującego H^+ ATP-azę u *D. salina* występował po 12 godzinach od przeniesienia tych glonów z pH = 9,0 (warunki kontrolne) do pH = 7,0 [74]. Pompa protonowa w komórkach bakterii kwaśnolubnych *Oenococcus oeni* była również indukowana niskim pH, a jej aktywacja, jak wykazano, mogła odbywać się na poziomie genetycznym, ponieważ komórki bakterii, które rosły przy niskim odczynie (pH = 3,5), miały wyższą zawartość mRNA kodującego plazmolekową H^+ ATP-azę [24]. Jednak podobne badania przeprowadzone na plazmolekowej pompie protonowej z korzeni słonecznika nie ujawniły różnic w aktywności i ilości enzymu podczas zakwaszania czy alkalizacji środowiska zewnętrznego [63].

Także przejściowe spadki temperatur (6–10°C) uruchamiają procesy prowadzące do aktywacji ATP-az. Początkowy wzrost aktywności H^+ ATP-azy w korzeniach ogórka jest odwracalny i stopniowo zmniejsza się w trakcie przedłużania czasu działania niskiej temperatury, co jest skorelowane z obniżoną ekspresją genu kodującego to markerowe białko plazmolemy [1]. W odpowiedzi na niską temperaturę następuje zwiększona ekspresja genów kodujących kinazy zależne od jonów wapnia [43], otwieranie kanałów wapniowych i wzrost stężenia kwasu abscysynowego, a to najprawdopodobniej prowadzi do aktywacji plazmolemowych pomp protonowych.

Wysoką ekspresję genu *NaPHA3* kodującego pompę protonową u *Nepenthes alata* stwierdzono również w warunkach niskiego pH w wyspecjalizowanych organach roślin owadożernych, np. w dzbankach. Z jednej strony niskie pH jest wymagane do aktywacji enzymów proteolitycznych, a z drugiej może aktywować H^+ ATP-azę, która generując gradient elektrochemiczny napędza pobieranie składników odżywczych z trawionych owadów [36].

Modyfikacje aktywności roślinnych pomp plazmolemowych na poziomie transkrypcyjnym mogą być wywoływane także przez dostępność określonych składników mineralnych. Analiza RT-PCR wykazała, że azotany już po trzech godzinach stymulują ekspresję genów *MHA3* i *MHA4* w korzeniach kukurydzy, chociaż odpowiedź była różna w tych obu przypadkach. Ilość transkryptu *MHA3* względem kontroli wewnętrznej (tubuliny) była wyższa o 50–70%, natomiast w przypadku *MHA4* – 120% w porównaniu z kontrolą [66]. Okazało się również, że obecność azotu w pożywce istotnie wpływa na plazmolemową pompę protonową w korzeniach ogórka, a to w jaki sposób zmieniała się jej aktywność, zależało od formy związku azotowego. I tak, obecność azotanów w pożywce wyraźnie stymulowała aktywność hydrolityczną i transporterową pompy, podczas gdy jony amonowe hamowały obie aktywności (dane niepublikowane). Udowodniono, że działanie azotanów i jonów amonowych na aktywność plazmolemowej pompy protonowej obejmowało zarówno poziom genetyczny, jak i różnorakie modyfikacje potranslacyjne. Najnowsze badania [65] dowiodły, że niedobór żelaza może także powodować wzrost transkryptu jednej z izoform *CsHA1* występującej tylko w korzeniach *Cucumis sativus* nawet o 160% w porównaniu z roślinami kontrolnymi, którym podawano Fe. Natomiast druga znaleziona izoforma *CsHA2* nie była wrażliwa na ten mikroelement, a jej obecność wykryto zarówno w korzeniach, jak i liściach ogórka. Należy przy tym zaznaczyć, że obydwie izoformy *CsHA1* i *CsHA2* należą do tej samej II podrodziny.

POTRANSLACYJNE MODYFIKACJE PLAZMOLEMOWEJ POMPY PROTONOWEJ

Szereg czynników środowiskowych reguluje katalityczną aktywność roślinnej H^+ ATP-azy na poziomie potranslacyjnym, poprzez modyfikacje struktury białka. Wiadomo, że koniec karboksylowy, tzw. C-koniec jest domeną regulatorową i pełni rolę autoinhibitorową. Odłączenie końca C (trawienie trypsyną), czy zmiany genetyczne (punktowe mutacje i delecje) zmieniające skład aminokwasowy łańcucha oraz inne modyfikacje, takie jak: fosforylacja wybranych reszt aminokwasowych Thr 947, Thr 948 przez specyficzne grupy kinaz (kinazy PKC oraz kinazy białkowe CDPK-zależne od jonów wapnia i kalmoduliny), a także przyłączenie aktywatorów typu fuzikokcyna, białko 14-3-3 do C końca pozwalają na przyjęcie przez enzym aktywnej konformacji (ryc. 1). Nie wyjaśniono natomiast jeszcze, jakie funkcje pełniłby koniec z wolną grupą aminokwasową (N-koniec) [25, 42, 56, 57, 61, 71].

Eksperymenty, w których zastosowano proteazy (trypsynę) i usunięto fragment C końca, wykazały, że aktywność enzymu wzrosła [56]. Wykazano także, że mutacje punktowe w regionie fragmentu C aktywują działalność H^+ ATP-azy. Mutacje te powodują identyczny efekt na końcu N enzymu. O tym, że region C pełni funkcje regulatorowe, przekonano się, gdy zbadano kinetykę roślinnego enzymu, którego ekspresja zachodziła w komórkach drożdży. Dowiedziono, że wszystkie mutanty, które

miały skrócony koniec C, wykazywały większą wrażliwość na wanadan i charakteryzowały się wyższą aktywnością enzymatyczną w porównaniu z roślinami kontrolnymi z normalną długością końca węglowego [61].

Jak ujawniono, przynajmniej jedna z reszt serynowych lub treoninowych domeny autoinhibitorowej ulega odwracalnej fosforylacji. Fosforylacja aminokwasów końca C łańcucha polipeptydowego powoduje wzrost aktywności enzymu, więc zasadnicza modyfikacja potranslacyjna plazmolemowej H^+ ATP-azy u roślin i grzybów polega na fosforylacji białka enzymatycznego. Obecnie wiadomo, że fosforylacja białka jest niezbędna dla jego aktywacji. W procesie fosforylacji mogą uczestniczyć kinazy serynowo/treoninowe (należące do kinaz typu PKC) oraz kinazy białkowe (CDPK) zależne od jonów wapnia i kalmoduliny [42,64]. Zastosowanie inhibitorów kinazy białkowej zależnej od Ca^{2+} powodowało zahamowanie transportu H^+ [15, 27, 75]. Odmienne wyniki uzyskano z badań korzeni buraka czerwonego, w których udowodniono, że zależna od jonów wapnia fosforylacja H^+ ATP-azy hamuje jej aktywność enzymatyczną. Inhibicja ta była odwracalna po traktowaniu alkaliczną fosfatazą [39].

Dodatkowo przyłączenie białka 14-3-3 do ufosforylowanej reszty aminokwasowej na C końcu powodowało przejście enzymu ze stanu niskiej do wysokiej aktywności. Do przyłączenia białka 14-3-3 wymagana jest jedynie fosforylacja pompy protonowej. Po przyłączeniu do ufosforylowanej reszty seryny bądź treoniny białko 14-3-3 powoduje odsunięcie odcinka autoinhibitorowego od domeny katalitycznej [13, 71]. Białka 14-3-3 są klasą białek obecnych we wszystkich organizmach eukariotycznych i funkcjonują jako aktywatory wielu kluczowych enzymów metabolizmu węglowego i azotowego w komórce [13, 41].

Roślinna H^+ ATP-aza jest również stymulowana przez toksyny grzybowe m.in. fuzikokcyne, produkowaną przez grzyba *Fusicoccum amygdali*. Toksyna ta prawdopodobnie działa na końcu C aktywując nieaktywny enzym, a nie indukując jego syntezy *de novo*. Fuzikokcyna promuje wiązanie białka 14-3-3 do ufosforylowanego końca węglowego. Najpierw wiąże się z 14-3-3, a potem kompleks ten wiąże się z ufosforylowaną domeną autoinhibitorową, odsłaniając domenę katalityczną i stabilizując aktywną konformację enzymu [53]. Stwierdzono, że roślinny receptor fuzikokcyny należy do rodziny białek 14-3-3. Związany z błoną receptor wiąże fuzikokcyne i kompleks ten aktywuje H^+ ATP-azę. Przypuszcza się, że zmiany metaboliczne wywołane przez fuzikokcyne mogą przebiegać przez swoiste reakcje fosforylacji, angażując kinazy białkowe. Białko 14-3-3 pełni, więc nie tylko funkcję receptora dla fuzikokcyny, ale reguluje również kinazy białkowe specyficzne dla H^+ ATP-azy [54]. Siringomycyna – toksyna z grzyba *Pseudomonas syringae* stymulowała także aktywność plazmolemowej H^+ ATP-azy w pęcherzykach izolowanych z łodyg ryżu, ale ten efekt był niwelowany przez dodanie Brij 58, a to sugerowałoby, że siringomycyna odwraca pęcherzyki i czyni je łatwiej dostępnymi dla ATP [6]. Inna toksyna – betikolina, produkowana przez patogeniczne grzyby *Cerospora beticola* hamuje aktywność H^+ ATP-azy wiążąc jony Mg^{2+} , a te wymagane są do katalizowania reakcji hydrolizy ATP przez enzym [26].

Najnowsze prace przedstawiają nowo zidentyfikowane na poziomie cDNA i wstępnie scharakteryzowane białko PPI1, które oddziałuje z C końcem H^+ ATP-azy powodując

przejście ze stanu niskiej do wysokiej aktywności. Stymulacja ta ma charakter synergistyczny, bowiem zachodzi również po wcześniejszym traktowaniu białka enzymatycznego fuzikokcyną, a także po usunięciu regionu C, dowodząc, że PPI1 może wchodzić w interakcje także powyżej C-końca [47].

Aktywność H^+ ATP-azy jest również regulowana przez lizofosfolipidy, które są naturalnymi detergentami wytwarzanymi w wyniku działania fosfolipazy i rozkładu fosfolipidów błonowych. Lizofosfolipidy (lizofosfocholiny) 2–3-krotnie zwiększają aktywność H^+ ATP-azy. Aktywacja enzymu może wynikać z bezpośredniego oddziaływania lizofosfolipidu na białko i ze zmian konformacyjnych, które prowadzą do odsłonięcia centrum aktywnego. Lizofosfocholiny podnosiły stopień hydrolizy ATP i transport H^+ , jednakże wzrost transportu protonów nie wynikał z jej właściwości detergentowych, ponieważ nie zwiększała ona przepuszczalności błony i pasywnego przepływu H^+ [32,57]. Niektórzy badacze uważają, że cholesterol i stigmasterol stymulują aktywność pompy protonowej, podczas gdy inne sterole działają jak inhibitory [45].

Udowodniono, że wiele środowiskowych czynników reguluje aktywność H^+ ATP-azy nie tylko poprzez zmienioną ekspresję genów, ale także w drodze modyfikacji potranslacyjnych. Modulacje te obejmują bezpośrednio zmiany w samej cząsteczce białka H^+ ATP-azy oraz mogą być związane ze zmianami składu frakcji lipidowej błony, co pośrednio również może regulować aktywność enzymu. I tak, światło niebieskie, [18, 79] uszkodzenia tkanek (patogeny) [23, 73, 78, 80], niskie pH [11, 21, 37, 76], zasolenie [9, 35, 70], niedobór żelaza [65] i fosforu [60] oraz obecność kwasów humusowych [12] aktywują H^+ ATPazę poprzez indukcję fosforylacji specyficznych reszt aminokwasowych w obrębie domeny autoinhibitorowej. Dość dokładnie poznano ścieżkę transdukcji sygnału prowadzącą do aktywacji pompy protonowej w warunkach stresu solnego u rzodkiewnika. Badania nad mutantami tych roślin wykazały, że podwyższone stężenie chlorku sodu aktywuje gen *SOS2* kodujący białko wiążące wapń i gen *SOS3* kodujący kinazę białkową. Kompleks *SOS2/SOS3* prawdopodobnie podwyższa aktywność H^+ ATP-azy w drodze fosforylacji, a wytworzona siła protonomotoryczna jest wykorzystywana do napędzania funkcjonującego w plazmolemie antyportera Na^+/H^+ [35, 70].

Wzrost aktywności enzymu poprzez jego zmiany ilościowe może być wywołany przez auksyny. H^+ ATP-aza jest syntetyzowana w retikulum endoplazmatycznym i stamtąd w wyniku egzocytozy jest wydzielana do cytoplazmy, a auksyny zwiększają sekrecyjny przepływ pęcherzyków z siateczki śródplazmatycznej i ich fuzję z plazmolemą [28].

PODSUMOWANIE

W wielu roślinach i mikroorganizmach transport protonów zależny od ATP związany jest głównie z regulacją równowagi jonowej i kojarzy się z pompą protonową, której działanie jest podobne do pompy sodowo-potasowej występującej w organizmach zwierzęcych.

Powszechnie wiadomo, że H^+ ATP-azy, z uwagi na istotny udział w podstawowych procesach fizjologicznych podlegają bardzo czulej regulacji, pozwalającej na adaptację

komórek do zmiennych warunków środowiska. Z danych literaturowych wynika, że czynniki, takie jak: zasolenie podłoża, stosunki wodne, warunki świetlne czy hormony roślinne, determinują aktywność enzymu. Niezależnie czy regulacja aktywności enzymu dotyczy poziomu ekspresji genu, czy modyfikacji potranslacyjnych gotowego produktu białkowego musi ona odbywać się bez zakłóceń na wszystkich jej poziomach, aby zapewnić optymalne funkcjonowanie H⁺ATP-azy w komórkach roślinnych.

LITERATURA

- [1] AHN SJ, IM YJ, CHUNG GC. Sensitivity of plasma membrane H⁺ATPase of cucumber root system in response to low root temperature. *Plant Cell Reports* 2000; **19**: 831–835.
- [2] ARANGO M, GEVAUDANT F, OUFATTOLE M, BOUTRY M. The plasma membrane proton pump ATP-ase: the significance of gene subfamilies. *Planta* 2003; **216**: 355–365.
- [3] AREND M, WEISENSEEL MH, BRUMMER M. Seasonal Changes of Plasma Membrane H⁺ATPase and Endogenous Ion Current during Cambial Growth in Poplar Plants. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1652–1663.
- [4] ARREDONDO CE, SANCHEZ-NIETO S, RENDON-HUERTA E, GONZALEZ-HALPHEN D, GAVILANES-RUIZ M, DIAZ-PONTONES D. The plasma membrane H⁺ATPase of maize embryos localizes in regions that are critical during the onset of germination. *Plant Sci* 2005; **169**: 11–19.
- [5] ASMMAN SM, HAUBRICK L. Transport proteins of the plasma membrane. *Curr Opin Cell Biol* 1999; **8**: 458–467.
- [6] BATOKO H, de KERCHOVE A, d'EXAERDE, BOUTRY M. Modulation of plant plasma membrane H⁺ATPase by phytotoxic lipopeptides produced by the plant pathogen *Pseudomonas fuscovagrine*. *BBA* 1998; **1372**: 216–226.
- [7] BAXTER I, TCHIEU J, SUSSMAN MR, BOUTRY M, PALMGREN MG, GRIBSKOV M, HARPER JF, AXELSEN KB. Genomic comparison of P-type ATPase Ion Pumps in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiol* 2003; **132**: 618–628.
- [8] BENABDELLAH K, AGUILAR C, FERROL N. Plasma membrane ATP-ase and H⁺ transport activities in microsomal membranes from mycorrhizal tomato roots. *J Exp Bot* 1999; **337**: 1349–1349.
- [9] BINZEL ML. NaCl induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H⁺ATPase message in tomato. *Plant Physiol* 1995; **94**: 722–728.
- [10] BOYER JS, SUROWY TK. Low water potentials affect expression of genes encoding vegetative storage proteins and plasma membrane proton ATPase in soybean. *Plant Mol Biol* 1991; **16**: 251–262.
- [11] BURGSTALLER W, MULLER B, SCHINNER F. The *in vivo* effect of glucose and extracellular pH on the plasma membrane H⁺ATPase of *Penicillium simplicissimum*. *FEMS Microbiol Let* 1997; **147**: 109–114.
- [12] CANELLAS LP, OLIVARES FL, OKOROKOVA AL. Humic Acids Isolated from Earthworm Compost Enhance Root Elongation, Lateral Root Emergence, and Plasma Membrane H⁺ATPase Activity in Maize Roots. *Plant Physiol* 2002; **130**: 1951–1957.
- [13] COMPAROT S, LINGIAH G, MARTIN T. Function and specificity of 14-3-3 proteins in the regulation of carbohydrate and nitrogen metabolism. *J Exp Bot* 2003; **54**; **382**: 595–604.
- [14] COSTA MS, de MEIS L. Regulation of plasma membrane H⁺ATPase from corn roots by Mg²⁺ and pH. *Biochimica et Biophysica Acta* 1996; **1279**: 214–218.
- [15] De NISI MP, DELL'ORTO L, PIROVANO ZOCCHI G. Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma membrane H⁺ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta* 1999; **209**: 187–194.
- [16] DE WITT N, HONG B, SUSSMAN MR, HARPER JF. Targeting of two *Arabidopsis* H⁺ATPase Isoforms to the Plasma Membrane. *Plant Physiol* 1996; **112**: 833–844.
- [17] DELROT S, ATANASSOVA R, GOMEZ E. Plasma membrane transporters: a machinery for uptake organic solutes and stress resistance. *Plant Sci* 2001; **161**: 391–404.
- [18] EMI T, KINOSHITA T, SHIMAZAKI K. Specific binding of vf 14-3-3a Isoform to the plasma Membrane H⁺ATP-ase in response to Blue Light and Fusicoccin in Guard Cells of Broad Bean. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1115–1125.

- [19] EWING NN, BENNETI AB. Assessment of the Number and Expression of P-Type H^+ ATPase Genes in Tomato. *Plant Physiol* 1994; **106**: 547–557.
- [20] EWING NN, WIMMERS LE, MAYER DJ. Molecular Cloning of Tomato Plasma Membrane H^+ ATPase. *Plant Physiol* 1990; **94**: 1874–1881.
- [21] FELLE HH. pH Signal and Messenger in Plant Cell. *Plant Biol* 2001; **3**: 577–559.
- [22] FERROL N, JOSE POZO M, ANTEIO M. Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H^+ ATPase gene expression in tomato plants. *J Exp Bot* 2002; **53**: 374: 1683–1687.
- [23] FINNIE CH, ANDERSEN CH, BORCH J. Do 14-3-3 proteins and plasma membrane H^+ ATPases interact in the barley epidermis in response to the barley powdery mildew fungus? *Plant Mol Biol* 2002; **49**: 137–147.
- [24] FORTIER LCH, TOURDOT-MARECHAL R, DIVIES Ch. Induction of *Oenococcus oeni* H^+ ATPase activity and mRNA transcription under acidic conditions. *FEMS Microbiol Let* 2003; **222**: 165–169.
- [25] FUGLSANG A, VISCONTI TS, DRUMM K. Binding of 14-3-3 Protein to the Plasma Membrane H^+ ATPase AHA2 Involves the Tree C-terminal Residues Tyr 946-Thy-Val and requires Phosphorylation of Thr 947. *J Biol Chem* 1999; **274**: 51: 36774–36780.
- [26] GOMES E, GORDON-WEEKS R, SIMON-PLAS F. *Cerospora beticola* toxins. Part XVII. The role of the beticolin/ Mg^{2+} complexes in their biological activity. *BBA* 1996; **1285**: 38–46.
- [27] GOOSSENS A, de la FUENTE N. Regulation of Yeast H^+ ATPase by protein Kinases Belonging to a Family Dedicated to Activation of Plasma Membrane Transporters. *Mol Cell Biol* 2000; **20**: 7654–7661.
- [28] HAGER A, DEBUS G, EDEL H. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of a high turnover pool of plasma membrane ATPase. *Planta* 1991; **185**: 527–537.
- [29] HARMS K, WOHNER RV, SCHULZ B, FROMMER WB. Isolation and characterization of P-type H^+ ATPase genes from potato. *Plant Mol Biol* 1994; **25**: 979–988.
- [30] HARPER JF, MANNEY L, DE WITT N, YOO MH, SUSSMAN MR. The *Arabidopsis thaliana* Plasma membrane H^+ ATPase Multigene. *J Biol Chem* 1990; **265**: 23: 13601–13608.
- [31] KALAMPANAYIL BD, WIMMERS LE. Identification and characterization of a salt-stress-induced plasma membrane H^+ ATPase in tomato. *Abstract Plant Cell Environment* 2001; **24**: 99.
- [32] KASANO K, SAKAKIBARA Y. The plasma membrane H^+ ATPase from higher plants: functional reconstruction into liposomes and its regulation by phospholipids. *Plant Sci* 1995; **111**: 117–131.
- [33] KIM D, KIM YS, JUNG J. Involvement of soluble proteinous factors in auxin-induced modulation of P-type ATPase in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *FEBS Letters* 1997; **409**: 273–276.
- [34] KLEBER N, ALBRECHTOVA JP, FLEIG S. Plasma Membrane H^+ ATPase is involved in Auxin-Mediated Cell Elongation during Wheat Embryo Development. *Plant Physiol* 2000; **131**: 1302–1312.
- [35] KŁOBUS G, JANICKA-RUSSAK M. Modulation by cytosolic components of proton pump activities in plasma membrane and tonoplast from *Cucumis sativus* roots during salt stress. *Physiol Plant* 2000; **121**: 84–92.
- [36] KOBAYASHI A, FUKUSAKI E, An Ch-II. Plasma Membrane H^+ ATPases are expressed in pitchers of the carnivorous plant *Nepenthes Blanco*. *Planta* 2001; **212**: 547–555.
- [37] KURKDJIAN A, GUERN J. Intracellular pH measurement and importance in cell activity. *Ann Rev Plant Physiology, Plant Mol Biol* 1989; **40**: 271–303.
- [38] LAPORTE K, ROSSIGNOL M. Auxin control of the sensitivity the proton translocation catalyzed by the tobacco plasma membrane H^+ ATPase. *Plant Growth Regulation* 1997; **21**: 19–25.
- [39] LINO B, BAIZABAL-AGUIRRE VM, GONZALES de la VARA LE. The plasma-membrane from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta* 1998; **204**: 352–359.
- [40] LURIE S, OTHMAN S, BOROCCHOV A. Effects of heat treatment on plasma membrane of apple fruit. *Postharvest Biology and Biotechnology* 1995; **5**: 29–38.
- [41] Mac KINTOSH C. Regulation of cytosolic enzymes in primary metabolism by reversible protein phosphorylation. *Curr Opin in Plant Biol* 1998; **1**: 224–229.
- [42] MALERBA M, BIANCHETTI R. 14-3-3 Protein-Activated and Autoihibited Forms of Plasma Membrane H^+ ATPase. *Biochem Biophys Research Comm* 2001; **286**: 984–990.
- [43] MARTIN ML, BUSCONI L. A Rice Membrane-Bound Calcium-Dependent protein Kinases Is Activated in Response to Low Temperature. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1442–1449.
- [44] MICHELET B, BOUTRY M. Proton-translocating ATPases of plasma membrane. W: Membranes Specialized Functions in Plants, 1995; rozdz. 16; Bios-Scientific Publishers 1996, Oxford, UK.
- [45] MICHELET B, ŁUKASZEWICZ M, DUPRIEZ V. A Plant Plasma Membrane Proton-ATPase Gene Is Regulated by Development and Environment and Shows Signs of a Translational Regulation. *The Plant Cell* 1994; **6**: 1375–1389.

- [46] MITO N, WIMMERS LE, BENNETT AB. Sugar regulates mRNA Abundance of H⁺ATPase Gene Family Members in Tomato. *Plant Physiol* 1996; **112**: 1229–1236.
- [47] MORANDINI P, VALERA MC, ALBUMI A. A novel interaction partner for C-terminus of *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H⁺ATPase (AHA1 isoform): site and mechanism of action on H⁺ATPase activity differ from those of 14-3-3 protein. *The Plant J* 2002; **31**,4: 487–497.
- [48] MORIAU L, BOGAERTS P, BOUTRY M. Identification and characterization of a second plasma membrane H⁺ATPase gene subfamily in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* 1993; **21**: 955–963.
- [49] MORSOMME P, BOUTRY M. The plant plasma membrane H⁺ATPase: structure, function and regulation. *BBA Biomembranes* 2000; **1435**: 1–16.
- [50] NAKAJIMA N, SAJI H, AONO M, KONDO N. Isolation of cDNA for a Plasma Membrane H⁺ATPase from Guard Cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol* 1995; **36**,5: 919–924.
- [51] NIU X, NARASIMHAN ML, SALZMAN RA. NaCl regulation of plasma membrane H⁺ATPase gene expression in Glycophyte and Halophyte. *Plant Physiol* 1993; **103**: 712–718.
- [52] NOUBHANI AM, SAKR S, DENIS MH, DELROT S. Transcriptional and post-translational control of the plant plasma membrane H⁺ATPase by mechanical treatments. *BBA* 1996; **1281**: 213–219.
- [53] OECKING C, HAGEMAN K. Association 14-3-3 proteins with C-terminal autoinhibitory domain of the plant plasma membrane H⁺ATPase generates a fusicoccin-binding complex. *Planta* 1999; **207**: 480–482.
- [54] OLIVARI C. Fusicoccin binding to its plasma membrane receptor and the activation of plasma membrane H⁺ATPase. IV. Fusicoccin induces the association between the plasma membrane H⁺ATPase and fusicoccin receptor. *Plant Physiol* 1999; **116**: 529–537.
- [55] OUFATTOLE M, ARANGO M, BOUTRY M. Identification and expression of the tree new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms of plasma membrane H⁺ATPase, and one of which is induced by mechanical stress. *Planta* 2000; **210**: 715–722.
- [56] PALMGREN MG. Plant pumps turned on by yeast. *Trends in Plant Sci* 1997; **2**,2: 43–45.
- [57] PALMGREN MG. Regulation of plant plasma membrane H⁺ATPase activity. *Physiol Plant* 1991; **83**: 313–323.
- [58] PEREZ CH, MICHELET B, FERRENT V. Differential expression within a three-gene subfamily encoding plasma membrane H⁺ATPase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J Biol Chem* 1992; **267**, 2: 1204–1211.
- [59] PORTILLO F. Regulation of plasma membrane H⁺ATPase in fungi and plants. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1496**: 31–42.
- [60] RAGHOTHAMA KG. Phosphate transport and signaling. *Curr Opin in Biol* 2000; **3**: 182–187.
- [61] REGENBERG B, VILLALBA JM, LANFERMEIJER FC, PALMGREN MG. C-terminal Deletion Analysis of Plant Plasma Membrane H⁺ATPase: Yeast as a Model System for Solute Transport across the Plant Plasma Membrane. *The Plant Cell* 1995; **7**: 1655–1666.
- [62] REQUEANA N, BREUNINGER M, FRANKEN P, OCON A. Symbiotic Status, Phosphate and Sucrose Regulate the Expression of two Plasma Membrane H⁺ATPase Genes from the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiol* 2003; **132**: 1540–1549.
- [63] ROLDAN M, DONAIRE J, PARDO JM. Regulation of root plasma membrane H⁺ATPase in sunflower seedlings. *Plant Sci* 1991; **79**: 163–172.
- [64] RUTSCHMANN F, STADLER URS. LeCPK1, Calcium-Dependent Protein Kinase from Tomato. Plasma Membrane Targeting and Biochemical Characterization. *Plant Physiol* 2002; **129**: 156–168.
- [65] SANTI S, CESCO S, VARANINI Z, PINTON R. Two plasma membrane H⁺ATPase gens are differentially expressed in iron-deficient cucumber plants. *Plant Physiol Bioch* 2005; **43**,3: 287–292.
- [66] SANTI S, LOCCI G, MONTE R. Induction of nitrate uptake in maize roots: Expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺ATPase isoforms. *J Exp Bot* 2003, **54**; **389**: 1851–1864.
- [67] SANTI S, LOCCI G, PINTON R, CESCO S, VARANINI Z. Plasma membrane H⁺ATPase in Maize roots induced for NO₃⁻ uptake. *Plant Physiol* 1995; **109**: 1277–1303.
- [68] SCARBOROUGH G. Crystallization, Structure and Dynamics of the Proton-Translocating P-type ATPase. *J Exp Biol* 2000; **203**: 147–154.
- [69] SCHALLER A, OECKING C. Modulation of Plasma-membrane H⁺ATPase Activity Differentially Activates Wound and pathogen Defense in Tomato Plants. *The Plant Cell* 1999; **11**: 263–272.
- [70] SHI H, ISHITANI M, KIM CH, ZHU JK. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ Antiporter. *PNAS* 2000; **97**, 6: 6896–6901.

- [71] SVENNELID F, OLSSON A, PIOTROWSKI M. i in. Phosphorylation of Thr-948 at the C Terminus of the Plasma Membrane H⁺ATPase Creates a Binding Site for the Regulatory 14-3-3 Protein. *The Plant Cell* 1999; **11**: 2379–2391.
- [72] VITART V, BAXTER DOERNER IP, HARPER JF. Evidence for a role in growth and salt resistance of plasma membrane H⁺ATPase in root endodermis. *The Plant J* 2000; **27**; **3**: 191–201.
- [73] WANG B, ZHAO H, WANG X. Influence of sound stimulation on Plasma Membrane H⁺ATPase activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2002; **25**: 183–188.
- [74] WEISS M, PICK U. Primary Structure and Effect of pH on the Expression of the Plasma Membrane H⁺ATPase from *Dunaliella acidophila* i *Dunaliella salina*. *Plant Physiol* 1996; **112**; **4**: 1693–1702.
- [75] XING T, HIGGINS VJ, BLUMWALD E. Regulation of Plant Defense Response to Fungal Pathogens: Two Types of Protein Kinases in the Reversible Phosphorylation of the Host Plasma Membrane H⁺ATPase. *The Plant Cell* 1996; **8**: 555–564.
- [76] YAN F, FEEUERLE R, SCHÄFFER S. Adaptation of Active Proton Pumping and Plasmalemma ATPase Activity of Corn Roots to Low Root Medium pH. *Plant Physiol* 1998; **117**: 311–319.
- [77] YANG YI, GUO JK, ZHANG F. NaCl induced changes of the H⁺ATPase in root plasma membrane of two wheat cultivars. *Plant Sci* 2004: 913–918.
- [78] YI J, BOCHU W, XIUJUAN W. Influence of sound wave on the microstructure of plasmalemma of chrysanthemum roots. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2003; **29**: 109–113.
- [79] ZEIGER E. Sensory transduction of blue light in guard cell. *Trend in Plant Sci* 2000; **5**, **5**: 183–184.
- [80] ZHAO HC, ZHU T, WU J, XI BS. Role of protein kinase in the effect of sound stimulation on the PM H⁺ATPase activity of *Chrysanthemum fallus*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2002; **26**: 335–340.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 24.11.2005 r.

Przyjęto: 22.02.2006 r.

ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

e-mail: ewamloda@biol.uni.wroc.pl