

## AKWAPORYNY ROŚLINNE – FUNKCJE I CZYNNIKI REGULUJĄCE ICH AKTYWNOŚĆ

### PLANT AQUAPORINS – FUNCTIONS AND FACTORS REGULATING THEIR ACTIVITY

Ewelina PALUCH<sup>1</sup>, Jan LUBAWY<sup>2</sup>, Władysław POLCYN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Zakład Fizjologii Roślin, <sup>2</sup>Zakład Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt,  
Instytut Biologii Eksperymentalnej, Wydział Biologii,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

*Streszczenie:* Akwaporyny to transbłonowe białka, które tworzą kanały w wewnętrznych i zewnętrznych błonach komórkowych. Ich wysoka różnorodność molekularna u roślin wiąże się nie tylko z symplastycznym transportem wody ale również niektórych niskocząsteczkowych składników organicznych i mineralnych, włącznie z dostarczaniem CO<sub>2</sub> do chloroplastów. W związku z tym białka te mają znaczący wpływ na szereg procesów fizjologicznych roślin takich jak fotosynteza, kiełkowanie i wzrost zalążków, zawiązywanie korzeni bocznych, oraz utrzymanie homeostazy komórek i tkanek w warunkach stresowych. Do czynników regulujących bramkowanie kanałów akwaporynowych należą między innymi: fosforylacja, heteromeryzacja, zmiany pH, stężenie jonów Ca<sup>2+</sup> i H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hormony roślinne oraz lokalne zmiany ciśnienia. Mechanizmy regulujące za pośrednictwem akwaporyn gospodarkę wodną są wysoce złożone gdyż łączą wyżej wymienione sygnały.

*Słowa kluczowe:* akwaporyny, bramkowanie, fosforylacja, heteromeryzacja, transport pęcherzykowy

*Summary:* Aquaporins are transmembrane proteins that form channels in the inner and outer cell membranes. Their high molecular diversity in plants is related not only to symplastic water movement but also to transport of small organic and mineral solutes, including transfer of CO<sub>2</sub> into chloroplasts. Therefore these proteins have a significant influence on a number of physiological processes as photosynthesis, seeds germination and growth, lateral roots formation and maintenance of homeostasis of cells and tissues under stress conditions. The factors affecting the gating of aquaporins channels involve: phosphorylation, heteromerization, pH changes, Ca<sup>2+</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, plant hormones and local water pressure variations. The mechanisms governing aquaporins mediated water management are highly complex since they combine above-mentioned signals.

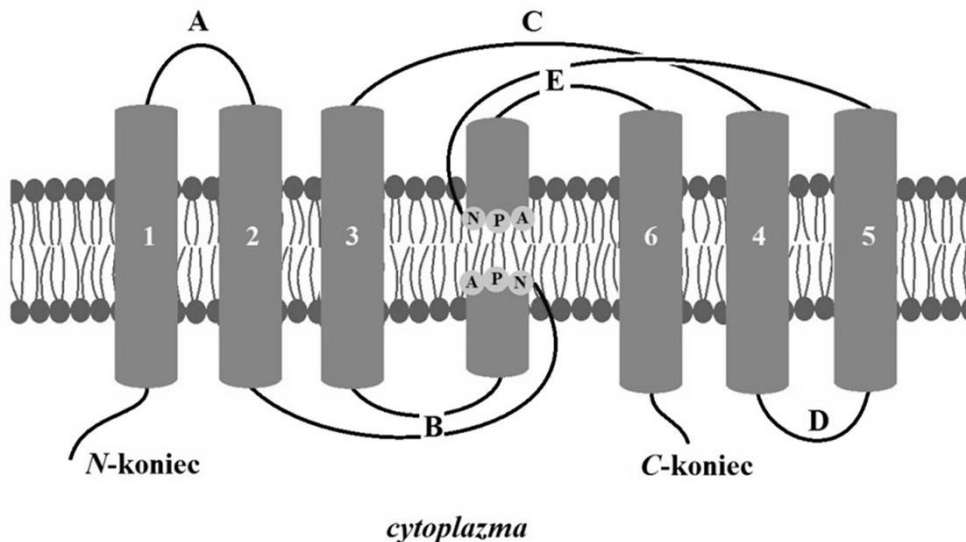
*Key words:* aquaporins, gating, phosphorylation, heteromerization, vesicular transport

## WSTĘP

Pobieranie wody i utrzymanie homeostazy osmotycznej w komórkach jest głównym ograniczeniem napotykanym przez organizmy żywe. Rośliny muszą dostosować swoją gospodarkę wodną w odpowiedzi na trudne warunki środowiskowe, takie jak susza, zasolenie, niska temperatura, ale także zmiany w natężeniu światła, niedobory składników odżywczych lub zakwaszenie gleby. Charakterystyka molekularna i funkcjonalna akwaporyn, białek, które ułatwiają dyfuzję wody przez błony komórkowe, wykazała ich znaczenie w regulacji odpowiedzi na wymienione bodźce środowiskowe [4, 20]. Komórkowy i tkankowy przepływ wody u roślin kontrolowany jest dzięki bezpośredniej lub pośredniej regulacji aktywności akwaporyn.

Akwaporyny to małe (od 26 do 35 kDa) [17], transbłonowe białka, które tworzą kanały w wewnętrznych i zewnętrznych błonach komórkowych żywych organizmów. Syntetyzowane są w retikulum endoplazmatycznym (ER), a następnie transportowane wzdłuż szlaku wydzielniczego do błony plazmatycznej [36, 56]. Białka te są zbudowane z 6 hydrofobowych alfa-helis transbłonowych połączonych pętlami. W centralnej części monomeru akwaporyny znajdują się struktury skróconych helis, ułożone symetrycznie na przeciwległych stronach błony cytoplazmatycznej, połączone pętlami z zewnętrznymi helisami, co tworzy mechanizm otwierania kanału (ryc. 1). Akwaporyny z reguły występują jako tetramery, gdzie każdy monomer formuje osobny kanał przepływowy. O właściwościach przewodzących akwaporyn błony komórkowej decyduje kompozycja monomerów, które mogą być kodowane przez odrębne izogeny [38]. O kształcie kanału decyduje podwójny konserwatywny motyw NPA, zawierający asparaginę, prolinę i alaninę, znajdujący się na obu skróconych helisach, w miejscu sekwencji przylegającym do ściany kanału. *N*- i *C*-końce białka są skierowane do cytoplazmy [91].

Akwaporyny roślinne można podzielić na pięć homologicznych podrodzin: PIP – akwaporyny błony komórkowej (ang. *Plasma membrane Intrinsic Protein*), TIP – akwaporyny tonoplastu (ang. *Tonoplast membrane Intrinsic Protein*), NIP – akwaporyny typowe dla błony peribakteroidalnej (ang. *Nodulin 26-like Intrinsic Protein*), SIP – białka o nieznacznej homologii z akwaporyną 1 człowieka (ang. *Small basic Intrinsic Protein*) [23] oraz niesklasyfikowane białka błonowe XIP [54]. W porównaniu do ssaków, akwaporyny roślinne charakteryzują się większą liczbą izoform, odpowiednio 35, 36, 33 u rzodkiewnika, kukurydzy i ryżu [18, 47, 79]. Poszczególne izoformy wydają się mieć odrębną rolę we wzroście, rozwoju i abiotycznej tolerancji na stres [41]. Najwięcej doniesień odnosi się do funkcjonowania akwaporyn błony komórkowej oraz tonoplastowej, ze względu na ich potencjalnie ważną rolę w regulacji przepuszczalności hydraulicznej korzeni i liści oraz osmoregulacji w obrębie cytoplazmy komórkowej.



**RYCINA 1.** Schemat budowy monomeru akwaporynu. Cyframi 1-6 zaznaczono domeny transbłonowe, literami A-E zaznaczono pętle łączące [19, 91]

**FIGURE 1.** Model of the aquaporin monomer. Numbers 1-6 indicate transmembrane domains, letters A-E indicate connecting loops [19, 91]

Niektórzy badacze [33] sugerują, że białka PIP mogą regulować cały transport wody w komórkach, gdyż pęcherzyki izolowane z błony komórkowej posiadają 100-krotnie mniejszą przepuszczalność niż pęcherzyki tonoplastowe. Natomiast akwaporyny tonoplastowe wydają się mieć kluczową rolę w regulacji osmotycznej niezbędnej w sytuacji stresu suszy czy też zasolenia.

## FUNKCJE AKWAPORYN

Do funkcji akwaporyn należy przede wszystkim transport wody, ale dodatkowo mogą one transportować niskocząsteczkowe, nienaładowane związki, takie jak: glicerol, mocznik, Si, B, CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, krótkie alkohole [9, 10, 35]. O specyficzności przewodzenia dla każdego z tych związków decyduje kształt kanału. Mogą występować także kanały wielospecyficzne. W zależności od rodzaju związków transportowanych przez kanały białkowe można określić fizjologiczne funkcje akwaporyn.

Wiele akwaporyn ulega wysokiej ekspresji w korzeniach [13, 67, 79], co potwierdza istotność tych białek w korzeniowym transporcie wody. Jony rtęci (Hg<sup>2+</sup>), które są blokerem akwaporyn, wiążącym się do reszt cysteinowych we-

wnątrz lub w pobliżu poru, po raz pierwszy użyte zostały w korzeniach pomidora [58], wykazując, że akwaporyny mogą w 70% odpowiadać za wodne przewodnictwo korzeni ( $L_p$ ). Wynik ten został potwierdzony przez wykorzystanie innych inhibitorów akwaporyn (azydek, słabe kwasy), które wykazywały podobne właściwości do  $Hg^{2+}$  u *Arabidopsis* [84]. Akwaporyny również ulegają wysokiej ekspresji w liściach, gdzie przyczyniają się do przewodnictwa hydraulicznego wewnętrznych tkanek [22, 51, 100]. Pierwszy dowód na funkcje akwaporyn w liściach uzyskano u słonecznika poprzez hamowanie ich funkcji chlorkiem rtęci [69]. Jednakże udział akwaporyn w przewodnictwie hydraulicznym liścia jest znacznie niższy niż w korzeniach i wynosi odpowiednio dla liści około 25%, a korzeni 70% [72, 84, 92]. Wiele rodzajów stresu abiotycznego w glebie, takich jak: zasolenie, niedostatek tlenu lub składników odżywczych znacząco zmniejszają  $L_p$  u różnych gatunków roślin [4].

Bor jest niezbędnym składnikiem dla wzrostu roślin, który jednakże może być toksyczny gdy obecny jest w wysokich stężeniach. Rola akwaporyn w transporcie kwasu borowego po raz pierwszy została zaproponowana przez Dordasa i wsp. [25]. AtNIP5;1 reprezentuje pierwszą grupę akwaporyn wykazujących znaczący wkład w poborze boru u roślin. Ich ekspresja znacząco się zwiększa w czasie niedoboru boru, a aktywność białka w transporcie kwasu borowego została wykazana poprzez ekspresję nip5;1 w oocytach żaby lub poprzez zastosowanie roślin typu knock-out [88]. Takano i wsp. [86] zaproponowali mechanizm współpracy, w którym AtNIP5;1 absorbuje kwas borowy  $[B(OH)_3]$  z gleby, natomiast AtBOR1 działa jako drugorzędowy transporter boranu  $[B(OH)_4^-]$  [87], aby przetransportować boran do ksylemu.

Krzem jest kolejnym głównym minerałem dla niektórych roślin (odpowiada za 10% suchej masy pędów ryżu), który zwiększa odporność na stres biotyczny i abiotyczny [27, 29]. Podejście genetyczne pozwoliło na zidentyfikowanie Lsi1 (OsNIP2;1) jako pierwszego białka transportującego krzem u roślin [57]. OsNIP2;1 funkcjonuje jako kanał do napływu kwasu krzemowego i razem z transporterem Lsi2 ułatwia pobór krzemu z gleby do tkanek [57, 66]. U *Arabidopsis*, krzem również odgrywa rolę w odporności na infekcję grzybami [34].

Jony amonowe rzadko są dostępne dla roślin na stanowiskach nieuprawnych, jednak stosowane są jako składnik nawozów mineralnych dla zbóż. Pomimo tego, że transportery dla  $NH_4^+$  zostały zidentyfikowane dawno temu, początkowo uważano że azot amonowy przedostaje się przez błony komórkowe w postaci  $NH_3$ , głównie poprzez dyfuzję swobodną [46]. Jednak dla kilku homologów TIP *Arabidopsis* i pszenicy wykazano zdolność ułatwiania transportu specyficzną dla  $NH_3$ , co może mieć znaczenie dla jego kompartmentacji do wakuoli [43, 46, 55]. Interakcje symbiotyczne roślin z mikroorganizmami glebowymi mogą dostarczyć ciekawych informacji pomagających w zrozumieniu roli akwaporyn w pozyskiwaniu przez rośliny  $NH_4^+$ / $NH_3$ . Po pierwsze, symbioza mikoryzowa powoduje znaczące zmiany w ekspresji akwaporyn u roślin [3, 59, 93]. Swoiste akwaporyny roślin strączkowych, takie jak GmNod26 ulegają ekspresji w błonie peribakterioidalnej brodawek wiążących  $N_2$

[32]. Po drugie, GmNod26 jest akwaporyną transportującą amoniak, która do swej domeny C-terminalnej wiąże cytozolową syntetazę glutaminową, aby stworzyć szlak metaboliczny i prawdopodobnie zwiększyć w ten sposób asymilację amoniaku [45, 61]. Po trzecie, niektóre akwaporyny grzybów ulegające symbiotycznej ekspresji wykazują wysoką przepuszczalność dla  $\text{NH}_3$  [24] i mogą przyczyniać się do przenoszenia  $\text{NH}_3$  z cytoplazmy grzyba do rośliny.

Akwaporyny mogą brać również udział w dyfuzji  $\text{CO}_2$  w tkankach liści, wykorzystywanego w procesie fotosyntezy. Przesłankami dla tej konkluzji są następujące fakty. Aktywność fotosyntezy i przewodnictwo  $\text{CO}_2$  w komórkach mezofilu u bobu i fasoli ulega inhibicji po zastosowaniu chlorku rtęci [89]. Dodatkowo, NtAQP1 i AtPIP1;2, z tytoniu i rzodkiewnika, wspomagają transbłonowy transport  $\text{CO}_2$  w przypadku heterologicznej ekspresji w oocytach *Xenopus* [40]. Modyfikacje genetyczne ich funkcji u tytoniu lub *Arabidopsis* wykazały dodatnią korelację pomiędzy ich ekspresją a przewodnictwem  $\text{CO}_2$  mezofilu [40]. NtAQP1 i AtPIP1;2 również znacząco przyczyniają się do całkowitego transportu wody w roślinie [72, 81]. Sugeruje to istotną zależność między transportem  $\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{CO}_2$  w wewnętrznych tkankach liści.

Chloroplasty komórek mezofilowych są zwykle ciasno upakowane wzdłuż tej części błon komórkowych, które mają kontakt z przestrzeniami powietrznymi łączącymi się z aparatem szparkowym. Dlatego też pierwotnie zakładano, że  $\text{CO}_2$  dostaje się do chloroplastów drogą dyfuzji z pominięciem cytoplazmy [28]. Wykazano jednak, że przepuszczalność obu typów błon dla dwutlenku węgla jest czynnikiem znacząco ograniczającym jego asymilację [31]. Wyżej wymienione właściwości akwaporyny NtAQP1 wskazywały, że jednym z czynników zwiększających współczynnik przewodności mezofilu dla  $\text{CO}_2$  (ang. *mesophyll conductance*,  $g_m$ ) może być transport  $\text{CO}_2$  przez białka kanałowe. Teoretyczne przesłanki sugerują, że taki transport ma znaczenie jedynie w przypadku błon o niskiej przepuszczalności dla  $\text{CO}_2$ . W mezofilu sytuacja taka występuje gdyż przepuszczalność błony komórkowej, która styka się z przestrzenią podszparkową, jest 5-cio krotnie wyższa niż przylegająca do tej błony powierzchnia chloroplastu. Bezpośredniego dowodu potwierdzającego pośrednictwo akwaporyn dostarczyli Uehlein i wsp. [94], którzy wykazali, że zarówno w błonie komórkowej jak i w błonie chloroplastów tytoniu zakotwiczone są kanały akwaporyny NtAQP1. Natomiast mutacja genu AtPIP1;2 u *Arabidopsis* powodowała zmniejszenie dyfuzji  $\text{CO}_2$  w liściach oraz fotosyntezy [40]. Dane funkcjonalne, wiążące ekspresję akwaporyn z aktywnością fotosyntezy, konduktancją mezofilową i szparkową dla  $\text{CO}_2$ , a także zawartością RUBISCO, sugerują, że pośrednictwo kanałów akwaporynowych może być istotnym czynnikiem wpływającym na wydajność fotosynteznej asymilacji  $\text{CO}_2$  [31, 77, 78].

Nasiona odgrywają kluczową rolę w cyklu reprodukcyjnym roślin wyższych. Większość nasion jest organami silnie odwodnionymi. Rozległa i dobrze zorganizowana wymiana wody jest powiązana z dojrzwaniem i kiełkowaniem nasion, uwzględniając ich imbibicję, a następnie rozwój zalążków [99]. U *Arabidopsis*

i grochu, pochodne rtęci zmniejszały tempo kiełkowania nasion oraz ich pęcznienie [96, 98], co sugeruje rolę akwaporyn w tych procesach.

Stymulującą rolę akwaporyn we wroście młodych siewek wykazano z użyciem roślin transgenicznych. Dla przykładu, nadekspresja AtPIP1;2 u tytoniu znacząco zwiększała wzrost roślin. Transgeniczne rośliny tytoniu z nadekspresją AtPIP1;2, wykazują zwiększoną dehydratację liści podczas stresu suszy [1]. Niedawno opublikowana praca na temat roli białek PIP w powstawaniu korzeni bocznych [71] dostarcza dokładniejszych danych dotyczących roli akwaporyn we wroście tkanek roślinnych. Hormon auksyna, który reguluje wzrost i rozwój korzeni, powoduje silną negatywną regulację transkrypcji prawie wszystkich genów PIP i TIP w korzeniach *Arabidopsis*, tym samym będąc dobrym regulatorem ekspresji akwaporyn w miejscach pojawiania się korzeni bocznych. Auksyna hamuje również transport wody w komórkach i w różnych regionach korzeni.

## REGULACJA AKTYWNOŚCI AKWAPORYN ROŚLINNYCH

Rośliny posiadają niezwykłą zdolność do wychwytywania różnych sygnałów z otaczającego je środowiska i odpowiednio dostosowania do nich właściwości transportu wody. Obecnie znanych jest kilka mechanizmów regulacji aktywności akwaporyn, m.in. przez fosforylację, heteromeryzację, zmiany pH, stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  czy też  $\text{H}_2\text{O}_2$  i hormony roślinne oraz lokalne zmiany ciśnienia wywoływane przepływem wody przez kanał.

## FOSFORYLACJA

Fosforylacja akwaporyn została odnotowana jeszcze przed poznaniem ich funkcji i specyfiki. Była pierwszą znaną modyfikacją, która bezpośrednio wpływała na aktywność kanału białkowego. Wykazano fosforylację *in vivo* i *in vitro* reszt serynowych na N- lub C- końcu PvTIP3;1 ziarna fasoli (Ser<sup>7</sup>), SoPIP2;1 liści szpinaku (Ser<sup>274</sup> i Ser<sup>277</sup>), i korzeni soi GmNod26 (Ser<sup>262</sup>) [65]. Dowody wskazują, że fosforylacje te spowodowane są przez kinazę błonową zależną od wapnia. Fosforylacja błonowych akwaporyn *Arabidopsis* oraz kukurydzy została zaobserwowana dzięki spektrometrii mas oraz znakowaniu radioaktywnemu [80]. Heterologiczna ekspresja akwaporyn w oocytach *Xenopus* jest wiarygodną metodą sprawdzenia funkcji oraz regulacji akwaporyn. W porównaniu z oocytami kontrolnymi, oocyty w których dochodziło do ekspresji akwaporyn w błonie, pęczniały gwałtowniej po przeniesieniu do hipoosmotycznego medium. Przydatną cechą tego systemu jest możliwość użycia agonistów i antagonistów kinaz i fosfataz, co pozwala zbadać rolę fosforylacji w kontroli aktywności akwaporyn. Dla przykładu aktywność ka-



nału wodnego PvTIP3;1 w oocytach *Xenopus*, zwiększała się po dodaniu agonisty cAMP który stymulował oocytową kinazę A. Podobnie aktywność SoPIP2;1 i GmNod26 wzrastała gdy oocyty inkubowano w obecności kwasu okadaikowego będącego inhibitorem fosfatyz [63]. Fosforylacja roślinnych akwaporyn jest bezapośrednio związana z gwałtownym i odwracalnym bramkowaniem kanału *in situ* [48]. Ponieważ zidentyfikowane *in vivo* miejsca fosforylacji znajdowały się na cytozolowym *N*- lub *C*-końcu białka oraz dane strukturalne na temat tych domen nie były dostępne, komputerowy model dla negatywnie naładowanych grup fosforanowych w tych pozycjach nie mógł być zaproponowany. Zatem dodatkowe dane są wymagane aby scharakteryzować mechanizm bramkowania regulowany przez fosforylację *N*- lub *C*-końca. Nie można w chwili obecnej wykluczyć, że fosforylacja roślinnych akwaporyn jest mechanizmem regulacji egzocytotycznego transportu białek, jak to zaobserwowano u ssaczki AQP2 [16]. W komórkach kanalikula zbiorczego nerki, hormon diuretyczny wazopresyna zwiększa poziom wewnątrzkomórkowego cAMP, co w konsekwencji prowadzi do aktywacji kinazy A i fosforylacji Ser<sup>256</sup> AQP2. Fosforylacja AQP2, która zachodzi w pęcherzykach wewnątrzkomórkowych, powoduje połączenie się tych pęcherzyków z apikalną częścią błony komórkowej, co w konsekwencji prowadzi do zwiększenia przepuszczalności błony.

Oprócz fosforylacji seryna na *N*- lub *C*-końcu istnieją eksperymentalne dane wskazujące, że fosforylowana może być seryna w cytoplazmatycznej pętli blisko pierwszego motywu NPA. Seryna ta jest konserwatywna dla wszystkich roślinnych PIP i kilku TIP i zawarta jest w sekwencji Arg/Xaa-Lys-Xaa-Ser-Xaa-Xaa-Arg, którą mogą fosforylować kinazy białkowe, w tym kinaza zależna od wapnia. Zastąpienie tych reszt serynowych alaniną w SoPIP2;1 lub PvTIP3;1 spowodowało zmniejszenie aktywności kanału wodnego gdy którakolwiek ulegała ekspresji w oocytach *Xenopus* [49]. Wysoki stopień konserwatywności tej seryny sugeruje, że pełni ona ważną rolę funkcjonalną i strukturalną. Jak dotąd nie zaobserwowano fosforylacji tej seryny w eksperymentach *in vivo* i *in vitro*. Należy jednak podkreślić, że przeciwnie do konserwatywnemu białku PIP2 pszenicy zawierającemu fosforylowaną serynę rozpoznało prążek w oczekiwanym miejscu dla PIP2 w rozdziale elektroforetycznym ekstraktu z korzeni kukurydzy [2]. Białka tego nie ujawniono po dodaniu inhibitora fosfatazy.

Regulacja fosforylacji roślinnych akwaporyn może być kontrolowana w zależności od stopnia rozwoju lub czynników środowiskowych. Dla przykładu, fosforylacja PvTIP3;1 wykrywana *in vitro* osiągała najwyższe wartości w rozwijających się nasionach i ulegała obniżeniu podczas pęcznienia nasion [50], co prawdopodobnie odzwierciedla wzmożoną fosforylację PsTIP3;1 *in vivo* podczas tych samych okresów i sugeruje dynamiczną kontrolę puchnięcia i fuzji wakuol [62]. Fosforylacja Ser<sup>274</sup> SoPIP2;1 była wzmożona przez wzrost potencjału wody liści oraz spadała podczas deficytów wody, prawdopodobnie aby zapobiec wpływowi wody z komórek liści [49]. Ostatnio odnotowano, że fosforylacja i defosfory-

lacja akwaporyn błonowych u tulipana reguluje otwieranie się płatków kwiatów w 20°C i ich zamykanie w 5°C [5]. Obserwacje te były skorelowane ze zmianami w transporcie wody z łądygi do płatków, który był zależny od Ca<sup>2+</sup>. Przykłady te jasno pokazują istotną rolę fosforylacji i defosforylacji roślinnych akwaporyn, nawet gdy molekularne konsekwencje tych modyfikacji pozostają nieznane.

## HETEROMERYZACJA

Na aktywność akwaporyn może mieć wpływ również oligomeryzacja białek. Generalnie akwaporyny występują jako tetrametry, zarówno *in vitro* jak i *in vivo*. Tetrameryzacja następuje w wyniku interakcji  $\alpha$  helis sąsiadujących monomerów oraz zewnątrzkomórkowej pętli, która przyczynia się do stabilizacji tetramery [68]. Wiele eksperymentów pokazało, że różne akwaporyny tworzą stabilne homotetramery. Wykazano jednak również, że kilka izoform roślinnych tworzy hetrotetramery. Przykładowo heteromery dwóch tonoplastowych akwaporyn z nasion soczewicy zostały wykryte w eksperymentach sieciowania (ang. cross-linking). Inkubacja błon tonoplastowych w obecności odczynnika sieciującego wzmagala formowanie się dimerów, trimerów i tetramerów, utworzonych z białek o masie 25 i 26 kDa [39].

O heteromeryzacji błonowych akwaporyn wnioskowano na podstawie badań koekspresji ZmPIP w oocytach *Xenopus*. Roślinne białka PIP mogą być podzielone na dwie duże grupy, PIP1 i PIP2, na podstawie ich sekwencji i aktywności kanału wodnego. Wszystkie PIP2 wykazują wysoką aktywność kanału wodnego w oocytach *Xenopus* lub pęcherzykach drożdży, natomiast PIP1 zazwyczaj w tych układach są nieaktywne lub mają bardzo niską aktywność [83, 101]. Koekspresja ZmPIP1;2 oraz innej ZmPIP2 w oocytach *Xenopus* wykazała większą efektywność tej ostatniej, co było prawdopodobnie efektem usprawnienia transportu PIP2 do błony komórkowej. Fizyczne interakcje pomiędzy ZmPIP1;2 i ZmPIP2 wykazano przy wykorzystaniu chromatografii powinowactwa, a taka heteromeryzacja skutkowała wyższym poziomem ZmPIP1;2 w błonie komórkowej. Pomimo tego, że izoformy ZmPIP1;1 i ZmPIP1;2 wykazywały słabą aktywność gdy ulegały ekspresji indywidualnie, widoczna była zwiększona ich aktywność gdy ulegały ekspresji razem. Również koekspresja ZmPIP1;2 i ZmPIP2;5 powodowała zwiększoną aktywność kanału wodnego, lecz nie obserwowano żadnego efektu współdziałania ZmPIP1;1 i ZmPIP2;5. Co ciekawe, mutanty ZmPIP1;1LE, w których przez substytucję czterech aminokwasów zmieniono sekwencję pętli E na taką jak w ZmPIP1;2, w eksperymentach koekspresji zachowywały się identycznie jak ZmPIP1;2. Wyniki te wskazują, że heteromeryzacja ZmPIP1 jest wymagana aby te izoformy działały jako funkcjonalny kanał wodny [30]. Wykazano, że reszty aminokwasowe w pętli E są ważne w propagowaniu zmian strukturalnych



od helisy 6 do motywu NPA. Alternatywnie zmiany w pętli E mogą wpłynąć na symetryczny motyw NPA i zmienić aktywność kanału, lub wpływać na strukturę międzybłonowej helisy 6, a przez to na oligomeryzację białka. Istotna rola pętli E w aktywności akwaporyn została odnotowana wcześniej w chimerach krowiej akwaporyny AQP0 i ludzkiej AQP2.

Dalsze eksperymenty są niezbędne aby ujawnić interakcje akwaporyn w komórkach roślinnych oraz określić fizjologiczną istotność tych procesów.

## TRANSPORT PĘCHERZYKOWY AKWAPORYN

Ukierunkowany transport białek odgrywa również kluczową rolę w ekspresji i regulacji akwaporyn roślinnych. Wiadomo, że białka PIP1, wykazują słabą aktywność transportu wody, gdy podlegają odosobnionej ekspresji w oocytach *Xenopus*. Można to wytłumaczyć nieprawidłowym transportem białek do błony komórkowej oocytu [30]. Efekt ten udało się wyeliminować poprzez koekspresję z homologami PIP2. Dowód na bezpośrednie oddziaływanie pomiędzy PIP1 i PIP2 został uzyskany przez oczyszczanie metodami powinowactwa, koimmunoprecypitacji oraz mikroskopii fluorescencyjnego rezonansowego przeniesienia energii (FRET) [30, 101]. Potwierdziło to hipotezę, że tworzenie się heterotetramerów może pełnić ważną rolę w prawidłowej lokalizacji kanałów wodnych na powierzchni komórki roślinnej. Wewnątrzkomórkowy transport roślinnych akwaporyn indukowany bodźcem po raz pierwszy został scharakteryzowany u *Mesembryanthemum crystallinum*. Podczas stresu osmotycznego, akwaporyna tonoplastowa McTIP1;2 zostaje przeniesiona z wakuoli do pęcherzyków wewnątrzkomórkowych poprzez wykorzystanie mechanizmu zależnego od glikozylacji [97]. Zaproponowano również, że ukierunkowany transport białek PIP i TIP odgrywa ważną rolę w odpowiedzi korzeni na stres solny i oksydacyjny [36, 56]. Potraktowanie korzeni *Arabidopsis* roztworami soli lub H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> powodowało spadek przewodnictwa wodnego korzeni (L<sub>p</sub>) o 70% i relokalizację akwaporyn błonowych i tonoplastowych [13]. Kolejne badania pokazały, że w ukierunkowanym transporcie izoform PIP, wywołanym stresem solnym, pośredniczy kaskada sygnałowa uruchamiana reaktywnymi formami tlenu (ROS). Dodatkowo wykazano rolę fosforylacji Ser<sup>283</sup> w ukierunkowanym transporcie białka do odpowiedniego przedziału endosomalnego [12, 73]. Zaawansowane techniki mikroskopii fluorescencyjnej wskazują na wpływ stresu solnego na dynamikę transportu białek PIP w komórkach epidermalnych korzeni. Technika mikroskopowa przywracania fluorescencji po fotowygazaniu (FRAP) pokazała, że stres solny zwiększa krążenie akwaporyn błony komórkowej pomiędzy powierzchnią komórki a endosomami, oddziałując na endo- i egzocytozę [56, 60]. Jednak dokładny mechanizm zarządzający tym procesem nie został jeszcze poznany.

## REGULACJA ZALEŻNA OD PH I STĘŻENIA $\text{Ca}^{2+}$

Regulacja akwaporyn przez zmiany stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  i/lub protonów była wykazana dla ssaczy AQP0, AQP3, AQP6, i roślinnych PIP [70]. Przepuszczalność dla wody błony komórkowej komórek korzenia lub zawieszin komórkowych *Arabidopsis* była zmniejszona w obecności wolnego  $\text{Ca}^{2+}$  i/lub niskiego pH. Kwasica cytozolowa jest obserwowana podczas anoksji spowodowanej zalaniem gleby i towarzyszy jej ograniczenie przepuszczalności wody w komórkach korzenia. Co ciekawe, pokazano że w oocytach *Xenopus* kanały wodne AtPIP2;1, AtPIP2;2, AtPIP2;3 i AtPIP1;2 zamykają się pod wpływem zmian pH w cytozolu z 7 do 6. Aminokwasem głównie odpowiedzialnym za bramkowanie AtPIP2;2 związane ze zmianą pH jest His<sup>197</sup>, która znajduje się w pętli D. Substytucja His<sup>197</sup> przez alaninę (Ala<sup>197</sup>) zmniejsza efekt kwasicy cytozolowej [92].

Wysokorozdzielcza analiza krystalograficzna akwaporyny *Pichia pastoris* pokazała, że motyw NPA w centrum kanału oraz inny konserwatywny motyw Arg<sup>227</sup> i His<sup>212</sup> blisko wyjścia zewnętrznego, oddziałują z przepływającymi cząsteczkami wody. Dzięki tworzącym się przejściowo wiązaniom wodorowym cząsteczki wody oddzielane są od siebie i przepychane przez kanał. Oddziaływania te decydują o selektywności kanału dla cząsteczek naładowanych, stanowiąc m.in. barierę elektrostatyczną dla protonów [53].

Wraz ze spadkiem pH, cząsteczki wody częściej występują w postaci jonów hydroniowych ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ), które zbyt silnie oddziałują ze ścianą kanału, zmniejszając jego przepustowość. Model strukturalny sugeruje prawdopodobny mechanizm bramkowania zależnego od pH dla AtPIP2;2. Cytoplazmatyczna strona AtPIP2;2, wyłączając *N*-koniec, posiada dużą liczbę zasadowych aminokwasów i ujemnie naładowaną powierzchnię. W czasie kwasicy cytozolowej His<sup>197</sup> oraz inne histydyny po stronie cytozolowej są uprotonowane i posiadają ładunek dodatni. Głównie His<sup>103</sup> tworzy kluczową część poru kanału [85] i jest wysoce konserwatywna w rodzinie białek akwaporyn błonowych (MIP), natomiast pozycje His<sup>197</sup> i His<sup>264</sup> są wysoce konserwatywne w roślinnych PIP i dlatego mogą odgrywać ważną rolę w tych izoformach.

Aby zbadać wpływ pH na strukturę AtPIP2;2 stworzono tetrameryczne modele, gdzie histydyny 103, 197 i 264 zostały przedstawione jako uprotonowane lub nie. Następnie przeprowadzono na tych modelach symulacje dynamiki molekularnej. W wyniku symulacji model z histydyną His<sup>197</sup> pozbawioną ładunku dodatniego był w stanie otwartym, a model z histydyną posiadającą ładunek dodatni w stanie zamkniętym, w którym pętla D przykrywała światło poru [19]. Model ten wyjaśnia obserwowane efekty u mutantów AtPIP2;2. Substytucja H197D sprawia, że kanał jest cały czas otwarty co prawdopodobnie spowodowane jest obecnością ujemnie naładowanych reszt kwasu asparaginowego, który zakłóca wiązania jonowe pomiędzy pętlą D a ujemnie naładowanym *N*-końcem. U mutantu H197K obserwuje się niewrażliwość kanału na zmiany pH oraz niską jego aktywność, co spowodowane

jest dodatnio naładowaną lizyną, która umożliwia, niezależnie od pH, interakcję między pętlą D a *N*-końcem, prowadząc do zamknięcia kanału. Wrażliwość na pH u mutantu H197A nie została zniesiona lecz znacząco zmniejszona [92]. Obserwacje te sugerują przesunięcie się krzywej odpowiedzi na pH oraz udział kwasowych aminokwasów takich jak kwas asparaginowy i glutaminowy w „wyczuwaniu” pH. Wrażliwość na pH była także zmniejszona u mutantów R194A i D195A, oraz była całkowicie zniesiona dla podwójnych mutantów R194A/H197A i D195A/H197A. Modele te sugerują że His<sup>197</sup> u *Arabidopsis* odgrywa kluczową rolę w tworzeniu „siatki napięciowej”, do której zaliczamy reszty Arg<sup>194</sup> i Asp<sup>195</sup>, które stabilizują stan zamknięty kanału poprzez wiązania jonowe z *N*-końcem AtPIP2;2. Mechanizm prowadzący do redukcji przepuszczalności wody przez błony w obecności Ca<sup>2+</sup>, jaki zaobserwowano w komórkach rzodkiewnika, pozostaje nadal niejasny. W przypadku ssaczyh AQP0, zmniejszenie poziomu Ca<sup>2+</sup> lub pH zwiększało przepuszczalność kanału dla wody, natomiast obniżenie obydwu jednocześnie powodowało dalsze zmniejszenie przepuszczalności kanału dla wody [70]. Zwiększanie lub zmniejszanie poziomu wewnątrzkomórkowego Ca<sup>2+</sup> niwelowało wrażliwość na zewnątrzkomórkowy Ca<sup>2+</sup>, co wskazuje, że ten mechanizm regulacji zachodzi po stronie cytoplazmatycznej. Ostatnie dane wskazują, że zmiany poziomu Ca<sup>2+</sup> oraz pH mogą zachodzić niezależnie od siebie. Wrażliwość AQP0 na pH jest zależna od pozycji histydyny w pętli A, natomiast Ca<sup>2+</sup> ma oddziaływanie regulacyjne, powodując wiązanie się kalmoduliny do *C*-końca AQP0. Podobnie jak naładowana histydyna w pętli A, tak samo jon Ca<sup>2+</sup>, obecny w rejonie *C*-końca za pośrednictwem kalmoduliny, może reorganizować cząsteczki wody dookoła poru w taki sposób, że ogranicza przepływ wody przez kanał wodny [19].

## SYGNAŁY CIŚNIENIOWE

Spadek ciśnienia turgorowego (oddziaływanie wnętrza komórki) albo zmiany ciśnienia osmotycznego (oddziaływanie ze strony tkanek) mogą skutkować odpowiednio: większym lub mniejszym przewodnictwem kanału akwaporynowego.

Jako sygnał stresu wodnego pomiędzy korzeniem a pędem zaproponowano zmiany ciśnienia w ksylemie [21]. Sygnał ciśnienia prawdopodobnie zwiększa poziom kwasu abscysynowego (ABA) w pędzie, w odpowiedzi powodując zamykanie się aparatów szparkowych. Zmiana w naprężeniu ksylemu, okaleczenie ksylemu poprzez nacięcie pędu lub liści, zmiany w tempie transpiracji prawdopodobnie powodują otwarcie się akwaporyn [64].

Zmniejszone naprężenie ksylemu w korzeniach może powodować wzrost ciśnienia turgoru w komórkach korzenia; natomiast u soi turgor korzeniowy spada już 5 min po odcięciu wierzchołka pędu [95]. Wyniki te mogą zostać wytłumaczone gradientem turgoru w poprzek korzenia. Zmiany gradientu ciśnienia w poprzek komórek korty-

kalnych korzeni pszenicy i kukurydzy, w szybki sposób wpływają na zmiany w poziomie transpiracji [76]. Należy podkreślić, że Hachez i współpracownicy (2012) [37] nie wykazali żadnych znaczących różnic w turgorze komórek korykalnych kukurydzy hodowanej w świetle oraz w ciemności, gdy aparaty szparkowe są zamknięte. W tym przypadku przewodnictwo hydrauliczne komórek korykalnych korzenia było wyższe u roślin hodowanych w świetle, co było powiązane z wyższym poziomem mRNA różnych izoform akwaporyn PIP. Być może te sprzeczne obserwacje mogą być wytłumaczone poprzez: różne ścieżki transportu wody w poprzek korzenia u różnych gatunków roślin [15], różne rodzaje odpowiedzi wykazywane przez różne warstwy komórek korykalnych, [76], oraz regulację związaną z cyklem okołodobowym, przeciwstawne do efektów transpiracji.

## $H_2O_2$

Nadtlenek wodoru, który jest reaktywną formą tlenu (ROS), jest produktem ubocznym metabolizmu roślinnego, który może być toksyczny przy wysokich stężeniach. Przy niższych stężeniach, może służyć jako cząsteczka sygnałowa podczas reakcji roślin na stres zasolenia, suszy i niskiej temperatury. Wiadomo, że niektóre izoformy akwaporyn ułatwiają dyfuzję nadtlenu wodoru do cytoplazmy, organelli, a także przestrzeni pozakomórkowych, co sprzyja przemieszczaniu się tej sygnałnej cząsteczki [11].

Oprócz bycia przypuszczalnym substratem dla pewnych typów akwaporyn [8]  $H_2O_2$  jest silnym inhibitorem akwaporyn i korzeniowego transportu wody. Dla przykładu egzogenne  $H_2O_2$  zmniejszało komórkowe i/lub korzeniowe przewodnictwo wody u ogórka i kukurydzy [2, 12]. Podejrzewa się, że u alg  $H_2O_2$  bierze udział w bramkowaniu akwaporyn poprzez mechanizmy bezpośredniej oksydacji aminokwasów światła kanału [42], natomiast związek ten nie był w stanie zahamować akwaporyn rzodkiewnika po ich ekspresji w oocytach *Xenopus*. W korzeniach *Arabidopsis*,  $H_2O_2$  oddziałuje raczej poprzez szlaki sygnałowe związane z  $Ca^{2+}$  i fosforylacją, prowadząc do relokalizacji białek PIP w wewnątrzkomórkowych pęcherzykach [12]. Jednakże, mechanizm ten wydaje się różnić w zależności od gatunku. Dla przykładu nie obserwowano żadnego efektu na  $L_p$  poprzez podanie egzogenne  $H_2O_2$  u kukurydzy [2], natomiast niski poziom egzogenne  $H_2O_2$  zwiększał  $L_p$  u fasoli [7].

## HORMONY ROŚLINNE

Hormony roślinne są ważnymi cząsteczkami sygnałowymi, które odgrywają istotną rolę w kontrolowaniu pobierania i transportu wody oraz wzrostu roślin, zarówno w warunkach optymalnych jak i stresowych. W warunkach suszy ABA wpły-

wa nie tylko na zamknięcie szparek, ale również reguluje funkcjonowanie akwaporyn w całej roślinie. Podawanie roślinom egzogenego ABA [75] oraz obserwacje roślin z nadprodukcją lub deficytem ABA [90] wykazały pozytywny wpływ tego hormonu na  $L_p$ . W przeciwieństwie, kwas abscysynowy zmniejsza przewodnictwo hydrauliczne liści u *Arabidopsis* poprzez zahamowanie regulacji akwaporyn w komórkach pochwy okołowiązkowej [72] ze stałym zmniejszeniem fosforylacji kilku izoform PIP2 w siewkach [52].

Hose i współpracownicy [44] byli pierwszymi, którzy donieśli o tym że auksyny (IAA) redukują hydrauliczne przewodnictwo komórek kory pierwotnej korzenia. Najnowsze badania wykazały, że auksyna ta u *Arabidopsis* działa za pośrednictwem czynnika ARF7, hamując ekspresję większości PIP zarówno na poziomach transkrypcyjnym jak i translacyjnym [71]. ARF7 wcześniej zidentyfikowano jako jeden z głównych czynników transkrypcji zaangażowanych w auksyno-zależny rozwój hypokotyli i korzeni bocznych. Kwas salicylowy, hormon wydzielany przy ataku patogena lub podczas stresu abiotycznego, działa podobnie do soli i hamuje ekspresję akwaporyn błony komórkowej oraz obniża poziom  $L_p$  poprzez mechanizmy związane z działaniem ROS [12, 14]. Inne hormony stymulujące wzrost, takie jak giberelina 3 (GA3) i brasinosteroidy również uczestniczą w regulacji aktywności akwaporyn [6, 82], ale do tej pory mechanizmy te nie są poznane. Przy okazji badań, obrazujących wpływ kwasu salicylowego oraz analogów auksyny na konstytutywne krążenie pęcherzykowe białek błony cytoplazmatycznej u rzodkiewnika, wykazano silnie hamujący wpływ tych hormonów na proces endocytozy akwaporyny PIP2 [26, 74].

Etylen może zwiększać przewodnictwo hydrauliczne pędu. Także mechanizm związany z ograniczeniem przewodnictwa hydraulicznego liści spowodowanym brakiem fosforu, okazuje się być pośredniczony przez etylen. Natomiast spryskiwanie liści inhibitorem prekursora syntezy etylenu nie znosiło inhibującego efektu zranienia pędu na  $L_p$  [20, 95].

## PODSUMOWANIE

Badania przeprowadzone w ostatnich 20 latach, pozwoliły na znaczący postęp w poznaniu struktury i funkcji roślinnych akwaporyn. Jednak wciąż daleko nam do pełnego poznania ich roli. Akwaporyny wykazują wysoką różnorodność molekularną u roślin a funkcje wielu izoform, nawet u najczęściej badanych organizmów takich jak rzodkiewnik czy ryż, nie są cały czas poznane. Uzyskane wyniki jednak pokazują, że akwaporyny nie uczestniczą wyłącznie w transporcie wody ale również w transporcie licznych niskocząsteczkowych składników organicznych i mineralnych. Białka te mają wpływ na szereg procesów fizjologicznych roślin, takich jak: kiełkowanie i wzrost załączków, zawiązywanie korzeni bocznych, dostarczanie  $CO_2$  do chloroplastów oraz na utrzymanie homeostazy komórek i tkanek w warun-

kach stresowych. Aktywność akwaporyn kontrolowana jest przez wiele bodźców zewnętrznych jak i wewnętrznych cząsteczek sygnałowych. Mechanizmy regulujące aktywność akwaporyn to między innymi: fosforylacja, heteromeryzacja, zmiany pH, stężenie jonów  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{H}_2\text{O}_2$ , hormony roślinne oraz lokalne zmiany ciśnienia zmieniające przepływ wody przez kanał. Mechanizmy regulujące gospodarkę wodną za pośrednictwem akwaporyn są wysoce złożone i łączą różne sygnały, przez co na wiele pytań nie ma dotychczas odpowiedzi.

## PODZIĘKOWANIA

Artykuł finansowany ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego

Autor jest stypendystą w ramach Poddziałania 8.2.2 „Regionalne Strategie Innowacji”, Działania 8.2 „Transfer wiedzy”, Priorytetu VIII „Regionalne Kadry Gospodarki” Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Unii Europejskiej i z budżetu państwa



KAPITAŁ LUDZKI  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Lubuskie

UNIA EUROPEJSKA  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



## LITERATURA

- [1] AHARON R, SHAHAK Y, WININGER S, BENDOV R, KAPULNIK Y, GALILI G. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell* 2003; **15**: 439-447.
- [2] AROCA R, AMODEO G, FERNANDEZ-ILLESCAS S, HERMAN EM, CHAUMONT F, CHRISPEELS MJ. The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiol* 2005; **137**: 341-353.
- [3] AROCA R, PORCEL R, RUIZ-LOZANO JM. How does arbuscular mycorrhizal symbiosis regulate root hydraulic properties and plasma membrane aquaporins in *Phaseolus vulgaris* under drought, cold or salinity stresses? *New Phytol* 2007; **173**: 808-816.
- [4] AROCA R, PORCEL R, RUIZ-LOZANO JM. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. *J Exp Bot* 2012; **63**: 43-57.
- [5] AZAD AK, SAWA Y, ISHIKAWA T, SHIBATA H. Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 608-617.
- [6] BAE EK, LEE H, LEE JS, NOH EW. Drought, salt and wounding stress induce the expression of the plasma membrane intrinsic protein 1 gene in poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*). *Gene* 2011; **483**: 43-48.
- [7] BENABDELLAH K, RUIZ-LOZANO JM, AROCA R. Hydrogen peroxide effects on root hydraulic properties and plasma membrane aquaporin regulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol Biol* 2009; **70**: 647-661.



- [8] BIENERT GP, CHAUMONT F. Transporters and Pumps in Plant Signaling. *Plant aquaporins: roles in water homeostasis, nutrition, and signaling processes*. Springer, 2011; 3-36.
- [9] BIENERT GP, CHAUMONT F. Encyclopedia of Metalloproteins. In: Kretsinger RH, Uversky VN, Permyakov E eds. *Boron and aquaporins*. New York: Springer, 2013;
- [10] BIENERT GP, CHAUMONT F. Encyclopedia of Metalloproteins. In: Kretsinger RH, Uversky VN, E. P eds. *Silicon and aquaporins*. New York: Springer, 2013; 1979-1982.
- [11] BIENERT GP, CHAUMONT F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2014; **1840**: 1596-1604
- [12] BOURSIAC Y, BOUDET J, POSTAIRE O, LUU DT, TOURNAIRE-ROUX C, MAUREL C. Stimulus-induced downregulation of root water transport involves reactive oxygen species-activated cell signalling and plasma membrane intrinsic protein internalization. *Plant J* 2008; **56**: 207-218.
- [13] BOURSIAC Y, CHEN S, LUU DT, SORIEUL M, VAN DEN DRIES N, MAUREL C. Early effects of salinity on water transport in Arabidopsis roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* 2005; **139**: 790-805.
- [14] BOURSIAC Y, PRAK S, BOUDET J, POSTAIRE O, LUU DT, TOURNAIRE-ROUX C, SANTONI V, MAUREL C. The response of Arabidopsis root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species- and phosphorylation-dependent internalization of aquaporins. *Plant Signal Behav* 2008; **3**: 1096-1098.
- [15] BRAMLEY H, TURNER NC, TURNER DW, TYERMAN SD. Roles of morphology, anatomy, and aquaporins in determining contrasting hydraulic behavior of roots. *Plant Physiol* 2009; **150**: 348-364.
- [16] BROWN D. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; **284**: F893-901.
- [17] CARBREY JM, AGRE P. Discovery of the aquaporins and development of the field. *Handb Exp Pharmacol* 2009: 3-28.
- [18] CHAUMONT F, BARRIEU F, WOJCIEK E, CHRISPEELS MJ, JUNG R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol* 2001; **125**: 1206-1215.
- [19] CHAUMONT F, MOSHELION M, DANIELS MJ. Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* 2005; **97**: 749-764.
- [20] CHAUMONT F, TYERMAN SD. Aquaporins: highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol* 2014; **164**: 1600-1618.
- [21] CHRISTMANN A, WEILER EW, STEUDLE E, GRILL E. A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *Plant J* 2007; **52**: 167-174.
- [22] COCHARD H, VENISSE JS, BARIGAH TS, BRUNEL N, HERBETTE S, GUILLIOT A, TYREE MT, SAKR S. Putative role of aquaporins in variable hydraulic conductance of leaves in response to light. *Plant Physiol* 2007; **143**: 122-133.
- [23] DĄBROWSKA G, MORDAKA PM. Przeszukiwanie bazy danych EST w celu zidentyfikowania pełnej sekwencji cDNA genu kodującego akwaporynę *Pharbitis nil* Choisy (PnPIP1). *Biotechnologia* 2008; **2**: 190-198.
- [24] DIETZ S, VON BULOW J, BEITZ E, NEHLS U. The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: lessons for symbiotic functions. *New Phytol* 2011; **190**: 927-940.
- [25] DORDAS C, CHRISPEELS MJ, BROWN PH. Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol* 2000; **124**: 1349-1362.
- [26] DU Y, TEJOS R, BECK M, HIMSCHOOT E, LI H, ROBATZEK S, VANNESTE S, FRIML J. Salicylic acid interferes with clathrin-mediated endocytic protein trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 7946-7951.
- [27] EPSTEIN E. The anomaly of silicon in plant biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; **91**: 11-17.
- [28] EVANS JR, VONCAEMMERER S. Carbon dioxide diffusion inside leaves. *Plant Physiol* 1996; **110**: 339-346.
- [29] FAUTEUX F, REMUS-BOREL W, MENZIES JG, BELANGER RR. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiol Lett* 2005; **249**: 1-6.
- [30] FETTER K, VAN WILDER V, MOSHELION M, CHAUMONT F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell* 2004; **16**: 215-228.

- [31] FLEXAS J, RIBAS-CARBO M, DIAZ-ESPEJO A, GALMES J, MEDRANO H. Mesophyll conductance to CO<sub>2</sub>: current knowledge and future prospects. *Plant Cell and Environment* 2008; **31**: 602-621.
- [32] FORTIN MG, MORRISON NA, VERMA DP. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res* 1987; **15**: 813-824.
- [33] GERBEAU P, AMODEO G, HENZLER T, SANTONI V, RIPOCHE P, MAUREL C. The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J* 2002; **30**: 71-81.
- [34] GHANMI D, MCNALLY DJ, BENHAMOU N, MENZIES JG, BELANGER RR. Powdery mildew of *Arabidopsis thaliana*: a pathosystem for exploring the role of silicon in plant-microbe interactions. *Physiol Mol Plant Pathol* 2004; **64**: 189-199.
- [35] GOMES D, AGASSE A, THIEBAUD P, DELROT S, GEROS H, CHAUMONT F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1788**: 1213-1228.
- [36] HACHEZ C, BESSERER A, CHEVALIER AS, CHAUMONT F. Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. *Trends Plant Sci* 2013; **18**: 344-352.
- [37] HACHEZ C, VESELOV D, YE Q, REINHARDT H, KNIPFER T, FRICKE W, CHAUMONT F. Short-term control of maize cell and root water permeability through plasma membrane aquaporin isoforms. *Plant Cell Environ* 2012; **35**: 185-198.
- [38] HACHEZ C, ZELAZNY E, CHAUMONT F. Modulating the expression of aquaporin genes in planta: A key to understand their physiological functions? *Biochim Biophys Acta* 2006; **1758**: 1142-1156.
- [39] HARVENGT P, VLERICK A, FUKS B, WATTIEZ R, RUYSSCHAERT JM, HOMBLE F. Lentil seed aquaporins form a hetero-oligomer which is phosphorylated by a Mg(2+)-dependent and Ca(2+)-regulated kinase. *Biochem J* 2000; **352 Pt 1**: 183-190.
- [40] HECKWOLF M, PATER D, HANSON DT, KALDENHOFF R. The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO<sub>2</sub> transport facilitator. *Plant J* 2011; **67**: 795-804.
- [41] HEINEN RB, YE Q, CHAUMONT F. Role of aquaporins in leaf physiology. *J Exp Bot* 2009; **60**: 2971-2985.
- [42] HENZLER T, YE Q, STEUDLE E. Oxidative gating of water channels (aquaporins) in Chara by hydroxyl radicals. *Plant Cell Environ* 2004; **27**: 1184-1195.
- [43] HOLM LM, JAHN TP, MOLLER AL, SCHJOERRING JK, FERRI D, KLAERKE DA, ZEUTHEN T. NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflugers Arch* 2005; **450**: 415-428.
- [44] HOSE E, STEUDLE E, HARTUNG W. Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes. *Planta* 2000; **211**: 874-882.
- [45] HWANG JH, ELLINGSON SR, ROBERTS DM. Ammonia permeability of the soybean nodulin 26 channel. *FEBS Lett* 2010; **584**: 4339-4343.
- [46] JAHN TP, MOLLER AL, ZEUTHEN T, HOLM LM, KLAERKE DA, MOHSIN B, KUHLEBRANDT W, SCHJOERRING JK. Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS Lett* 2004; **574**: 31-36.
- [47] JOHANSON U, KARLSSON M, JOHANSSON I, GUSTAVSSON S, SJOVALL S, FRAYSSE L, WEIG AR, KJELLBOM P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol* 2001; **126**: 1358-1369.
- [48] JOHANSSON I, KARLSSON M, JOHANSON U, LARSSON C, KJELLBOM P. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1465**: 324-342.
- [49] JOHANSSON I, KARLSSON M, SHUKLA VK, CHRISPEELS MJ, LARSSON C, KJELLBOM P. Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation. *Plant Cell* 1998; **10**: 451-459.
- [50] JOHNSON KD, CHRISPEELS MJ. Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein. *Plant Physiol* 1992; **100**: 1787-1795.
- [51] KALDENHOFF R, KOLLING A, MEYERS J, KARMANN U, RUPPEL G, RICHTER G. The blue light-responsive AthH2 gene of *Arabidopsis thaliana* is primarily expressed in expanding as well as in differentiating cells and encodes a putative channel protein of the plasmalemma. *Plant J* 1995; **7**: 87-95.

- [52] KLINE KG, BARRETT-WILT GA, SUSSMAN MR. In planta changes in protein phosphorylation induced by the plant hormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; **107**: 15986-15991.
- [53] KOSINSKA ERIKSSON U, FISCHER G, FRIEMANN R, ENKAVI G, TAJKHORSHID E, NEUTZE R. Subangstrom resolution X-ray structure details aquaporin-water interactions. *Science* 2013; **340**: 1346-1349.
- [54] LOPEZ D, BRONNER G, BRUNEL N, AUGUIN D, BOURGERIE S, BRIGNOLAS F, CARPIN S, TOURNAIRE-ROUX C, MAUREL C, FUMANAL B, MARTIN F, SAKR S, LABEL P, JULIEN JL, GOUSSET-DUPONT A, VENISSE JS. Insights into Populus XIP aquaporins: evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *J Exp Bot* 2012; **63**: 2217-2230.
- [55] LOQUE D, LUDEWIG U, YUAN L, VON WIREN N. Tonoplast intrinsic proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 facilitate NH<sub>3</sub> transport into the vacuole. *Plant Physiol* 2005; **137**: 671-680.
- [56] LUU DT, MAUREL C. Aquaporin trafficking in plant cells: an emerging membrane-protein model. *Traffic* 2013; **14**: 629-635.
- [57] MA JF, TAMAI K, YAMAJI N, MITANI N, KONISHI S, KATSUHARA M, ISHIGURO M, MURATA Y, YANO M. A silicon transporter in rice. *Nature* 2006; **440**: 688-691.
- [58] MAGGIO A, JOLY RJ. Effects of Mercuric Chloride on the Hydraulic Conductivity of Tomato Root Systems (Evidence for a Channel-Mediated Water Pathway). *Plant Physiol* 1995; **109**: 331-335.
- [59] MARJANOVIC Z, UEHLEIN N, KALDENHOFF R, ZWIAZEK JJ, WEISS M, HAMPP R, NEHLS U. Aquaporins in poplar: what a difference a symbiont makes! *Planta* 2005; **222**: 258-268.
- [60] MARTINIERE A, LI X, RUNIONS J, LIN J, MAUREL C, LUU DT. Salt stress triggers enhanced cycling of Arabidopsis root plasma-membrane aquaporins. *Plant Signal Behav* 2012; **7**: 529-532.
- [61] MASALKAR P, WALLACE IS, HWANG JH, ROBERTS DM. Interaction of cytosolic glutamine synthetase of soybean root nodules with the C-terminal domain of the symbiosome membrane nodulin 26 aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 2010; **285**: 23880-23888.
- [62] MAUREL C, CHRISPEELS M, LURIN C, TACNET F, GEELEN D, RIPOCHE P, GUERN J. Function and regulation of seed aquaporins. *J Exp Bot* 1997; **48 Spec No**: 421-430.
- [63] MAUREL C, KADO RT, GUERN J, CHRISPEELS MJ. Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP. *EMBO J* 1995; **14**: 3028-3035.
- [64] MCELDRONE AJ, BICHLER J, POCKMAN WT, ADDINGTON RN, LINDER CR, JACKSON RB. Aquaporin-mediated changes in hydraulic conductivity of deep tree roots accessed via caves. *Plant Cell Environ* 2007; **30**: 1411-1421.
- [65] MIAO GH, HONG Z, VERMA DP. Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane. *J Cell Biol* 1992; **118**: 481-490.
- [66] MITANI N, YAMAJI N, MA JF. Identification of maize silicon influx transporters. *Plant Cell Physiol* 2009; **50**: 5-12.
- [67] MONNEUSE JM, SUGANO M, BECUE T, SANTONI V, HEM S, ROSSIGNOL M. Towards the profiling of the *Arabidopsis thaliana* plasma membrane transportome by targeted proteomics. *Proteomics* 2011; **11**: 1789-1797.
- [68] MURATA K, MITSUOKA K, HIRAI T, WALZ T, AGRE P, HEYMANN JB, ENGEL A, FUJIYOSHI Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 2000; **407**: 599-605.
- [69] NARDINI A, SALLEO S. Water stress-induced modifications of leaf hydraulic architecture in sunflower: co-ordination with gas exchange. *J Exp Bot* 2005; **56**: 3093-3101.
- [70] NEMETH-CAHALAN KL, KALMAN K, HALL JE. Molecular basis of pH and Ca<sup>2+</sup> regulation of aquaporin water permeability. *J Gen Physiol* 2004; **123**: 573-580.
- [71] PERET B, LI G, ZHAO J, BAND LR, VOSS U, POSTAIRE O, LUU DT, DA INES O, CASIMIRO I, LUCAS M, WELLS DM, LAZZERINI L, NACRY P, KING JR, JENSEN OE, SCHAFFNER AR, MAUREL C, BENNETT MJ. Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nat Cell Biol* 2012; **14**: 991-998.
- [72] POSTAIRE O, TOURNAIRE-ROUX C, GRONDIN A, BOURSIAC Y, MORILLON R, SCHAFFNER AR, MAUREL C. A PIP1 aquaporin contributes to hydrostatic pressure-induced water transport in both the root and rosette of Arabidopsis. *Plant Physiol* 2010; **152**: 1418-1430.

- [73] PRAK S, HEM S, BOUDET J, VIENNOIS G, SOMMERER N, ROSSIGNOL M, MAUREL C, SANTONI V. Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Mol Cell Proteomics* 2008; **7**: 1019-1030.
- [74] ROBERT S, KLEINE-VEHN J, BARBEZ E, SAUER M, PACIOREK T, BASTER P, VANNESTE S, ZHANG J, SIMON S, COVANOV A M, HAYASHI K, DHONUKSHE P, YANG Z, BEDNAREK SY, JONES AM, LUSCHNIG C, ANIENTO F, ZAZIMALOVA E, FRIML J. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell* 2010; **143**: 111-121.
- [75] RUIZ-LOZANO JM, DEL MAR ALGUACIL M, BARZANA G, VERNIERI P, AROCA R. Exogenous ABA accentuates the differences in root hydraulic properties between mycorrhizal and non mycorrhizal maize plants through regulation of PIP aquaporins. *Plant Mol Biol* 2009; **70**: 565-579.
- [76] RYGOL J, PRITCHARD J, ZHU JJ, TOMOS AD, ZIMMERMANN U. Transpiration Induces Radial Turgor Pressure Gradients in Wheat and Maize Roots. *Plant Physiol* 1993; **103**: 493-500.
- [77] SADE N, GEBRETSADIK M, SELIGMANN R, SCHWARTZ A, WALLACH R, MOSHELION M. The Role of Tobacco Aquaporin1 in Improving Water Use Efficiency, Hydraulic Conductivity, and Yield Production Under Salt Stress. *Plant Physiol* 2010; **152**: 245-254.
- [78] SADE N, SHATIL-COHEN A, ATTIA Z, MAUREL C, BOURSIAIC Y, KELLY G, GRANOT D, YAARAN A, LERNER S, MOSHELION M. The role of plasma membrane aquaporins in regulating the bundle sheath-mesophyll continuum and leaf hydraulics. *Plant Physiol* 2014; **166**: 1609-1620.
- [79] SAKURAI J, ISHIKAWA F, YAMAGUCHI T, UEMURA M, MAESHIMA M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1568-1577.
- [80] SANTONI V, VINH J, PFLIEGER D, SOMMERER N, MAUREL C. A proteomic study reveals novel insights into the diversity of aquaporin forms expressed in the plasma membrane of plant roots. *Biochem J* 2003; **373**: 289-296.
- [81] SIEFRITZ F, BIELA A, ECKERT M, OTTO B, UEHLEIN N, KALDENHOFF R. The tobacco plasma membrane aquaporin NtAQP1. *J Exp Bot* 2001; **52**: 1953-1957.
- [82] SUGA S, KOMATSU S, MAESHIMA M. Aquaporin isoforms responsive to salt and water stresses and phytohormones in radish seedlings. *Plant Cell Physiol* 2002; **43**: 1229-1237.
- [83] SUGA S, MAESHIMA M. Water channel activity of radish plasma membrane aquaporins heterologously expressed in yeast and their modification by site-directed mutagenesis. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 823-830.
- [84] SUTKA M, LI G, BOUDET J, BOURSIAIC Y, DOUMAS P, MAUREL C. Natural variation of root hydraulics in Arabidopsis grown in normal and salt-stressed conditions. *Plant Physiol* 2011; **155**: 1264-1276.
- [85] TAJKHORSHID E, NOLLERT P, JENSEN MO, MIERCKE LJ, O'CONNELL J, STROUD RM, SCHULTEN K. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science* 2002; **296**: 525-530.
- [86] TAKANO J, MIWA K, FUJIWARA T. Boron transport mechanisms: collaboration of channels and transporters. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 451-457.
- [87] TAKANO J, NOGUCHI K, YASUMORI M, KOBAYASHI M, GAJDOS Z, MIWA K, HAYASHI H, YONEYAMA T, FUJIWARA T. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature* 2002; **420**: 337-340.
- [88] TAKANO J, WADA M, LUDEWIG U, SCHAAF G, VON WIREN N, FUJIWARA T. The Arabidopsis major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 2006; **18**: 1498-1509.
- [89] TERASHIMA I, ONO K. Effects of HgCl<sub>2</sub> on CO<sub>2</sub> dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO<sub>2</sub> diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiol* 2002; **43**: 70-78.
- [90] THOMPSON AJ, ANDREWS J, MULHOLLAND BJ, MCKEE JM, HILTON HW, HORRIDGE JS, FARQUHAR GD, SMEETON RC, SMILLIE IR, BLACK CR, TAYLOR IB. Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiol* 2007; **143**: 1905-1917.

- [91] TOMKOWIAK E, PIENKOWSKA JR. The Current Knowledge of Invertebrate Aquaporin Water Channels with Particular Emphasis on Insect Aqps. *Post Biol Kom* 2009; **36**: 203-216.
- [92] TOURNAIRE-ROUX C, SUTKA M, JAVOT H, GOUT E, GERBEAU P, LUU DT, BLIGNY R, MAUREL C. Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 2003; **425**: 393-397.
- [93] UEHLEIN N, FILESCHI K, ECKERT M, BIENERT GP, BERTEL A, KALDENHOFF R. Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 2007; **68**: 122-129.
- [94] UEHLEIN N, OTTO B, HANSON DT, FISCHER M, MCDOWELL N, KALDENHOFF R. Function of Nicotiana tabacum aquaporins as chloroplast gas pores challenges the concept of membrane CO<sub>2</sub> permeability. *Plant Cell* 2008; **20**: 648-657.
- [95] VANDELEUR RK, SULLIVAN W, ATHMAN A, JORDANS C, GILLIHAM M, KAISER BN, TYERMAN SD. Rapid shoot-to-root signalling regulates root hydraulic conductance via aquaporins. *Plant Cell Environ* 2014; **37**: 520-538.
- [96] VANDER WILLIGEN C, POSTAIRE O, TOURNAIRE-ROUX C, BOURSIAC Y, MAUREL C. Expression and inhibition of aquaporins in germinating Arabidopsis seeds. *Plant Cell Physiol* 2006; **47**: 1241-1250.
- [97] VERA-ESTRELLA R, BARKLA BJ, BOHNERT HJ, PANTOJA O. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol* 2004; **135**: 2318-2329.
- [98] VESELOVA TV, VESELOVSKII VA, USMANOV PD, USMANOVA OV, KOZAR VI. Hypoxia and imbibition injuries to aging seeds. *Russian Journal of Plant Physiology* 2003; **50**: 835-842.
- [99] WELBAUM GE, BRADFORD KJ, YIM KO, BOOTH DT, OLUOCH MO. Biophysical, physiological and biochemical processes regulating seed germination. *Seed Science Research* 1998; **8**: 161-172.
- [100] YAMADA S, KATSUHARA M, KELLY WB, MICHALOWSKI CB, BOHNERT HJ. A family of transcripts encoding water channel proteins: tissue-specific expression in the common ice plant. *Plant Cell* 1995; **7**: 1129-1142.
- [101] ZELAZNY E, BORST JW, MUYLAERT M, BATOKO H, HEMMINGA MA, CHAUMONT F. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 12359-12364.

*Redaktor prowadzący – Janusz Maszewski*

*Otrzymano: 22.09.2014*

*Przyjęto: 13.02.2015*

*Ewelina Paluch*

*Zakład Fizjologii Roślin, Wydział Biologii UAM*

*ul. Umultowska 89, 61-614 Poznań*

*tel. (61) 829 58 85*

*email: e.paluch@amu.edu.pl*

