

STRESZCZENIE

W niniejszym artykule przeglądowym przedstawiono informacje o rezultatach najnowszych badań dotyczących funkcji NTPDaz (apiraz) roślinnych. Omawiane enzymy to białka rozpuszczalne lub integralne białka błonowe. Ich obecność stwierdzono w różnych przedziałach komórkowych. Apirazy hydrolizują wiązania pirofosforanowe di- i trifosforanów nukleozydów. Ich wspólną cechą jest podobna budowa, niska specyficzność substratowa i aktywacja w obecności jonów dwuwartościowych. W apoplazmie apirazy uczestniczą w zwrotnym wychwytywaniu produktów degradacji nukleotydydów. Enzymy te katalizują bowiem reakcję hydrolizy ATP do AMP; AMP jest następnie degradowany przez inne ektoenzymy do adeniny, rybozy i ortofosforanu. Częsteczki te z udziałem odpowiednich transporterów i kanałów są transportowane do komórki. Rezultaty niektórych badań wskazują, że apirazy mogą również uczestniczyć w regulacji syntezy skrobi i przekazywaniu sygnałów. Ich aktywność jest także niezbędna do prawidłowego rozwoju i wzrostu bulw oraz korzeni. U roślin strączkowych z kolei aktywują proces symbiozy z bakteriami korzeniowymi. NTPDazy, które znajdują się wewnątrz komórek, katalizując reakcję hydrolizy nukleotydydów, zmieniają wewnątrzkomórkowy stosunek ATP:ADP:AMP. Sugeruje to, że większość z opisanych funkcji apiraz może wynikać ze stanu energetycznego komórki.

WPROWADZENIE

ATP to najbardziej uniwersalna cząsteczka nie tylko wśród nukleotydydów, ale również i innych związków obecnych w komórkach organizmów żywych. ATP jest substratem wykorzystywanym w syntezie kwasów nukleinowych i wielu koenzymów oraz wtórnych cząsteczek sygnałowych. Jest uniwersalnym środkiem wymiany energii swobodnej i składnikiem ładunku energetycznego komórki. Stężenie tego nukleotydy w komórkach reguluje szybkość przemian tworzących energetycznie użyteczne cząsteczki [1]. Wreszcie ATP jest również cząsteczką sygnałową [2-9]. U zwierząt ektonukleotydy w tym ATP i ADP, aktywują receptory nukleotydydowe typu P2 [2-8]. Receptory te uczestniczą w aktywacji i regulacji licznych procesów fizjologicznych. W układzie krwionośnym aktywują agregację płytek i regulują ciśnienie krwi [2-6], z kolei w układzie nerwowym biorą udział w neurotransmisji i neuromodulacji. Są również sygnałem bólu [6-9]. Wyczerpujący przegląd funkcji receptorów nukleotydydowych znajdziemy w obszernych publikacjach prof. Burnstock'a [3,5,7,9].

Stężenie nukleotydydów, tak w komórce jak i poza nią, regulują enzymy należące do kilku klas i rodzin takich jak: fosfatazy, kinazy, pirofosfatazy/fosfodiesterazy nukleotydydów (NPPazy), ATPazy i tri-difosfohydrolazy nukleotydydów (NTPDazy) [2,5,10-12]. Właściwości i funkcje NTPDaz zwierząt zostały bardzo dobrze poznane i opisane. Synteza NTPDaz zachodzi we wszystkich typach komórek zwierzęcych [10,11,13-16]. Oznacza to, że enzymy te są istotnym składnikiem metabolizmu i mają wpływ na szereg procesów fizjologicznych zależnych lub regulowanych przez nukleotydy. NTPDazy uczestniczą w procesach proliferacji, różnicowania i apoptozy [14,15]. Degradując ektonukleotydy, wpływają również na rozwój procesów zapalnych [5,14,15]. Większość dotychczas opisanych NTPDaz zwierzęcych to białka błonowe z centrum aktywnym znajdującym się po zewnętrznej stronie błony komórkowej (ekto-NTPDazy) lub enzymy rozpuszczalne (egzo-NTPDazy) uwalniane do przestrzeni międzykomórkowej lub płynów tkankowych, takich jak krew i płyn mózgowo-rdzeniowy [10-16]. Enzymy te regulują stężenie nukleotydydów znajdujących się poza komórką lub w płynach fizjologicznych i w ten sposób uczestniczą w sygnalizacji purynowej [2-8,10,15]. NTPDaza1 zwierząt jest analogiem apirazy roślin [12,15].

W skutek historycznych uwarunkowań NTPDazy roślinne nazywa się często apirazami. Mimo wcześniejszego odkrycia i opisanie enzymów roślinnych wiedza na temat ich funkcji w roślinach jest niepełna i wymaga dalszych intensywnych badań. Dopiero w ostatnich kilku latach pojawiło się kilka prac dostarczających interesujących informacji na temat budowy i ekspresji genów roślinnych

Magdalena Wujak

Michał Komoszyński✉

Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, Toruń

✉Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Zakład Biochemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń; tel.: (56) 611 45 20, e-mail: michkom@chem.uni.torun.pl

Artykuł otrzymano 6 maja 2010 r.
Artykuł zaakceptowano 19 lipca 2010 r.

Słowa kluczowe: roślinne NTPDazy, apirazy, funkcja, ektonukleotydy, geny NTPDaz roślinnych, kasety ABC

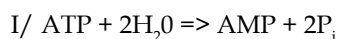
Wykaz skrótów: adn (ang. *adenine*) - adenina; ado (ang. *adenosine*) - adenozylna; apy (ang. *apyrase*) - apiraza; ATP (ang. *adenosine triphosphate*) - trifosforan adenozylny; NPA (ang. *1-naphthylphthalamic acid*) - kwas N-(1-naftylo)ftalamowy; NTPDaza (ang. *nucleoside triphosphate diphosphohydrolase*) - tri-difosfohydrolaza nukleotydydów; 5'-NUC (ang. *5'-nucleosidase*) - 5'-nukleotydydaza; Pi - ortofosforan; PPADS (ang. *pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate*) - kwas 2',4'-disulfonopirydoksylofosforano-6-azofenylowy; RB2 (ang. *reactive blue 2*) - reaktywny błękit; XDP - difosforan nukleozydu

NTPDaz oraz przypuszczalnych funkcji kodowanych przez nie białek. Badania te dotyczą ich udziału w regulacji procesów wzrostu i rozwoju rośliny, w tym kiełkowania ziarna pyłku i dojrzewania bulw [17-25]. Inne badania koncentrują się na procesach sygnalizacji oraz ich udziale w reakcjach odpornościowych roślin [24-32]. Białka te z uwagi na wysoką aktywność katalityczną oraz brak glikozylacji mogą być wykorzystywane w leczeniu chorób degeneracyjnych układu nerwowego, udarów czy też zawałów serca [15,16,33,34].

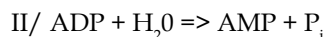
WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE, BUDOWA I LOKALIZACJA APIRAZ ROŚLINNYCH

Apirazy ziemniaka (difosfohydrolazy ATP - EC 3.6.1.5) to najlepiej scharakteryzowane enzymy należące do rodziny NTPDaz roślin [23,34-37]. Po raz pierwszy enzym ten został opisany przez Meyerhof'a w 1945 roku [36]. Była to rozpuszczalna apiraza izolowana z komórek bulw ziemniaka (*Solanum tuberosum*). Z ziemniaka wyizolowano i oczyszczono dwie izoformy apirazy, jednak sklonowano tylko jedną jej formę [36,37].

Apirazy hydrolizują wiązania bezwodnikowe dwu- i trójfosforanów nukleozydów w obecności jonów metali dwuwartościowych zgodnie ze schematem I i II [33-37]:



lub



Końcowymi produktami reakcji są AMP i dwie lub jedna cząsteczka ortofosforanu. Apirazy nie hydrolizują wiązań estrowych nukleotydu i nieorganicznego pirofosforanu [34-37,39]. Najwyższa aktywność hydrolizy obserwowana jest w obecności jonów Ca^{2+} lub Mg^{2+} [11,37]. Inne dwuwartościowe kationy, takie jak Mn^{2+} , Co^{2+} oraz Zn^{2+} stymulują jej aktywność ze znacznie mniejszym efektem [37,40]. Dla apirazy z *S. tuberosum* stwierdzono, że jony Ca^{2+} wzmacniają aktywność hydrolityczną względem ADP, a Mg^{2+} - względem ATP [37]. Aktywność enzymatyczna apiraz może być również modulowana przez lektyny oraz związki bifunkcjonalne [11,40]. Wszystkie NTPDazy, niezależnie od pochodzenia, charakteryzują się niską specyficznością substratową, a szybkość hydrolizy ATP nie jest ograniczona stężeniem wolnego ADP [37,40]. Są również niewrażliwe na inhibitory alkalicznych fosfataz i ATPaz typu P, V, F [11,15,36,39].

Białka kodowane przez geny apiraz roślinnych są pojedynczym łańcuchem polipeptydowym o masie cząsteczkowej 45-50 kDa [23,36-38,40,41]. Struktura wszystkich dotychczas wyizolowanych genów apiraz roślinnych sugeruje, że na końcu aminowym białek znajduje się sekwencja peptydu sygnałowego oraz sekwencje jednej lub dwóch domen transbłonowych [18,19,23,38]. Enzymy występują w dwóch formach - rozpuszczalnej lub błonowej [18,19,23,36]. Centrum katalityczne apiraz związanych z błoną znajduje się po stronie ekstracytoplazmatycznej [18,35,36]. Na podstawie sekwencji nukleotydowej stwierdzono, że apirazy roślin i zwierząt zawierają zachowane w ewolucji rejony określane

jako ACR (ang. *apyrase conserved regions*) [12,15, 34-36]. Badania prowadzone nad apirazami zwierząt sugerują, że rejony ACR odpowiadają za specyficzność, wiązanie, hydrolizę substratu oraz oddziaływanie z jonami metali [11,15]. Skonstruowany *ab initio* model struktury przestrzennej apirazy ziemniaka sugeruje, że w proces katalizy zaangażowane są reszty aminokwasowe Thr127 i Thr55 oraz Glu170 i Glu78. Dwustopniowy mechanizm hydrolizy zakłada, że obie reszty treoniny są nukleofilami odpowiedzialnymi za rozerwanie wiązań bezwodnikowych (γ i β) ATP. Dodatkowo w procesie tym niezbędne są Glu170 i Glu78. Obecność dwóch nukleofili w centrum katalitycznym wyjaśnia różnice w aktywności hydrolitycznej między apirazami a innymi enzymami rodziny NTPDaz [35].

Obecność NTPDaz roślin stwierdzono w różnych przedziałach komórkowych [18,21-23,40-42]. Aktywność apirazy oznaczono w mikrosomach grochu, pszenicy, ziemniaka i bawełny [34]. Apirazę wyizolowano również z błony jądrowej zarodka i z cytoszkieletu grochu [41, 42]. U soi (*Glycine soja*) zidentyfikowano dwie apirazy (GS50 i GS52), z których jedna jest apirazą obecną w świetle aparatu Golgiego, a druga z nich jest ektoapirazą związaną z błoną komórkową [44]. Z kolei z korzeni fasoli indyjskiej (*Dolichos biflorus*) wyizolowano lektynę o aktywności apirazy. Enzym ten zawiera cztery rejony o sekwencji reszt aminokwasowych identycznej z ACRami spotykanymi u apiraz [43,44].

GENY NTPDaz ROŚLINNYCH I ICH EKSPRESJA

Geny kodujące NTPDazy znaleziono w genomach kręgowców, bezkręgowców, roślin, drożdży oraz pierwotniaków [15,23,34,36]. Do dnia dzisiejszego w różnych gatunkach roślin zidentyfikowano blisko 18 genów kodujących apirazy. Dwie sekwencje kodujące apirazę z ziemniaka zidentyfikowali Riewe i wsp. (2008). Komoszyński i wsp. wyizolowali osiem genów kodujących apirazę ziemniaka. Sekwencje reszt aminokwasowych wyznaczone na ich podstawie są identyczne w 93-99% (dane nieopublikowane, umieszczone w bazie NCBI). W mimozie wstydlivej znaleziono jeden gen kodujący apirazę, a w komórkach bawełny dwa [2,22,45]. W roślinach strączkowych zidentyfikowano łącznie dwanaście genów kodujących apirazy [23,38,43-45]. Na podstawie analizy genomu rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) znaleziono siedem genów kodujących apirazy. Dwa z nich (*AtAPY1* i *AtAPY2*) zostały sklonowane. Określono profil ich ekspresji i podjęto próbę oceny ich funkcji fizjologicznych. Sekwencje reszt aminokwasowych tych białek są identyczne w 87%, co sugeruje, że enzymy te mogą brać udział w różnych procesach metabolicznych [18,19,21,40].

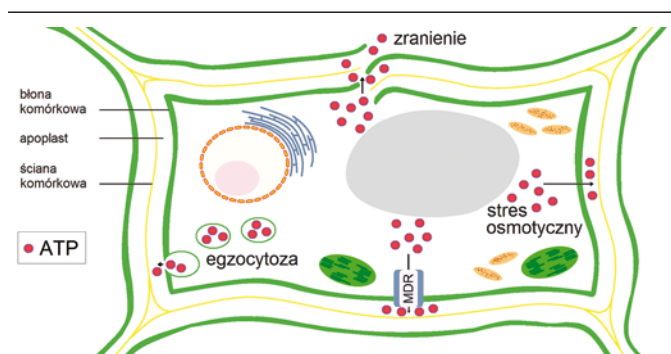
Na podstawie analizy zawartości mRNA można stwierdzić, że poziom ekspresji genów kodujących apirazy jest różny dla różnych typów tkanek [18,19,23,38,40-45]. Wyższy poziom transkryptów obserwuje się w tkankach, które charakteryzują się szybkim wzrostem oraz w tych, które ulegają procesowi różnicowania [18,23,40,44]. Steinebrunner i wsp. (2007) wykazali, że najwyższą ekspresję genów apiraz rzodkiewnika (*AtAPY1* i *AtAPY2*) wykazują szybko dzielące i różnicujące się tkanki oraz organy. Należą do nich łagiewka pyłkowa, etiolowane hypokotyle, wierzchołek

korzenia oraz miejsca akumulacji auksyny i jej transportu, a także komórki wykazujące wysoką ekspresję genów kodujących białka PIN [18,19]. Ponadto w elementach regulatorowych *cis* obu tych genów występują charakterystyczne motywy sekwencji, których aktywność regulowana jest przez światło oraz auksynę. Stwierdzono, że światło czerwone powoduje obniżenie liczby transkryptów apirazy w hypokotylu, co wywołuje zahamowanie wzrostu korzeni [18]. U ziemniaka apiraza występuje przede wszystkim w komórkach tkanek korzenia, kwiatów, pędu i bulw, natomiast w liściach i tkankach łodygi ilość mRNA jest niewielka lub żadna [23]. Niskim poziomem transkryptów apirazy charakteryzują się liście rzodkiewnika i grochu [18,38,40]. U innych roślin obserwuje się zbliżone profile ekspresji tych enzymów [41-45].

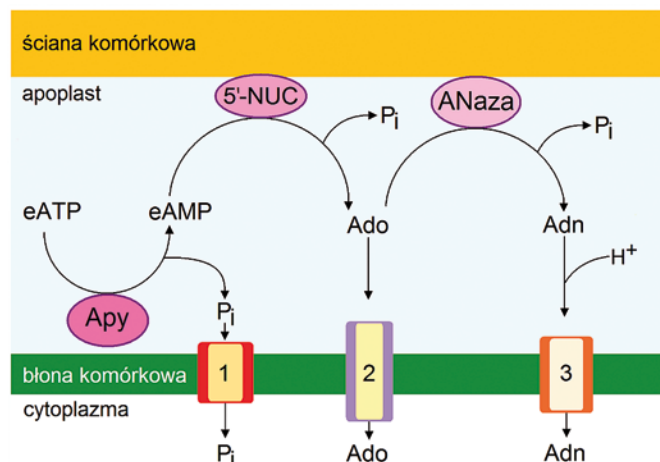
ŹRÓDŁA I METABOLIZM EKTONUKLEOTYDÓW W ROŚLINACH

ATP jest związkiem wysokoenergetycznym. Zmieniające się stężenia tego nukleotydu w komórce kontrolują wiele szlaków metabolicznych. Hydroliza obecnych w tej cząsteczce wiązań bezwodnikowych dostarcza energii dla szeregu endoergicznych reakcji i procesów niezbędnych do wzrostu i rozwoju komórki [1]. ATP może pojawiać się w przestrzeni poza komórką na drodze egzocytozy z pęcherzyków wydzielniczych lub być transportowany z udziałem transporterów ABC (białek zawierających kasetę wiążącą ATP) [17,24-30,48]. Nukleotyd ten jest również uwalniany z komórek roślinnych podczas stresu osmotycznego lub w wyniku utraty integralności błony komórkowej spowodowanej uszkodzeniem mechanicznym lub atakiem patogenów (Ryc. 1) [27-30]. Jego źródłem mogą być również mikroorganizmy żyjące w glebie [17,30].

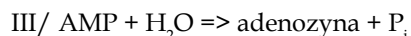
Zewnątrzkomórkowy ATP (eATP) nie jest transportowany do wnętrza komórki, jednak związek ten zawiera elementy strukturalne, których synteza wymaga wysokich nakładów energii (adenina, ryboza) [1,17,48]. Wielu autorów sądzi, że podstawową funkcją roślinnych apiraz jest kontrola stężenia ATP znajdującego się w apoplacie (Ryc 2.) [23,46-50]. Ektoapirazy hydrolizują ATP zgodnie ze schematem I i II. Jak dotąd nie zostały zidentyfikowane białka, które umożliwiałyby transport AMP do wnętrza komórki [48]. Ten nukleotyd jest hydrolizowany do ortofosforanu i adenozyliny przez obecną w apoplacie 5'-nukleotydazę (schemat III).



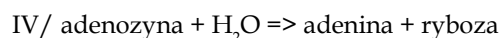
Rycina 1. Źródła ATP w apoplacie. MDR – transporter ABC z kasetą wiążącą ATP. Szczegółowy opis ryciny w tekście. Wg [26] zmodyfikowana.



Rycina 2. Metabolizm ektonuukleotydu w apoplacie. Apy – apiraza; 5-NUC – 5'-nukleotydaza; ANaza – N-glikozydaza; Pi – ortofosforan; H⁺ – kation wodorowy; Ado – adenozylina; Adn – adenina; 1 – kanał jonowy; 2 – transporter adenozyliny; 3 – transporter adeniny. Szczegółowy opis ryciny w tekście. Wg [50] zmodyfikowana.



Powstająca w tej reakcji adenozylina może być transportowana do wnętrza komórki za pośrednictwem białkowych transporterów na drodze symportu z jonami wodorowymi lub ulegać dalszej degradacji do adeniny i rybozy [47,48]. Powstający w powyższych reakcjach ortofosforan jest transportowany do komórki z udziałem kanałów anionowych [49]. Rezultaty badań Rewie i wsp. (2008) sugerują, że w przestrzeni międzykomórkowej znajduje się również N-glikozydaza (nazwana przez autorów ANazą) [47]. Jej wysoce specyficzna aktywność względem adenozyliny umożliwia efektywne odzyskiwanie adeniny i rybozy z cząsteczek adenozyliny (schemat IV).



Stwierdzono, że aktywność ANazy zależy od aktywności ektoapiraz. Wynika to z dwóch powodów. Po pierwsze, stężenie adenozyliny zależy od aktywności apiraz i 5'-nukleotydazy. Po drugie aktywność 5'-nukleotydazy jest uzależniona od stężenia ATP i ADP, które hamują aktywność tego enzymu [10,16,47].

Ektoapiraza obecna w apoplacie może być enzymem rozpuszczalnym lub słabo zasocjowanym z błoną komórkową [22,23,40,47]. Inna hipoteza sugeruje, że ektoapiraza i pozostałe enzymy uczestniczące w metabolizmie eATP, związane są ze ścianą komórkową [48]. Wielu autorów podziela opinię, że apirazy, regulując poziom zewnątrzkomórkowego ATP, uczestniczą w katabolizmie ATP i funkcjonują jako regulatory zewnątrzkomórkowego stanu energetycznego [17,23,47]. Obecne w apoplacie apirazy dzięki wysokiej aktywności katalitycznej, którą ogranicza jedynie dostępność substratu, hydrolizują ATP (niezależnie od źródła jego pochodzenia) i błyskawicznie zwiększają pulę zewnątrzkomórkowego ortofosforanu, który np. może być wykorzystywany przez ryzosferę [17,47,49]. Naszym zdaniem podstawową funkcją apiraz oraz innych enzymów metabolizujących ektonuukleotydy jest umożliwienie odzy-

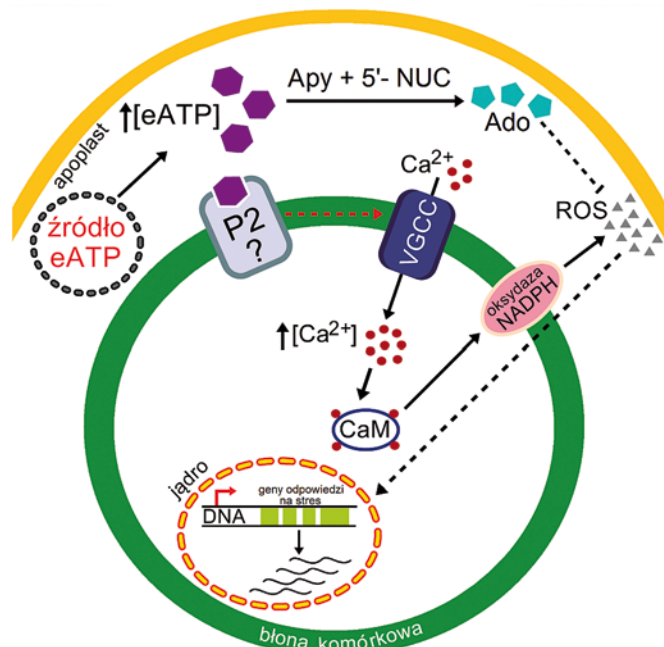
skania przez komórkę, z udziałem stosownych kanałów i transporterów, takich produktów degradacji nukleotydów jak ortofosforan, adenozyne, adenina i ryboza (Ryc. 2).

PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU Z UDZIAŁEM EATP

Istnieją hipotezy, że zewnątrzkomórkowy ATP mógłby pełnić w roślinach funkcję sygnalizacyjną [17,20,23-30]. Niektórzy badacze twierdzą, że u roślin istnieją receptory podobne do receptorów nukleotydowych (P1 i P2) zwierząt, jednak jak dotąd nie odnaleziono ich w roślinach [20,26-29]. Sekwencje reszt aminokwasowych receptorów zwierząt nie są zachowane w ewolucji [20,24,28]. Istnieją wyraźne różnice zarówno w sekwencji jak i strukturze pomiędzy receptorami nukleotydowymi zidentyfikowanymi u ssaków i alg [20,28]. Autorzy sugerują, że niski stopień zachowania w ewolucji sekwencji kodujących receptory P1 i P2 jest głównym problemem utrudniającym ich identyfikację w genomie roślinnym [17,20,27,30].

W doświadczeniach dotyczących wytwarzania nadtlenu przez oksydazę NADPH w odpowiedzi na wzrost stężenia zewnątrzkomórkowego ATP zauważono, że po dodaniu do środowiska ATP linie transgeniczne *A. thaliana* wykazujące nadekspresję genu *apy2*, charakteryzują się niższym poziomem syntezy rodnika nadtlenkowego [27-29]. Jednocześnie zmniejsza się ilość transkryptów genu *pal1* (kodującego liazę fenylolanina-amoniak), który jest indukowany przez reaktywne formy tlenu (ROS) [24]. Obserwuje się również zmniejszoną transkrypcję genów *LOX2* oraz *ACS6* kodujących enzymy zaangażowane w biosyntezę dwóch hormonów roślinnych – kwasu jasmonowego i etylenu [24,29]. Oba te hormony uczestniczą w odpowiedziach obronnych roślin (w tym na zranienie). W doświadczeniach dotyczących transmisji sygnału z udziałem eATP u roślin, zauważono, że użycie PPADS - inhibitora receptorów adenozyne i RB2 - niespecyficznego inhibitora receptorów nukleotydowych, zmniejsza ekspresję powyższych genów [24,27-29]. Na podstawie tych wyników autorzy proponują następujący model szlaku przekazywania sygnałów z udziałem eATP (Ryc 3.). Podczas stresu wywołanego czynnikami biotycznymi lub abiotycznymi, jak również stymulacja mechaniczna powoduje wypływ ATP z komórki [17,24-26,30]. eATP wiąże się do receptora, co powoduje napływ jonów wapnia do cytoplazmy [17,26-28]. Aktywacja przez jony Ca^{2+} kalmoduliny zwiększa aktywność oksydazy NADPH i tym samym podnosi poziom reaktywnych form tlenu, takich jak rodnik nadtlenkowy [17,27-39]. Zwiększenie ilości ROS powoduje aktywację genów kodujących białka związane z mechanizmami obronnymi i odpowiedzią (adaptacją) na działające bodźce środowiskowe [17,24,26,27,30]. Należy do nich kinaza białkowa aktywowana mitogenem (MAPK3), która poprzez fosforylację reguluje aktywność docelowych białek [27]. W tym przypadku autorzy sugerują, że ektoapirazy, z uwagi na ich wysoką aktywność, mogłyby, przez hydrolizę eATP, modulować lub wyciszać szlaki sygnalizacyjne, w których eATP funkcjonuje jako cząsteczka sygnałowa [20,25,27,28,31].

Wyniki badań z zastosowaniem mikromacierzy DNA pokazują, że wyciszenie genów apirazy zwiększa blisko dwukrotnie ekspresję genów kodujących białka należące



Rycina 3. Model sygnalizacji zewnątrzkomórkowej z udziałem eATP. *Apy* – apiraza; 5'-NUC – 5'-nukleotydaza; P2 – hipotetyczny receptor typu P2; VGCC – kanał wapniowy bramkowany napięciem; CaM – kalmodulina; ROS – reaktywne formy tlenu; Ado – adenozyne. Szczegółowy opis ryciny w tekście. Wg [29] zmodyfikowana.

do rodziny ekstensyn [23]. Ekstensyny są bogate w glikozylowaną hydroksyprolinę. Zlokalizowane są w ścianie komórkowej od strony apoplastu i pełnią funkcje strukturalne oraz sygnalizacyjne. Udowodniono, że ich aktywność wpływa na procesy zaangażowane w rozpoznanie ziarna pyłku, zapłodnienie, rozwój zarodka, podział komórki, różnicowanie oraz starzenie się komórek [23,50]. Białka te są również zaangażowane w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny [50]. Autorzy sugerują, że ekstensyny mogą uczestniczyć w transmisji sygnału z udziałem eATP. Zważywszy, że najważniejszą funkcją apirazy w apoplaste jest kontrola zewnątrzkomórkowego stężenia ektonukleotydów, enzymy te mogą również regulować ten szlak sygnalizacyjny [23]. W tym przypadku celem procesów prowadzonych z udziałem apirazy i ekstensyn może być zwiększenie żywotności komórek oraz kontrola ich polarnego wzrostu [23,30,50].

ROLA APIRAZY W SYNEZIE SKROBI

Bardzo wysoka ekspresja mRNA apirazy w bulwach ziemniaka (organach służących akumulacji tego polisacharydu) jest argumentem sugerującym, że apiraza jest zaangażowana w proces biosyntezy skrobi [23,36,46,47]. Ponadto wiele etapów biosyntezy tego cukru jest regulowanych substratami (ATP i ADP) i produktami (ortofosforan) reakcji katalizowanych przez apirazę [1,23,47]. Podczas 140-dniowego rozwoju bulw ziemniaka jednocześnie rośnie ilość skrobi i aktywność apirazy. Wraz ze wzrostem syntezy skrobi stężenie XDP powinno rosnąć (schemat V), jednak obserwowany poziom tego związku w bulwach nie odpowiadał ilości zsyntetyzowanej skrobi (był niższy).

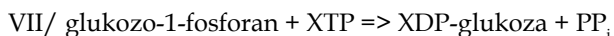


UDZIAŁ APIRAZ W KONTROLI WZROSTU ROŚLIN

Obniżone stężenie ADP, śladowa aktywność kinazy adenylanowej oraz wzrost aktywności apirazy sugerują, że podczas dojrzewania bulw enzym ten reguluje stężenie ADP [23,46]. Obecna w komórkach apiraza umożliwia stałą szybkość syntezy wielocukrów poprzez degradację difosfokleotydów, przeprowadzając reakcję zgodnie ze schematem VI:



Wiadomo, że w komórkach roślinnych degradacja i biosynteza cukrów jest kontrolowana przez ortofosforan [1,46]. Zauważono, że podczas nagłego spadku temperatury poniżej 0°C następuje wzrost ilości monocukrów [23,46]. Obrona przed zachodzącymi zmianami w środowisku polega na uruchomieniu rezerw cukrów prostych, które są zgromadzone w postaci skrobi. Podczas hydrolizy skrobi (fosforolizy) niezbędny jest ortofosforan. Gwałtowny wzrost zapotrzebowania na ortofosforan jest pokrywany ze źródeł znajdujących się w komórce. Apiraza, hydrolizując ATP, dostarcza substratu (ortofosforanu) do hydrolizy skrobi i uczestniczy w odpowiedziach na zachodzące w środowisku zmiany temperatury. Apiraza może również kontrolować proces akumulacji skrobi, ponieważ mutacja obu genów *AtAPY1* i *AtAPY2* powoduje, że skrobia akumuluje się w komórkach w postaci wyraźnie większych ziaren [21]. W doświadczeniach w których użyto linie transgeniczne ziemniaka, w których wyciszono transkrypcję genów kodujących ziemniaczane apirazy, obserwowano wzrost ilości transkryptów białek zaangażowanych w syntezę skrobi, takich jak syntaza sacharozy, mitochondrialne i plastydowe translokazy ATP/ADP oraz translokaza glukozy-6-fosforanu [23]. Enzymy te stymulują wzrost liczby ziaren skrobi w bulwach ziemniaka. Obniżona aktywność apirazy skoordynowana jest ze wzrostem liczby transkryptów podjednostki pirofosforylasy ADP-glukozy (AGPazy) [23]. AGPaza jest kluczowym enzymem w biosyntezie skrobi i przeprowadza reakcję przeniesienia glukozy z fosforanu glukozy na XDP (schemat VII):



Aktywność AGPazy regulowana jest przez utlenianie i redukcję grup -SH cysteiny [23]. Autorzy sugerują, że reakcje te mogą być katalizowane przez zależną od NADPH plastydową reduktazę tioredoksyny, ponieważ w warunkach obniżonej syntezy apiraz roślinie ekspresja genu kodującego ten enzym [23]. Powyższe wyniki sugerują, że aktywność apiraz wpływa na proces biosyntezy skrobi na poziomie transkrypcji, jednak nieznanne są mechanizmy, w jaki sposób apirazy mogłyby regulować syntezę białek zaangażowanych w tym procesie. Naszym zdaniem obserwowane zmiany nie są wynikiem bezpośredniej regulacji aktywności genów przez apirazy, lecz są związane z podwyższeniem ilości ADP i obniżeniem w komórkach bulw puli ortofosforanu (fosforoliza) i AMP, a więc tych związków, które wpływają na ładunek energetyczny i potencjał fosforylacyjny komórki. Powyższe zmiany mogą mieć istotny wpływ na tempo wzrostu i rozwój bulw ziemniaka.

Linie transgeniczne ziemniaka, w których wyciszono geny apiraz konstruktem znajdującym się pod kontrolą konstytutywnego promotora wirusa mozaiki kalafiora (CaMV 35S) charakteryzowały się mniejszą o 90% aktywnością apiraz w porównaniu z roślinami kontrolnymi [23]. Obniżona aktywność apirazy skorelowana jest ze zmianami morfologicznymi w tkankach i organach rosnących pod ziemią. Są to tkanki, w których ekspresja genów apiraz w warunkach fizjologicznych jest najwyższa [23]. Skutkiem wyciszenia genów apiraz jest otrzymanie mniejszych roślin, u których widoczny jest zahamowany wzrost pędów, a bulwy tych roślin są liczniejsze i mniejsze [23]. Zastosowanie organospecyficznego promotora B33 umożliwiło wyciszenie ekspresji genów apiraz tylko w bulwach rośliny. W tym przypadku nie doszło do zahamowania wzrostu całych roślin, natomiast bulwy ziemniaka były wydłużone oraz zawierały nieznacznie podwyższoną zawartość skrobi [23]. Przedstawione wyżej badania sugerują, że apirazy uczestniczą w regulacji wzrostu rośliny. Wyniki badań przeprowadzonych na grochu sugerują, że znajdująca się w aparacie Golgiego apiraza o wysokiej aktywności względem UDP, uczestniczy w biosyntezie składników ściany komórkowej [23,38,42], jednak w komórkach bulw ziemniaka, w których wyciszono geny apiraz nie obserwowano różnic w ilości celulozy i kwasu uronowego, składników ściany komórkowej [23]. Brak tych zmian wskazuje, że apirazy nie są zaangażowane w proces biosyntezy tych cząsteczek. Wiemy jednak, że aktywność ektoapiraz powoduje wzrost stężenia jonów fosforanowych poza komórką, co obniża pH apoplastu. Zakwaszenie to może aktywować syntezę ściany komórkowej (tzw. kwaśny wzrost ściany komórkowej) [21,23,51].

W minionej dekadzie pojawiło się w literaturze szereg prac dotyczących roli apiraz rzodkiewnika w procesie kiełkowania ziarna pyłku [18-21,42]. Wyniki tych badań sugerują udział omawianych enzymów w regulacji ekspresji genów w komórkach męskiego gametofitu. Użycie konstruktyw utworzonych z promotora genów *AtAPY1* lub *AtAPY2* i genu kodującego białko reporterowe (β -glukuronidazę), umożliwiło identyfikację tkanek, w których dochodzi do transkrypcji genów apirazy. Wyniki tych doświadczeń wskazują, że ich wysoka ekspresja ma miejsce tylko w kwiatach zawierających dojrzałe ziarna pyłku, podczas gdy jest ledwie zauważalna w niedojrzałych ziarnach [19]. Pozbawienie ciągłości obu genów kodujących apirazy (*AtAPY1* i *AtAPY2*) przez umieszczenie w ich sekwencji fragmentu T-DNA pozwoliło na utworzenie mutantów, ze zmodyfikowanym jednym lub dwoma genami tego enzymu [19,21]. Analiza fenotypów uzyskanych roślin transgenicznych wykazała, że pojedyncze mutanty były podobne morfologicznie do roślin typu dzikiego [19]. Nie obserwowano również różnic tak w szybkości kiełkowania ziaren pyłku jak i w budowie gametofitów. Podwójny nokaut genów *AtAPY1* i *AtAPY2* był letalny, jeśli dwa znokautowane allele pochodziły od gametofitu męskiego [19,21]. Uzyskany w tych warunkach gametofit był niedojrzały i fizjologicznie nieaktywny. Powyższe zmiany powodowały również spowolnienie procesu rozwoju i wydłużania łagiewki pyłkowej. Nokaut obu genów apiraz całkowicie hamował proces zapylenia, a uzyskane nasiona nie kiełkowały [19,21]. Oznacza to, że

aktywność apirazu odgrywa ważną rolę w procesie rozmnażania rzodkiewnika. Powyższą hipotezę potwierdziły badania nad wpływem ATP, substratu apirazy, na kiełkowanie ziaren pyłku. W doświadczeniach tych wykazano, że ATP w stężeniu 2mM całkowicie hamuje kiełkowanie tych roślin, podczas gdy ADP, tylko w pewnym stopniu. Z kolei 4mM AMP, który nie jest hydrolizowany przez apirazę, hamował proces kiełkowania tylko w 10% [19]. Zastosowanie NGXT1913, silnego inhibitora aktywności apirazy lub poliklonalnych przeciwciał skierowanych przeciwko apirazom rzodkiewnika również hamowało proces kiełkowania. Na podstawie powyższych wyników autorzy sugerują, że wysoki poziom zewnątrzkomórkowego ATP może być przyczyną męskiej sterility u rzodkiewnika [19]. Tak więc, brak aktywności apirazy powoduje wzrost ilości niehydrolizowanego ATP oraz obniżenie puli dostępnego AMP i P_i , czego widocznym skutkiem są morfologiczne i funkcjonalne zmiany męskiego gametofitu [19,21]. Zdaniem autorów regulacja procesu rozmnażania u rzodkiewnika przez apirazę jest wynikiem ich katalitycznej funkcji polegającej na obniżaniu stężenia nukleotydów w komórkach i tkankach. Autorzy sugerują, że apirazy są niezbędne w utrzymaniu odpowiedniego (wyraźnie stromego) gradientu ATP przez błonę komórkową, który ułatwiłby lub umożliwiłby transport substancji niezbędnych podczas procesu kiełkowania i wzrostu [18-21]. Naszym zdaniem powyższe doświadczenia należy traktować ostrożnie. Milimolowe stężenia ATP (a takich używali autorzy w swoich badaniach) oraz hamowanie aktywności apirazy powoduje utrzymywanie się wysokiego stężenia ATP w pobliżu błon. Wiele badań wskazuje, że wysokie stężenia ATP są dla komórek cytotoksyczne i powodują tworzenie w błonach plazmatycznych porów o średnicy pozwalającej na przenikanie przez nie cząsteczek o masie do 1000 Da [17,26].

Analiza z zastosowaniem konstruktów składających się z β -glukuronidazy i promotorów genu *AtAPY1* i *AtAPY2* (*AtAPY1:GUS* i *AtAPY2:GUS*) wykazała, że oba geny ulegają wysokiej ekspresji w szybko dzielących się tkankach roślinnych i charakteryzujących się wysoką aktywnością wydzielniczą. Są to przede wszystkim wierzchołki korzeni głównych jak i bocznych, etiolowane hypokotyle oraz łagiewki pyłkowe [18]. W tych obszarach stwierdzono największe stężenie zewnątrzkomórkowego ATP [25]. Wyniki te sugerują, że funkcja apirazy może być związana z kontrolą wzrostu rośliny. Rozwój rośliny regulowany jest przez szereg czynników, z których światło oraz auksyna pełnią najistotniejsze funkcje [18,52]. Auksyna jest hormonem roślinnym, którego dystrybucja w tkankach zachodzi na drodze transportu polarnego [52]. Badania Tang'a i wsp. (2003) wykazały, że egzogenny ATP powoduje akumulację auksyny w wierzchołkach korzeni siewek rzodkiewnika i kukuzydzy oraz hamuje proces grawitropizmu. Podobny rezultat otrzymano stosując NPA, inhibitor transportu auksyny [18,52]. Powyższe obserwacje sugerują, że apirazy mogą również uczestniczyć w regulacji transportu auksyny.

U rzodkiewnika światło czerwone z udziałem fitochromu hamuje wydłużanie hypokotyli i jednocześnie gwałtownie zmniejsza ekspresję genów apirazy w tej tkance [18,21]. Oznacza to, że u rzodkiewnika oba procesy są regulowane przez światło. Światło czerwone nie wydłuża hypokotyli

roślin pozbawionych ekspresji genów kodujących fitochrom, natomiast aktywuje ekspresję genów apirazy [18]. Świadczy to o negatywnej regulacji ekspresji genów apirazy przez fitochrom. Stwierdzono, że w promotorach genów apirazy występują charakterystyczne sekwencje, których aktywność regulowana jest przez światło oraz auksynę [18,40]. Potwierdzeniem sugestii, że apirazy uczestniczą w procesach regulacji wzrostu tkanek roślin są obserwacje wskazujące, że hamowanie ekspresji dwóch z siedmiu genów apirazy (metodą RNAi i T-DNA) hamuje wzrost hypokotyli siewek [18,21]. Brak obecności transkryptów apirazy przejawia się krótszymi korzeniami oraz mniejszą strefą elongacji. Uzyskane rośliny mają karłowaty fenotyp ze zmniejszoną ilością korzeni bocznych i pędów [18]. Stąd wniosek, że aktywność apirazy jest bezwzględnie warunkiem prawidłowego wzrostu i rozwoju siewki w postaci dorosłej rośliny.

OPORNOŚĆ NA SUBSTANCJĘ TOKSYCZNE

Zjawisko oporności wielolekowej (MDR, ang. *Multi Drug Resistance*) jest biologicznym procesem obserwowanym u zwierząt, roślin, drożdży i bakterii, który przejawia się opornością komórek na ksenobiotyki [53]. Podstawowym składnikiem mechanizmu MDR są transportery ABC, które uczestniczą w usuwaniu z komórki szkodliwych substancji. Białka te należą do nadrodziny zawierającej kasety wiążącą ATP [53]. P-glikoproteiny, kodowane przez geny *MDR1*, wykorzystują energię zgromadzoną w znajdującym się poza komórką ATP do usuwania z komórki substancji toksycznych [31,53]. Dotychczasowe badania wskazują, że transport ATP poza komórkę może być regulowany przez zmianę potencjału membranowego lub aktywację receptorów nukleotydowych [20,26-29]. W doświadczeniach z wykorzystaniem siewek rzodkiewnika stwierdzono, że obniżenie aktywności zewnątrzkomórkowych ATP zwiększa wrażliwość tych roślin na ksenobiotyki [31,32]. Natomiast nadekspresja *PsNTP9* (gen apirazy z grochu zwyczajnego) lub *AtPGP1* (homolog genu MDR) umożliwia kiełkowanie nasion *A. thaliana* na podłożu zawierającym toksynę (cykloheksimid) i lepszy wzrost siewek na podłożu zawierającym toksyczne stężenia 2-izopentenyloadeniny [31]. Nadprodukcja białka MDR lub apirazy zwiększa oporność roślin na herbicydy w porównaniu z roślinami niestransformowanymi. Najwyższą oporność obserwowano w doświadczeniach, w których oba te geny ekspresowano w komórkach rzodkiewnika jednocześnie, natomiast hamowanie aktywności apirazy wyraźnie obniża wrażliwość tych roślin na toksynę [31,32]. Na tej podstawie autorzy sformułowali hipotezę, że hydroliza zewnątrzkomórkowego ATP przez NTPdazy i fosfatazy może być niezbędnym elementem procesów regulujących aktywność transporterów ABC.

KONTROLA WCZESNYCH ETAPÓW SYMBIOZY BAKTERII Z RODZAJU RHIZOBIUM Z ROŚLINAMI STRĄCZKOWYMI

Z korzeni fasoli indyjskiej wyizolowano ektoapirazę, zdolną do wiązania czynnika nodulacji (Nod) z bakterii *Rhizobium* [46]. Ten rodzaj ektoapirazy zlokalizowano na powierzchni komórek epidermy młodych korzeni, w miejscu pierwotnego kontaktu bakterii symbiotycznych z rośliną [46]. U lucerny (*Medicago truncatula*) zidentyfikowano sześć

genów apirazy [46]. Poziom mRNA dwóch z nich (*MtAPY1* i *MtAPY4*) wzrasta wyraźnie po 3-6 godzinach od inokulacji korzeni bakteriami *Sinorhizobium meliloti* [47]. U soi stwierdzono obecność dwóch genów apirazy, *GS50* i *GS52*. Podczas pierwszych sześciu godzin od inokulacji *Bradyrhizobium japonicum*, następuje wyraźny wzrost ilości transkryptów genu *GS52* [44,45]. Zastosowanie specyficznych przeciwciał skierowanych wobec apirazy lub wyciszenie jej ekspresji technologią RNAi hamuje u soi i fasoli proces brodawkowania [44,45]. Na włośnikach korzeni tych roślin pojawiają się tylko małe, nie zawierające bakteroidów brodawki. Uzyskany fenotyp korzeni przypomina fenotyp korzeni mutantów, u których brak jest ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w procesie brodawkowania [45]. Dalsze badania wykazały, że wyciszenie genu wczesnej nodulacji *enod40* silnie hamuje rozwój primordiów i dojrzewanie brodawek. Linie transgeniczne *Lotus japonicus*, do których wprowadzono gen apirazy *GS52* pod kontrolą konstytutywnego promotora, charakteryzują się większą podatnością na infekcję przez bakterie symbiotyczne oraz zwiększoną ilością brodawek na korzeniach [45]. Z kolei dodanie ADP do pożywki, w której rosły rośliny z wyciszonym genem *GS52*, znosi częściowo efekty wyciszenia ekspresji genów ektoapirazy i powoduje pojawienie się dobrze rozwiniętych bakteroidów otoczonych symbiosomem [45]. Obecność ADP podwyższa również ekspresję genu *enod40*, przy niezmiennym poziomie transkryptów mRNA kodujących apirazę *GS52*. Dodanie ATP w stężeniu od 10 do 200 μM nie ma wpływu na proces nodulacji i liczbę wytworzonych brodawek u roślin z wyciszonym genem ektoapirazy [45]. Powyższe wyniki sugerują, że ADP pełni kluczową rolę podczas pierwszych etapów tworzenia brodawek przez bakterie symbiotyczne.

Procesy depolaryzacji błony, aktywność hormonów, zmiany poziomu wapnia i przekazywanie sygnału są ściśle związane z tworzeniem brodawek przez bakterie symbiotyczne. 1 mM eATP depolaryzuje potencjał błonowy włośników korzeni rzodkiewnika i jest czynnikiem zapewniającym właściwy wzrost i rozwój rośliny [27,30]. Dodanie apirazy z *S. tuberosum* do pożywki, na której rosła lucerna, hamuje wzrost korzeni włośnikowych, co umożliwia inicjację procesu symbiozy bakterii z rodzaju *Rhizobium* z roślinami strączkowymi [43]. eATP w stężeniu 1 mM hamuje grawitropizm korzeni i polarny transport auksyn [52]. Inne badania wskazują, że ATP znajdujący się poza komórką zwiększa poziom wapnia w komórce, co jest istotnym elementem wczesnych etapów infekcji bakteriami z rodzaju *Rhizobium* [30,44]. Z kolei zwiększenie cytoplazmatycznego poziomu wapnia jest związane z regulacją ekspresji genów [17,26-30]. Z drugiej strony istnieją badania, w których ATP aktywuje syntezę etylenu, inhibitora procesu brodawkowania i może hamować nodulację [30,43,44,52]. Powyższe badania wyraźnie wskazują, że ATP może uczestniczyć w różnych, często przeciwstawnych, procesach regulujących brodawkowanie. Ektoapirazy roślin, hydrolizując eATP, zapewniają odpowiedni stosunek ADP/ATP, co jest niezbędne dla utrzymania równowagi pomiędzy wzrostem korzeni oraz żywotnością rośliny, a procesami symbiozy z bakteriami glebowymi z rodzaju *Rhizobium* [17,25,30,42-45,52].

PODSUMOWANIE

NTPDazy (apirazy) to rodzina enzymów rozpowszechniona w królestwie roślin. Enzymy te hydrolizują nukleotydy tri- i difosforanowe, głównie ATP i ADP, do ortofosforanu i AMP. W wielu roślinach białka te kodowane są przez kilka genów, których poziom ekspresji jest różny w różnych tkankach i organach. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych na rzodkiewniku udowodniono, że ekspresja genów apirazy (*AtAPY1* i *AtAPY2*) jest regulowana przez auksynę oraz światło, jednak wciąż niewiele wiadomo o mechanizmach regulacji ekspresji genów apirazy w innych organizmach roślinnych. Niektóre z roślinnych apirazy są ektoenzymami, jednak większość zidentyfikowanych apirazy roślinnych zlokalizowanych jest w jądrze, cytosolu i aparacie Golgiego. Zróżnicowany poziom ekspresji oraz lokalizacja subkomórkowa sugerują, że roślinne apirazy mogą uczestniczyć w różnych procesach metabolicznych.

U roślin strączkowych produkcja ADP przez ekto-NTPDazy stanowi jeden z kluczowych elementów aktywujących inicjację symbiozy tych roślin z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*. Wielu autorów sugeruje, że apirazy roślinne, które metabolizują ATP poza komórką, mogą uczestniczyć w regulacji procesów przekazywania sygnałów. Proponowane modele przekazywania sygnałów zakładają istnienie hipotetycznych receptorów nukleotydydowych o strukturze odmiennej od receptorów zwierzęcych typu P2, jednak do dnia dzisiejszego w żadnym genomie roślinnym nie zidentyfikowano ich homologów. U wielu gatunków roślin udowodniono udział apirazy w procesach wzrostu i rozwoju organów roślinnych, takich jak łagiewka pyłkowa, korzenie oraz bulwy. W rozważaniach dotyczących funkcji apirazy należy wziąć pod uwagę ich wpływ na ładunek energetyczny komórki, bowiem regulacja stężenia składników tego parametru (ATP, ADP, i AMP) wpływa na wiele szlaków metabolicznych, a więc także na niektóre procesy omawiane w tej publikacji. Ekto-NTPDazy apoplastu również degradują nukleotydy di- i trifosforanowe, jednak w tym przypadku zasadniczym celem działania ektoapirazy, oraz innych ektonukleotydz i ektonukleozydz, jest uzyskanie takich produktów jak adenozyne i/lub adenina oraz ortofosforan. Cząsteczki te są transportowane do komórki z udziałem odpowiednich transporterów i kanałów jonowych (wychwyt zwrotny) i wykorzystywane do resyntezy nukleotydydów. Rosnące poza komórką stężenie ortofosforanu zakwasza środowisko, co ma istotny wpływ na wzrost ściany komórkowej.

Wciąż pozostają bez odpowiedzi pytania, jakie funkcje pełnią rozpuszczalne apirazy i jaka jest rola pozostałych izoenzymów NTPDaz w komórkach rzodkiewnika, lucerny i ziemniaka. Nierozstrzygnięta jest również kwestia pokrewieństwa filogenetycznego apirazy roślinnych. Znajomość filogenezy tych białek mogłaby ułatwić określenie ich funkcji u innych roślin. Poza badaniami nad funkcją NTPDaz roślinnych istotne są również badania ich właściwości fizykochemicznych oraz opracowanie wydajnych metod ich nadekspresji i oczyszczania. Zainteresowanie tą rodziną enzymów jest duże również z powodów czysto praktycznych, bowiem apirazy stosuje się podczas sekwencjonowania kwasów nukleinowych, oznaczania aktywności cykla-

zy adenylationowej oraz bioluminometrycznym monitoringu ATP [54]. Enzymy te są coraz częściej brane pod uwagę jako białka terapeutyczne, które mogą być użyte do leczenia niektórych schorzeń układu nerwowego i krwionośnego.

PIŚMIENNICTWO

- Geigenberger P, Riewe D, Fernie AR (2009) The central regulation of plant physiology by adenylates. *Trends Plant Sci* 15: 98-105
- Deli T, Csernoch L (2008) Extracellular ATP and cancer: an overview with special reference to P2 purinergic receptors. *Pathol Oncol Res* 14: 219-231
- Burnstock G (2007) Purine and pyrimidine receptors. *Cell Mol Life Sci* 64: 1471-1483
- Gachet C (2008) P2 receptors, platelet function and pharmacological implications. *Thromb Haemost* 99: 446-472
- Burnstock G (2009) Purinergic regulation of vascular tone and remodeling. *Auton Autacoid Pharmacol* 29: 63-72
- Ralevic V (2009) Purines as neurotransmitters and neuromodulators in blood vessels. *Curr Vasc Pharmacol* 7: 3-14
- Burnstock G (2009) Purines and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol* 194: 333-392
- Trang T, Beggs S, Salter MW (2006) Purinoceptors in microglia and neuropathic pain. *Pflugers Arch* 452: 645-652
- Burnstock G (2006) Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* 27: 166-176
- Yegutkin GG (2008) Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: important modulators of purinergic signaling cascade. *Biochim Biophys Acta* 1783: 673-694
- Zimmermann H (2006) Ectonucleotidases in the nervous system. *Novartis Found Symp* 276: 113-128
- Komoszyński M, Wojtczak A (1996) Apyrases (ATP-diphosphohydrolases, EC 3.6.1.5): function and relationship to ATPases. *Biochim Biophys Acta* 1310: 233-241
- Vorhoff T, Zimmermann H, Pelletier J, Sévigny J, Braun N (2005) Cloning and characterization of the ecto-nucleotidase NTPDase3 from rat brain: predicted secondary structure and relation to other members of the E-NTPDase family and actin. *Purinergic Signal* 1: 259-270
- Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, Olson KE, Islam N, Pinsky DJ, Levi R (2005) Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost* 31: 234-246
- Robson S, Sevigny J, Zimmermann H (2006) The E-NTPDase family of ectonucleotidases: structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* 2: 409-430
- Schettiger MR, Morsch VM, Bonan CD, Wyse AT (2007) NTPDase and 5'-nucleotidase activities in physiological and disease conditions: new perspectives for human health. *Biofactors* 31: 77-98
- Chivasa S, Ndimba BK, Simon WJ, Lindsey K, Slabas AR (2005) Extracellular ATP functions as an endogenous external metabolite regulating plant cell viability. *Plant Cell* 17: 3019-3034
- Wu J, Steinebrunner I, Sun Y, Butterfield T, Torres J, Arnold D, Gonzalez A, Jacob F, Reichler S, Roux SJ (2007) Apyrases (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolases) play a key role in growth control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 144: 961-975
- Steinebrunner I, Wu J, Sun Y, Corbett A, Roux SJ (2003) Disruption of Apyrases Inhibits Pollen Germination in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 1638-1647
- Reichler SA, Torres J, Rivera AL, Cintolesi VA, Clark G, Roux SJ (2009) Intersection of two signalling pathways: extracellular nucleotides regulate pollen germination and pollen tube growth via nitric oxide. *J Exp Bot* 60: 2129-2138
- Wolf C, Hennig M, Romanovic D, Steinebrunner I (2007) Developmental defects and seedling lethality in apyrase AtAPY1 and AtAPY2 double knockout mutants. *Plant Mol Biol* 64: 657-672
- Clark G, Torres J, Finlayson S, Guan X, Handley C, Lee J, Kays JE, Chen ZJ, Roux SJ (2010) Apyrase (nucleoside triphosphate-diphosphohydrolase) and extracellular nucleotides regulate cotton fiber elongation in cultured ovules. *Plant Physiol* 152: 1073-1083
- Riewe D, Grosman Ł, Fernie A R, Wucke C, Geigenberger P (2008) The potato-specific apyrase is apoplastically localized and has influence on gene expression, growth, and development. *Plant Physiol* 147: 1092-1109
- Jeter CR, Roux SJ (2006) Plant responses to extracellular nucleotides: Cellular processes and biological effects. *Purinergic Signal* 2: 443-449
- Kim SY, Sivaguru M, Stacey G (2006) Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol* 142: 984-992
- Roux SJ, Steinebrunner I (2007) Extracellular ATP: an unexpected role as a signaler in plants. *Trends Plant Sci* 12: 522-527
- Demidchik V, Shang Z, Shin R, Thompson E, Rubio L, Laohavisit A, Mortimer J C, Chivasa S, Slabas AR, Glover BJ, Schachtman DP, Shabala SN, Davies JM (2009) Plant extracellular ATP signalling by plasma membrane NADPH oxidase and Ca²⁺ channels. *Plant J* 58: 903-913
- Wu SJ, Wu JY (2008) Extracellular ATP-induced NO production and its dependence on membrane Ca²⁺ flux in elicitation of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *J Exp Bot* 59: 4007-4016
- Song CJ, Steinebrunner I, Wang X, Stout SC, Roux SJ (2006) Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140: 1222-1232
- Chivasa S, Tome D, Murphy AM, Hamilton JM, Lindsey K, Carr JP, Slabas AR (2009) Extracellular ATP: A modulator of cell death and pathogen defense in plants. *Plant Signal Behav* 4: 1078-1080
- Windsor B, Roux SJ, Lloyd A (2003) Multiherbicide tolerance conferred by AtPgp1 and apyrase overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotechnol* 21: 328-433
- Mulwa R, Mwanza L (2006) Biotechnology approaches to developing herbicide tolerance/selectivity in crops. *Afr J Biotechnol* 5: 396-404
- Atkinson B, Dwyer K, Enjyoji K, Robson SC (2006) Ecto-nucleotidases of the CD39/NTPDase family modulate platelet activation and thrombus formation: Potential as therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis* 36: 217-222
- Komoszyński M (1996) Comparative studies on animal and plant apyrases (ATP diphosphohydrolase EC 3.6.1.5) with application of immunological techniques and various ATPase inhibitors. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 113: 581-591
- Kozakiewicz A, Neumann P, Banach M, Komoszyński M, Wojtczak A (2008) Modeling studies of potato nucleoside triphosphate diphosphohydrolase NTPDase1: an insight into the catalytic mechanism. *Acta Biochim Pol* 55: 141-150
- Handa M, Guidotti G (1996) Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* 218: 916-923
- Kettlun AM, Espinosa V, Garcia L, Valenzuela MA (2005) Potato tuber isoapyrases: Substrate specificity, affinity labeling, and proteolytic susceptibility. *Phytochemistry* 66: 975-982
- Shibata K, Abe S, Davies E (2001) Structure of the coding region and mRNA variants of the apyrase gene from pea (*Pisum sativum*). *Acta Physiol Plant* 23: 3-13
- Windsor JB, Thomas C, Hurley L, Roux SJ, Lloyd AM (2002) Automated colorimetric screen for apyrase inhibitors. *Biotechniques* 33: 1024, 1026, 1028-1030
- Steinebrunner I, Jeter C, Song C, Foux SJ (2003) Molecular and biochemical comparison of two different apyrases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 38: 913-922
- Shibata K, Morita Y, Shunnosuke A, Stankovic B, Davies E (2000) Apyrase from pea stems: isolation, purification, characterization and identification of a NTPase from the cytoskeleton fraction of pea stem tissue. *Plant Physiol Biochem* 37: 881-888
- Yoneda M, Davies E, Morita EH, Abe S (2009) Immunohistochemical localization of apyrase during initial differentiation and germination of pea seeds. *Planta* 231: 47-56

43. McAlvin CB, Stacey G (2005) Transgenic expression of the soybean apyrase in *Lotus japonicus* enhances nodulation. *Plant Physiol* 137: 1456-1462
44. Govindarajulu M, Kim SY, Libault M, Berg RH, Tanaka K, Stacey G, Taylor CG (2009) GS52 Ecto-apyrase plays a critical role during soybean nodulation. *Plant Physiol* 149: 994-1004
45. Cohn JR, Uhm T, Ramu S, Nam YW, Kim DJ, Penmetsa V, Wood TC, Denny RL, Young ND, Cook DR, Stacey G (2001) Differential regulation of a family of apyrase genes from *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* 122: 2104-2119
46. Riewe D, Grosman Ł, Zauber H, Wucke C, Fernie AR, Geigenberger P (2008) Metabolic and developmental adaptations of growing potato tubers in response to specific manipulations of the adenylate energy status. *Plant Physiol* 146: 1579-1598
47. Riewe D, Grosman Ł, Fernie AR, Zauber H, Wucke C, Geigenberger P (2008) A cell wallbound adenosine nucleosidase is involved in the salvage of extracellular ATP in *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Physiol* 49: 1572-1579
48. Mohlmann T, Mezher Z, Schwerdtfeger G, Neuhaus HE (2001) Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 509: 370-374
49. Ward JM, Mäser P, Schroeder JI (2009) Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annu Rev Physiol* 71: 59-82
50. Roberts K, Shirsat AH (2006) Increased extensin levels in *Arabidopsis* affect inflorescence stem thickening and height. *J Exp Bot* 57: 537-545
51. Durachko DM, Cosgrove DJ (2009) Measuring plant cell wall extension (creep) induced by acidic pH and by alpha-expansin. *J Vis Exp* 11: 1263
52. Tang W, Brady SR, Sun Y, Muday GK, Roux SJ (2003) Extracellular ATP inhibits root gravitropism at concentrations that inhibit polar auxin. *Plant Physiol* 131: 147-154
53. Aszalos A (2008) Role of ATP-binding cassette (ABC) transporters in interactions between natural products and drugs. *Curr Drug Metab* 9: 1010-1018
54. Nourizad N, Ehn M, Gharizadeh B, Hober S, Nyren P (2003) Methylophilic yeast *Pichia pastoris* as a host for production of ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Protein Expr Purif* 27: 229-237

Function of plant apyrases

Magdalena Wujak, Michał Komoszyński✉

Department of Biochemistry, Institute of General and Molecular Biology, University of Nicolaus Copernicus, 7 Gagarina St., 87-100 Torun, Poland

✉e-mail: michkom@chem.uni.torun.pl

Key words: plant NTPDases, apyrases, metabolic function, ectonucleotides, plant NTPDase genes, ABC cassette

ABSTRACT

This publication presents results of the recent studies on plant NTPDases (apyrases). The structure and major physicochemical properties of these enzymes are reviewed. The attention has been paid to metabolic functions of apyrases from *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*. Apyrases constitute a family of proteins hydrolyzing phosphoanhydride bonds of nucleoside tri- and di-phosphates. They share common features like a similar structure, broad nucleotide substrate specificity and divalent cation requirement for their catalytic activity. The presence of plant NTPDases was detected in various cellular compartments. They are soluble or membrane-bound proteins. In hydrolytic processes catalyzed by activity of apoplasmic apyrases and other ectoenzymes, adenine, ribose and orthophosphate are produced. These compounds are transported to the cell. Apyrases have been speculated to be involved in the regulation of starch synthesis and signal transmission. Their activity is necessary for development and growth of tubers and roots. Enzymes from leguminous plants activate the symbiosis with root nodule bacteria. Considering the fact, that NTPDases change the nucleotide concentration in cells and tissues, most of described functions may be related to the regulation of the energy charge of cell.