

DONATO PASTORE^{*,**}, MARIO SOCCIO^{*,**}, ELIDE FORMENTIN^{***},
FIORELLA LO SCHIAVO^{***}

Identificazione di un canale mitocondriale del potassio come possibile strumento per migliorare la resistenza agli stress abiotici in frumento duro

INTRODUZIONE

L'esistenza di un canale mitocondriale del K^+ sensibile all'ATP in specie vegetali è stata dimostrata per via funzionale per la prima volta nel 1999 in frumento duro (Pastore et al., 1999). In analogia con la controparte animale (*Mitochondrial Potassium channel- ATP sensitive*, mitoK_{ATP}, Paucek et al., 1992) questo canale è stato chiamato *Plant Mitochondrial Potassium channel - ATP sensitive* (PmitoK_{ATP}). Il PmitoK_{ATP} catalizza l'uniport elettroforetico del K^+ dall'esterno del mitocondrio verso la matrice, è inibito da ATP e attivato da specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS), (Pastore et al., 1999) (fig. 1). Anche in altre specie vegetali è stata dimostrata l'esistenza di canali mitocondriali del potassio che presentano caratteristiche a volte differenti dal PmitoK_{ATP} (Fratianni et al., 2001; Petrussa et al., 2001, 2008; Ruy et al., 2004; Casolo et al., 2005); questo suggerisce che sia opportuno in genere riferirsi a "canali" per il potassio nei mitocondriali vegetali piuttosto che a una singola entità molecolare (per un confronto tra i diversi canali si veda Pastore et al., 2007). In questo lavoro si farà riferimento al solo PmitoK_{ATP} di frumento duro perché di questo canale è apparsa particolarmente interessante la capacità di essere attivato in frumento duro quando la pianta è soggetta a stress abiotici (osmotico e salino in particolare, Trono et al., 2004); questo, unitamente al modo in cui il canale può profondamente interferire con la bioenergetica mitocondriale, lascia intravedere un possibile interessante target

* Dipartimento di Scienze Agroambientali, Chimica e Difesa Vegetale, Università degli Studi di Foggia

** Centro di Ricerca Interdipartimentale BIOAGROMED, Università degli Studi di Foggia

*** Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Padova

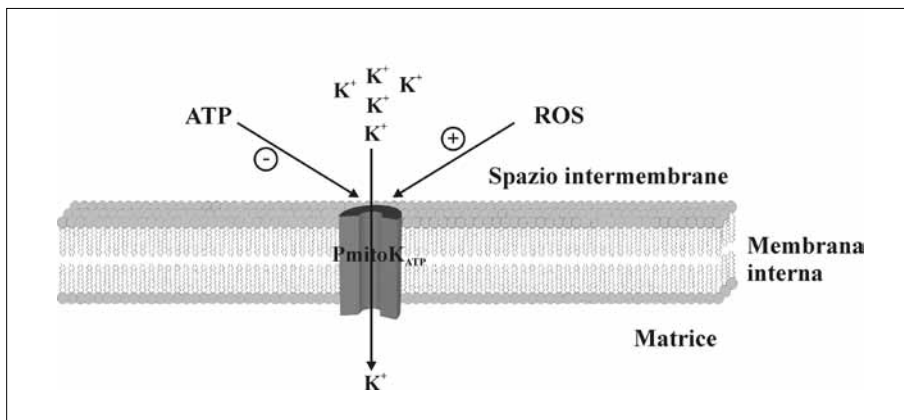


Fig. 1 *Trasporto vettoriale dello ione potassio da parte del canale mitocondriale del K^+ ($PmitoK_{ATP}$) in frumento duro. Sono indicati i compartimenti mitocondriali implicati e la modulazione da ROS e ATP. Per la spiegazione si veda il testo*

molecolare sul quale poter intervenire per aumentare la capacità del frumento duro di resistere ad alcuni stress.

In che modo l'attività del canale può essere connessa alla resistenza agli stress a livello di mitocondrio/cellula/pianta? La risposta a questa domanda passa attraverso i meccanismi di produzione di ROS, altamente reattivi, che portano a uno stress ossidativo, e quindi a un danno cellulare, quando sono prodotte in quantità elevata, come tipicamente avviene in condizioni di stress ambientale (Alsher et al., 1997).

IL NESSO TRA PRODUZIONE DI ROS, STRESS AMBIENTALI E PMITOKATP

I ROS vengono prodotti fisiologicamente dalla cellula durante il normale metabolismo aerobio. I mitocondri sono secondi solo ai cloroplasti in quanto a produzione di ROS e rimangono i principali produttori nei tessuti eziolati. In figura 2 è mostrato in che modo i mitocondri vegetali generano ROS; deve essere notato che il meccanismo è analogo anche per i mitocondri animali, ma date le elevate concentrazioni di ossigeno nelle cellule vegetali, il fenomeno è, in queste, molto più accentuato. Nella figura 2 è schematizzata la membrana interna di un mitocondrio vegetale. Come si può vedere, oltre ai complessi I-IV, i mitocondri vegetali possiedono quattro NAD(P)H deidrogenasi rotenone insensibili, due localizzate sul lato esterno NAD(P)H DH_{ext} e due sul lato interno NAD(P)H DH_{int} della membrana mitocondriale in-

terna; due sono specifiche per il NADH e due per il NADPH. È presente, inoltre, l'ossidasi alternativa (*Alternative Oxidase*, AOX).

Nella figura, il flusso degli equivalenti di riduzione attraverso i complessi della catena respiratoria è indicato unitamente all'espulsione di protoni nello spazio intermembrane da parte dei complessi I, UQ/III e IV. Si genera, così, un gradiente protonico elettrochimico trans membrana, o forza proton motrice ($\Delta\mu_{H^+}/ZF$) che consiste di due componenti: il gradiente elettrico ($\Delta\Psi$), che nei mitocondri vegetali è la principale componente (Douce et al., 1987), e il gradiente protonico (ΔpH). Il rientro dei protoni attraverso l'ATPasi (fig. 2A) porta alla sintesi di ATP. In queste condizioni si assiste anche a una produzione basale di ROS sotto forma di anione superossido ($O_2^{\cdot-}$) da parte del complesso I e del UQ/complesso III. A questo livello, infatti, singoli elettroni sfuggono da alcuni particolari trasportatori della catena respiratoria, che realizzano così delle cessioni mono elettroniche direttamente all'ossigeno molecolare. Si ritiene che il citocromo c possa anch'esso generare ROS sotto forma di ossigeno singoletto (1O_2).

In condizioni di stress ambientale (fig. 2B) la forza proton motrice non viene adeguatamente utilizzata dal mitocondrio. Per esempio gli stress iperosmotici causano una diminuzione della velocità sintesi di ATP in mitocondri di frumento duro (Flagella et al., 2006 e referenze all'interno). Ciò determina un aumento del $\Delta\Psi$ associato a un eccessivo livello di riduzione dei trasportatori di elettroni, che si traduce in un aumento del processo di autossidazione con l'ossigeno molecolare descritto in precedenza, con conseguente formazione di $O_2^{\cdot-}$ su larga scala. In mitocondri di frumento duro purificati da plantule sottoposte a stress osmotico o salino è stato misurato un aumento di almeno due volte della produzione di $O_2^{\cdot-}$ (Trono et al., 2004). Dall'azione della superossido dismutasi sull' $O_2^{\cdot-}$ deriva poi l'acqua ossigenata (H_2O_2) e da questa, mediante la reazione di Fenton, il radicale ossidrilico ($\cdot OH$), specie fortemente ossidante e reattiva. Questi sono i ROS principalmente responsabili dell'instaurarsi dello stress di tipo ossidativo a livello cellulare.

L'eccesso di ROS è estremamente pericoloso per la cellula a causa dei pesanti danni che questi possono arrecare a macromolecole biologicamente importanti come lipidi, acidi nucleici e proteine. Per contrastare l'azione negativa dei ROS, i mitocondri vegetali possono mettere in atto diversi meccanismi di difesa. Oltre ai sistemi enzimatici di detossificazione dei ROS e di riparazione delle molecole modificate (Møller, 2001), i mitocondri possiedono i cosiddetti sistemi di dissipazione dell'energia, che rappresentano la prima linea di difesa contro i ROS perché evitano la loro formazione. Si tratta di proteine localizzate a livello della membrana mitocondriale interna:

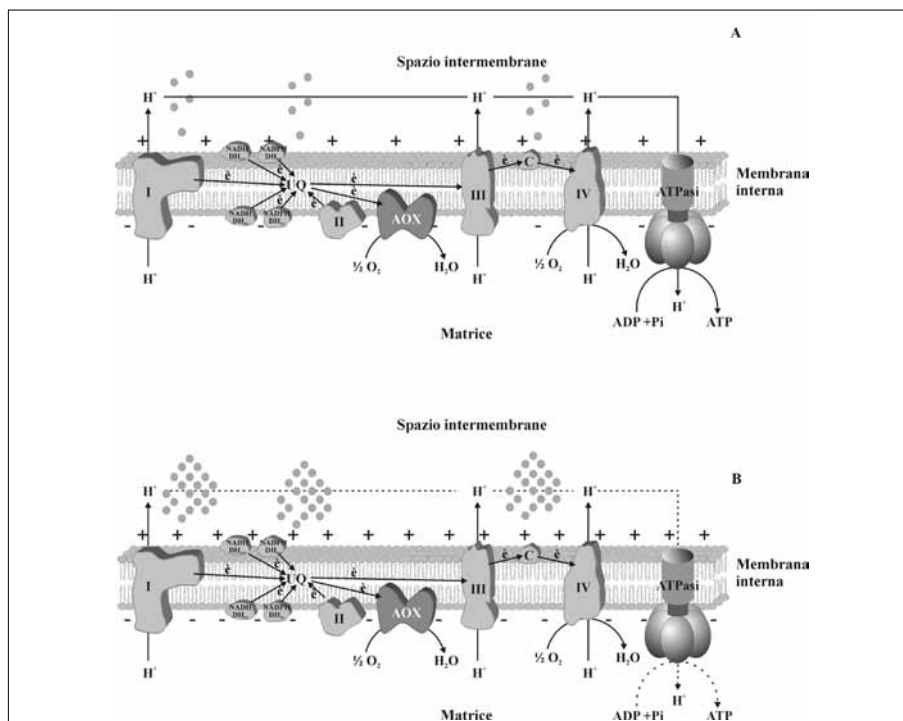


Fig. 2 Produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) da parte di mitocondri vegetali in condizioni basali (A) e in condizioni di stress ambientale (B). Abbreviazioni: UQ, ubiquinone; C, citocromo c; e^- , elettroni o equivalenti di riduzione. Per la spiegazione si veda il testo

l'AOX (Meeuse, 1975; Møller, 2001 e referenze all'interno), la proteina di disaccoppiamento (*Plant Uncoupling Protein*, PUCP) (Vercesi et al., 1995) e, ora sappiamo, anche il $PmitoK_{ATP}$.

Il funzionamento di AOX e PUCP, sebbene con meccanismi differenti e in gran parte noti (Møller, 2001) determina un abbassamento del $\Delta\Psi$ e, conseguentemente, della produzione di ROS. In accordo con questo esiste una vasta letteratura che associa un'aumentata attività della AOX e della PUCP con l'aumento della resistenza agli stress ambientali (Pastore et al., 2007 e referenze all'interno); prime evidenze in questo senso sono disponibili anche per il frumento duro (Pastore et al., 2001; Trono et al., 2006).

Anche il $PmitoK_{ATP}$ riesce ad abbattere il $\Delta\Psi$ e controllare la produzione mitocondriale di ROS (Pastore et al., 1999; Trono et al., 2004). In figura 3 è illustrato il meccanismo alla base di questo fenomeno. È noto che i mitocondri vegetali possiedono un antiporter H^+/K^+ , particolarmente attivo (Diolez e Moreau, 1985), pertanto la cooperazione tra il $PmitoK_{ATP}$ e lo scambiatore

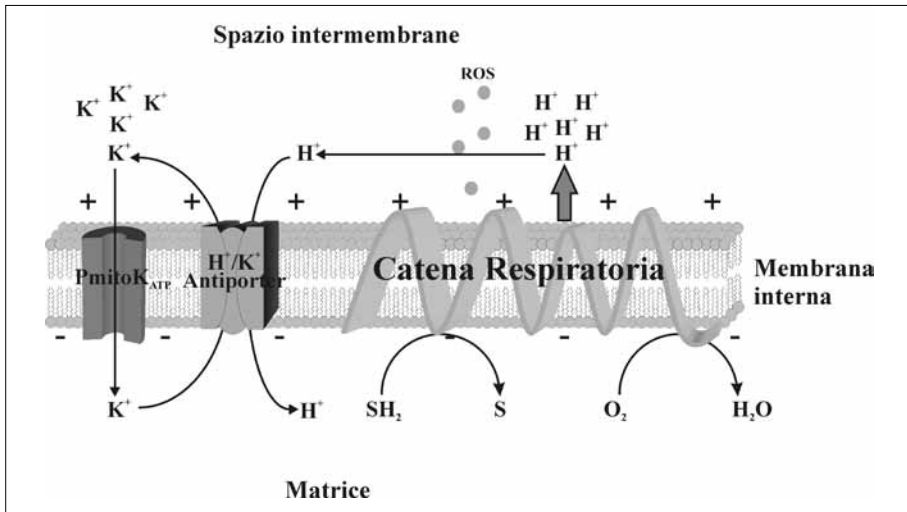


Fig. 3 *Ciclo del potassio e controllo dei ROS in mitocondri vegetali. Abbreviazioni: SH_2 , substrati ridotti; S, substrati ossidati. Per la spiegazione si veda il testo*

può dare origine a un ciclo del K^+ che, consentendo il rientro degli H^+ nella matrice, è in grado di disaccoppiare i mitocondri. Se nei mitocondri animali la bassa attività del ciclo del K^+ rende l'entità di questo disaccoppiamento trascurabile (Garlid e Paucek, 2003), nei mitocondri di frumento duro il ciclo del K^+ è così attivo da poter abbattere completamente il $\Delta\Psi$ (Pastore et al., 1999).

Quindi il canale è attivato da ROS come riportato inizialmente (fig. 1), ma è anche in grado di controllare la produzione di ROS, con una inibizione rapida e molto efficace (fino a venti volte, dati non pubblicati).

Questi risultati sono in accordo con l'ipotetico meccanismo di attivazione del $PmitoK_{ATP}$ riportato nella figura 4. In condizioni controllo l'inibizione da parte dell'ATP prevale sull'attivazione da ROS impedendo al canale di funzionare (fig. 4A). In condizioni di stress, invece, l'aumento della produzione di ROS (Trono et al., 2004) e la diminuzione della sintesi di ATP (Flagella et al., 2006) porta a un cambiamento nel bilanciamento dei modulatori; i ROS, quindi attivano il $PmitoK_{ATP}$ che, di conseguenza, dissipa il $\Delta\Psi$ portando a una riduzione della produzione mitocondriale di ROS su larga scala attraverso un meccanismo a *feed back* (fig. 4B).

È ragionevole pensare, quindi, che il $PmitoK_{ATP}$ che è rapidamente attivato dai ROS, possa servire come meccanismo di difesa della cellula/pianta contro gli stress. Questa ipotesi è stata dimostrata in cellule di patata in coltura (Fratianni et al., 2001) e, come già riportato, in plantule eziolate di frumento duro sottoposte a stress iperosmotico (Trono et al., 2004).

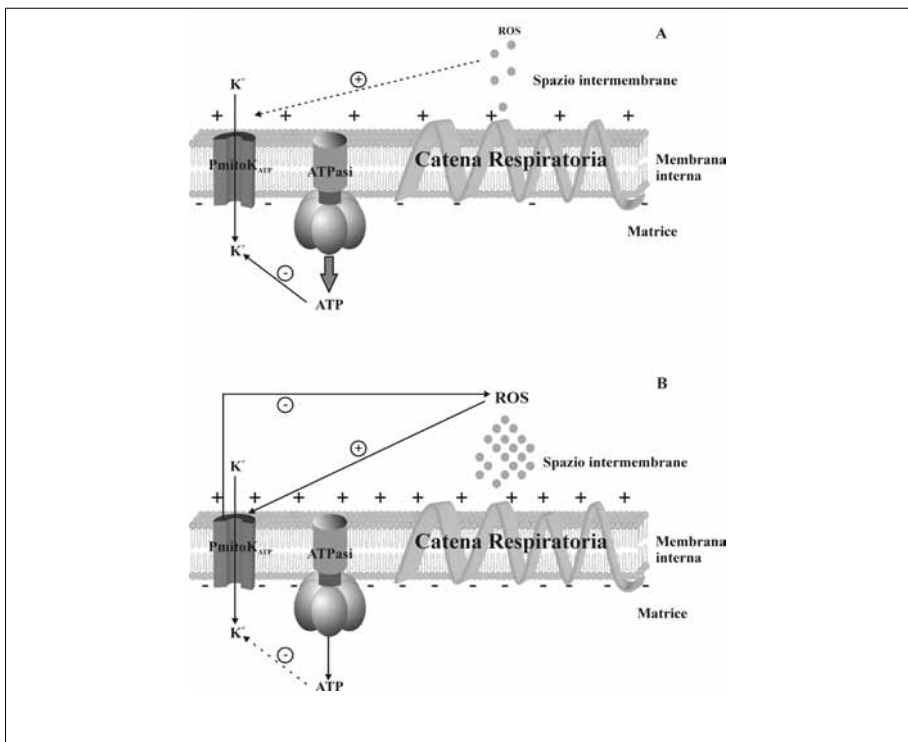


Fig. 4 Meccanismo di attivazione del $PmitoK_{ATP}$ in mitocondri di plantule eziolate di frumento duro basato sulla modulazione da ROS e ATP. Per la spiegazione si veda il testo

È interessante notare che in condizioni di stress severo, che causano danni significativi sia all'integrità sia alla funzionalità dei mitocondri (Trono et al., 2004; Flagella et al., 2006), il $PmitoK_{ATP}$ risulta ancora più attivato piuttosto che inibito. Questo dato suggerisce che la proteina può resistere in condizioni di stress elevato e che risulta coinvolta nella risposta prolungata allo stress.

LE POSSIBILI “CONTROINDICAZIONI” BIOENERGETICHE - EFFETTO DEL CANALE SUI TRASPORTI MITOCONDRIALI E SULLA SINTESI DI ATP

Appare evidente che l'abbattimento del $\Delta\Psi$ ottenuto mediante attivazione del $PmitoK_{ATP}$ è utile a contrastare il danno ossidativo causato dai ROS, ma può fortemente interferire con gli altri processi mitocondriali dipendenti dal $\Delta\Psi$ stesso, tra cui il trasporto transmembrana di metaboliti (anioni) rilevanti

per il metabolismo del mitocondrio e la sintesi di ATP mediante il processo di fosforilazione ossidativa. È legittimo, pertanto, chiedersi se il $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ non aiuti la cellula per un verso, ma al contempo non la danneggi rendendo inutilizzabili i mitocondri per due loro funzioni fondamentali. È indispensabile dare risposta a questa domanda prima di ipotizzare ogni possibile risvolto applicativo degli studi sul $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$, per esempio, prima di ipotizzare una strategia di miglioramento genetico, convenzionale o non, teso a ottenere un aumento dell'attività del canale.

Le nostre conoscenze più recenti, però, incoraggiano fortemente in questo senso. Relativamente ai trasporti a livello della membrana mitocondriale interna, è stata riportata l'esistenza, in frumento duro, di un canale degli anioni (*Plant Inner Membrane Anion Channel*, PIMAC) (Laus et al., 2008). Questo canale è inibito da ATP e da un elevato $\Delta\Psi$ e svolge un ruolo fondamentale nel mediare il flusso di anioni metabolicamente rilevanti tra mitocondrio e citosol.

L'inibizione da ATP e la modulazione da potenziale elettrico dell'attività del PIMAC suggeriscono che il PIMAC possa funzionare essenzialmente quando il mitocondrio presenta un basso $\Delta\Psi$. In condizioni di elevato $\Delta\Psi$,

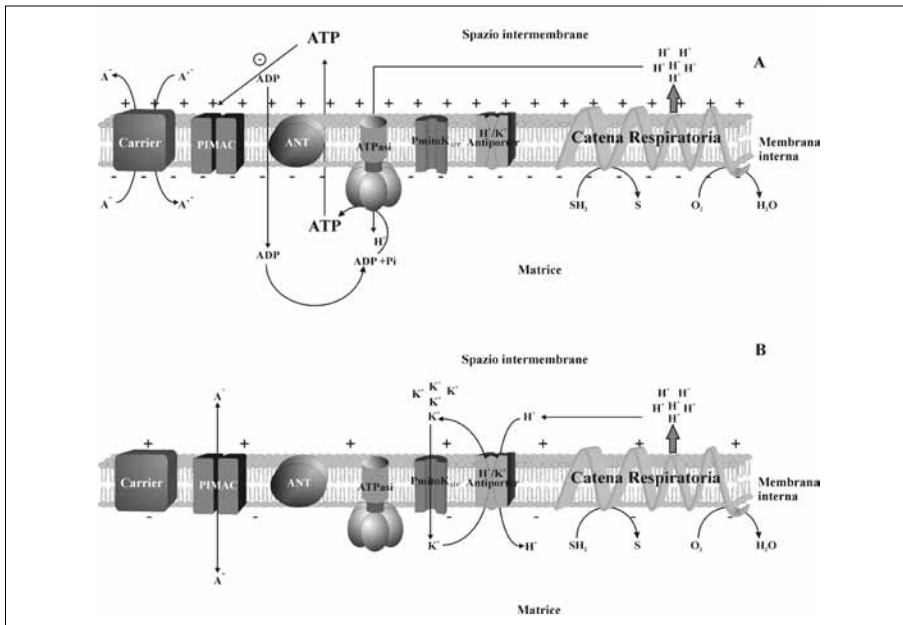


Fig. 5 Meccanismo di trasporto degli anioni in condizioni normali (A) e di de-energizzazione (B) in mitocondri di frumento duro. Abbreviazioni: SH_2 , substrati ridotti; S, substrati ossidati; ANT, scambiatore ATP/ADP. Per la spiegazione si veda il testo

infatti, è elevata anche la sintesi di ATP per cui, mentre il $\Delta\Psi$ ostacola l'ingresso di anioni attraverso il PIMAC, l'ATP può inibirne l'uscita (fig. 5A). Poiché il PIMAC trasporta in modo molto efficiente fosfato, dicarbossilati, chetodicarbossilati e tricarbossilati, ci si deve attendere che esso possa rappresentare il meccanismo privilegiato di trasporto di questi anioni in condizioni in cui il mitocondrio è depolarizzato dall'azione del $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ (fig. 5B).

Relativamente all'effetto dell'attività del $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ sulla sintesi di ATP mediante il processo di fosforilazione ossidativa è stato valutato l'effetto del KCl sul $\Delta\Psi$ e sulla sintesi di ATP in mitocondri di frumento duro che ossidano succinato. Inaspettatamente, i mitocondri di frumento duro trattati con KCl, nonostante mostrassero un bassissimo valore di $\Delta\Psi$, mostravano un buon controllo respiratorio e un buon rapporto ADP/O (due parametri dell'efficienza del processo di fosforilazione ossidativa) e sintetizzavano ATP alla stessa velocità dei mitocondri controllo (lavoro in preparazione). Questo risultato è unico in letteratura. Alcuni esperimenti suggeriscono l'esistenza di una forza proton-motrice latente, non direttamente misurabile in maniera classica, generata dalla proprietà del $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ di essere inibito da ATP. In pratica, l'inibizione del canale eserciterebbe un freno tale da consentire che una quota di protoni non sia utilizzata dal ciclo del potassio descritto in figura 3, ma resti a disposizione dell'ATP sintasi per la sintesi dell'ATP.

IPOTESI SULLA NATURA MOLECOLARE DEL $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$

Alla luce di quanto riportato, l'abbattimento della forza proton-motrice indotto dal $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ è in grado di controllare l'extra-produzione di ROS da parte dei mitocondri soggetti a stress, così proteggendo la cellula, senza al contempo compromettere, almeno inizialmente, la bioenergetica cellulare. Questa indicazione rende il $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ estremamente interessante per il miglioramento genetico del frumento duro per resistenza agli stress ambientali; probabilmente è più interessante dell'AOX e della PUCP, che sono anche in grado di prevenire la sovra-produzione di ROS, ma nel far questo possono incidere anche fortemente sulla resa energetica del mitocondrio inibendo la sintesi di ATP.

Sfortunatamente a oggi non è ancora nota la natura molecolare del $\text{PmitoK}_{\text{ATP}}$ e addirittura non è nota neanche quella della sua controparte animale, umana in particolare, sulla quale pure esiste una importante letteratura per il suo coinvolgimento nei meccanismi di difesa, a livello del cuore e del cervello,

dai danni da riperfusione post ischemica. A oggi sono disponibili solo ipotesi e la proteina resta particolarmente elusiva.

POSSIBILI STRUTTURE MOLECOLARI DEL CANALE MITOCONDRIALE DEL K^+ IN MAMMIFERI E VEGETALI

La presenza di un canale del K^+ in mitocondri di mammifero è nota dal 1991 (Inoue et al., 1991), ma, al momento, le informazioni sulla sua struttura e identità molecolare sono piuttosto controverse. Tre diversi gruppi sono giunti a tre diverse proposte. Il gruppo di Garlid ha purificato da fegato di ratto, cuore di bue (Paucek et al., 1992) e cervello di ratto (Bajgar et al., 2001) un canale mitocondriale del K^+ definito $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$, che, al pari del K_{ATP} del pla-

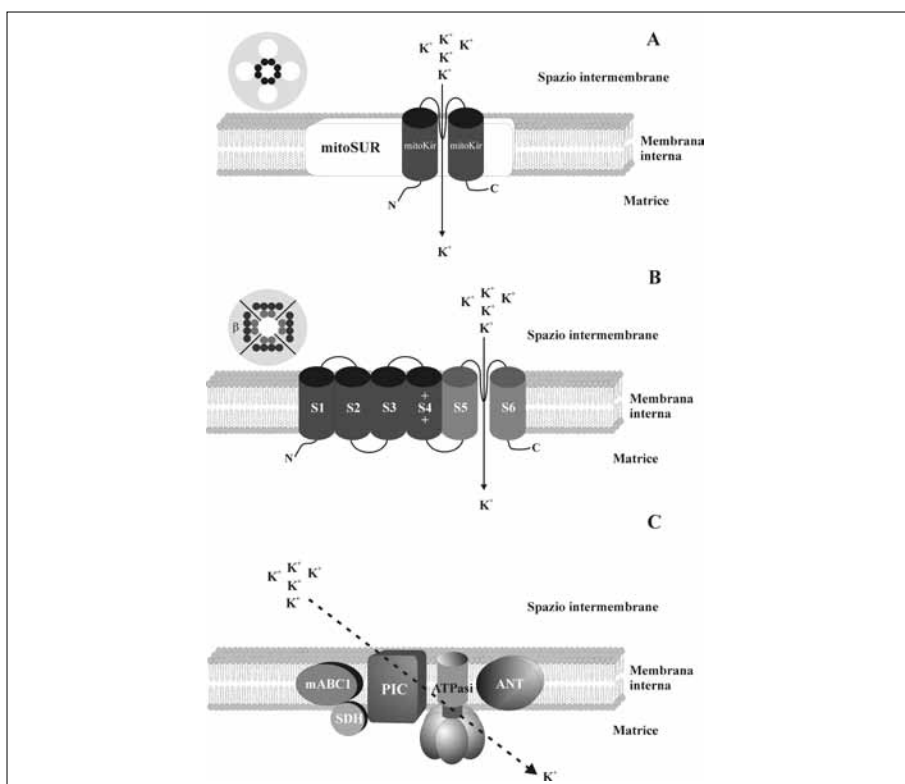


Fig. 6 Strutture proposte per il/i canale/i mitocondriale/i del K^+ nei mammiferi. Abbreviazioni: S, segmenti transmembrana; mABC1; proteina mitocondriale 1 con cassetta di legame per l'ATP; PIC; carrier del fosfato; ANT; carrier degli adenin nucleotidi, SDH, succinato deidrogenasi. Per la spiegazione si veda il testo

smalemma, sembra essere costituito da un complesso eteromultimerico di 4 subunità di 55 kDa del tipo Kir (2TMD/1P, cioè 2 domini transmembrana e 1 Poro) (mitoKir) e da 4 recettori per la sulfonilurea (SUR) di 63 kDa (mitoSUR) (fig. 6A, Grover e Garlid, 2000; Mironova et al., 2004; Carreira et al., 2005). Szabò e collaboratori, invece, hanno dimostrato nella membrana mitocondriale interna di linfociti T (Szabò et al., 2005) e di una linea cellulare umana di tumore del colon (De Marchi et al., 2009) la localizzazione di un canale del tipo Kv e K_{Ca} , rispettivamente, cioè di canali del tipo 6TMD/1P (fig. 6B), da sempre ritenuto presente esclusivamente nella membrana plasmatica. Ardehali et al. (2004) hanno riportato attività di tipo mitoK_{ATP} in una frazione della membrana mitocondriale interna, altamente purificata e ricostituita in liposomi, contenente 5 differenti proteine mitocondriali [la proteina mitocondriale 1 con cassetta di legame per l'ATP (mABC1), il carrier del fosfato (PIC), il carrier degli adenin nucleotidi (ANT), l'ATPasi e la succinato deidrogenasi (SDH)], ma, apparentemente, non contenente nessuna subunità di tipo Kir (fig. 6C).

Le tre diverse situazioni descritte non sono necessariamente in antitesi tra di loro e potrebbero essere tutte corrette, descrivendo così una situazione in cui diverse proteine, presenti contemporaneamente, sono attive nel trasporto del K⁺.

A oggi quasi nulla è noto riguardo all'identità molecolare del/i canale/i del K⁺ nei mitocondri vegetali: in una comunicazione a congresso è stata riportata una prima purificazione di un canale tipo mitoK_{ATP} da patata (Paucek et al., 2002) con subunità di tipo Kir e subunità regolatrici di tipo SUR, ma la comunicazione non è stata seguita da una pubblicazione vera e propria. Deve però essere sottolineato che nel genoma di *Arabidopsis* e riso non esistono geni per veri e propri canali di tipo Kir, ma al limite di tipo Kir-like. Mediante studi di proteomica, inoltre, in mitocondri di riso è stata suggerita l'esistenza di una subunità regolatrice di tipo β (Tanaka et al., 2004), che suggerirebbe la possibile esistenza di canali tipo Kv. Le uniche informazioni nei vegetali riguardano al momento canali del potassio non mitocondriali, in parte riassunte nel paragrafo che segue.

CANALI DEL K⁺ NELLE PIANTE

Nelle piante l'identificazione di geni per i canali del K⁺ è ancora all'inizio; al momento il maggior numero di informazioni riguarda *Arabidopsis thaliana*. I canali del K⁺ individuati in questa specie appartengono a tre distinte famiglie:

quella dei canali 6TMD/1P di tipo shaker, quella dei canali 4TMD/2P (Tandem-Pore K⁺ Channel, TPK) e quella dei canali Kir-like, rappresentati dal solo KCO3 (Mäser et al., 2001; Lebaudy et al., 2007). La prima famiglia, che comprende nove geni omologhi dei geni Kv tipo Shaker dei mammiferi, è a sua volta suddivisa in due subfamiglie: alla prima appartengono i geni AKTs e KATs, che codificano per canali *inward rectifying*; la seconda include i geni SKOR e GORK codificanti per canali *outward rectifying*. Alla famiglia 4TMD/2P appartengono cinque geni (TPKs) che codificano per canali a due pori *outward rectifying* (Mäser et al., 2001; Chérel, 2004; Lebaudy et al., 2007). In carota è stato isolato e caratterizzato il primo canale del K⁺ (KDC1) espresso nelle fasi precoci dell'embriogenesi somatica (Downey et al., 2000; Costa et al., 2004); successivamente è stato identificato un canale del K⁺ (DKT1) espresso in fasi tardive del processo embriogenico (Formentin et al., 2004).

Al pari dei mammiferi, anche nelle piante i canali del K⁺ mostrano un'elevata diversità funzionale, che deriva dall'esistenza di numerosi geni, dalla possibilità di assemblare subunità identiche o correlate, dall'associazione con subunità regolatrici, da modificazioni post-traduzionali, da differenti livelli di espressione dei geni e da espressione tessuto-specifica (Cao et al., 1995).

DALLA FUNZIONE ALLA PROTEINA — STRATEGIE PER L'IDENTIFICAZIONE DEL PMITOK_{ATP}

L'identificazione a livello molecolare del canale del potassio mitocondriale individuato in grano duro (PmitoK_{ATP}) si è basata sul confronto con il suo omologo animale. Nei mammiferi, come si è detto, è però ancora dubbia la composizione di tale canale. Una delle ipotesi è che il mitoK_{ATP} sia strutturalmente simile al K_{ATP} presente nella membrana plasmatica, un complesso costituito da due proteine: il recettore della sulfonilurea SUR (~160 kDa), un membro della famiglia di trasportatori ABC (ATP-binding cassette), e una proteina più piccola (~40 kDa), Kir6.1 o Kir6.2, appartenente alla famiglia dei canali del potassio *inward rectifying*. Quattro subunità Kir6.x si assemblano a formare un poro selettivo per il potassio, associato a quattro subunità SUR (Moreau et al., 2005). La struttura secondaria delle subunità costituenti i canali Kir6.x è costituita di due domini transmembrana (TMD) e una regione del poro (P), appartenendo così alla categoria di subunità alfa di canali del potassio 2TMD/1P.

L'analisi bioinformatica mediante Blastx (Altschul et al., 1990) sui genomi vegetali fino a oggi sequenziati non ha dato risultati: non esistono

canali simili ai Kir animali nelle piante. Questi canali, molto simili ai canali del potassio batterici, sono evidentemente stati persi nel corso dell'evoluzione. Nell'alga *Chlamydomonas reinhardtii*, infatti, è presente un membro appartenente a questa famiglia suggerendo che il gene sia stato perso nella separazione tra clorofite e spermatofite. Questo non significa che la funzione sia andata perduta, infatti, abbiamo prova dell'esistenza del PmitoK_{ATP} in molte piante (Pastore et al., 1999, 2007). Molto probabilmente un'altra proteina o un complesso proteico sopperiscono alla stessa funzione. Questa nuova proteina potrebbe o derivare dalla fusione del dominio funzionale per il trasporto del potassio con altri domini che negli animali costituiscono le subunità regolatrici del canale, oppure essere una proteina diversa, ma

TIPO DI CANALE	MODELLO GENICO AL TAIR ^a	NOME DELLA PROTEINA	LOCALIZZAZIONE* (BIOINFORMATICA)	DIMENSIONE (AA)	BIBLIOGRAFIA
Shaker inward-rectifier (1P/6TM)	At5g46240	KAT1	PM (secr>mito)	677	Anderson et al., 1992; Szyroki et al., 2001; Mura et al., 2004
	At4g18290	KAT2	PM (mito=secr)	697	Pilot et al., 2001
	At4g32650.1	KAT3	PM** (chl>mito>secr)	662	Reintanz et al., 2002;
	At4g32650.2***		idem	597	Duby et al., 2008
	At4g22200	AKT2/3	PM (secr)	802	Latz et al., 2007
	At2g26650	AKT1	PM (secr>chl=mito)	857	Sentenac et al., 1992;
	At4g32500	AKT5	(secr)	880	Geiger et al., 2009
Shaker outward-rectifier (6TMD/1P)	At3g02850	SKOR	PM (secr)	828	Gaymard et al., 1998
	At5g37500	GORK	PM (mito=secr)	820	Ache et al., 2000; Hosy et al., 2003
Tandem-pore (4TMD/2P)	At5g55630	TPK1	T (chl>>secr)	363	Czempinski et al., 2001; Gobert et al., 2007
	At5g46370	TPK2	(chl>secr)	443	Voelker et al., 2006
	At4g18160	TPK3	(chl>secr)	436	Voelker et al., 2006
	At1g02510	TPK4	PM (secr>>chl)	284	Becker et al., 2004
	At4g01840	TPK5	(chloroplast)	408	Voelker et al., 2006
	At5g46360	KCO3	T (secr=mito>chl)	260	Voelker et al., 2006

^awww.arabidopsis.org; *dimostrata sperimentalmente; **è una subunità regolatrice che è in grado di localizzarsi in membrana solo con determinate altre subunità (ad es. KAT1 e AKT1); ***forma alternativa del trascritto.

Tab. 1 Lista di canali del potassio di *Arabidopsis thaliana*

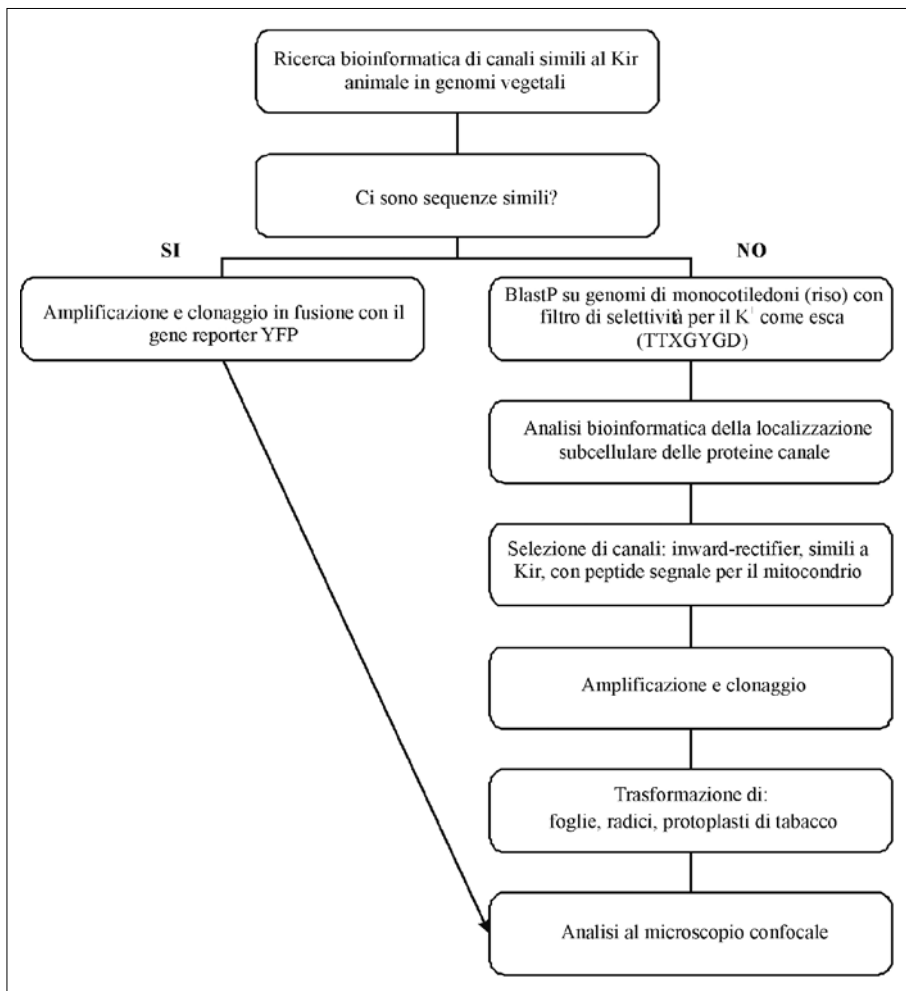
con funzione simile. Poiché non conosciamo la risposta, abbiamo pensato di individuare tutti i putativi canali del potassio presenti nelle monocotiledoni. In *Triticum aestivum* è stato studiato un solo canale TaAKT1, in mais invece ne sono stati studiati quattro, mentre in riso solo due. Tutti questi canali sono del tipo Shaker *inward rectifying* (6TMD/1P), voltaggio-dipendenti e altamente selettivi per il potassio, ma con localizzazione a livello della membrana plasmatica. Nella pianta modello *Arabidopsis thaliana*, come si è detto, sono stati individuati nove geni codificanti per canali al potassio del tipo Shaker, sei geni codificanti canali tandem-pore (4TMD/2P) (vedi tab. 1) in più sono stati individuati almeno venti geni codificanti per canali debolmente selettivi per il potassio del tipo *Cyclic Nucleotide Gated Channels*, CNGC. Questi ultimi sono stati poco considerati in questa analisi in quanto non altamente selettivi.

Nonostante gli studi su questi canali siano cominciati più di un decennio fa, nessuno finora è stato localizzato a livello del mitocondrio.

I canali della famiglia tandem-pore sono i più simili strutturalmente ai canali Kir animali in quanto presentano un dominio ripetuto in tandem costituito da due regioni transmembrana e una regione del poro, i due canali attualmente caratterizzati (TPK1 e TPK4) non mostrano voltaggio-dipendenza e sono localizzati nel tonoplasto e nella membrana plasmatica rispettivamente.

STRATEGIA DI ISOLAMENTO DEL GENE/PROTEINA BASATA SU GENI CANDIDATI

A causa degli scarsi dati presenti nei database sui canali di monocotiledoni, abbiamo pensato di sfruttare il genoma sequenziato di riso per cercare tutti i canali selettivi per il potassio e studiarne la localizzazione subcellulare in un sistema eterologo come il tabacco (vedi schema 1). L'analisi è stata effettuata mediante BlastP (Altschul et al., 1990), utilizzando la sequenza consenso del filtro di selettività per il potassio (TTXGYGD) come "esca". Sono state così identificate alcune sequenze che codificano per putativi canali del potassio (tab. 2). Quindi, utilizzando appositi programmi disponibili in rete per la predizione della localizzazione subcellulare, quali Predotar e Mitopred, è stato individuato un canale Shaker-like *inward rectifying* (Aramemnon Os01g45990, GenBank AK120308) con un putativo peptide segnale per il mitocondrio (punteggio 22,3 contro 5,3 per la predizione per la via secretoria). Dal momento che non sempre è necessario un segnale per traghettare una proteina al mitocondrio, si è deciso di estendere comunque lo studio



Schema 1 *Schema della strategia di isolamento di canali mitocondriali in riso*

della localizzazione subcellulare a tutti i canali isolati. Come si può vedere in tabella 2 sono stati scartati alcuni canali, o perché la sequenza sembrava incompleta, o perché *outward rectifying* (canali Shaker presenti solo nelle piante). È stato invece tenuto in considerazione un canale del tipo CNGC in quanto presentava 5 varianti di *splicing* e una di queste aveva una predizione di localizzazione mitocondriale (punteggio 4,5 contro 0,0 per via secretoria e cloroplasto) e una dimensione paragonabile al Kir animale (ca. 56,4 kDa), rispetto ad alcuni Shaker, ben più grandi.

TIPO DI CANALE	CDNA ID	ARAMEMNON ^a ID	ARABIDOPSIS MIGLIOR RISULTATO	LOCALIZZAZIONE (SOLO BIOINFORMATICA)	DIMENSIONE (AA)	BIBLIOGRAFIA
Shaker inward-rectifier (1P/6TM)	AK065938	Os01g11250	KAT1-like	weak secr	568	-
	AK100739	Os01g55200	KAT1-like	weak secr	502	Obata et al., 2007
	AK120308	Os01g45990	AKT1-like	mito	935	Fuchs et al., 2005
	AK061594	Os05g35410	AKT2/3-like	weak secr	703	-
	AK100808	Os02g14840	KAT1-like	secr	718	-
		Os06g14310	KAT3/AtKC1-like	mito/secr	591	-
		Os04g02720	KAT3-like	mito/secr	368	-
		Os01g52070	KAT3-like	weak mito/secr	593	-
Tandem-pore (2P/4TM)		Os07g01810	TPK1-like	weak mito/secr	349	-
		Os03g54100	TPK1-like	weak secr	347	-
CNGC		Os09g38580	CNGC-like	weak mito splicing n.3 (450aa)	5 splicing variants	-
Canali non considerati		Os04g36740	SKOR-like	n.d.	722	-
		Os06g14030	SKOR-like	n.d.	858	-
		Os07g07910	AKT5-like	chl	891	-
		Os03g28120	KAT1-like	incompleto	156	-

^aAramemnon.botanik.uni-koeln.de

Tab. 2 Lista di canali del potassio di *Oryza sativa* (cv Japonica)

Le sequenze codificanti così selezionate sono state quindi sottoposte ad amplificazione con specifici oligonucleotidi sintetici per poter essere successivamente inserite nel vettore binario pGreen0029 (Hellens et al., 2000) in fusione con il gene reporter YFP (*Yellow Fluorescent Protein*). La fusione è stata fatta al C-terminale della proteina in esame per non mascherare l'eventuale peptide segnale N-terminale.

- Una volta ottenuti, i costrutti sono stati amplificati in *E. coli* e in seguito:
- purificati e utilizzati per la trasformazione transiente di protoplasti (PPS) di mesofillo di tabacco mediata da polietilenglicole (PEG) 4000. I PPS trasformati sono stati osservati al microscopio confocale dopo 16-24 ore di incubazione a 18-23°C al buio (Hosy et al., 2005).
 - inseriti nel ceppo di *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 ingegnerizzato con il plasmide helper pSoup (Vain et al., 2003), che permette il trasferimento del T-DNA contenuto nel vettore pGreen, per il protocollo di agroinfiltrazione. Foglie ottenute da piante dopo quattro settimane dalla semina sono state trasformate utilizzando una concentrazione batterica di

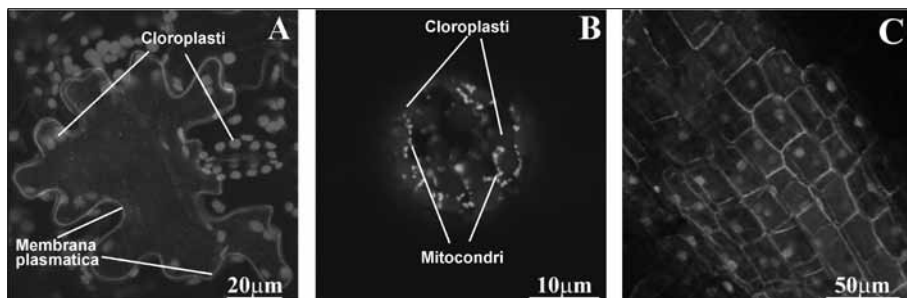


Fig. 7 Osservazione al microscopio confocale dei marcatori di controllo. A) la fluorescenza è localizzata a livello della membrana plasmatica di una cellula epidermica di una foglia di tabacco agroinfiltrata, è mostrata anche l'autofluorescenza dei cloroplasti; B) la fluorescenza è localizzata a livello dei mitocondri in protoplasti di mesofillo di tabacco trasformati transientemente; anche in questo caso è mostrata anche l'autofluorescenza dei cloroplasti; C) la fluorescenza è diffusa nel citoplasma e nel nucleoplasma di cellule di radice trasformata. Per la spiegazione si veda il testo

$OD_{600}=1$. Dal secondo giorno dopo l'agroinfiltrazione i campioni sono stati osservati al microscopio confocale (Zottini et al., 2008).

- Inseriti in *Agrobacterium rhizogenes* in co-trasformazione con il plasmide helper pSoup. Espianti fogliari di piante di tabacco di quattro settimane sono stati usati per la trasformazione e per l'ottenimento di radici transgeniche. Il protocollo prevedeva in questo caso la co-coltivazione degli espianti con il batterio ingegnerizzato e la successiva crescita in terreno selettivo fino all'ottenimento delle radici (Chen et al., 2007).

Per la messa a punto del protocollo sono stati utilizzati costrutti di controllo disegnati nel vettore pGreen0029 (Hellens et al., 2000) ed esprimenti: i) la proteina di fusione KDC2::YFP (Formentin et al., 2006), come marcatore per la membrana plasmatica (fig. 7A); ii) la proteina YFP con il peptide segnale N-terminale della subunità beta della ATPase mitocondriale, come marcatore del mitocondrio (fig. 7B); iii) la forma solubile della YFP per marcare il citoplasma (fig. 7C).

PRIMI ESPERIMENTI DI LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DEI PRODOTTI GENICI ANALIZZATI

Risultati preliminari hanno indicato come il sistema migliore per lo studio siano le foglie di tabacco agroinfiltrate, dove infatti è stata ottenuta un'ottima efficienza di trasformazione. Mentre i protoplasti si sono rivelati poco infor-

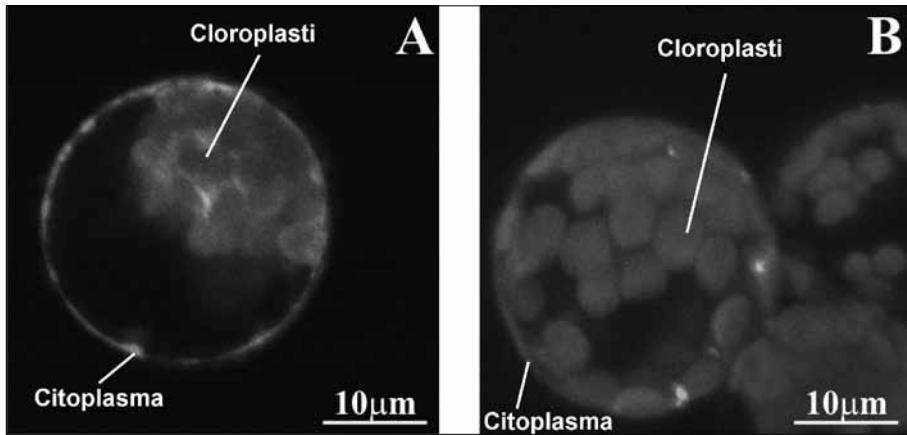


Fig. 8 Localizzazione subcellulare della subunità beta di riso in protoplasti di mesofillo di tabacco (PPS). A) PPS trasformati esprimenti la proteina di fusione KOB1::GFP. La fluorescenza è localizzata intorno ai cloroplasti e alla periferia della cellula. B) PPS trasformati esprimenti la proteina di fusione KOB1::GFP e il canale Shaker-like inward rectifying AKT1 di *Arabidopsis*. La fluorescenza è localizzata sempre nel citoplasma. In entrambe le figure è mostrata anche l'autofluorescenza dei cloroplasti. Per la spiegazione si veda il testo

mativi in quanto l'efficienza di trasformazione non superava il 20% e l'intensità di fluorescenza era molto variabile, dipendendo dal numero di copie di plasmide inseritesi in ogni cellula durante la trasformazione. Nelle cellule epidermiche della pagina inferiore delle foglie, invece, la fluorescenza, dopo qualche giorno di incubazione, è più uniforme. In questa situazione è più facile confermare il risultato di localizzazione ed escludere falsi risultati dovuti all'espressione troppo forte del transgene.

Una volta messi a punto i protocolli, è stato possibile iniziare lo studio seriale dei canali, a partire da quelli di dimensioni più piccole e facili da clonare, quali AK109604 e AK069303, due rappresentanti della famiglia tandem-pore, e la proteina KOB1.

Quest'ultima è una proteina di 36kDa, nota come subunità beta dei canali al potassio, identificata in un'analisi del proteoma di mitocondrio di riso (Fang et al., 1998; Tanaka et al., 2004). Queste subunità sono poco studiate nelle piante, mentre negli animali si sa che regolano i canali del potassio legandosi alle subunità alfa che li compongono e inoltre possiedono un'attività ossidoreduttasica.

Abbiamo verificato la localizzazione subcellulare di questa proteina in PPS di tabacco. Per fare ciò, la proteina è stata fusa al C-terminale con la proteina fluorescente GFP nel vettore pUC-GFP utile per l'espressione transiente del

transgene. Purtroppo non è stata osservata la marcatura a livello dei mitocondri, ma nel citoplasma (fig. 8A). Per verificare ulteriormente la localizzazione, PPS sono stati co-trasformati con un costrutto per l'espressione del canale Shaker AtAKT1 di *A. thaliana*, noto per essere un partner della subunità beta in Arabidopsis. Anche in questo caso la fluorescenza è stata osservata nel citoplasma (fig. 8B). Questo risultato è in contrasto con quanto pubblicato in precedenza (Tanaka et al., 2004), però non è del tutto inatteso in quanto spesso gli esperimenti di proteomica danno falsi positivi dovuti a contaminazioni durante la preparazione dei campioni.

In merito ai due canali AK109604 e AK069303, risultati preliminari suggeriscono una localizzazione in tonoplasto e reticolo endoplasmatico, rispettivamente, con abbondante presenza di entrambi i canali anche in sistemi di vescicole intracellulari. Per definire in maniera conclusiva questi risultati sono, però, ancora necessari ulteriori approfonditi esperimenti di co-localizzazione con marcatori di compartimenti intracellulari.

PROSPETTIVE DELLA RICERCA

Nel prossimo futuro sarà necessario continuare lo studio seriale dei canali di riso con saggi di espressione eterologa in tabacco. Questo studio verrà affiancato dall'analisi fenotipica di mutanti per gli stessi canali, per vedere se mutazioni in tali geni possano portare alla modificazione dell'attività del PmitoK_{ATP} o della funzionalità mitocondriale. Questo tipo di studio, applicato anche a quei canali che non avessero localizzazione mitocondriale, permetterà di definire la funzione di geni non ancora studiati in riso. Per confermare la localizzazione subcellulare, inoltre, i costrutti verranno utilizzati in saggi di espressione omologa mediante trasformazione di germogli di riso secondo un protocollo che è attualmente in fase di messa a punto.

Deve essere sottolineato che l'interesse ultimo è quello di arrivare all'identificazione del PmitoK_{ATP} di frumento duro, per cui l'utilizzo della "genetica" di specie prossime a quella di interesse serve come strumento iniziale, per acquisire conoscenze da applicare poi alla specie target. Nel contempo, dovranno anche continuare le ricerche bioenergetiche e funzionali in frumento duro, con particolare interesse all'individuazione di nuove vie di regolazione del PmitoK_{ATP} oltre a quella "ATP/ROS" riportata in figura 4. In questo senso, recentissime osservazioni suggeriscono l'esistenza di una regolazione da parte di acidi grassi liberi prodotti da una fosfolipasi mitocondriale attivata dallo stress (dati non pubblicati); si apre così un nuovo capitolo, che potrebbe

portare sviluppi molto interessanti nella ricerca sui meccanismi di resistenza allo stress in frumento duro.

I risultati ottenuti e le buone prospettive di ricerca, dimostrano che nel complesso è vincente la strategia di associare, quanto più possibile strettamente, gli studi bioenergetici a quelli molecolari e così anche è vincente la strategia di finalizzare la ricerca di base a singoli e ben definiti aspetti applicativi per un'agricoltura del XXI secolo.

RINGRAZIAMENTI

La realizzazione di questo lavoro è stata possibile grazie ai finanziamenti del progetto AGROGEN "Laboratorio di GENomica per caratteri di importanza AGRonomica in frumento duro: identificazione di geni utili, analisi funzionale e selezione assistita con marcatori molecolari per lo sviluppo della filiera sementiera nazionale" del Ministero dell'Università e della Ricerca.

RIASSUNTO

Nei mitocondri vegetali di frumento duro è stata dimostrata per via funzionale l'esistenza di un canale del potassio (*Plant Mitochondrial Potassium Channel – ATP sensitive*, PmitoK_{ATP}) simile al canale animale mitoK_{ATP}. Questo canale è in grado di inibire la dannosa sovra produzione mitocondriale di specie reattive dell'ossigeno, che si verifica generalmente quando la pianta/cellula è sottoposta a uno stress ambientale. In accordo con questa proprietà, si è trovato che il PmitoK_{ATP} viene attivato quando plantule di frumento duro sono sottoposte a stress iperosmotico e si ritiene che questo canale possa rappresentare un nuovo, interessante sistema di difesa dagli stress abiotici in frumento duro. Purtroppo, non è stata ancora definita la natura molecolare del PmitoK_{ATP}. Per isolarlo e caratterizzarlo a livello molecolare sono stati considerati tutti i canali del potassio di riso che somigliassero ai canali Kir animali e tutti quelli riconosciuti utilizzando la sequenza consenso del filtro di selettività per il potassio (TTXGYGD); particolare attenzione è stata posta ai canali che presentassero anche un putativo peptide segnale mitocondriale. È stata completata una lista di undici canali che ora sono studiati sistematicamente. Per determinare la localizzazione subcellulare di questi canali, le sequenze codificanti sono state fuse al gene reporter YFP ed espresse in un sistema eterologo, il tabacco. Vengono qui riportati i primi risultati.

ABSTRACT

A potassium channel similar to animal mitoK_{ATP} was functionally demonstrated in durum wheat mitochondria (*Plant Mitochondrial Potassium Channel – ATP sensitive*, PmitoK_{ATP}), deeply affecting mitochondrial bioenergetics. This channel was found to

be able to inhibit the large-scale mitochondrial production of harmful ROS, generally occurring when the plant/cell is subjected to an environmental stress. Consistently, the channel activity was found to be increased when durum wheat seedlings were subjected to hyperosmotic stress, so the PmitoK_{ATP} may be a novel, interesting defense system in durum wheat against abiotic stress. Unfortunately, the gene/s – protein/s of the channel are unknown. To isolate this protein complex eleven rice potassium channels were selected being similar to animal Kir channels or being potassium channels on the basis of the selectivity filter TTXGYGD, with particular attention towards channels possibly putatively targeted to mitochondria. All coding sequences have been fused to YFP reporter gene and expressed in the heterologous system tobacco to find their sub-cellular localization. Here, the first results are reported.

BIBLIOGRAFIA

- ACHE P., BECKER D., IVPASTORASHIKINA N., DIETRICH P., ROELFSEMA M.R., HEDRICH R. (2000): *GORK, a delayed outward rectifier expressed in guard cells of Arabidopsis thaliana, is a K⁺-selective, K⁺-sensing ion channel*, «FEBS Letters», 486, pp. 93-98.
- ALSCHER R.G., DONAHUE J.L., CRAMER C.L. (1997): *Reactive oxygen species and antioxidants: relationship in green cells*, «Physiologia Plantarum», 100, pp. 224-233.
- ALTSCHUL S.F., GISH W., MILLER W., MYERS E.W., LIPMAN D.J. (1990): *Basic local alignment search tool*, «Journal of Molecular Biology», 215, pp. 403-410.
- ANDERSON J.A., HUPRIKAR S.S., KOCHIAN L.V., LUCAS W.J., GABER R.F. (1992): *Functional expression of a probable Arabidopsis thaliana potassium channel in Saccharomyces cerevisiae*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 89, pp. 3736-3740.
- ARDEHALI H., CHEN Z., KO Y., MEJIA-ALVAREZ R. MARBÁN E. (2004): *Multiprotein complex containing succinate dehydrogenase confers mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel activity*, «Proceedings of the National Academy of Science of USA», 101, pp. 11880-11885.
- BAJGAR R., SEETHARAMAN S., KOWALTOWSKI A.J., GARLID K.D., PAUCEK P. (2001): *Identification and Properties of a Novel Intracellular (Mitochondrial) ATP-sensitive Potassium Channel in Brain*, «The Journal of Biological Chemistry», 276, pp. 33369-33374.
- BECKER D., GEIGER D., DUNKEL M., ROLLER A., BERTL A., LATZ A., CARPANETO A., DIETRICH P., ROELFSEMA M.R., VOELKER C., SCHMIDT D., MUELLER-ROEBER B., CZEMPINSKI K., HEDRICH R. (2004): *AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K⁺ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca²⁺-dependent manner*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 101, pp. 5621-5626.
- CAO Y., WARD J.M., KELLY W.B., ICHIDA A.M., GABER R.F., ANDERSON J.A., UOZUMI N., SCHROEDER J.I., CRAWFORD N.M. (1995): *Multiple Genes, Tissue Specificity, and Expression-Dependent Modulation Contribute to the Functional Diversity of Potassium Channels in Arabidopsis thaliana*, «Plant Physiology», 109, pp. 1093-1106.
- CARREIRA R.S., FACUNDO H.T.F., KOWALTOWSKI A.J. (2005): *Mitochondrial K⁺ transport and cardiac protection during ischemia/reperfusion*, «Brazilian Journal of Medical and Biological Research», 38, pp. 345-352.

- CASOLO V., PETRUSSA E., KRAJÁKOVÁ J., MACRÌ F., VIANELLO A. (2005): *Involvement of the mitochondrial K^+_{ATP} channel in H_2O_2 - or NO-induced programmed death of soybean suspension cell cultures*, «Journal of Experimental Botany», 56, pp. 997-1006.
- CHEN S.C., LIU H.W., LEE K.T., YAMAKAWA T. (2007): *High-efficiency Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of heat inducible sHSP18.2-GUS in Nicotiana tabacum*, «Plant Cell Reports», 26, pp. 29-37.
- CHÉREL I. (2004): *Regulation of K^+ channel activities in plants: from physiological to molecular aspects*, «Journal of Experimental Botany», 55, pp. 337-351.
- COSTA A., CARPANETO A., VAROTTO S., FORMENTIN E., MARIN O., BARIZZA E., TERZI M., GAMBALE F., LO SCHIAVO F. (2004): *Potassium and carrot embryogenesis: Are K^+ channels necessary for development?*, «Plant Molecular Biology», 54, pp. 837-852.
- CZEMPINSKI K., FRACHISSE J.M., MAUREL C., BARBIER-BRYGOO H., MUELLER-ROEBER B. (2002): *Vacuolar membrane localization of the Arabidopsis two-pore K^+ channel KCO1*, «The Plant Journal», 29, pp. 809-820.
- DE MARCHI U., SASSI N., FIORETTI B., CATACUZZENO L., CEREGHETTI G.M., SZABÒ I., ZORATTI M. (2009): *Intermediate conductance Ca^{2+} -activated potassium channel ($K_{Ca}3.1$) in the inner mitochondrial membrane of human colon cancer cells*, «Cell Calcium», 45, pp. 509-516.
- DIOLEZ P., MOREAU F. (1985): *Correlation between ATP synthesis, membrane potential and oxidation rate in potato mitochondria*, «Biochimica et Biophysica Acta», 806, pp. 56-63.
- DOUCE R., BOURGUIGNON J., BROUQUISSE R., NEUBURGER M. (1987): *Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity*, «Methods in Enzymology», 148, pp. 403-415.
- DOWNEY P., SZABÒ I., IVASHIKINA N., NEGRO A., GUZZO F., ACHE P., HEDRICH R., TERZI M., LO SCHIAVO F. (2000): *KDC1, a novel carrot root hair K^+ channel: cloning characterization, and expression in mammalian cell*, «The Journal of Biological Chemistry», 275, pp. 39420-39426.
- DUBY G., HOSY E., FIZAMES C., ALCON C., COSTA A., SENTENAC H., THIBAUD J.B. (2008): *AtKCI, a conditionally targeted Shaker-type subunit, regulates the activity of plant K^+ channels*, «The Plant Journal», 53, pp. 115-123.
- FANG Z., KAMASANI U., BERKOWITZ G.A. (1998): *Molecular cloning and expression characterization of a rice K^+ channel beta subunit*, «Plant Molecular Biology», 37, pp. 597-606.
- FLAGELLA Z., TRONO D., POMPA M., DI FONZO N., PASTORE D. (2006): *Seawater stress applied at germination affects mitochondrial function in durum wheat (Triticum durum) early seedlings*, «Functional Plant Biology», 33, pp. 357-366.
- FORMENTIN E., NASO A., VAROTTO S., PICCO C., GAMBALE F., LO SCHIAVO F. (2006): *KDC2, a functional homomeric potassium channel expressed during carrot embryogenesis*, «FEBS Letters», 580, pp. 5009-5015.
- FORMENTIN E., VAROTTO S., COSTA A., DOWNEY P., BREGANTE M., NASO A., PICCO C., GAMBALE F., LO SCHIAVO F. (2004): *DKT1, a novel K^+ channel from carrot, forms functional heteromeric channels with KDC1*, «FEBS Letters» 573, pp. 61-67.
- FRATIANNI A., PASTORE D., PALLOTTA M.L., CHIATANTE D., PASSARELLA S. (2001): *Increase of membrane permeability of mitochondria isolated from water stress adapted potato cells*, «Bioscience Reports», 21, pp. 81-91.
- FUCHS I., STOLZLE S., IVASHIKINA N., HEDRICH R. (2005): *Rice K^+ uptake channel OsAKT1 is sensitive to salt stress*, «Planta», 221, pp. 212-221.

- GARLID K.D., PAUCEK P. (2003): *Mitochondrial potassium transport: the K^+ cycle*, «Biochimica et Biophysica Acta», 1606, pp. 23-41.
- GAYMARD F., PILOT G., LACOMBE B., BOUCHEZ D., BRUNEAU D., BOUCHEREZ J., MICHAUX-FERRIERE N., THIBAUD J.B., SENTENAC H. (1998): *Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K^+ release into the xylem sap*, «Cell», 94, pp. 647-655.
- GEIGER D., BECKER D., VOSLOH D., GAMBALE F., PALME K., REHERS M., ANSCHUETZ U., DREYER I., KUDLA J., HEDRICH R. (2009): *Heteromeric AtKC1/AKT1 channels in Arabidopsis roots facilitate growth under K^+ limiting conditions*, «The Journal of Biological Chemistry», doi:10.1074/jbc.M109.017574
- GOBERT A., ISAYENKOV S., VOELKER C., CZEMPINSKI K., MAATHUIS F.J. (2007): *The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K^+ conductance and plays a role in K^+ homeostasis*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 104, pp. 10726-10731.
- GROVER G.J., GARLID K.D. (2000): *ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology*, «Journal of Molecular and Cellular Cardiology», 32, pp. 677-695.
- HELLENS R.P., EDWARDS E.A., LEYLAND N.R., BEAN S., MULLINEAUX P.M. (2000): *pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation*, «Plant Molecular Biology», 4, pp. 819-832.
- HOSY E., DUBY G., VÉRY A.A., COSTA A., SENTENAC H., THIBAUD J.B. (2005): *A procedure for localisation and electrophysiological characterisation of ion channels heterologously expressed in a plant context*, «Plant Methods», 19, pp. 1-14.
- HOSY E., VAVASSEUR A., MOULINE K., DREYER I., GAYMARD F., POREE F., BOUCHEREZ J., LEBAUDY A., BOUCHEZ D., VÉRY A.A., SIMONNEAU T., THIBAUD J.B., SENTENAC H. (2003): *The Arabidopsis outward K^+ channel GORK is involved in regulation of stomatal movements and plant transpiration*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 100, pp. 5549-5554.
- INOUE I., NAGASE H., KISHI K., HIGUTI T. (1991): *ATP-sensitive K^+ channel in the mitochondrial inner membrane*, «Nature», 352, pp. 244-247.
- LATZ A., IVASHIKINA N., FISCHER S., ACHE P., SANO T., BECKER D., DEEKEN R., HEDRICH R. (2007): *In planta AKT2 subunits constitute a pH- and Ca^{2+} -sensitive inward rectifying K^+ channel*, «Planta», 225, pp. 1179-1191.
- LAUS M.N., SOCCIO M., TRONO D., CATTIVELLI L., PASTORE D. (2008): *Plant Inner Membrane Anion Channel (PIMAC) function in plant mitochondria*, «Plant Cell Physiology», 49, pp. 1039-1055.
- LEBAUDY A., VÉRY A.A., SENTENAC H. (2007): *K^+ channel activity in plants: genes, regulations and functions*, «FEBS Letters», 581, pp. 2357-2366.
- MÄSER P., THOMINE S., SCHROEDER J.I., WARD J.M., HIRSCHI K., SZE H., TALKE I.N., AMTMANN A., MAATHUIS F.J.M., SANDERS D., HARPER J.F., TCHIEU J., GRIBSKOV M., PERSANS M.W., SALT D.E., KIM S.A., GUERINOT M.L. (2001): *Phylogenetic relationships within cation transporter families of Arabidopsis*, «Plant Physiology», 126, pp. 1646-1667.
- MEEUSE B.J.D. (1975): *Thermogenic respiration in aroids*, «Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology», 26, pp. 117-126.
- MIRONOVA G.D., NEGODA A.E., MARINOV B.S., PAUCEK P., COSTA A.D., GRIGORIEV S.M., SKARGA Y.Y., GARLID K.D. (2004): *Functional distinctions between the mitochondrial ATP-dependent K^+ channel (mitoK_{ATP}) and its inward rectifier subunit (mitoKIR)*, «The Journal of Biological Chemistry», 279, pp. 32562-32568.

- MØLLER I.M. (2001): *Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species*, «Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology», 52, pp. 561-591.
- MOREAU C., PROST A.L., DÉRAND R., VIVAUDOU M. (2005): *SUR, ABC proteins targeted by K_{ATP} channel openers*, «Journal of Molecular and Cellular Cardiology», 38, pp. 951-963.
- MOULINE K., VERY A.A., GAYMARD F., BOUCHEREZ J., PILOT G., DEVIC M., BOUCHEZ D., THIBAUD J.B., SENTENAC H. (2002): *Pollen tube development and competitive ability are impaired by disruption of a Shaker K^+ channel in Arabidopsis*, «Genes & Development», 16, pp. 339-350.
- MURA C.V., COSMELLI D., MUNOZ F., DELGADO R. (2004): *Orientation of Arabidopsis thaliana KAT1 channel in the plasma membrane*, «The Journal of Membrane Biology», 201, pp. 157-165.
- OBATA T., KITAMOTO H.K., NAKAMURA A., FUKUDA A., TANAKA Y. (2007): *Rice Shaker potassium channel OsKAT1 confers tolerance to salinity stress on yeast and rice cells*, «Plant Physiology», 144, pp. 1978-1985.
- PASTORE D., TRONO D., LAUS MN, DI FONZO N., PASSARELLA S. (2001): *Alternative oxidase in durum wheat mitochondria. Activation by pyruvate, hydroxypyruvate and glyoxylate and physiological role*, «Plant and Cell Physiology», 42, pp. 1373-1382.
- PASTORE D., STOPPELLI M.C., DI FONZO N., PASSARELLA S. (1999): *The existence of the K^+ channel in plant mitochondria*, «The Journal of Biological Chemistry», 274, pp. 26683-26690.
- PASTORE D., TRONO D., LAUS M.N., DI FONZO N., FLAGELLA Z. (2007): *Possible plant mitochondria involvement in cell adaptation to drought stress. A case study: durum wheat mitochondria*, «The Journal of Experimental Botany», 58, pp. 195-210.
- PAUCEK P., DOLGACOVA L., GARLID K.D. (2002): «Biophysical Journal», 82, 109 (Abstract).
- PAUCEK P., MIRONOVA G., MAHDI F., BEAVIS A.D., WOLDEGIORGIS G., GARLID K.D. (1992): *Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K^+ channel from rat liver and beef heart mitochondria*, «The Journal of Biological Chemistry», 267, pp. 26062-26069.
- PETRUSSE E., CASOLO V., BRAIDOT E., CHIANDUSSI E., MACRÌ F., VIANELLO A. (2001): *The K_{ATP}^+ channel is involved in a low-amplitude permeability transition in plant mitochondria*, «Journal of Bioenergetics and Biomembranes», 33, pp. 107-117.
- PETRUSSE E., CASOLO V., PERESSON C., KRAJŇÁKOVÁ J., MACRÌ F., VIANELLO A. (2008): *Activity of a channel in Arum spadix mitochondria during thermogenesis*, «Journal of Plant Physiology», 165, pp. 1360-1369.
- PILOT G., LACOMBE B., GAYMARD F., CHEREL I., BOUCHEREZ J., THIBAUD J.B., SENTENAC H. (2001): *Guard cell inward K^+ channel activity in arabidopsis involves expression of the twin channel subunits KAT1 and KAT2*, «The Journal of Biological Chemistry», 276, pp. 3215-3221.
- REINTANZ B., SZYROKI A., IVASHIKINA N., ACHE P., GODDE M., BECKER D., PALME K., HEDRICH R. (2002): *AtKC1, a silent Arabidopsis potassium channel alpha-subunit modulates root hair K^+ influx*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 99, pp. 4079-4084.
- RUY F., VERCESI A.E., ANDRADE P.B.M., BIANCONI M.L., CHAIMOVICH E., KOWALTOWSKI A.J. (2004): *A highly active ATP-insensitive K^+ import pathway in plant mitochondria*, «Journal of Bioenergetics and Biomembranes», 36, pp. 195-202.

- SENTENAC H., BONNEAUD N., MINET M., LACROUTE F., SALMON J.M., GAYMARD F., GRIGNON C. (1992): *Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system*, «Science», 256, pp. 663-665.
- SZABÓ I., BOCK J., JEKLE A., SODDEMAN M., ADAMS C., LANG F., ZORATTI M., GULBINS E. (2005): *A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria*, «The Journal of Biological Chemistry», 280, pp. 12790-12798.
- SZYROKI A., IVASHIKINA N., DIETRICH P., ROELFSEMA M.R., ACHE P., REINTANZ B., DEEKEN R., GODDE M., FELLE H., STEINMEYER R., PALME K., HEDRICH R. (2001): *KAT1 is not essential for stomatal opening*, «Proceedings of the National Academy of Sciences», 98, pp. 2917-2921.
- TANAKA N., FUJITA M., HANDA H., MURAYAMA S., UEMURA M., KAWAMURA Y., MITSUI T., MIKAMI S., TOZAWA Y., YOSHINAGA T., KOMATSU S. (2004): *Proteomics of the rice cell: systematic identification of the protein populations in subcellular compartments*, «Molecular Genetics and Genomics», 271, pp. 566-576.
- TRONO D., FLAGELLA Z., LAUS M.N., DI FONZO N., PASTORE D. (2004): *The uncoupling protein and the potassium channel are activated by hypersomotic stress in mitochondria from durum wheat seedlings*, «Plant, Cell and Environment», 27, pp. 437-448.
- TRONO D., SOCCIO M., MASTRANGELO A.M., DE SIMONE V., DI FONZO N., PASTORE D. (2006): *The transcript levels of two plant mitochondrial uncoupling protein (pUCP)-related genes are not affected by hyperosmotic stress in durum wheat seedlings showing an increased level of pUCP activity*, «Bioscience Reports», 26, pp. 251-261.
- VAIN P., AFOLABI A.S., WORLAND B., SNAPE J.W. (2003): *Transgene behaviour in populations of rice plants transformed using a new dual binary vector system: pGreen/pSoup*, «Theoretical and Applied Genetics», 107, pp. 210-217.
- VERCESI A.E., MARTINS I.S., SILVA M.A.P., LEITE H.M.F., CUCCOVIA I.M., CHAIMOVICH H. (1995): *PUMPing plants*, «Nature», 375, p. 24.
- VOELKER C., SCHMIDT D., MUELLER-ROEBER B., CZEMPINSKI K. (2006): *Members of the Arabidopsis AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta*, «The Plant Journal», pp. 48, 296-306.
- ZOTTINI M., BARIZZA E., COSTA A., FORMENTIN E., RUBERTI C., CARIMI F., LO SCHIAVO F. (2008): *Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells*, «Plant Cell Reports», 27, pp. 845-853.