

AZ IONFELVÉTEL LÁTSZÓLAGOS AKTIVÁLÁSI ENERGIÁJÁNAK VÁLTOZÁSA GYÖKEREK KÜLÖNBÖZŐ FELVÉTELI RENDSZEREIBEN

BOGNÁR JÁNOS

Eötvös Loránd Tudományegyetem TTK Növényélettani Tanszék, Budapest

Növényi sejtekben az ionfelvétel kinetikája megegyezik az enzimreakciók kinetikai sajátosságaival [5]. Széles koncentráció intervallumban az iontranszport összetett Michaelis—Menten-kinetikával írható le [4]. A több szakaszból felépülő ún. kettős felvételi rendszer általánosan előfordul a növényvilágban [8]. Gyökerek, levelek mellett megtalálható raktározó szövetekben [22], és zöldalgákban is kimutatták [14]. Hasonló kinetika jellemzi a gyökerek aminosav transzportját [19], és különböző hexózok felvételét raktározó szövetekben [17].

Gátló érzékenység, kompetíciós sajátosságok alapján feltételezik, hogy 1 mM külső koncentráció alatt nagy kötőaffinitású, anyagcseréhez szorosan kapcsolódó ún. I. rendszer szabályozza a transzportot. Az 1 mM felett működő alacsonyabb kötőaffinitású ún. II. rendszerben a transzport inkább fizikai jellegű passzív folyamat [6, 27]. Általánosan elfogadott, hogy az I. rendszer a plazmalemmán lokalizált. A II. rendszer helyét vagy a plazmalemmán [6, 31], vagy a vakuólumot határoló tonoplaszton feltételezik [27, 22, 20].

Részletes kinetikai analízissel megállapítható, hogy az I. rendszer kevésbé, a II. rendszer kifejezetten heterogén. A kisebb szakaszokból álló, bonyolultabb ún. multi-fázisos kinetikát a membránok ionkoncentrációtól függő fázisváltozásai idézhetik elő. [20].

A kinetikai hasonlóságra alapozva a gyökerek iontranszport mechanizmusát számos kutató a szállítóelmélettel értelmezi a kinetikai analízisekből kapott maximális sebességnek (V_m), és az enzimreakciók Michaelis-konstansával formálisan azonos transzport konstansnak (K_t) ugyanazt a tartalmat tulajdonítva, amit ezek a paraméterek az enzimkinetikában kifejeznek. A kinetikai hasonlóság alapvetően szükséges, de nem elégséges feltétele annak, hogy igazolhassuk közvetített transzport működését gyökérsejtek ionfelvételében. A transzportkinetika és enzimkinetika formai hasonlósága tartalmi egyezést akkor jelent, ha több oldalról tudjuk ezt igazolni. Ha a feltételezett szállítókat növényi membránokban is kimutatjuk, ismerjük fontosabb biokémiai, kinetikai, termodinamikai paramétereiket, ezeket egyeztetni tudjuk a transzport megfelelő adataival, igazoljuk, hogy a klasszikus enzimkinetika alapfeltételezései és megkötései a gyökér iontranszportban is érvényesek.

A gyökér iontranszport szigorúan szabályozott folyamat. Feltehető, hogy állati sejtekhez, baktériumokhoz hasonlóan a transzportban itt is szerepelnek specifikus membránalkotók, melyek működése a növényi sejt sajátosságai (sejtfal, vakuóla) miatt eltérő is lehet az eddig megismert szállítók működésétől. Valószínű, hogy a gyökér iontranszportban egyéb tényezők is jelentős reguláló szerepet játszanak (pl. hőmérséklettől, töltésviszonyoktól függő membránszerkezet változások, a sejtfal állapota, a turgor, kapcsolódás az anyagszeréhez, intakt növénynél a transpiráció stb.).

A szállítókkal történő iontranszport mechanizmus előfordulásának lehetőségét támogatja a gyökér plazmalemma ATPázok kimutatása. A membránhoz kötött enzimek különböző ionokkal aktiválhatók, strofantin érzékenységgükről ellentmondóak az irodalmi adatok. In vivo szerepüket a gyökér kationtranszportban [7] és a ritkán kimutatható kálium—nátrium szelekcióban [12, 18] általánosan igazoltnak, elfogadottnak még nem tekinthetjük. Azt sem látjuk világosan, hogy ezek az enzimek milyen szerepet játszanak a gyökér ionfelvétel regulációjában. Tekinthesz-e szállítóknak, talán más típusú szállítók működéséhez szolgáltatnak energiát, esetleg szerepet játszanak egy ionmozgást okozó potenciálgradiens létrehozásában.

Az aktív vagy passzív iontranszportra az ionkoncentrációtól függő elektrokémiai potenciálkülönbség megállapításával a Nerust—Goldman-egyenlet alapján végzett számításokkal is következtethetünk. A technika segítségével meg lehet állapítani a tonoplaszt és a plazmalemma elektrokémiai potenciálját adott ionra, ki lehet számítani a mikroelektrodokkal mért potenciálkülönbségnek megfelelő ionmegoszlást a sejt és környezete, illetve a plazma és a vakuólum között [10]. A mikroelektrodokkal végzett mérések következtetéseit megnehezíti az elektród által okozott jelentős károsítás a gyökérsejt membránon. A mikroelektrodos technika mai fejlettségével a viszonylag nagyméretű Charafajoknál ad megbízható eredményeket [9].

Az elektrokinetikai transzport modell [26] szintetizáló törekvés, amely a növény iontranszportját alacsony külső koncentráción, az egyensúlyhoz közeli I. rendszerben a lineáris áramlás-hajtóerő összefüggés alapján tárgyalja.

Magas külső koncentráción (II. rendszer) a transzport kinetikát az elektrokinetika nem lineáris áramlás-hajtóerő törvényére építve értelmezi. Az elektrokinetikai modell nem tagadja a szállítóelméletet, de az iontranszportban hangsúlyozottan figyelembe veszi az ionok töltésviszonyait. Az elmélet egyaránt nyitott a szállítóelmélet, az irreverzibilis termodinamika és az elektrokémiai potenciálgradiensnek megfelelő iontranszport mechanizmussal történő értelmezés irányába.

A rendelkezésre álló fő vonalaiban ismertett gyökér iontranszport kutatások alapján a transzport mechanizmusáról nehéz egyértelmű képet alkotni. További, más irányú adatok is szükségesek a kinetikai, enzimológiai, elektrokinetikai adatok kiegészítéséhez. Ehhez járulhat hozzá az ionfelvétel hőmér-

sékletfüggésének vizsgálata. Annak eldöntésére, hogy egy folyamat anyagcserétől szorosan függő, enzimműködéssel regulált, vagy metabolizmustól független fizikai törvényekkel magyarázható jelenség, a sebességmeghatározó lépés hőmérsékletfüggéséből is következtethetünk. Ismert, hogy egy fizikai folyamat hőmérsékletérzékenysége, Q_{10} értéke és aktiválási energiája kisebb, mint egy enzimreakcióé. A hőmérsékletfüggés alapján termodinamikai számításokat, bioenergetikai következtetéseket is megállapíthatunk. Ezek a számítások szintén lényegesek, mivel az irodalomban a transzport energiaigényéről, energiaforgalmáról gyakran történik említés, míg a gyökér iontranszport energiaforgalmáról kevés kísérleti adat áll rendelkezésre.

Anyag és módszer

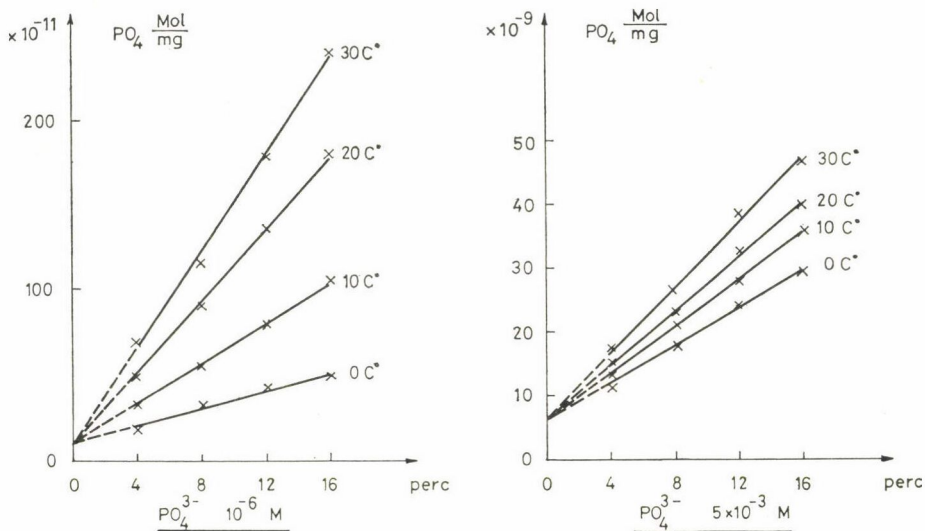
A vizsgálatokhoz Hoagland-tápoldaton konstans klímafeltételek között tartott 7 napos árpagyökereket használtunk. A tápoldatot naponta cseréltük és folyamatosan levegőztettük. A kísérletekben jelzett, K, Rb és foszfát felvételét mértük $5 \cdot 10^{-3}$ és 10^{-6} mol. koncentrációban 0–10–20–és 30 °C hőmérsékleten. Az oldatokat az ionkoncentrációtól függően 10 és 80 μC ^{42}K /liter, 5 és 40 μC ^{86}Rb /liter és 20 és 80 μC ^{32}P /liter izotóppal jelöltük, a felvételi oldat pH-ja: 5,6–5,8. A felvételi kísérletek minden egyes hőmérsékleten 16 percig tartottak. A rövid idejű felvételi kísérletekben az alkalmazott jelölésnél az anyagcserére gyakorolt direkt izotóp hatás és a felvett izotópok leadásának valószínűsége csekély. A tápoldaton tartott gyökereknél izotóp hozzáadásakor a látszólagos szabad helyek feltöltődése már megtörtént. Így a Donnanhelyeken lejátszódó izotóp ioncsere abszorpció az alkalmazott izotópkoncentráció és pH mellett rövid idejű kísérletekben nem jelentős. A kísérleti idő lejártával a gyökereket 5-ször azonos térfogatú desztillált vízzel 30–30 sec. ideig mostuk. Szárítás után a minták aktivitását gázáramlásos proporcionális GM-csővel mértük. A felvett ionmennyiséget szárazsúlyra vonatkoztattuk. A 3–5 ismétlés átlagaiból szerkesztett időgörbéket lineáris regresszió analízissel számítottuk ki.

Eredmények és értékelésük

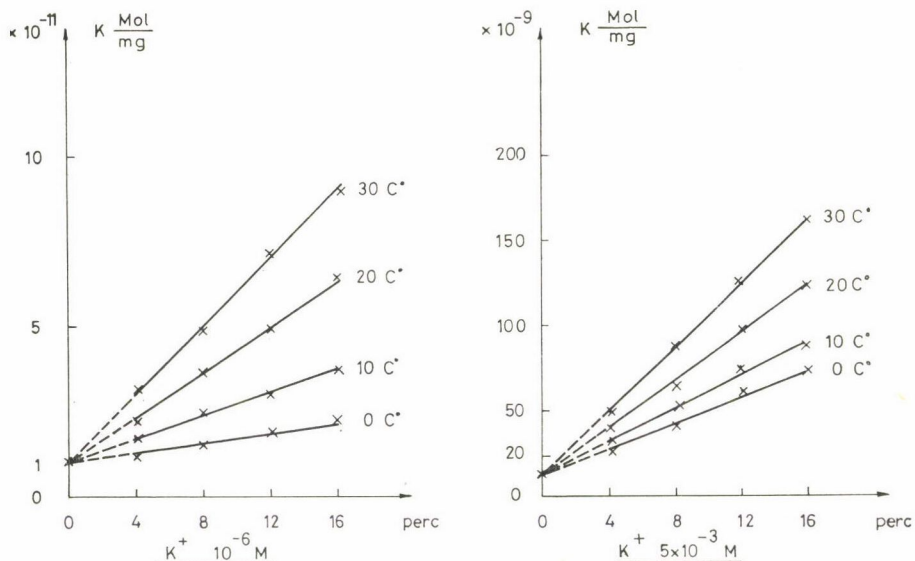
A felvett ionok mennyiségét az idő függvényében ábrázolva a rövid idejű felvételi kísérletekben egyenest kapunk, ami az izotópfelvétel steady-state állapotára utal (1–3. ábra). A hőmérséklet emelésével növekszik az időgörbék meredeksége. A különböző hőmérsékleten kapott egyenesek extrapolálva az ordinátát közel azonos pontban metszik. Az ordinátametszet értéke jelentősen nem függ a hőmérséklettől, az ionkoncentráció növelésével azonban emelkedik. A szállító elméletben egyensúlyi feltételek között az ordinátametszet

értéke enzimkinetikai megfontolások alapján megfelel a szállító-ion komplex aktuális koncentrációjának [5, 21]. A felvett ionmennyiség (M) arányos a sebességi állandóval (k) és az ordinátametszettel (MR):

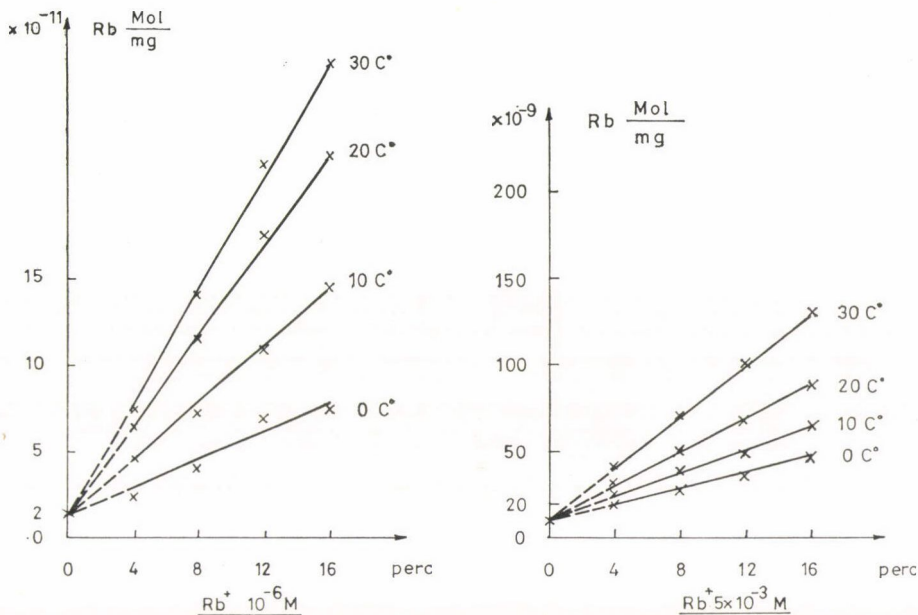
$$M = k[MR]t + [MR].$$



1. ábra. A foszfátfelvétel árpagyökerekben különböző hőmérsékleten



2. ábra. A káliumfelvétel árpagyökerekben különböző hőmérsékleten



3. ábra. A rubidiumfelvétel árpagyökerekben különböző hőmérsékleten

A felvétel sebességi állandója az egyenletből:

$$k = \frac{\text{tg } d}{[\text{MR}]}$$

A sebességi állandók értékeit az I. táblázat tartalmazza. Értékük növekszik a hőmérséklettel, valamint az oldat ionkoncentrációjával. A hőmérsékleti kvóciens (Q_{10}) értéke szobahőmérsékleten, alacsony külső koncentráción (I. rendszer) az enzimelekciók megfelelő Q_{10} értékéhez hasonlít. $5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ koncentráción inkább a fizikai reakciók jellemző alacsonyabb érték.

I. táblázat

Az ionfelvétel sebességi állandói különböző hőmérsékleten az I. és II. felvételi rendszerben

Koncentráció	Hőmérséklet	Kálium	Rubidium	Foszfát
10 ⁻⁶ Mol I. rendszer	0 °C	1,4 × 10 ⁻³	1,7 × 10 ⁻³	1,1 × 10 ⁻³
	10 °C	3,1	3,2	2,0
	20 °C	6,4	5,6	3,5
	30 °C	9,3	8,0	5,5
5 × 10 ⁻³ Mol II. rendszer	0 °C	3,1 × 10 ⁻²	2,7 × 10 ⁻²	1,2 × 10 ⁻²
	10 °C	4,3	4,1	1,3
	20 °C	6,3	5,8	1,6
	30 °C	8,8	8,6	1,9

Az ionfelvétel látszólagos aktiválási energiájának kiszámítása az ionfelvétel sebességi állandójának hőmérsékletfüggéséből történt.

A számítást az Arrhenius-egyenlethől EYRING által kidolgozott és a biokémiában általánosan alkalmazott aktivált komplex elmélet alapján numerikusan végeztük az egyenlet integrált formájának felhasználásával [3]:

$$\Delta E^* = R \frac{T^I \cdot T^{II}}{T^I - T^{II}} \ln \frac{k^I \cdot T^{II}}{k^I \cdot T^I}$$

A számításokat grafikus módszerrel ellenőriztük. A kiszámított aktiválási energia értékeket a 2. sz. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

Az ionfelvétellátszólagos aktiválási energiája a gyökerek különböző felvételi rendszereiben

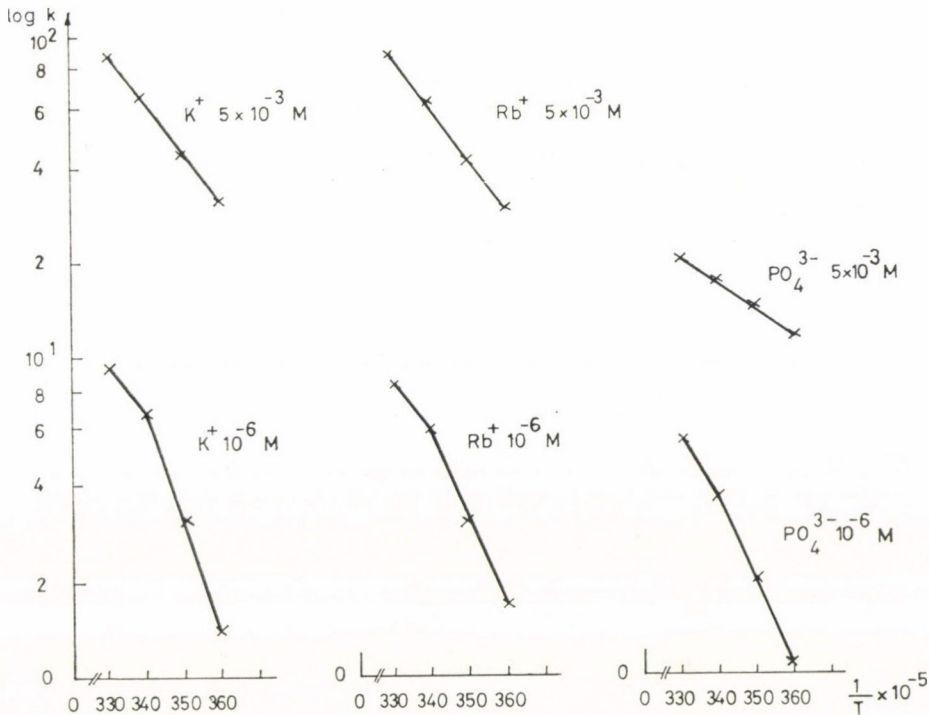
Koncentráció	Hőmérséklet	Látszólagos aktiválási energia cal/Mol		
		Kálium	Rubidium	Foszfát
10 ⁻⁶ Mol	0—20 °C	10 700	9200	9500
	20—30 °C	6 500	6500	7400
5 × 10 ⁻³ Mol	0—30 °C	5 700	6000	2700

Az aktiválási energia alacsony külső koncentrációnál hasonlít az enzimreakciónál [3], és egyes nem elektrolitok katalizált diffúzióval történő felvételénél mért értékekhez [11]. A növényi objektumokból rendelkezésre álló kevés adattal is egyeztethető [1, 21]. A II. rendszer aktiválási energiaértékei mindhárom ionnál hasonlítanak a fizikai folyamatokra jellemző értékekhez. Állat- és növénysejtek vízfelvételénél állapítottak meg hasonló adatokat [15, 29]. A foszfát és az alkáli kationok aktiválási energiaértékei nem azonosak, ami arra utal, hogy a felvételi rendszerek energiaigény szempontjából is különbözők. Biokémiából ismert, hogy egy enzimreakció aktiválási energiája nem a szubsztráttól, hanem az enzimtől függ. Adott enzim különböző szubsztrátok átalakítását azonos aktiválási energiával katalizálja, míg különböző enzimek adott szubsztrát átalakítását eltérő aktiválási energiával valósítják meg.

Az aktiválási energiák hasonlósága jobban megfigyelhető a K és Rb felvételben, de teljes egyezés nem mutatható ki. Az I. rendszerben alacsony hőmérsékleten a gyökér több Rb-t vesz fel, mint K-t, míg magasabb hőmérsékleten több K-t, mint Rb-t.

A II. rendszerben az Arrhenius-függvény lineáris (4. ábra), az aktiválási energia nem változik. Az I. rendszerben az Arrhenius-függvény „görbül”, „törik” magasabb hőmérsékleten. Az anyagcserétől szorosabban függő rendszerben a látszólagos aktiválási energia nem állandó, magasabb hőmérsékleten csökken. Az Arrhenius-grafikon görbülését az irodalomban különbözőképpen

magyarázzák. Mivel az I. rendszerben megállapított látszólagos aktiválási energia értéke hasonlít az enzimreakciók aktiválási energiájához, és számos enzimnél az Arrhenius-grafikon hasonló görbülést mutat az enzimológiai magyarázat lehetőségét nem lehet kizárni az I. rendszerben talált görbülés értelmezésére. Az enzimkinetikai alapokon kidolgozott két paralel- és a két szukcesszív reakcióelmélet közös vonása, hogy egy enzim két aktív centrummal,



4. ábra. A gyökér ionfelvétel Arrhenius-diagramjai különböző felvételi rendszerekben

vagy két különböző enzim nem azonos kémiai aktivitással rendelkezik, hőmérsékletérzékenységük, aktiválási energiájuk is különböző. A nagyobb hőmérsékleti koeficiensú rendszer magasabb hőmérsékleten gyorsabban működik, így magasabb hőmérsékleten az egész folyamatot az alacsonyabb aktiválási energiát igénylő részreakció szabályozza. Magasabb hőmérsékleten tehát alacsonyabb aktiválási energiát mérünk, az Arrhenius-grafikon görbül [3, 13].

Az elméletet növényi sejt transzportfolyamataira vonatkoztatva a plazmalemma, tonoplaszt fluxus-arányainak hőmérsékletfüggése lehet eltérő. Ennek igazolására ismernünk kellene a plazmalemma és a tonoplaszt influx és efflux hőmérsékletfüggését.

Az utóbbi években a hőmérsékleti anomáliákat, az Arrhenius-grafikon görbülését a membrán szerkezetváltozásaival hozzák összefüggésbe [16].

A növényi membránok hőmérséklettől függő szerkezetváltozásaiban szerepe lehet a struktúrához kötött víznek és a membrán foszfolipideknek. A víz és a foszfolipid fázis szerkezetváltozásai okozhatnak funkcióváltozást és törést az Arrhenius-grafikonban a membránhoz erősen kötött enzimeknél különböző organelumokban, vagy a transzport ATPázoknál *in vitro* [2, 28]. A foszfolipidek szerepére utal, hogy a foszfolipázzal kezelt K—Na—ATPáz aktiválási energiája a hőmérséklet függvényében nem változik [25]. Hasonló szerkezetváltozás alapján magyarázhatjuk magasabb szerveződési szinteken is az egyes funkciók hőmérsékleti anomáliáit: levelekben a fitokrómok sötét reakciójának [24], vagy a sztómamozgásnak [23] a hőmérséklet függését, vagy az ún. ionfelvételi anomáliát gyökerekben [32].

Az eredmények alapján az I. II. rendszer lokalizációjáról nem lehet egyértelműen állást foglalni. Ha a TORII—LATIES-hipotézis alapján állunk az Arrhenius-grafikon két különböző egyenese két membrán funkcióját tükrözi. Azt mutatja, hogy a két membrán szerkezete, lipid összetétele, fluiditása feltehetően jelentősen eltér. Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy magas ionkoncentrációnál az ionerősség, az ion foszfolipidek és a víz sajátos kölcsönhatásai okozhatnak megváltozott hőmérsékletérzékenységet ugyanabban a membránban [6, 20, 30, 31].

IRODALOM

1. CARTER, O. G., LATHWELL, D. J.: Effects of temperature on orthophosphate absorption by excised corn roots. *Plant Physiol.* **42**, 1407—1412 (1967).
2. CHARNOCK, J. S., COOK, D. A., CASEY, R.: The role of cations and other factors on the apparent energy of activation of Na-K-ATP-ase. *Arch. Biochem. Biophys.* **147**, 323—329 (1971).
3. DIXON, M., WEBB, E. C.: *Enzymes*. p. 154—158 (1964).
4. EPSTEIN, E.: Dual pattern of ion absorption by plant cells and by plant. *Nature* **212**, 1324—1327 (1966).
5. EPSTEIN, E., HAGEN, C. E.: A kinetic study of the absorption of alkali cations by barley roots. *Plant Physiol.* **27**, 457—474 (1952).
6. EPSTEIN, E., ELZAM, O. E.: Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **53**, 1320—1324 (1963).
7. FISCHER, J. D., HANSEN, D., HODGES, T. K.: Correlation between ion fluxes and ion-stimulated ATP-ase activity of plant roots. *Plant Physiol.* **46**, 812—814 (1970).
8. GERSON, D. F., POOLE, R. J.: Anion absorption by plants. A unary interpretation of "dual mechanisms". *Plant Physiol.* **48**, 509—511 (1971).
9. GINSBURG, H.: Analysis of plant root electropotentials. *J. Theor. Biol.* **37**, 389—412 (1972).
10. HIGINBOTHAM, N.: Transmembrane potentials and ion transport in cells of higher plants. *Biophys. Congr. Baden* 55—62. Ed.: BRODA (1971).
11. HOARE, D. G.: The temperature dependence of the transport of L-leucine in human erythrocytes. *J. Physiol.* **221**, 331—348 (1972).
12. JESCHKE, W. D.: Evidence for a K-stimulated Na efflux at the plasmalemma of barley root cells. *Planta* **94**, 240—245 (1970).
13. JOHNSON, F. H., EYRING, H., POLISSAR, M. J.: *The kinetic basis of molecular biology*. pp. 197—214 (1954).
14. KANNAN, S.: Plasmalemma: The seat of dual mechanisms of ion absorption in *Chlorella pyrenoidosa*. *Science* **173**, 927—929 (1971).
15. KEITH, G., PEDERSON, E. J.: Effect of temperature on water flow through the ciliary epithelium. *Am. J. Physiol.* **222**, 1227—1229 (1972).
16. KUMAMOTO, J., RAISON, J. K., LYONS, J. M.: Temperature "breaks" in Arrhenius plots: a thermodynamic consequence of a phase change. *J. Theor. Biol.* **31**, 47—51 (1971).

17. LINASK, J., LATIES, G. G.: Multiphasic absorption of glucose and 3-o-methyl glucose by aged potato slices. *Plant Physiol.* **51**, 289–295 (1973).
18. NASSERY, H., BAKER, D. A.: Extrusion of sodium ions by barley roots I. *Ann. Bot.* **36**, 881–887 (1972).
19. NEWTON, R. J.: Dual pattern of DL-leucine absorption by duckweed root tips. *Plant Cell Physiol.* **15**, 249–254 (1974).
20. NISSEN, P.: Kinetics of ion uptake in higher plants. *Physiol. Plant.* **28**, 113–120 (1973).
21. OBERLÄNDER, H. E.: Die thermodynamischen Grössen der Aktivierung der Phosphat-ionenaufnahme durch Gerstenwurzeln. *Experientia* **19**, 298–299 (1963).
22. OSMOND, C. B., LATIES, G. G.: Interpretation of the dual isotherm for ion absorption in beet tissue. *Plant Physiol.* **43**, 747–755 (1968).
23. RASCHKE, K.: Temperature dependencies and apparent activation energies of stomatal opening and closing. *Planta* **95**, 1–17 (1970).
24. SCHÄFER, E., SCHMIDT, W.: Temperature dependence of phytochrom dark reactions. *Planta* **116**, 257–266 (1974).
25. TANIGUCHI, K., CHOICHI, J.: The effect of phospholipids on the apparent activation energy of (Na-K)-ATP-ase. *Biochim. Biophys. Acta* **274**, 536–541 (1972).
26. THELLIER, M.: An electrokinetic interpretation of the functioning of biological systems and its application to the study of mineral salts absorption. *Ann. Bot.* **34**, 983–1009 (1970).
27. TORII, K., LATIES, G. G.: Dual mechanisms of ion uptake in relation to vacuolation in corn roots. *Plant Physiol.* **41**, 863–870 (1966).
28. WALLKE, R. J. A., WHEELER, K. P.: Differential effect of temperature on a membrane adenosine triphosphatase and associated phosphatase. *Biochem. J.* **151**, 439–442 (1975).
29. WEIGL, J.: Wasserstruktur und Permeations: Die Aktivierungsenergie und der molekulare Mechanismus der Wasserpermeation. *Z. Naturforsch. B.* **22**, 885–890 (1967).
30. WEIGL, J.: Die Wirkung hoher Salzkonzentration auf die Permeabilität der pflanzlichen Zellmembran. *Z. Naturforsch. B.* **25**, 96–100 (1970).
31. WELCH, R. M., EPSTEIN, E.: The plasmalemma: Seat of the type 2 mechanisms of ion absorption. *Plant Physiol.* **44**, 301–304 (1969).
32. ZSOLDOS, F.: Uptake of rubidium ion different plant exposed to sudden fall in temperature. *Zeitschr. Pflanzenernähr. Bodenk.* **119**, 169–173 (1968).