

Receptory glutaminianu u roślin

Elżbieta Król, Maria Stolarz, Halina Dziubińska, Kazimierz Trębacz

Zakład Biofizyki, Instytut Biologii
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

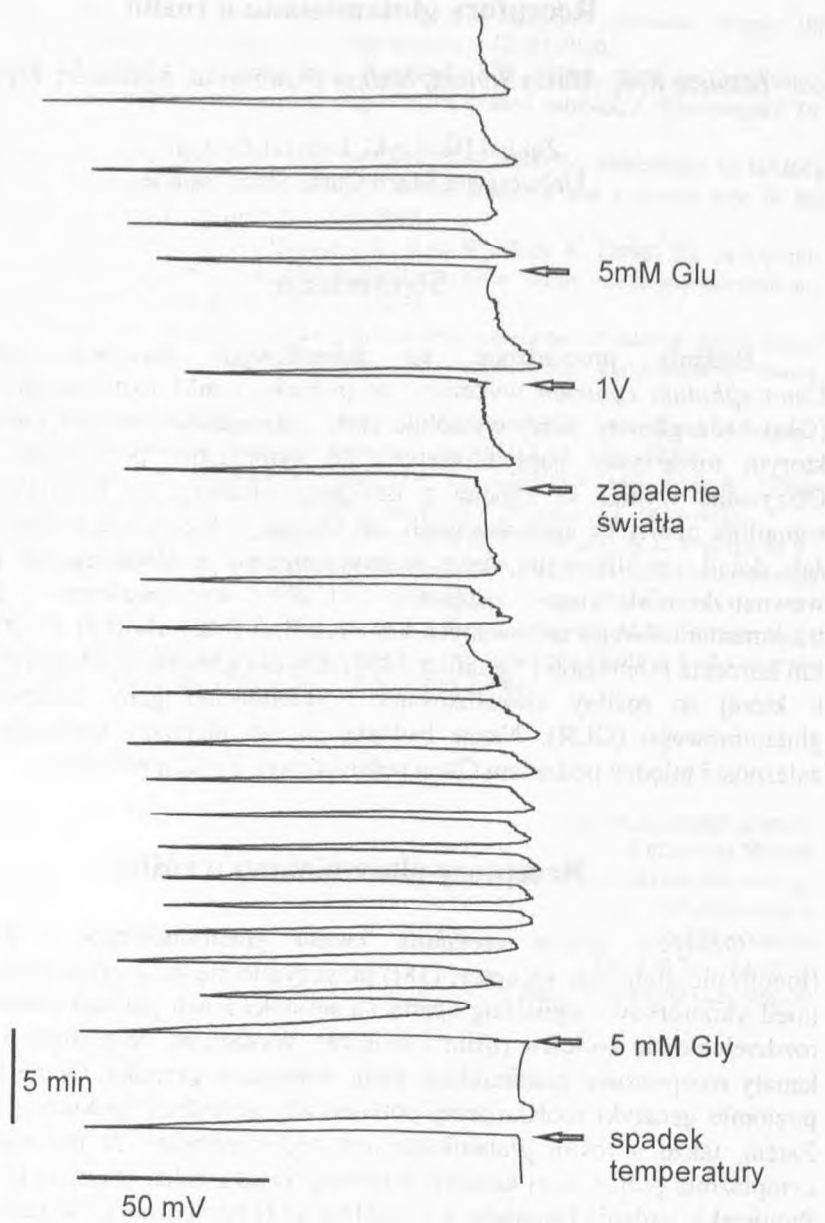
Streszczenie

Badania prowadzone na pobudliwych plechach wątrobowca *Conocephalum conicum* wykazały, że podanie 5 mM roztworu glutaminianu (Glu) bądź glicyny (Gly) wywołuje serie potencjałów czynnościowych (AP), którym towarzyszy napływ wapnia do cytoplazmy pobudzonej komórki. Otrzymane wyniki są zgodne z istniejącą hipotezą, że międzykomórkowy signalling oparty na aminokwasach jest obecny w królestwie roślin i zwierząt. Jak dotąd opublikowane dane eksperymentalne z równoległych pomiarów wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} i poziomu potencjału transmembranowego izolowanych komórek liści (Meyerhoff *et al.* 2004, 2005) lub korzenia (Dennison i Spalding 2000) dotyczą głównie *Arabidopsis thaliana*, u której to rośliny zlokalizowano i sklonowano geny receptora kwasu glutaminowego (GLR). Nasze badania po raz pierwszy wykazały istnienie zależności między podaniem Glu a pobudzeniem u roślin niższych.

Receptory glutaminianu u roślin

Odkrycie genów receptora kwasu glutaminowego u *Arabidopsis* (ionotropic glutamate receptor, [18]) przyczyniło się do powstania hipotezy, że międzykomórkowy signalling oparty na aminokwasach powstał zanim nastąpiło rozdzielenie się królestw roślin i zwierząt. Wykazując, że roślinne i zwierzęce kanały receptorowe glutaminianu mają wspólnego przodka, liczne badania na poziomie genetyki molekularnej potwierdziły powyższą spekulację [3, 4, 20]. Zatem, także u roślin glutaminian jest odpowiedzialny za pojawienie się w cytoplazmie pobudzonej komórki wtórnego przekąźnika, jakim są jony wapnia. Pionierskie badania Dennison'a i Spalding'a [8] bezspornie to wykazały.

Wiadomo obecnie, że w genomie rzodkiewnika 20 genów koduje roślinne receptory glutaminianu (GLR). Ze względu na ich wysoką homologię ze zwierzęcymi iGluR-NMDA zakłada się, że wszystkie one są



Ryc.1. Serie potencjałów czynnościowych (AP) pojawiają się po podaniu aminokwasowych neuroprzekaźników – Gly i Glu, natomiast pojedyncze AP są efektem stymulacji termicznej (nagły spadek temperatury z 22 do 10 °C), świetlnej ($130 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) lub elektrycznej (1V).

niespecyficznymi kanałami wapniowymi, których najefektywniejszymi inhibitorami są: DNQX (6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione), CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione), MNQX (5,7-dinitro-1,4-dihydroquinoxaline-2,3-dione) oraz jony lantanu [7, 11, 17]. Przyjęto także założenie, że kanały te są obecne w plazmalemmie, gdyż nikt dotąd nie wykazał ich wewnątrzkomórkowej lokalizacji [6]. Posługując się sekwencjami aminokwasowymi, wyodrębniono 3 rodziny GLR, oznaczając je odpowiednio AtGLR1(1-4), AtGLR2(1-9), AtGLR3(1-7). Wszystkie one ulegają ekspresji w ciągu życia rośliny – w różnym czasie, w różnych jej organach i tkankach – i nie można żadnej z rodzin przypisać specyficznej lokalizacji [4]. Pomimo ogromnego wysiłku badawczego i potężnego zaplecza molekularnego, sklonowano dotąd tylko sześć różnych genów GLR, zaś fizjologiczną funkcję przypisano zaledwie trzem:

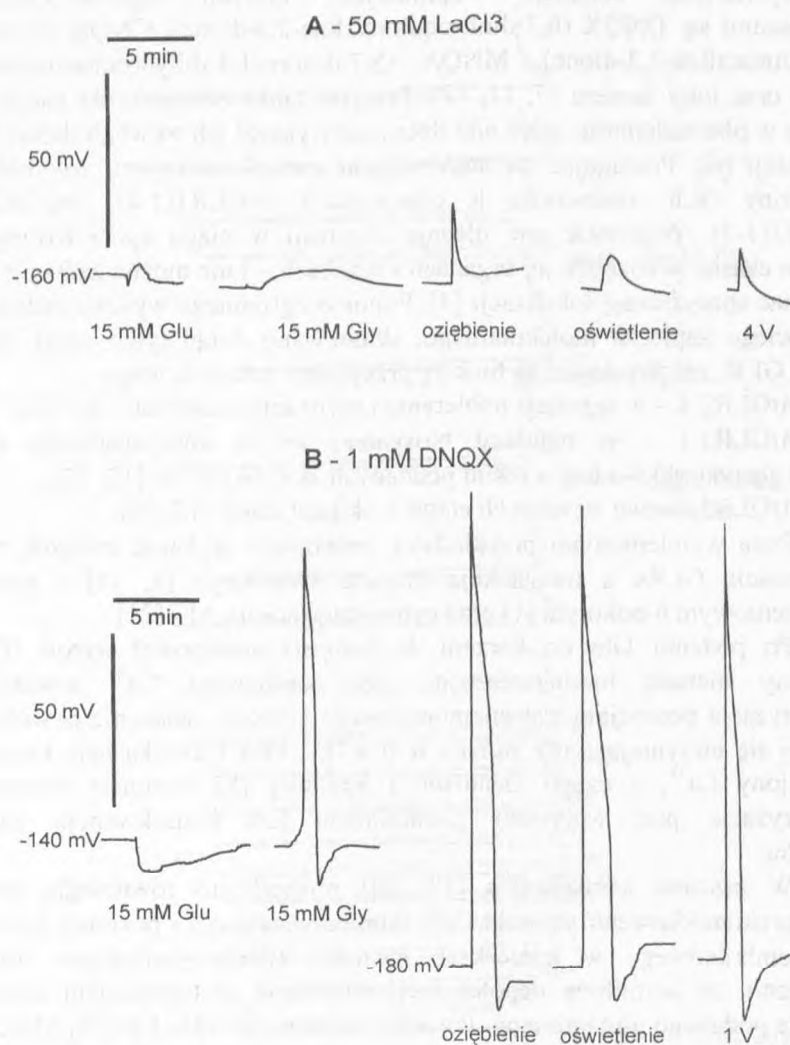
- AtGLR2.1 – w regulacji pobierania i utylizacji jonów Ca^{2+} , K^{+} i Na^{+} [14];
- AtGLR1.1 – w regulacji biosyntezy kwasu abscysynowego (ABA) i gospodarki wodnej u roślin poddanych stresowi suszy [12, 13];
- AtGLR3.4 – we wczesnych etapach aklimatyzacji [19, 20].

Poza wymienionymi przykładami, próbowano wykazać związek między aktywnością GLRs a transdukcją sygnału świetlnego [1, 18] i wzrostem wydłużeniowym hipokotyla [1] oraz cytotoksycznością Al^{3+} [21].

Po podaniu Glu do korzeni *Arabidopsis* następował wzrost $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ mierzony metodą luminescencyjną [8]. Napływowi Ca^{2+} towarzyszyła depolaryzacja potencjału transmembranowego komórki, znacznie powolniejsza i dłużej się utrzymująca niż zmiany w $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$. Oba zjawiska były hamowane przez jony La^{3+} , z czego Dennison i Spalding [8] wysunęli wniosek, że depolaryzacja pod wpływem glutaminianu jest konsekwencją napływu kationów.

W pracach Meyerhoff'a [19, 20] prowadzono równolegle pomiary wewnątrzkomórkowego stężenia Ca^{2+} (luminescencyjnie) i poziomu potencjału transmembranowego w komórkach mezofilu (liści) *Arabidopsis thaliana*. Wykazano, że amplituda depolaryzacji wywołana glutaminianem zależy od stężenia podanego glutaminianu. Ponadto, zarówno DNQX, CNQX, MNQX jak i La^{3+} znacząco upośledzały napływ wapnia. Po „pobudzeniu” następował okres niepobuliwości, który trwał godzinę.

Nasze badania prowadzone na pobudliwych plechach wątrobowca *Conocephalum conicum* skupiły się wyłącznie na zmianach potencjału membranowego wywołanych napływem Ca^{2+} do cytoplazmy [15, 16]. Wykazano, że podanie 5 mM roztworu glutaminianu (Glu) bądź glicyny (Gly) wywołuje serie potencjałów czynnościowych (AP), (rys. 1). Po podaniu, do roztworu omywającego roślinę, 50 mM LaCl_3 , żaden bodziec nie wywoływał

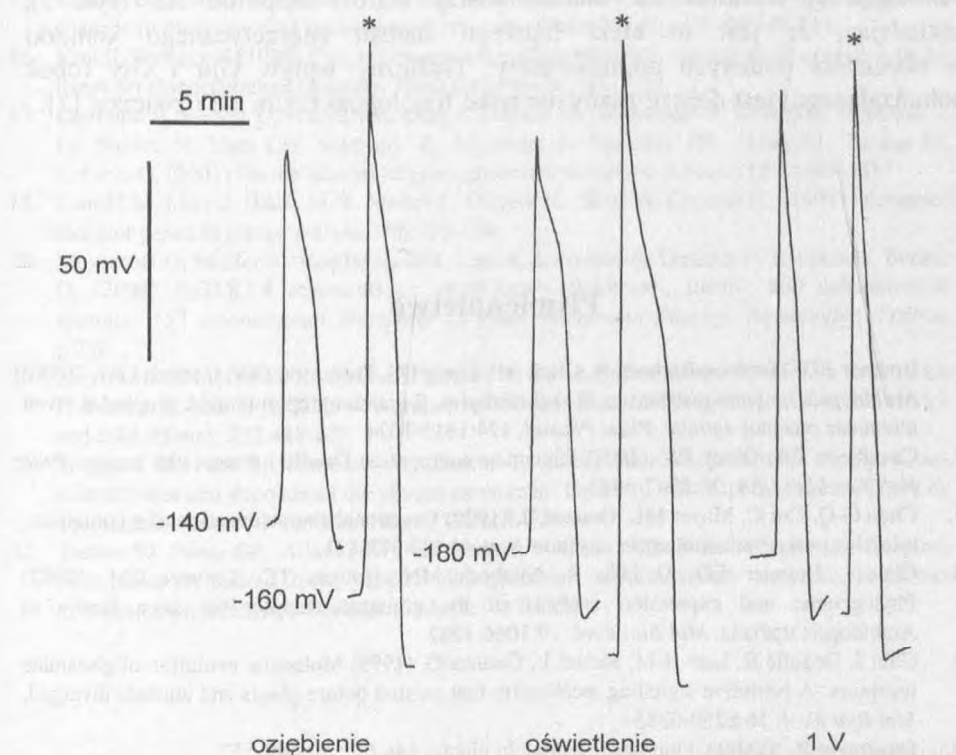


Ryc.2. Wpływ inhibitorów receptorów glutaminianu na potencjały czynnościowe wywoływane różnymi bodźcami u *Conocephalum conicum*:

A – 50 mM La³⁺ jest niespecyficznym blokerem większości kanałów kationowych, stąd po jego podaniu następuje całkowity zanik pobudliwości – żaden bodziec nie wywołuje AP;

B – 1 mM DNQX działa specyficznie na iGLR hamując generację APs wywoływanych glutaminianem.

AP (rys. 2A), natomiast 1 mM roztwór DNQX hamował tylko AP wywołane glutaminianem (rys. 2B). Składowa wapniowa potencjałów czynnościowych również nie pojawiała się po podaniu 1 mM roztworu DNQX w odpowiedzi na Glu (DNQX nie hamował wapniowego komponentu potencjałów czynnościowych wywołanych bodźcami mechanicznymi, elektrycznymi, czy świetlnymi). Pod wieloma względami (zależność od siły bodźca i długi okres refrakcji) składowa wapniowa AP_{Glu} *Conocephalum conicum* przypominała charakterystykę zmian potencjału membranowego w opisaną u *Arabidopsis thaliana* [19, 20].



Ryc.3. Wpływ glutaminianu na potencjał spoczynkowy i potencjały czynnościowe wywołane różnymi bodźcami u *Conocephalum conicum*; gwiazdką oznaczono potencjały czynnościowe wywołane odpowiednim bodźcem w obecności 5 mM glutaminianu w roztworze omywającym.

Fizjologiczna rola pobudzenia (AP) u *Conocephalum conicum* została określona dla stymulacji elektrycznej, kiedy udało się powiązać przejście potencjału czynnościowego ze wzrostem oddychania [10]. Poza tym wykazano,

że w reakcje obronne plechy są zaangażowane APs [9]. Związek pomiędzy AP w odpowiedzi na glutaminian a fizjologią *Conocephalum conicum* nie jest nam znany. Rola, jaką odgrywają Glu i Gly w procesie pobudzenia u roślin nurtuje wielu badaczy i jest zagadnieniem do zbadania w najbliższej przyszłości.

Poza pobudzeniem, używając metody wewnątrzkomórkowych pomiarów potencjału błonowego, obserwowaliśmy długo trwający wpływ Glu i Gly na poziom potencjału spoczynkowego (RP). Nasze badania wykazały, że RP ulega znaczącej hiperpolaryzacji, jeśli w roztworze omywającym plechę *Conocephalum conicum* znajdzie się Glu bądź Gly. Wraz ze wzrostem bezwzględnej wartości RP odnotowaliśmy wzrost amplitud AP (rys. 3), zakładając, że jest to efekt lepszego statusu energetycznego komórki w obecności podanych aminokwasów. Troficzny wpływ Glu i Gly (obok pobudzającego) jest dobrze znany nie tylko fizjologom roślin ale i zwierząt [2].

Piśmiennictwo

1. Brenner ED, Martinez-Barboza N, Clark AP, Liang QS, Stevenson DW, Coruzzi GM, (2000) *Arabidopsis* mutants resistant to S(+)- β -methyl- α , β -diaminopropionic acid, a cycad-derived glutamate receptor agonist. *Plant Physiol*; 124:1615-1624
2. Cavaliheiro EA, Olney JW, (2001) Glutamate antagonists: Deadly liaisons with cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98:5947-5948
3. Chen G-Q, Cui C, Mayer ML, Gouaux E, (1999) Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor. *Nature*; 402:817-821
4. Chiu J, Brenner ED, DeSalle R, Nitabach MN, Holmes TC, Coruzzi GM, (2002) Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Biol Evol*; 19:1066-1082
5. Chiu J, DeSalle R, Lam H-M, Meisel L, Coruzzi G, (1999) Molecular evolution of glutamate receptors: A primitive signaling mechanism that existed before plants and animals diverged. *Mol Biol Evol*; 16:8260-0383
6. Davenport R, (2002) Glutamate receptors in plants. *Ann Bot*; 90:549-557
7. Demidchik V, Essah PA, Tester M, (2004) Glutamate activates cation currents in the plasma membrane of *Arabidopsis* root cells. *Planta*; 219:167-175
8. Dennison K, Spalding EP, (2000) Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*; 124:1511-1514
9. Dziubińska H, Szarek I, Trebacz K, Zawadzki T, (1999) Effects of local cutting on peroxidase activity in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Peroxidase Newsletter*; 12: 3 – 8
10. Dziubińska H, Trebacz K, Zawadzki T, (1989) The effect of the excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiol Plant*; 75: 417 – 423

11. Dubos C, Huggins D, Grant GH, Knight MR, (2003) Campbell MM, A role for glycine in the gating of plant NMDA-like receptors. *Plant J*; 35:800-810
12. Kang J, Mehta S, Turano FJ, (2004) The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) in *Arabidopsis thaliana* regulates abscisic acid biosynthesis and signalling to control development and water loss. *Plant Cell Physiol*; 45:1380-1389
13. Kang J, Turano FJ, (2003) The putative glutamate receptor 1.1 (AtGLR1.1) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100:6872-6877
14. Kim SA, Kwak JM, Jae S-K, Wang M-H, Nam HG, (2001) Overexpression of the *AtGluR2* gene encoding an *Arabidopsis* homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilization and sensitivity to ionic stress in transgenic plants. *Plant Cell Physiol*; 42:74-84
15. Krol E, Dziubinska H, Trebacz K. (2003) Low-temperature induced transmembrane potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Cell Physiol*; 44:527-533
16. Krol E, Trebacz K (1999) Calcium-dependent voltage transients evoked by illumination in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Cell Physiol*; 40:17-24
17. Lacombe B, Becker D, Hedrich R, Chiu J, DeSalle R, Heinemann S, Hollmann M, Kwak J, Le Novere N, Nam GH, Sakmann B, Schroeder JI, Spalding EP, Tester M, Turano FJ, Coruzzi G, (2001) On the identity of plant glutamate receptors. *Science*; 292:1486-1487
18. Lam H-M, Chiu J, Hsieh M-H, Meisel L, Olivera IC, Shin M, Coruzzi G, (1998) Glutamate receptor genes in plants. *Nature*; 396:125-126
19. Meyerhoff O, Müller K, Roelfsema RM, Latz A, Lacombe B, Dietrich P, Hedrich R, Becker D, (2004) *AtGLR3.4* represents an *Arabidopsis* glutamate-, touch-, and cold-sensitive receptor. *13th International Workshop on Plant Membrane Biology, Montpellier, France*, p 230
20. Meyerhoff O, Müller K, Roelfsema RM, Latz A, Lacombe B, Dietrich P, Hedrich R, Dietrich P, Becker D, (2005) *AtGLR3.4*, a glutamate receptor channel-like gene is sensitive to touch and cold. *Planta*; 222:418-427
21. Sivaguru M, Pike S, Gassmann W, Baskin T, (2003) Aluminium rapidly depolymerises microtubules and depolarises the plasma membrane: Evidence that responses are mediated by a glutamate receptor. *Plant Cell Physiol*; 44:667-675
22. Turano FJ, Panta GR, Allard MW, van Berkum P, (2001) The putative glutamate receptors from plants are related to two superfamilies of animal neurotransmitter receptors via distinct evolutionary mechanisms. *Mol Biol Evol*; 18:1417-1420

Adres do korespondencji:

Elżbieta Król
 Zakład Biofizyki
 Instytut Biologii
 Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
 Akademicka 19
 20 – 033 Lublin
 tel. (48 81) 537 59 55
 e-mail: krol@biotop.umcs.lublin.pl