

POMPY PROTONOWE PLAZMALEMMY I TONOPLASTU

Proton pumps in plasma membrane and tonoplast

Grażyna KŁOBUS

Summary. Proton pumps, a specific group of membrane enzymes are involved in the transduction of energy in cells. They used the energy released during a hydrolysis of chemical bonds to the vectorial proton transport across membranes and generate an electrochemical proton gradient. H^+ gradient established by pumps is then used as a driving force for nutrient transport in cell. In last decade the proton pumps of plant membranes were intensively studied at the biochemical and molecular level. Achievements of these study and current ideas concerning the regulation of both plasma membrane (H^+ -ATPase) and tonoplast (V-ATPase and PPase) proton pumps are presented.

Key words: plasma membrane, tonoplast, H^+ -ATPase, NADH-ferricyanide oxidoreductase, vacuolar H^+ -ATPase, proton-translocating pyrophosphatase,

dr Grażyna Kłobus, Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Botaniki Uniwersytetu Wrocławskiego, Kanonia 6/8, 50–328 Wrocław

WSTĘP

Pompy protonowe są specyficzną grupą enzymatycznych białek błonowych, odgrywającą zasadniczą rolę w transdukcji energii. Wykorzystując energię wiązań chemicznych pompy protonowe katalizują wektorowy transport protonów, w wyniku czego w błonach komórkowych wytwarzany jest gradient potencjału elektrochemicznego. Gradient ten może być następnie wykorzystywany jako źródło energii dla substancji odżywczych w komórce.

POMPY PROTONOWE PLAZMALEMMY

H^+ – ATPAZA

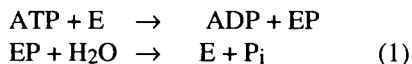
a) Funkcjonowanie H^+ – ATPazy plazmalemmowej.

Zasadniczą, jeśli nie jedyną pompą protonową plazmalemmy jest H^+ -ATPaza. Należy ona do grupy P-ATPaz transportowych, zwanych także E_1E_2 -ATPazami. Oprócz roślinnych, plazmalemmowych H^+ -ATPaz należą tutaj także

H^+ -ATPazy komórek grzybów oraz, zależne od kationów ATPazy występujące w błonach komórek zwierzęcych (tzw. „pompy jonowe”, Ca^{2+} -ATPaza, Na^+/K^+ ATPaza). Do wektorowego transportu protonów z cytoplazmy przez plazmalemmę, na zewnątrz komórki H^+ -ATPazy wykorzystują energię uwalnianą podczas kontrolowanej hydrolizy ATP. W konsekwencji więc, H^+ -ATPazy przetwarzają energię wiązania chemicznego, uwalnianą podczas hydrolizy ATP, w potencjalną energię, zmagazynowaną jako gradient potencjału elektrochemicznego plazmalemmy, na który składają się różnice stężeń jonów wodorowych oraz różnice potencjału elektrycznego.

b) Kataliza enzymatyczna Hydroliza ATP katalizowana przez H^+ -ATPazy oraz przez pozostałe P-ATPazy transportowe przebiega wg schematu (1). Schemat reakcji jest uproszczony i obejmuje tylko te etapy, które pozwalają wyjaśnić powiązania pomiędzy hydrolizą ATP a transportem H^+ przez plazmalemmę. Najogólniej, końcowa grupa fosforanowa ATP jest naj-

pierw przenoszona na resztę aspartylową ATPazy (E) tworząc tzw. ufosforylowany enzym (EP), z którego, po przyłączeniu H_2O , uwalniany jest nieorganiczny fosforan (P_i):

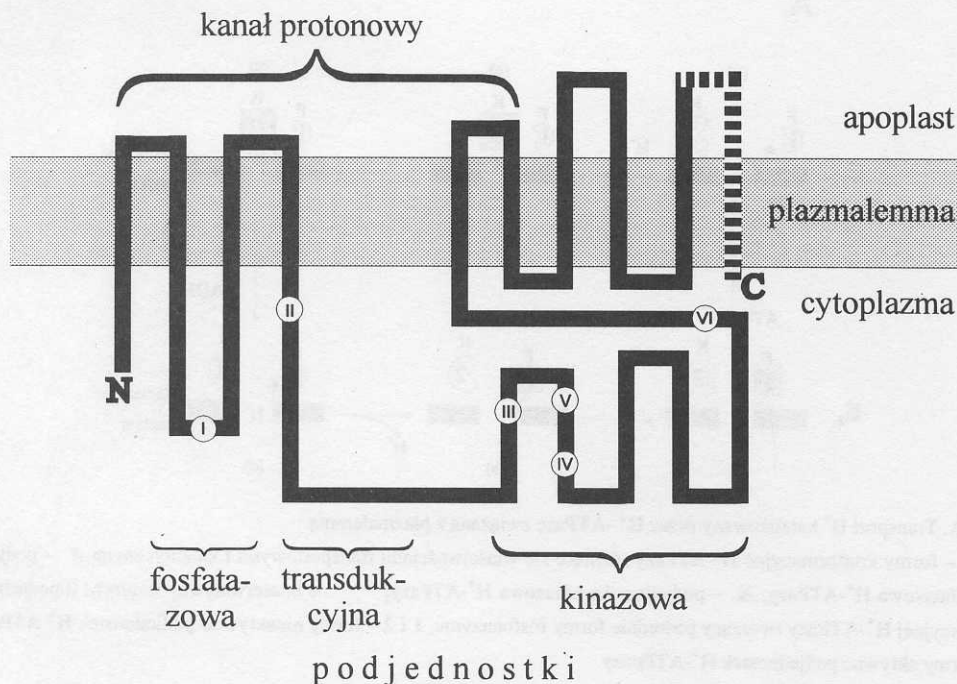


Dla hydrolizy ATP katalizowanej przez roślinne ATPazy plazmalemmowe znamienne jest tworzenie dwóch form fosfoenzymu: E_1P i E_2P . Doświadczalnie udowodniono, że powstawanie fosfoenzymu stymulowane jest niskim pH. Na tej podstawie zasugerowano, że przyłączenie reszty fosforanowej do białka enzymatycznego wymaga jednoczesnego związania protonu przez ATPazę. Kolejność reakcji przyłączania reszty fosforanowej i protonu do enzymu nie jest ostatecznie ustalona. W wyniku tej reakcji powstaje potrójny kompleks $\text{H}^+ \cdot \text{E}_1\text{ATP}$, który po fosforylacji białka enzymatycznego, zachodzącej tylko w obecności jonów Mg^{2+} [18], daje fosfoenzym (E_1P) oraz ADP. Znamienne, że forma E_1P fosfoenzymu może reagować z ADP odtwierając ATP, ale nie może ulegać hydrolizie. Hydroliza nieorganicznego fosforanu z fosfoenzymu możliwa jest dopiero po przejściu E_1P w formę E_2P . Przejście formy pierwszej fosfoenzymu w formę drugą polega jedynie na zmianach konformacyjnych białka enzymatycznego i nie wymaga przesunięcia grupy fosforanowej na nowe miejsce akceptorowe [20]. Zmiany konformacyjne w obrębie fosfoenzymu powodują jednoczesne przesunięcie związanego wcześniej protonu ze strony cytoplazmatycznej na zewnętrzną stronę plazmalemmy. Przypuszcza się, że uwalnianie H^+ z E_2P możliwe jest dzięki słabemu powinowactwu tej formy fosfoenzymu do protonów. Różne powinowactwo E_1P (wysokie) i E_2P (niskie) do protonów pozwala wyjaśnić translokację protonów z cytoplazmy o pH bliskim obojętnemu do środowiska o pH niższym. Wraz z uwalnianiem protonu następuje hydrolityczne odłączenie reszty fosforanowej fosfoenzymu. Również w tym wypadku nie jest jasne, czy uwolnienie protonu poprzedza hydrolizę E_2P , czy też defosforylacja enzymu warunkuje odłączanie H^+ od ATPazy. O ile fosforylacja

formy pierwszej enzymu wymaga obecności jonów magnezowych, o tyle zmiany konformacyjne białka ATPazy warunkujące przejście E_1P w E_2P oraz reakcja defosforylacji są specyficznie zależne od jonów potasowych [21, 36]. Ostatnim etapem cyklu katalityczno-transportowego ATPazy jest przejście formy drugiej enzymu (E_2) w formę pierwszą (E_1). Nie jest wykluczone, że zmiany konfiguracji białka enzymatycznego związane z tym przejściem indukowane są przyłączeniem ATP do enzymu. Mechanizm reakcji hydrolizy ATP przez roślinne H^+ -ATPazy jest podobny do reakcji typu Post-Alberts właściwych dla transportowych P-ATPaz komórek zwierzęcych [63].

c) Struktura H^+ -ATPazy plazmalemmowej

H^+ -ATPazy plazmalemmowe izolowane z różnych tkanek roślinnych są monomerami o masie 100 KDa [1, 17, 60, 77, 88]. Podczas hydrolizy z $\{\gamma^{32}\text{P}\}$ ATP plazmalemmowa H^+ -ATPaza tworzy ufosforylowane produkty, co jest cechą wspólną dla ATPaz typu E_1E_2 [17, 76]. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym, w obecności siarczanu dodecyłu sodu (SDS) wykazała, że masa ufosforylowanych produktów wynosi 100 KDa. Tak więc polipeptyd o masie 100 KDa stanowi jednostkę katalityczną i jest jedyną podjednostką roślinnych H^+ -ATPaz [23]. Jednakże w natywnych błonach H^+ -ATPaza tworzy najprawdopodobniej dimery. Dowiodły tego analizy tzw. inaktywacji promieniotwórczej natywnych pęcherzyków plazmalemmy owsa i kukurydzy, na podstawie których określono masę ATPaz związanych z błonami na około 225–228 KDa [19, 31]. Klonowanie i sekwencjonowanie genów kodujących roślinne H^+ -ATPazy pozwoliło ustalić skład aminokwasowy białka enzymatycznego (dokładne informacje patrz 78 i 80 oraz prace tam cytowane). Znamienne, że przy stosunkowo niskiej, ogólnej homologii z białkami pozostałych P-ATPaz transportowych, odcinki katalityczne wszystkich enzymów należących do tej grupy są wysoce konserwatywne [78]. Analiza sekwencji aminokwasowej w połączeniu z tzw. analizą hydrofatyłową, tzn. przestrzenną aranżacją łańcucha aminokwasowego w błonie, ustaloną na



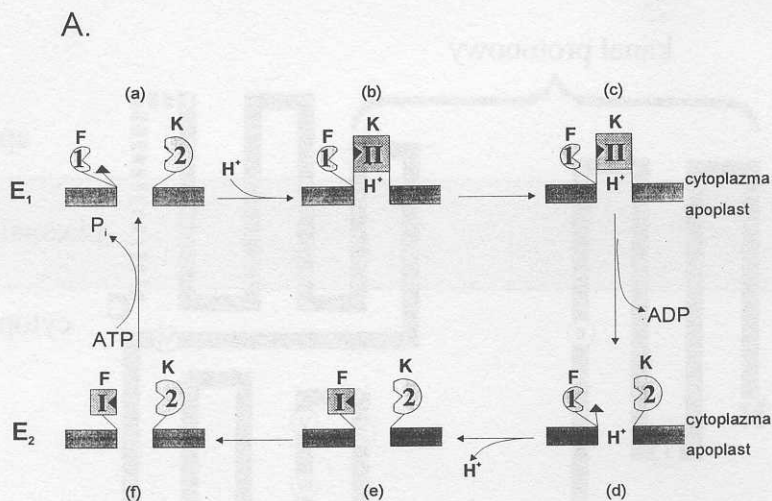
① – ④ — konserwatywne fragmenty łańcucha polipeptydowego H^+ -ATPazy

Ryc. 1. Topografia podjednostek katalitycznych H^+ ATPazy w plazmalemmie. Numerami I do VI zaznaczono konserwatywne fragmenty łańcucha polipeptydowego H^+ -ATPazy.

Fig. 1. Proposed structure of H^+ -ATPase functional domains in plasma membrane. The conservative fragments of H^+ -ATPase polypeptide chain were marked (I to IV).

podstawie hydrofilnych i hydrofobowych właściwości aminokwasów, pozwoliła na określenie topologii podjednostek katalitycznych H^+ -ATPazy [13, 39, 78]. Podobnie do innych ATP-az transportowych, łańcuch polipeptydowy roślinnej plazmalemmowej H^+ -ATPazy tworzy 8 do 10-ciu transbłonowych helis (rys. 1). Koniec łańcucha z wolną grupą aminową znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony. Koniec z wolną grupą karboksylową zdaniem jednych [78] znajduje się po stronie zewnętrznej plazmalemmy, zdaniem innych [13,39] – po stronie cytoplazmatycznej. Położenie C – końca polipeptydowego łańcucha H^+ -ATPazy determinuje ilość tworzonych pentli (8 lub 10). Na rys. 1 koniec z wolną grupą karboksylową umieszczono po stronie cytoplazmatycznej błony. Jest to ana-

logia do komórek grzybów, gdzie koniec łańcucha z wolną grupą karboksylową znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony, czego dowiodły badania przeprowadzone z użyciem specyficznych przeciwciał dla tego fragmentu łańcucha polipeptydowego [56] oraz wyniki ograniczonej proteolizy [40, 56]. Większość hydrofilnych fragmentów H^+ -ATPazy wysunięta jest z błony po stronie cytoplazmatycznej. Ta część enzymu odpowiada za katalizę skalarnej hydrolizy ATP i obejmuje fragment N – końcowy łańcucha, obszar fosfatazowy, transdukcyjny, kinazowy oraz fragment łańcucha z wolną grupą karboksylową. W cytoplazmatycznej, hydrofilnej części ATP-azy znajdują się konserwatywne fragmenty łańcucha, zaznaczone na rys. 1 nr I do VI, identyczne dla wszystkich P-ATPaz. Rala fragmentu z



Ryc. 2 A. Transport H^+ katalizowany przez H^+ -ATPazę związaną z plazmalemą.

E_1 , E_2 – formy konformacyjne H^+ -ATPazy różniące się właściwościami transportowymi i katalitycznymi, F – podjednostka fosfatazowa H^+ -ATPazy, K – podjednostka kinazowa H^+ -ATPazy, – konserwatywny fragment II podjednostki transdukcyjnej H^+ -ATPazy tworzący pośrednie formy fosfoenzymu, 1 i 2 – formy nieaktywne podjednostek H^+ -ATPazy, I i II – formy aktywne podjednostek H^+ -ATPazy.

Fig. 2 A. Proposed schemes for H^+ transport catalyzed by the plasma membrane-bound ATPase.

E_1 , E_2 – conformation forms of H^+ -ATPase with different transport and catalytic properties, F – phosphatase domains, K – kinase domains, – conservative fragment of transduction domains forming the phosphorylated intermediate, 1, 2, I, II – active and inactive confirmations of enzyme domains, respectively.

wolną grupą aminową oraz fragmentu z wolną grupą karboksylową nie jest wyjaśniona. Prawdopodobnie są one istotne dla utrzymania właściwej struktury białka ale nie uczestniczą w katalizie enzymatycznej.

Obszar kinazowy enzymu katalizuje wiązanie ATP do H^+ -ATPazy i tworzenie fosfoenzymu. Miejsca IV, V i VI, poprzez reszty asparaginowe, łączą się z adeniną cząsteczki ATP. Miejsce VI, poprzez drugą resztę asparaginianową, przy udziale Mg^{2+} oraz poprzez resztę lizynową, wiąże grupy fosforanowe ATP. Ponadto, γ -fosforanowa grupa ATP przyłączana jest do fragmentu III obszaru kinazowego. Opisany model podobny jest do struktury miejsc wiążących ATP innych enzyków, takich jak kinaza fosfoglicerynianowa [5] czy fosfofruktokinaza [33].

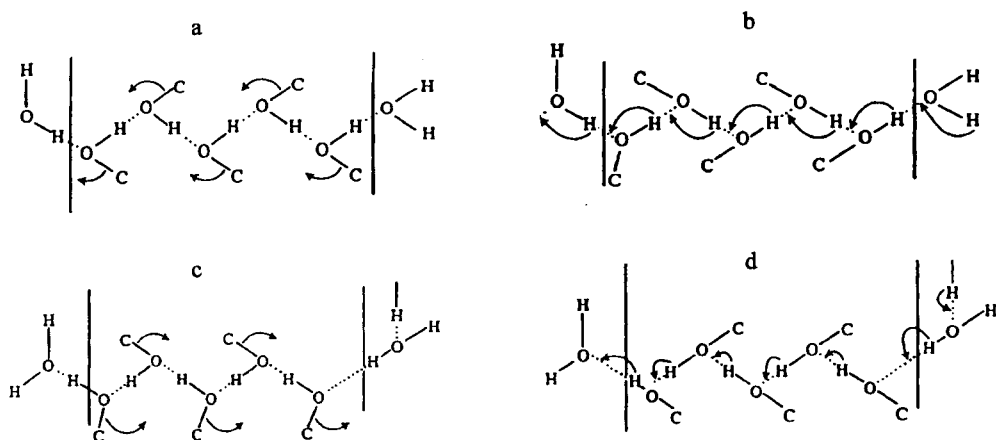
Kolejny obszar enzymu, tzw. transdukcyjny, odpowiada najprawdopodobniej za sprzężenie hydrolizy ATP z transportem protonów. W komórkach drożdży mutageniza reszty asparagi-

nianowej miejsca II obszaru transdukcyjnego uniemożliwia zarówno fosforylację enzymu jak i transport kationów [64]. Ostatni, hydrofilny obszar ATPazy, tzw. fosfatazowy odpowiada za hydrolityczną defosforylację fosfoenzymu. Konserwatywny fragment podjednostki fosfatazowej stanowi miejsce I. Sześć pierwszych pętli plazmalemowej H^+ -ATPazy jest zaangażowana w transport protonów. Tworzą one tzw. kanał kationowy. W tej części enzymu stwierdzono obecność czterech polarnych reszt aminokwasowych, które mogą bezpośrednio uczestniczyć w przekazywaniu H^+ . Są to asparagina helisy 2, asparaginian helisy 6 (transbłonowe), zewnętrzny asparaginian helisy 2 i cytoplazmatyczna arginina w helisie 5.

d) Model transportu protonów przy udziale H^+ -ATP-azy.

Transport protonów przez białko H^+ -ATPazy wyjaśniają dwa różne modele (ryc. 2). Pier-

B.



Ryc. 2 B. a, b, c i d – kolejne stany energetyczne powierzchniowych aminokwasów transbłonowych odcinków H⁺-ATPazy stanowiących łańcuch transportujący protony, wywołane zmianami konformacyjnymi (fosforylacja – defosforylacja) enzymu.

Fig. 2 B. a, b, c and d – subsequent energetic status of periferic amino acids of transmembrane H⁺-ATPase fragments involved in the proton-transferring chain.

wszy, zaproponowany przez Serrano [77] zakłada, że H⁺-ATPazy występujące w dwóch konformacjach (E₁ i E₂) różnią się właściwościami transportowymi i katalitycznymi (ryc. 2 A). W pierwszej konformacji (E₁) enzym wykazuje aktywność kinazową a jego miejsce transportowe, charakteryzujące się dużym powinowactwem do protonów jest otwarte po stronie cytoplazmatycznej (ryc. 2 A a). Przyłączanie H⁺ do enzymu umożliwia przyłączenie cząsteczki ATP i indukuje aktywność kinazową (ryc. 2 A b). W konsekwencji reszta fosforanowa z ATP przenoszona jest na podjednostkę kinazową tworząc fosfoenzym (ryc. 2 A c). Uwalnianie ADP z cząsteczki E₁ wywołuje zmiany konformacyjne białka enzymatycznego i jego przejście w formę E₂ (ryc. 2 A d). Jednocześnie miejsce transportowe otwiera się na zewnątrz. Zmienia się jego powinowactwo do protonów, skutkiem czego mogą być one uwalniane po stronie zewnętrznej plazmalemy (ryc. 2 A e). Po dysocjacji protonu ATPaza uzyskuje aktywność hydrolytyczną, co umożliwia odłączenie reszty fosforanowej z fosfoenzymu (ryc. 2 A f). Powyższy

model zakłada przenoszenie reszty fosforanowej z podjednostki kinazowej na fosfatazową. Rolę przekaźnika spełnia tu reszta asparaginianowa fragmentu II. Jej asocjacja z podjednostką kinazową bądź fosfatazową, połączona z przemieszczaniem reszty fosforanowej, zapoczątkowuje zmiany konformacyjne białka enzymatycznego.

Drugi model transportu protonów przez H⁺-ATPazy zaproponował Briskin i Hanson [23] w oparciu o koncepcję Copeland i Chan [27] oraz Nagle i Tristan-Nagle [61] tzw. telegrafu protonowego (*proton wires*). Zakłada ona szybkie przekazywanie protonów przez łańcuch wiążący H⁺ utworzony na powierzchni transmembranych łańcuchów H⁺-ATPazy przez reszty aminokwasowe, których grupy funkcyjne są akceptorami i donorami protonów. Te aminokwasy to treonina, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, lizyna, arginina, tyrozyna i histydyna [27]. Przekazywanie protonów wzdłuż łańcucha połączone jest ze zmianami konformacyjnymi ATPazy, wynikającymi z fosforylacji i defosforylacji enzymu [22]. Model telegrafu protonowego przedstawia rys. 2 B. W stanie spoczynkowym

białek transportujących, protony znajdują się po lewej stronie mostków wodorowych (ryc. 2 B a). Zmiany konformacyjne enzymu występujące podczas cyklu katalitycznego (ryc. 2 B b) powodują zmiany stanu energetycznego łańcucha co umożliwia odwrócenie mostków wodorowych (ryc. 2 B c); teraz protony znajdują się po stronie prawej wiązania wodorowego. Relaksacja całego układu, związana z defosforylacją fosfoenzymu, powoduje przesunięcie protonów o jedno wiązanie (ryc. 2 B d).

OKSYDOREDUKTAZY ZWIĄZANE Z PLAZMALEMMA

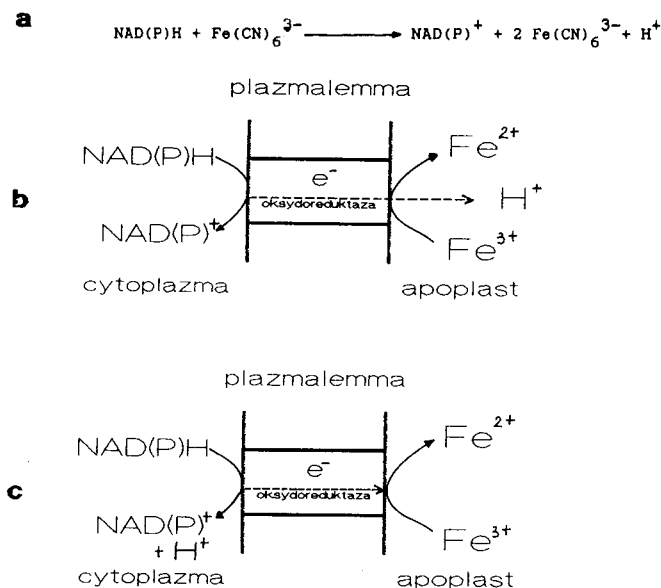
Szereg danych literaturowych sugeruje, że H^+ -ATPaza nie jest jedynym enzymem związanym z plazmalemmą odpowiadającym za transport protonów. Świadczy o tym brak ścisłej zależności pomiędzy poziomem ATP a aktywnością elektrogennych pomp protonowych, oznaczana jako zmiany potencjału membranowego oraz sekrecja protonów [49]. Ponadto doświadczenia przeprowadzone na całych korzeniach oraz zawiesinach komórek [11, 28, 33, 34, 48, 57] dowiodły, że redukcji egzogennych utleniaczy towarzyszy spadek pH apoplastu, depolaryzacja błon oraz spadek stężenia równoważników redoks wewnątrz komórki. Jednocześnie w plazmalemmie komórek roślinnych stwierdzono obecność cytochromu b [2, 3, 44, 86, 87], flawin [6, 66, 74] oraz chinonów typu witamina K₃ [51, 52] mogących stanowić elementy łańcucha transportującego elektrony. Powyższe dane sugerowały udział plazmalemmowych systemów redox w transporcie elektronów i protonów przez błony.

W roślinnych błonach plazmatycznych zidentyfikowano przynajmniej dwa typy oksydoreduktaz. Są to oksydoreduktaza konstytucyjna, zwana także standartową, katalizująca redukcję oksydantów na powierzchni komórki [29, 59] oraz tzw. turbo-reduktaza odpowiedzialna za redukcję chelatów żelazowych [9, 25]. Ponadto, pewne dane sugerują również udział plazmalemmowej reduktazy azotanowej w transporcie elektronów przez błony plazmatyczne [41, 45].

a) Oksydoreduktaza konstytucyjna

Aktywność oksydoreduktazy konstytucyjnej zależy od NADH. Dawcą elektronów dla tego enzymu może być także NADPH, jakkolwiek aktywność oznaczana w obecności fosforanu nukleotydu pirydynowego jest znacznie niższa [7, 10, 45, 58]. Utlenianiu wewnątrzkomórkowego NADH towarzyszy redukcja egzogennych utleniaczy, których potencjał redoks jest wyższy od 0. Generalnie, im wyższy jest potencjał redoks związku akceptorowego, tym wyższa jest oznaczana wobec niego aktywność oksydoredukcyjna [74]. Najefektywniejszym akceptorem elektronów jest żelazicyjanek, jakkolwiek oksydoreduktaza konstytucyjna może także redukować durochinon, 2,6-dichloro-fenolindofenol (DCIP) czy cytochrom c [3, 6, 10, 71, 74].

Ryc. 3 a przedstawia schematycznie reakcję katalizowaną przez plazmalemmowe oksydoreduktazy konstytucyjne. Wzrost pH środowiska zewnętrznego towarzyszący utlenianiu żelazicyjanku (HCFelI) przez tkanki i zawiesiny komórkowe, oraz fakt, że żelazicyjanek częściowo niwelował hamujące działanie dicykloheksylokarbodiimidu (DCCD) na transport protonów zależny od ATP [14, 62] sugerował, że oksydoreduktaza transportuje zarówno elektrony jak i protony przez błony komórkowe (ryc. 3 b). Jednak z drugiej strony, redukcja żelazicyjanku wywoływała silną (50 do 100 mV) depolaryzację błon, co z kolei wskazywało, że przez plazmalemmę transportowane są jedynie elektrony (ryc. 3 c). Wg Marre i wsp. [57] transportowi e^- na zewnątrz komórki, katalizowanemu przez oksydoreduktazy towarzyszy uwalnianie protonu w cytoplaźmie. Świadczył o tym fakt, iż równolegle z redukcją egzogennego żelazicyjanku, obok zakwaszania środowiska zewnętrznego, spadało także pH wewnątrzkomórkowe. Podobne wyniki uzyskali Ullrich i Guern [82] dla *Lemna gibba* oraz Rubinstein i wsp. [73] dla protoplastów izolowanych z komórek mezofilu owsa. Jak wiadomo, zarówno niskie pH cytoplaźmy jak i depolaryzacja błony aktywują H^+ -ATPazy [37, 38, 70, 72]. Te z kolei katalizując transport protonów na zewnątrz komórki obniżają pH środowiska (ryc. 4).

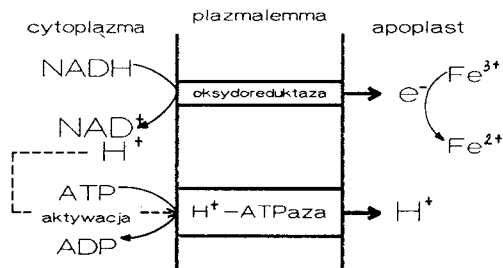


Ryc. 3. Hipotetyczny udział konstytucyjnej oksydoreduktazy związanej z plazmalemą w transporcie elektronów i protonów. a Schemat reakcji katalizowanej przez plazmalemmowe oksydoreduktazy konstytucyjne. b Model przedstawiający jednoczesny transport elektronów (e^-) i protonów (H^+) katalizowany przez enzym. c Model przedstawiający udział oksydoreduktazy w transporcie samych elektronów przez plazmalemmę. Dokładny opis przedstawionych schematów w tekście.

Fig. 3. Proposed role of the plasma membrane constitutive oxidoreductase in electron and proton transport. a The reaction catalyzed by plasma membrane-bound constitutive oxidoreductase; b Scheme for the simultaneous transport of electrons and protons; c Schemes for the transport of electrons only. Details in the text.

Potwierdzenie hipotezy Marre i wsp. [57] uzyskano w doświadczeniach przeprowadzonych na izolowanych pęcherzykach plazmalemmy o właściwej bądź odwróconej orientacji

[15,46]. Pęcherzyki o właściwej orientacji zawierające wewnątrz etanol, dehydrogenazę alkoholową i NAD^+ , a więc system zapewniający stałą produkcję NADH, były zdolne do redukcji żelazicyjanku [12]. Z kolei pęcherzyki plazmalemmy o odwróconej orientacji zaopatrzone w żelazicyjanek utleniały egzogeny NADH [46]. Powyższe wyniki sugerują, że oksydoreduktaza katalizująca ten proces jest enzymem transmembranowym a jej centra aktywne dla NADH i HCFeIII znajdują się odpowiednio po wewnętrznej (cytoplazmatycznej) i zewnętrznej (apoplastycznej) stronie błony. Również badania Askerlund i Larsson [4] wskazywały, iż oksydoreduktaza odpowiada za transport e^- , jakkolwiek stanowi on tylko około 10% ogólnej ilości elektronów transportowanych przez błony plazmatyczne. W doświadczeniach Askerlund i Larsson [4] żelazicyjanek nie był efektywnym akceptorem elektronów. Transport elektronów z



Ryc. 4. Model współdziałania konstytucyjnej oksydoreduktazy z H^+ -ATPazą w transporcie protonów przez plazmalemmę.

Fig. 4. Model for the cooperation of oxidoreductase activity and H^+ -ATPase in transmembrane proton transport.

NADH znajdującego się wewnątrz pęcherzyków obserwowano jeśli zamiast HCFelIII do mieszaniny inkubacyjnej wprowadzono dichlorofenolindofenol (DCIP). Jest to silny utleniacz, którego część akceptorowa ma charakter hydrofobowy. Może więc ona częściowo penetrować błonę i wyłapywać elektrony łatwiej niż hydrofilny żelazycyjanek. Ponadto, autorzy nie wykluczają, że podczas preparacji plazmalemy nastąpiła dysocjacja peryferycznych białek, które pośredniczą w przekazywaniu elektronów po apoplastycznej stronie plazmalemy na hydrofilne akceptory, takie jak żelazycyjanek. Reasumując, oksydoreduktaza plazmalemmowa najprawdopodobniej katalizuje transport e^- przez błony oraz, jakkolwiek nie uczestniczy bezpośrednio w transbłonowym przepływie protonów, to jednak pośrednio, poprzez modulację aktywności pompy protonowej zależnej od ATP wpływa na ten proces.

b) „Turbo – reduktaza”

Również drugi system oksydoredukcyjny związany z plazmalemą, tzw. turbo-reduktaza nie wydaje się być bezpośrednio zaangażowana w transport protonów przez błonę. Turbo-reduktaza odpowiada za redukcję Fe^{3+} -chelatów o potencjale redoks niższym od 0 i jest drastycznie aktywowana w warunkach deficytu żelazowego

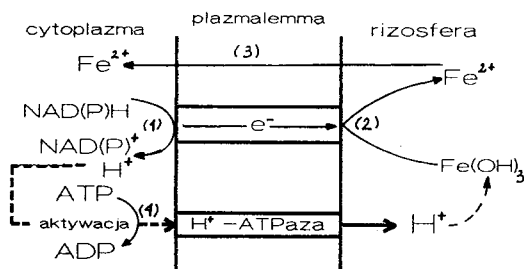
[9]. Objawia się to wzrostem redukcji chelatów żelazowych i w konsekwencji stymulacją pobierania Fe przez rośliny. Dawcą elektronów w reakcji redukcji Fe-chelatów są endogenne zredukowane nukleotydy pirydynowe [NAD(P)H_2] (ryc. 5). Elektrony pochodzące z reakcji (1), poprzez system turbo uwalniane są do środowiska gdzie redukują Fe-chelaty (2). Żelazichelaty są następnie transportowane do cytoplazmy poprzez kanały dla jonów dwuwartościowych (3). Protony uwalniane podczas utleniania nukleotydów w reakcji (1) obniżają pH cytoplazmy. Spadek pH stymuluje z kolei aktywność H^+ -ATPazy powodując wzmożony transport protonów na zewnątrz komórki (4). W konsekwencji dochodzi do zakwaszania gleby. W tych warunkach, Fe^{3+} ze słabo rozpuszczalnych wodorotlenków powstających w dobrze natlenionych glebach, jest wychwytywany przez związki chelatowe (5), które stanowią substrat reduktazy „turbo”.

POMPY PROTONOWE TONOPLASTU

W tonoplaście komórek roślinnych funkcjonują dwie pompy protonowe: wakuolarna H^+ -ATPaza oraz H^+ -PPiaza [67].

TONOPLASTOWA H^+ -ATPAZA

Wakuolarna H^+ -ATPaza należy do typu V-ATPaz. Do tej samej grupy należą ATPazy retikulum endoplazmatycznego i pęcherzyków Goldiego [82] komórek roślinnych i zwierzęcych. V-ATPazy są niewrażliwe na działanie inhibitorów P-ATPaz transportowych (wanadan) oraz inhibitorów F-ATPaz (azydek i oligomycyna). Specyficznym inhibitorem ATPaz wakuolarnych jest bafilomycyna [15]. Ward i Sze [85] wykazali, że jedna cząsteczka bafilomycyny powoduje całkowitą inhibicję jednej cząsteczki ATPazy. Miejsca oddziaływania inhibitora z enzymem, ani mechanizm działania nie są wyjaśnione. Aktywność V-ATPaz jest również modyfikowana przez aniony. I tak azotany specyficznie hamują aktywność enzymu. Działanie niskich stężeń NO_3^- (1–10mM) jest pseudokompetycyjne i ma charakter odwracalny. Wyższe stężenia azotanów (250–500 mM) powodują natomiast dysocjację kompleksu ATPazy [69]. Z

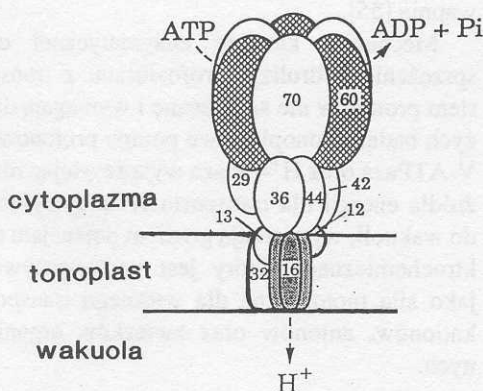


Ryc. 5. Redukcja i transport żelaza katalizowana przez plazmalemmowy system „turbo”.

Dokładny opis poszczególnych reakcji (1), (2), (3) i (4) katalizowanych przez „turbo-reduktazę” przedstawiono w tekście.

Fig. 5. Reduction and transport of ferric catalyzed by „turbo” system. Details for the reactions (1, 2, 3 and 4) in the text.

kolei chlorki są specyficznymi aktywatorami ATPaz tonoplastowych. Randall i Sze [65] sugerują, że endogenne chlorki i azotany współzawodniczą o miejsce wiązania anionu i w ten sposób modulują pompowanie protonów do wakuoli w warunkach *in vivo*. Roślinne V-ATPazy są dużymi białkami złożonymi z 7 do 10 podjednostek, podobnie jak ATPazy tej grupy występujące w błonach endoplazmatycznych komórek grzybów i zwierząt. Trzy największe polipeptydy (ryc. 6): 67–70, 55–60 i 16–17 kDa, począt-



Ryc. 6. Struktura tonoplastowej H^+ -ATPazy. Liczby określają masy cząsteczkowe (kDa) poszczególnych polipeptydów budujących ATPazę tonoplastową.

Fig. 6. Tonoplast H^+ -ATPase structure. The values on figure represent the molecular masses (kDa) of ATPase polypeptide chains.

kowo identyfikowane jako podjednostki są powszechne dla wszystkich ATPaz typu V. Zastosowanie znakowanych analogów ATP (7chloro 4 nitrobenzo-2-oksy 1,3 diazolu oraz 3-O-(4benzylo)-benzyladenozyno 5'- trifosforanu) dowiodło, że polipeptydy 70 i 60 kDa zawierają miejsca wiążące nukleotydy [84]. Miejsce wiążące nukleotydy na polipeptydzie 70 kDa stanowi centrum aktywne enzymu i odpowiada za hydrolizę ATP [81]. Sekwencja aminokwasowa tego miejsca ma charakter konserwatywny [16, 89] i wykazuje dużą homologię z sekwencją odpowiedzialną za wiązania ATP podjednostki β F_1 -ATPazy, co potwierdza jego rolę w katalizie enzymatycznej [35]. Także polipeptyd 60 kDa

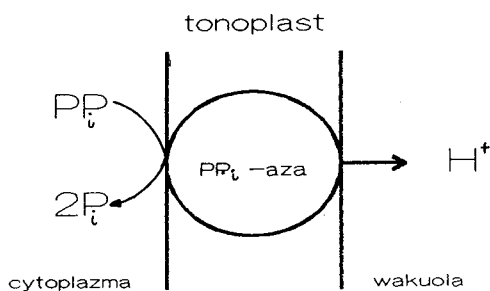
zawiera miejsce wiążące nukleotydy. Najprawdopodobniej spełnia on rolę regulatorową [81]. Polipeptydy 70 i 60 kDa mają charakter hydrofilny i wystają z tonoplastu po stronie cytoplazmatycznej, tworząc tzw. sektor peryferyczny (ryc. 6). W skład tego sektora wchodzi również hydrofilne mniejsze podjednostki V-ATPazy. W przypadku owsa są to polipeptydy o ciężarach 44, 42, 36 i 29 kDa [85]. Pięć polipeptydów sektora peryferycznego enzymu, w obecności substancji chaotropowych, takich jak KJ łatwo odłącza się od tonoplastu jako jedna duża podjednostka o ciężarze 540 kDa [47, 68, 85]. Polipeptyd 42 kDa nie jest składową tej podjednostki, ale również łatwo dysocjuje z błony w obecności KCl [84]. Sektor peryferyczny V-ATPazy przypomina w obrazie mikroskopowym strukturę syntetyzującej F_1F_2 ATPazy mitochondriów i chloroplastów. Kopie polipeptydów 70 i 60 kDa tworzą tzw. główkę a pozostałe polipeptydy tzw. trzonek.

Oprócz hydrofilnego sektora peryferycznego, V-ATPazy zawierają hydrofobowy sektor integralny. Tworzą go polipeptydy transbłonowe, spośród których jeden, o ciężarze 16 kDa, jest powszechny dla wszystkich roślinnych i zwierzęcych ATPaz typu V. Polipeptyd ten występuje w 6-ciu kopiach [43]. Ze względu na swoje właściwości (rozpuszczalność w mieszaninie chloroformu i metanolu) klasyfikowany jest jako proteolipid [69]. Każdy polipeptyd 16 kDa zawiera cztery fragmenty transbłonowe, z których jeden (IV) ma charakter wysoce konserwatywny. Przypuszcza się, że konserwatywny odcinek IV polipeptydu 16 kDa odpowiada za transport H^+ . Świadczy o tym wiązanie DCCD przez resztę glutaminową odcinka IV, hamujące całkowicie transport protonów. W przeciwieństwie do polipeptydów 70, 60 i 16 kDa, rola pozostałych łańcuchów V-ATPazy pozostaje niewyjaśniona. Przypuszcza się, że odpowiadają one za przyłączanie peryferycznego sektora enzymu do błon tonoplastu ale nie wyklucza się także ich regulatorowego charakteru.

b) Pirofosfatazy tonoplastowe

Drugą pompę protonową tonoplastu stanowią nieorganiczne pirofosfatazy (H^+ -PP₁azy).

Katalizują one z jednej strony hydrolizę nieograniczonego pirofosforanu, z drugiej elektrogeny transport protonów z cytoplazmy do wakuoli (ryc. 7). Jakkolwiek obecność nieorgani-



Ryc. 7. Pompa protonowa zależna od tonoplastowych H^+ -pirofosfataz.

Fig. 7. H^+ -pyrophosphatase dependent proton pump in the tonoplast.

cznych pirofosfataz w błonach mikrosomalnych izolowanych z tkanek roślinnych odkryto już w połowie lat 70-tych [43], to jednak ich udział w transporcie protonów przez błony tonoplastu udowodniono dopiero 10 lat później [8, 26]. W ostatnim czasie pojawiło się kilka prac poświęconych izolacji i charakterystyce tonoplastowych H^+ -PPi-az roślinnych. I tak wyizolowano tonoplastową H^+ -PPi-azę z tkanek fasoli [53] oraz buraka cukrowego [25, 75]. Okazało się, że w przeciwieństwie do tonoplastowej H^+ -ATPazy, nieorganiczna pirofosfataza tonoplastu zawiera tylko jeden polipeptyd o masie cząsteczkowej 73 kDa [55]. Nie jest jeszcze ustalona sekwencja aminokwasowa polipeptydu ani jego przestrzenna konfiguracja. Wiadomo jednak, że centrum aktywne enzymu, odpowiedzialne za hydrolizę pirofosforanu znajduje się po stronie cytoplazmatycznej błony [55]. Przyłączany jest tu kompleks $Mg-P_2O_7^{2-}$ będący substratem. Tak więc nieorganiczny pirofosforan nie jest hydrolizowany przy braku jonów magnezowych w środowisku. Jony Mg^{2+} konieczne są również dla utrzymania właściwej struktury białka enzymatycznego, bowiem jak wykazano aktywność tonoplastowej PPi-azy zależy od stężenia wolnych jonów magnezowych. Ponadto Mg^{2+} przeciwdziała termicznej i proteolitycznej inaktywacji

cji enzymu [55]. Wydaje się więc, że kompleks PPi-azy i Mg^{2+} może być stabilną, aktywną formą enzymu. Tonoplastowe pirofosfatazy są aktywowane również przez jony potasu. Jednakże K^+ stymuluje pompę protonową zależną od pirofosforanu tylko wtedy, gdy znajduje się po cytoplazmatycznej stronie tonoplastu [30], co sugeruje udział enzymu w antyportowym transporcie potasu przez tonoplast. Z kolei wapń jest silnym inhibitorem wakuolarnych H^+ -pirofosfataz. Hamujące działanie Ca^{2+} jest natychmiastowe i odwracalne, i wynika najprawdopodobniej z wiązania substratu w nieaktywny pirofosforan wapnia [55].

Mechanizm katalizy enzymatycznej oraz sprzężenie hydrolizy pirofosforanu z transportem protonów nie są poznane i wymagają dalszych badań. Tonoplastowe pompy protonowe – V-ATPaza oraz H^+ -PPi-aza wykorzystując różne źródła energii dla transportu H^+ z cytoplazmy do wakuoli, wytwarzają gradient potencjału elektrochemicznego, który jest wykorzystywany jako siła motoryczna dla wtórnego transportu kationów, anionów oraz związków organicznych.

LITERATURA

- [1] ANTON G. W., SPANSWICK R. M. 1985. Purification and properties of the H^+ -translocating ATPase from the plasma membrane of tomato roots. *Plant Physiol.* **81**: 1080–1085.
- [2] ASARD H., VANKEN M., CAUBERGS R., REIJNDERS W., OLTMANN F. L., DE GREEF J. A. 1989. b-type cytochromes in higher plant plasma membranes. *Plant Physiol.* **90**: 1077–1083.
- [3] ASKERLUND P., LARSSON C. H., WIDELL S. 1989. Cytochromes of plant plasma membranes. Characterization by difference spectrophotometry and redox titration. *Physiol. Plant.* **76**: 123–134.
- [4] ASKERLUND P., LARSSON C. H. 1991. Transmembrane electron transport in plasma membrane vesicles loaded with NADH-generating system or ascorbate. *Plant Physiol.* **96**: 1178–1184.
- [5] BANKS R. D., BLAKE C. F., EVANS P. R., HASER R., RICE D. W. 1979. Sequence, structure and activity of phosphoglycerate kinase: a possible hinge-bending enzyme. *Nature* **279**: 773–777.
- [6] BARR R., SANDELIUS A. S., CRANE F. L., MORRE D. J. 1986. Redox reaction of tonoplast and plasma membrane isolated from soybean hypocotyles by free-flow electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* **852**: 254–261.

- [7] BARR R., BOTTGER M., CRANE F. L., MORRE D. J. 1990. Electron donation to the plasma membrane redox system of cultured carrot cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1017**: 91–97.
- [8] BENNETT A. B., SPANSWICK R. M. 1984. H^+ -ATPase activity from storage tissue of *Beta vulgaris*. H^+ -ATP stoichiometry of an anion sensitive H^+ -ATPase. *Plant Physiol.* **77**: 545–548.
- [9] BIENFAIT H. F. 1988. The turbo reductase in plant plasma membranes. W: CRANE F. L., MORRE D. J., LOW H. eds. *Plasma Membrane Oxidoreductases in Control of Animal and Plant Growth*, Plenum Press, New York, 89.
- [10] BOCKHOUT T. J., HRUBEC T. C. 1986. Pyridine nucleotide dependent ferricyanide reduction associated with isolated plasma membranes of maize (*Zea mays* L.) roots. *Protoplasma* **135**: 144–154.
- [11] BOTTGER M., HILGENDORF F. 1988. Hormone action on transmembrane electron and H^+ transport. *Plant Physiol.* **86**: 1038–1043.
- [12] BOTTGER M. 1989. Transmembrane electron transfer of NADH loaded right side out vesicles. W: DAINTY J., De MICHELIS M. F., MARRE, Rasi-CALDOGANI R. eds. *Plant Membrane Transport*, Elsevier, Amsterdam, 55.
- [13] BOUNTRY M., MICHELET B., GOFFEAU A. 1989. Molecular cloning of a family of plant genes encoding a protein homologous to plasma membrane H^+ -translocating ATPases. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **162**: 567–574.
- [14] BOWN A. W., CRAWFORD L. A. 1988. Evidence that H^+ efflux stimulated by redox activity is independent of plasma membrane ATPase activity. *Physiol. Plant.* **73**: 170–174.
- [15] BOWMAN E. J., SIEBERS A., Altendorf K-H. 1988. Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPase from microorganisms, animal cells and plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 7972–7976.
- [16] BOWMAN B. J., Vazquez-LASLOP N., BOWMAN E. J. 1992. The vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. *J. Bioen. Biomem.* **24**: 361–370.
- [17] BRISKIN D. P., LEONARD R. T. 1982. Partial characterization of phosphorylated intermediate associated with the plasma membrane ATPase of corn roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 6922–6926.
- [18] BRISKIN D. P., POOLE R. J. 1983. Plasma membrane ATPase of red beet forms a phosphorylated intermediate. *Plant Physiol.* **71**: 969–971.
- [19] BRISKIN D. P., THORNLEY W. R., Roti-ROTI J. L. 1985. Target molecular size of the red beet plasma membrane ATPase. *Plant Physiol.* **78**: 642–644.
- [20] BRISKIN D. P. 1986. Intermediate reaction states of the red beet plasma membrane ATPase. *Arch. Biochim. Biophys.* **248**: 106–115.
- [21] BRISKIN D. P. 1988. Phosphorylation and dephosphorylation reactions of beet plasma membrane ATPase studied in the transient state. *Plant Physiol.* **88**: 84–91.
- [22] BRISKIN D. P. 1990. The plasma membrane H^+ -ATPase of higher plant cells: biochemistry and transport function. *Biochim. Biophys. Acta* **1019**: 95–109.
- [23] BRISKIN D. P., HANSON J. B. 1992. How does the plasma membrane H^+ -ATPase pump proton? *J. Exp. Bot.* **43** (248): 269–289.
- [24] BRITTEN C. J., TURNER J. C., REA P. A. 1989. Identification and purification of substrate-binding subunit of higher plant H^+ transportation inorganic pyrophosphatase. *FEBS Lett.* **256**: 200–206.
- [25] BRUGGEMAN W., WOOD P. R., NAGAKAWA H., JANIESCH P., KUIPER P. J.C. 1990. Plasma membrane bound NADH Fe-EDTA reductase and iron deficiency in tomato. Is there a turbo reductase? *Physiol. Plant.* **79**: 339–.
- [26] CHURCHILL K. E., SZE H. 1983. Anion sensitive H^+ -pumpkin ATPase in membrane vesicles from oat roots. *Plant Physiol.* **71**: 610–617.
- [27] COPELAND R. A., CHAN S. I. 1989. Proton translocation in proteins. *Ann. Rev. Physic. Chem.* **40**: 671–698.
- [28] CRAIG T. A., CRANE F. L. 1981. Hormonal control of a transplasma membrane electron transport in plant cells. *Proc. Indiana Acad. Sci.* **91**: 150.
- [29] CRANE F. L., SUN I. L., CLARK M. G., GREBING C., LOW H. 1985. Transplasma membrane redox system in growth and development. *Biochim. Biophys. Acta* **811**: 233–264.
- [30] DAVIES J. M., REA P. A., SANDERS D. 1991. Vacuolar proton-pumping pyrophosphatase in *Beta vulgaris* shows vectorial activation by potassium. *FEBS Lett.* **278**: 66–68.
- [31] DeMICHELIS M. I., PUGLIARELLO M. O., OLIVARI C., Rasi-Caldogno F. 1990. On the mechanism of FC-induced activation of the plasma membrane H^+ -ATPase. W: DAINTY J., DeMICHELIS M. I., MARRE E., Rasi-Caldogno F. eds. *Plant Membrane Transport: the current position*. Elsevier Science Publisher, Amsterdam pp. 373–378.
- [32] DHARMAWAREDHANE S., RUBINSTEIN B., STERN A. I. 1989. Regulation of transplasma membrane electron transport in oat mesophyll cells by sphingoid bases and blue light. *Plant Physiol.* **89**: 1345.
- [33] EVANS P. R., FARRANTS W., HUDSON P. J. 1981. Phosphofructokinase: structure and control. *Philos. Trans. R. Soc., London, Ser. B*, **293**: 53–62.
- [34] FEDERICO R., GIARTOSI C. E. 1983. A trans-plasma membrane electron transport system in maize roots. *Plant Physiol.* **73**: 182–184.
- [35] GOGARTEN J. P., KIBAK H., DITTRICH P., TAIZ L., BOWMAN E. J., BOWMAN B. J., MANOLSON M., POOLE J., DATE T., OSHIMA T., KONISHI J., DENTA K., YOSHIDA M. 1989. Evolution of the vacuolar H^+ -ATPase: Implications for the origin of eucariotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **186**: 6661–6665.
- [36] GOMZALEZ DE LA VERA L. E., MEDINA G. 1990. Phosphorylation by inorganic phosphate of the plasma membrane H^+ -ATPase from red beet (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **94**: 1522–1527.
- [37] GUERN J., MATHIEU Y., EPHRITIKHNE G., ULLRICH-EBERIUS C. I., LUTTGE V., MARRE M. T., MARRE E. 1988. Intercellular pH modification linked to the activity of the ferricyanide driven activity of the plasmalemma redox system in *Elodea densa* leaves, *Acer pseudoplatanus*, and *Catharanthus roseus* cells. W: CRANE F. L.,

- MORRE D., J., LOW H. eds. *Plasma Membrane Oxidoreductase in Control of Animal and Plant Growth*. Plenum Press, New York, p. 412.
- [38] HAGER A., MOSER I. 1985. Acetic acid esters and permeable weak acids induce active proton extrusion and extension growth of coleoptile segments by lowering the cytoplasmic pH. *Planta* **163**: 391–400.
- [39] HARPER J. F., SUROWY T. K., SUSSMAN M. R. 1989. Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H^+ -ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **86**: 1234–1238.
- [40] HENNESSEY J., SCARBOROUGH G. A. 1988. Secondary structure of the *Neurospora crassa* plasma membrane H^+ -ATPase as estimated by circular dichroism. *J. Biol. Chem.* **263**: 3123–3130.
- [41] JONES G. L., MOREL F. M.M. 1988. Plasmalemma redox activity in diatoms *Thalassiosira*. A possible role for nitrate reductase. *Plant Physiol.* **87**: 143–147.
- [42] KARLSSON J. 1975. Membrane-bound potassium and magnesium ion stimulated inorganic pyrophosphatase from roots and cotyledons of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Biochim. Biophys. Acta* **399**: 356–363.
- [43] KAESTNER K. H., RANDALL K., SZE H. 1988. N, N'-dicyclohexylcarbodiimide-binding proteolipid of the vacuolar H^+ -ATPase from oat roots. *J. Biol. Chem.* **263**: 1282–1287.
- [44] KJELLBOM P., LARSSON C., ASKERLUND P., SCHELIN C., WIDELL S. 1985. Cytochrome P-450/420 in plant plasma membranes: a possible component of the blue-light-reducible flavoprotein-cytochrome complex. *Phytochem. Photobiol.* **42**: 779–783.
- [45] KLOBUS G., BUCZEK J. 1992. A possible role of plasmalemma redox activity in nitrate uptake by *Cucumis sativus* L. seedlings. *Acta Physiol. Plant.* **14**: 41–47.
- [46] KLOBUS G., BUCZEK J. 1994. The role of plasma membrane oxidoreductase activity in proton transport. *J. Plant Physiol.* (in press).
- [47] LAI S., RANDALL S. K., SZE H. 1988. Peripheral and integral subunits of the tonoplast H^+ -ATPase from oat roots. *J. Biol. Chem.* **263**: 16731–16737.
- [48] LIN W. 1982. Response of corn roots protoplasts to exogenous NADH: oxygen consumption, ion uptake and membrane potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 3773–3776.
- [49] LOPPERT H. 1981. Energy coupling for membrane hyperpolarization in *Lemma*: Evidence against an ATPase fueled electrogenic pump as an exclusive mechanism. *Planta* **151**: 293.
- [50] LUSTER D. G., BUCKHOUT. J. 1988. Characterization and purification of multiple electron transport activities in plasma membrane from maize roots. *Physiol. Plant.* **73**: 339–347.
- [51] LUTHJE S., DORING O., BOTTFGER M. 1992. Modification of the activity of the PM redox system of *Zea mays* L. roots by vitamin K₃ and dicumarol. *J. Exp. Bot.* **43**: 175–181.
- [52] LUTHJE S., DORING O., BOTTFGER M. 1992. The effects of vitamin K₃ and dicumarol on the plasma membrane redox system and H^+ pumping activity of *Zea mays* L. roots measured over a long time scale. *J. Exp. Bot.* **43**: 183–188.
- [53] MAESHIMA M., YOSHIDA S. 1989. Purification and properties of vacuolar membrane proton-translocating inorganic pyrophosphatase from mung bean. *J. Biol. Chem.* **264**: 20068–20073.
- [54] MAESHIMA M. 1990. Development of vacuolar membranes during elongation of cell in mung bean hypocotyls. *Plant Cell Physiol.* **131**: 311–317.
- [55] MAESHIMA M. 1991. H^+ -translocating inorganic pyrophosphatase of plant vacuoles. Inhibition by Ca^{2+} , stabilization by Mg^{2+} and immunological comparison with other inorganic pyrophosphatases. *Eur. J. Biochem.* **196**: 11–17.
- [56] MANDELA S. M., SLYMAN C. W. 1989. The amino and carboxyl termini of the *Neurospora* plasma membrane H^+ -ATPase are cytoplasmically located. *J. Biol. Chem.* **263**: 15122–15128.
- [57] MARRE M. T., MORONI A., ALBERGONI F. G., MARRE E. 1988. Plasmalemma redox activity and H^+ extrusion. I. Activation of the H^+ -pump by ferricyanide-induced potential depolarization and cytoplasm acidification. *Plant Physiol.* **87**: 25–29.
- [58] MOLLER I. M., BERCZI A. 1986. Salicylhydroxamic acid-stimulated NADH oxidation by purified plasmalemma vesicles from wheat roots. *Physiol. Plant.* **68**: 67–74.
- [59] MOLLER I. M., CRANE F. L. 1990. Redox processes in the plasma membrane. W: LARSSON C., MOLLER I. M. eds. *The Plant Plasma Membrane*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp 94–121.
- [60] NAGAO T., NASAKAWA H., SUGIYAMA T. 1987. Purification of H^+ ATPase from the plasma membrane of maize roots and preparation of its antibody. *Plant Cell Physiol.* **28**: 1181–1186.
- [61] NAGLE J. F., TRISTAN-NAGLE S. 1983. Hydrogen-bonded chain mechanisms for proton conduction and proton pumping. *J. Mem. Biol.* **74**: 1–14.
- [62] NEUFELD V. A., BOWN A. W. 1987. A plasmamembrane redox system and proton transport in isolated mesophyll cells. *Plant Physiol.* **83**: 895–899.
- [63] PEDERSON P. J., CARIFOLI E. 1987. Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties and significance to cell function. *Trends in Biochim. Sci.* **12**: 146–150.
- [64] PORTILLO F., SERRANO R. 1988. Dissection of functional domains of the yeast proton-pumping ATPase by directed mutagenesis. *EMBO J.* **7**: 1793–1798.
- [65] RANDALL S. K., SZE H. 1986. Properties of the partially purified tonoplast H^+ -pumping ATPase from oat roots. *J. Biol. Chem.* **261**: 1364–1371.
- [66] RAMIREZ J. A., VACATA V., MCCUSKER J. H., HABER J. E., MORTIMER R. K., OWEN W. G., LACER H. 1984. ATP-sensitive K^+ channels in a plasma membrane H^+ -ATPase mutant of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 7866–7870.
- [67] REA P. A., SANDERS D. 1987. Tonoplast energization: two H^+ pumps, one membrane. *Physiol. Plant.* **71**: 131–141.
- [68] REA P. A., GRIFFITH C. J., MANOLSON M. F., SANDERSON D. 1987. Irreversible inhibition of H^+ -ATPase of

- higher plant tonoplast by chaotropic anions: evidence for peripheral location of nucleotide-binding subunits. *Biochim. Biophys. Acta* **904**: 1–12.
- [69] REA P. A., GRIFFITH C. J., SANDERS D. 1987. N,N'-di-cyclohexyl-carbodiimide-binding proteolipid of a higher plant tonoplast H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **262**: 14745–14752.
- [70] ROMANI G., MARRE M. T., BELLANDO M., ALLOATTI G., MARRE E. 1985. H⁺ extrusion and potassium uptake associated with potential hyperpolarization in maize roots treated with permanent weak acid. *Plant Physiol.* **79**: 734.
- [71] RUBINSTEIN B., STERN A. I., STOUT R. G. 1984. Redox activity at the surface of oat root cells. *Plant Physiol.* **76**: 386.
- [72] RUBINSTEIN B., STERN A. I. 1986. Relationship of transplasmalemma redox activity to protein and solute transport by roots of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **80**: 805–811.
- [73] RUBINSTEIN B., STERN A. I., CHALMERS D. C. 1992. Relationship between electron transport across the plasmalemma and a pH decrease in the bulk medium. *Plant Physiol.* **98**: 988–994.
- [74] SANDELIUS A. S., BARR R., CRANE F. L., MORRE D. J. 1987. Redox reaction of plasma membranes isolated from soybean hypocotyls by phase partition. *Plant Sci.* **48**: 1–10.
- [75] SARAFIAN V., POOLE R. J. 1989. Purification of an H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from vacuole membranes of red beet. *Plant Physiol.* **91**: 34–38.
- [76] SCALLA R., AMORY A., RIGAUD J., GOFFEAU A. 1993. Phosphorylated intermediate of a transport ATPase and activity of protein kinase in membranes from corn roots. *Europ. J. Biochim.* **132**: 525–530.
- [77] SERRANO R. 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Eur. Top. Cell. Regul.* **23**: 87–126.
- [78] SERRANO R. 1989. Structure and function of plasma membrane ATPase. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* **40**: 61–88.
- [79] SING S. P., KESAV B. V., BRISKIN D. P. 1987. Reconstitution and rapid partial purification of the red beet plasma membrane ATPase. *Physiol. Plant.* **69**: 617–626.
- [80] SUSSMAN M. R., HARPER J. F. 1989. Molecular biology of the plasma membrane of higher plants. *The Plant Cell* **1**: 953–960.
- [81] SZE H., WARD J. M., LAI S. 1992. Vacuolar H⁺-translocating ATPases from plants: structure, function and isoforms. *Bioen. Biomem.* **24**(4): 371–381.
- [82] ULLRICH C. I., GUERN J. 1990. Ion fluxes and pH changes induced by transplasmalemma electron transfer and fusicoccin in *Lemna gibba*. *Planta* **180**: 390–399.
- [83] WARD J. M., REINDERS A., Hsu H.-T., SZE H. 1992. Dissociation and reassembly of the vacuolar H⁺-ATPase complex from oat roots. *Plant Physiol.* **99**: 161–169.
- [84] WARD J. M., SZE H. 1992. Subunit composition and organization of the vacuolar H⁺-ATPase from oat roots. *Plant Physiol.* **99**: 170–179.
- [85] WARD J. M., REINDERS A., Hsu H.-T., SZE H. 1992. Dissociation and reassembly of the vacuolar H⁺-ATPase complex from oat roots. *Plant Physiol.* **95**: 456–460.
- [86] WIDELL S. 1987. Membrane-bound blue light receptors – possible connection to blue light photomorphogenesis. W: SENGEL H. ed. *Blue light response: phenomena and occurrence in plants and microorganisms*. Vol. II, CRC, Boca Raton, FL, pp 89–98.
- [87] WIDELL S., CAUBERGS R. J., LARSSON C. 1983. Spectral characterization of light-reducible cytochrome in a plasma membrane-enriched fraction and in other membranes from cauliflower inflorescence. *Photochem. Photobiol.* **38**: 95–98.
- [88] VARA F., SERRANO R. 1982. Partial purification and properties of the proton translocating ATPase of plant plasma membranes. *J. Biol. Chem.* **252**: 12826–12830.
- [89] ZIMNIAK K., DITTRICH P., GOGARTEN J. P., KIBAK H., TAIZ L. 1988. The cDNA sequence of the 69-ka subunit of the carrot vacuolar H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* **263**: 9102–9112.