



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

JUDITA JANUŽAITĖ

Neurobiofizikos studijų programa

Bakalauro baigiamasis darbas

INOZITOLIO TRISFOSFATO (IP₃) POVEIKIS MENTURDUMBLIO
***NITELLOPSIS OBTUSA* LĄSTELIŲ ELEKTRINIŲ SIGNALŲ**
PARAMETRAMS

Darbo vadovas: dokt. Vilmantas Pupkis

TURINYS

ĮVADAS.....	3
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	5
1.1. Elektriniai signalai augaluose	5
1.2. Veikimo potencialas augaluose	6
1.4. Ca^{2+} kanalai	8
1.3. Inozitolio trisfosfatas	10
1.4. Inozitolio trisfosfatas augaluose	12
1.5. <i>Nitellopsis obtusa</i>	14
2. TYRIMO METODAI.....	16
3. REZULTATAI.....	23
3.1. Inozitolio trisfosfato 75 μM poveikis membranos ir VP parametrams	23
3.2 Inozitolio trisfosfato 150 μM poveikis membranos ir VP parametrams	29
3.3. IP_3 75 μM 30 min poveikis sužadavimo metu tekančio srauto parametrams	35
3.4. IP_3 150 μM 30 min poveikis sužadavimo metu tekančio srauto parametrams	38
4. REZULTATŲ APTARIMAS	42
IŠVADOS.....	43
SANTRAUKA	44
SUMMARY	45
1. LITERATŪROS SĄRAŠAS	46

IVADAS

Ilgą laiką buvo manoma, kad augalai, turintys ribotą gebėjimą judėti ir reaguoti į išorinę aplinką, turi primityvius jutimo gebėjimus. Tik keletas augalų rūšių, turinčių vizualiai greitesnę reakciją į išorinius dirgiklius (pvz., lapų judėjimas inicijuotas mechaniniu dirgikliu) buvo išimtimis. Tokių augalų kaip jautrioji mimoza (*Mimosa pudica*), saulašarė (*Drosera*) ir jautrusis musėkautas (*Dionaea muscipula*) tyrinėjimai atskleidė kur kas daugiau apie augalų pasaulį, nei buvo žinoma (Darwin, 1875; John Scott Burdon-Sanderson, 1873). Buvo nustatyta, kad šiuose augaluose yra ne tik įvairių receptorių, kurių jautrumas viršija žmogaus piršto jautrumą, bet ir elektrinių signalų, kuriais perduodama informacija.

Veikimo potencialai (VP) yra geriausiai aprašyti ir universaliausi elektriniai signalai generuojami augaluose (Sukhov ir kt., 2019). Jie geba perduoti informaciją apie vietinius išorinius dirgiklius ir informuoti augalo ląsteles apie esantį pavojų. VP sužadinami „viskas arba nieko“ principu, inicijuojami Ca^{2+} koncentracijos citoplazmoje padidėjimu. Inozitolio trisfosfatas (IP_3) reguliuoja kalcio išskyrimą iš ląstelės saugyklų gyvūninėse ląstelėse, tačiau augalų ląstelėse IP_3 vaidmuo dar nėra aiškus. IP_3 yra aptinkamas augalų ląstelėse kaip endogeninė medžiaga, kurios koncentracija padidėja augalams adaptuojantis prie nepalankių aplinkos sąlygų (pvz. sausros, per didelis druskingumas, šaltis). Manoma, kad IP_3 gali reguliuoti augalų kalcio signalinimo kelius, kaip antrinė signalinė molekulė, tačiau koku mechanizmu augalinėse ląstelėse veikia IP_3 dar nėra aprašyta, vienetinių elektrofiziologinių tyrimų rezultatai šia tematika vienareikšmiškų išvadų daryti neleidžia.

Nuolat dėl klimato kaitos ir žmogaus veiklos besikeičiančios aplinkos sąlygos augalų gyvavimui kelia pavojų, todėl yra svarbu sužinoti daugiau apie augalų fiziologinius pokyčius bei prisitaikymo mechanizmus. Išsiaiškinę IP_3 sukeltą poveikį augalinėms ląstelėms galėsime daugiau sužinoti apie augalų streso reguliavimą bei fiziologinius pokyčius, kurie apsaugo augalus nuo nepalankių aplinkos sąlygų. Šis žinių pritaikymas gali prisidėti prie agrokultūros gerinimo, biojutiklių kūrimo bei augalų įvairovės išsaugojime.

Darbo tikslas:

Įvertinti inozitolio trisfosfato (IP_3) poveikį menturdumblių *Nitellopsis obtusa* ląstelių elektrinių signalų parametrams.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti IP_3 poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranos laidumui ir ramybės potencialui.

2. Nustatyti IP_3 poveikį *Nitelloopsis obtusa* ląstelių veikimo potencialų parametrų: veikimo potencialo sužadavimo slenksčiui, amplitudei, smailei bei depoliarizacijos ir repoliarizacijos trukmėms;
3. Nustatyti IP_3 poveikį *Nitelloopsis obtusa* ląstelių sužadavimo metu tekančio srauto parametrų: maksimaliam membranai laidumui, maksimalaus srauto amplitudei bei aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmėms.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Elektriniai signalai augaluose

Elektrofiziologinių tyrimų pradžia laikomi L. Galvani tyrimai su elektra ir varlėmis (L. Galvani, 1791). Paaikškėjo, kad elektros srovės stimulus gali sukelti jonų srautų pokyčius kryptingai perduodamų elektrinių signalų pavidalu. Atlikti tyrimai įrodė, kad sužeidus nervų gijas atsiranda didelis įtampos skirtumas tarp sužeistos (vidinės) ir nepažeistos (išorinės) nervų vietos. Tokiu būdu grubiai užregistravus membranos potencialo pokyčius ir buvo aprašytas pirmasis elektrinis signalas vadintas žaizdos arba sužalojimo potencialu. Taip pat buvo nustatyta, kad įvairūs išoriniai dirgikliai (pvz., mechaninis sužalojimas) didina ramybės potencialo vertę (šiuolaikiniais terminais tariant, jie sukelia depoliarizaciją, vertė artėja prie nulio), o šiam plintančiam reiškiniui apibūdinti buvo sukurti nauji terminai, tokie kaip veikimo potencialas (VP) (Bois-Reymond, 1884). Po šių tyrimų pradėta naudoti mikroelektrodus (KCl pripildytas stiklines mikropipetės, kurių galiukų skersmuo yra pakankamai mažas, kad juos būtų galima įvesti į gyvas ląsteles), skirtus registruoti viduląstelinį membranos potencialus. Šis metodas buvo pritaikytas galvakojų milžiniškoms ląstelėms (aksonams) ir Characeae šeimos makrodumblių tarpubamblio ląstelėms tirti. XX a. ketvirtajame dešimtmetyje buvo ne tik atlikti pirmieji patikimi viduląsteliniai augalų ląstelių membraninių potencialų matavimai, bet ir pirmieji viduląsteliniai augalų VP įrašai (Osterhout, 1936; Umrath, 1930).

Atradimas, kad visi augalai generuoja veikimo potencialus, buvo mokslinis proveržis, turėjęs svarbių pasekmių. Pirmia, tai ištaisė ilgai vyravusį įsitikinimą, kad dauguma augalų yra tiesiog mažiau jautrūs išoriniams dirgikliams nei keletas išimčių - vizualiai greitai reaguojančios jautriosios mimozos, jautrieji musėkautai. Antra, tai paskatino manyti, kad augaluose generuojami elektriniai signalai turi nešti svarbius pranešimus (Pickard, 1973).

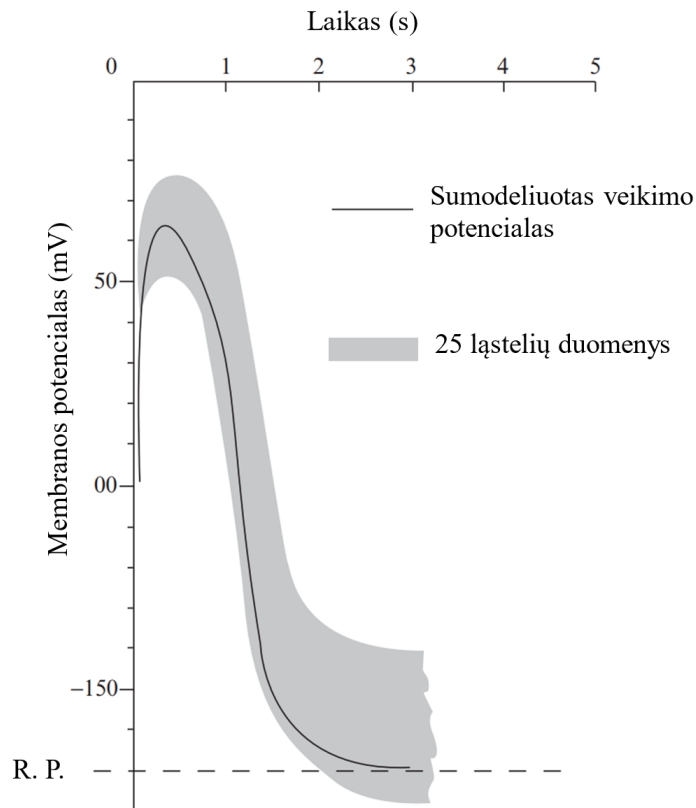
Elektrofiziologiniai ir kiti augalų ir gyvūnų toli sklindančių signalų tyrimai labai prisidėjo prie mūsų žinių apie gyvąjį pasaulį, nes atskleidė svarbius augalų ir gyvūnų panašumus ir esminius skirtumus elektrofiziologijos srityje, kuri gali būti tiesiogiai susijusi su jų skirtingais gebėjimais reaguoti į aplinkos signalus. Aukštesnieji augalai, užuot stokoję elektrinių signalų, išvystė daugiau nei vieną signalų tipą, galintį įveikti didelius atstumus. Be VP, kurie sužadinami ir gyvūnams bei žemesniesiems augalams, aukštesnieji augalai pasižymi papildomu, unikaliu, hidrauliškai plintančiu elektrinių signalų tipu,

vadinamu variabiliiaisiais potencialais ir mažai aprašytais sisteminiiais potencialais (Trebacz ir kt., 2006; Zimmermann ir kt., 2009).

1.2. Veikimo potencialas augaluose

Augaluose ir gyvūnuose adaptyvią reakciją į aplinkos sąlygų pokyčius ir trikdžius gali lemti jonų srauto per ląstelių membranas pokyčiai (Buchanan ir kt., 2015; R. Wayne, 1993). Augalų veikimo potencialai tyrinėjami jau daugiau nei pusę amžiaus. Modelinę sistemą daugiausia sudarė didelės Characeae ląstelės, kurios leido įvesti nuo 1 iki 10 μm galiuko skersmens elektrodus, elektriškai manipuluoti ląstelėmis, keisti vidinę ir išorinę ląstelių terpę. Characeae ląstelių veikimo potencialai buvo pirmieji augaluose nustatyti elektriniai toli sklindantys signalai. VP teikia informaciją apie daugybę aplinkos pokyčių (Kisnieriene ir kt., 2019). Augalų, kaip ir gyvūnų ląstelių, veikimo potencialai yra atsakas į palyginti švelnius, nežalojančius dirgiklius. Atskiri augalai per trumpą laiką gali sugeneruoti dešimtis VP, kuriuos atskiria refrakteriniai periodai: absoliutus refrakterinis periodas, per kurį vėlesnis sužadėjimas neįmanomas, ir santykinis refrakterinis periodas, kurio trukmė priklauso nuo dirgiklio stiprumo (Król ir kt., 2010). Augalų VP, kaip ir gyvūnų VP, veikia pagal principą „viskas arba nieko“, kuris reiškia, kad yra sugeneruojamas santykinai pastovios amplitudės VP, nesvarbu, koks stiprus buvo dirgiklis, jei jis viršijo tam tikrą slenkstį.

Augalų ląstelėse yra dvi membranos - plazmalema ir tonoplastas. Abi membranos paprastai gali būti sužadintos. Dviejų membranų indėlis ir jonų koncentracijos kitimas tiek citoplazmos, tiek vakuoliniuose skyriuose yra tikėtinos priežastys, dėl kurių augalų VP forma yra labiau kintanti nei gyvūnų VP (**1.2.1 pav.**) (Beilby, 2007). Daugumos augalų VP smailė įgyja neigiamą už 0 mV vertę, tačiau esama išimčių, kurių augalų smailė gali būti teigiamesnė už 0 mV. Vieni iš tokių augalų, kurių VP smailė yra teigiamesnė už 0 mV yra *Nitellopsis obtusa*.



1.2.1 pav. *Nitellopsis obtusa* ląstelių VP duomenų palyginimas su sumodeliuotu veikimo potencialu įvertinant VP kintamumą, adaptuota pagal Beilby, 2007.

Dauguma augalų gali generuoti VP ir šie vaidina svarbų vaidmenį tarpląstelinėje ir viduląstelinėje komunikacijoje, kartu su hormoniniais ir kitais cheminiais signalais. Dėl jonų koncentracijos, turgoro ir vandens srauto pokyčių gali pakisti ląstelės fermentų veikla ląstelės viduje ir gali lemti membranos bei citoplazmos fiziologinius pokyčius (pav., didesnis vandens pasisavinimas į ląstelės vidų sausros metu (Feng ir kt., 2016)). Augalų veikimo potencialuose Cl^- sudaro pagrindinį depoliarizuojantį jonų srautą, o Ca^{2+} reikalingas VP aktyvacijai (Findlay ir Hope, 1964). Padidėjusi Ca^{2+} koncentracija citoplazmoje suaktyvina Cl^- kanalus, kurie lemia VP depoliarizacijos fazę. Repolarizacija iki normalaus ramybės potencialo vyksta dėl Ca^{2+} , kurį Ca^{2+} siurbliai vėl perneša į saugyklas, Cl^- kanalų užsidarymo, K^+ nutekėjimo per depoliarizacijos suaktyvintus kanalus ir tęstinio protonų siurblio aktyvumo. Atlikus išsamius tyrimus paaiškėjo, kad Ca^{2+} daugiausia išsiskiria iš vidinių saugyklų (galbūt iš endoplazminio tinklo) VP metu (C. Plieth, 1999). Kartu Ca^{2+} , Cl^- ir K^+ kanalai leidžia augalų ląstelėms reaguoti į kintančias aplinkos sąlygas, keičiant kanalų elektrinį aktyvumą. Šie jonų pokyčiai VP metu medžiuose

patvirtinti naudojant dispersinę rentgeno spindulių analizę ir jonų kanalų inhibitorius (J. Fromm, R. Spanswick, 1993).

VP yra generuojamas siekiant apsaugoti augalą ir yra inicijuojamas tik esant pakankamai intensyviui stimului, kuomet augalui kyla tikras pavojus. VP gali informuoti toli esančias ląsteles apie vietinius dirgiklius (pvz., gyvūnus, kurie minta augalo lapais) ir priversti jas veikti atsakant į dirgiklį. Pavyzdžiui, VP informuoja augalo ląsteles ir jos sustabdo citoplazmos tekėjimą į pažeistą vietą ir/arba išskiria gynybines medžiagas, kurios atbaido ar veikia toksiškai. Augaluose egzistuoja daugybė elektrinio signalinimo funkcijų: lapų judėjimas (J. Fromm, W. Eschrich, 1988), kvėpavimo suintensyvėjimas (Dziubińska ir kt., 1989), citoplazmos tekėjimo sustabdymas (T. Hayama, T. Shimmen, 1979), Pin2 geno, atsakingo už ląstelės atsparumą patogenams, raiškos indukcija (Bratislav Stanković, 1996), kamieno ilgėjimo reguliavimas (T. Shiina, M. Tazawa, 1986). Žinios apie elektrinius signalus augaluose padeda išsiaiškinti augalo ląstelėse ir organuose vykstančius informacijos perdavimus bei suteikia galimybę naujiems tyrimams. Fotosintezės reguliavimas besikeičiančiomis aplinkos sąlygomis yra esminė augalų veikla. Įvairūs vietiniai dirginimai gali sukelti skirtingas fotosintezės reakcijas nepažeistose augalų dalyse, kurias atskleidžia CO₂ asimiliacijos greičio pokyčiai šviesos sąlygomis (Sukhov, 2016). Fotosintezės mechanizmas susideda iš daugybės skirtingų fazių, kurių valdyje dalyvauja elektriniai signalai (Oksana Sherstneva, Vladimir Vodeneev, 2015). Augalų elektrofiziologiniai tyrimai yra pagrindas atrasti ir tobulinti biojutiklius, skirtus aplinkos stebėsenai, teršalų, pesticidų ir dezinfekuojamųjų medžiagų poveikiui nustatyti, klimato pokyčiams stebėti, augalų ir vabzdžių sąveikai, žemės ūkiui, derliui įtaką darančioms sąlygoms valdyti ir greitai kontroliuoti.

1.4. Ca²⁺ kanalai

Kalcis į augalų ląsteles patenka per Ca²⁺ pralaidžius jonų kanalus esančius augalų plazminėje membranoje (White, 2000). Kadangi didelė [Ca²⁺]_{cyt} (citoplazminė Ca²⁺ koncentracija) yra citotoksiška, nestimuliuojamose ląstelėse submikromoliarinę [Ca²⁺]_{cyt} koncentraciją palaiko Ca²⁺-ATPazės ir H⁺/Ca²⁺- antiporteriai (Mäser ir kt., 2001). Šie fermentai perkelia citozolinius Ca²⁺ į apoplastą arba viduląstelių organelių, tokių kaip vakuolė arba endoplazminis tinklas (ET) vidų. Greitas Ca²⁺ patekimas per plazminės membranos, tonoplasto ir (arba) ET katijonų kanalus sukelia [Ca²⁺]_{cyt} pokyčius, kurie inicijuoja ląstelių atsaką į įvairius vystymosi signalus ir aplinkos pokyčius.

Spėjama, kad ląstelių atsakas į specifinius biotinius ir abiotinius stimulus yra koduojamas skirtingais [Ca²⁺]_{cyt} pokyčiais ir perduodamas [Ca²⁺]_{cyt} signalais. Daug dabartinių darbų, susijusių su

kalciu augaluose, skirta $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signalų ir atsako kelių ir specifiškumui nustatyti. Tokie signalai yra vadinami kalcio bangomis.

Naudojant *Nitella* ir *Chara* tarpubamblines ląsteles, į kurias mikroinjekcijomis buvo įšvirkštas fotoproteinas aekvorinas parodyta, kad veikimo potencialas sukelia staigų $[Ca^{2+}]_{cyt}$ padidėjimą ir citoplazminio srauto tekėjimo sustabdymą. Sistema taip pat pasižymėjo atsistatymu – greitai grįžo prie normalios $[Ca^{2+}]_{cyt}$ koncentracijos, o po to vėl normalizavosi citoplazminis tekėjimo srautas (Williamson & Ashley, 1982). Taip pat nustatyta, kad ląstelėms esant ramybės būsenoje $[Ca^{2+}]_{cyt}$ koncentracija *Chara* buvo $\sim 0,1 \mu M$, o *Nitella* – $0,4 \mu M$. Stimuliuojant $[Ca^{2+}]_{cyt}$ koncentracija *Chara* pakilo iki $6,7 \mu M$, o *Nitella* – iki $43 \mu M$. Atlikus analogišką tyrimą (M. Kikuyama & M. Tazawa, 1983) nustatyta, kad rezultatai sutapo su Williamson ir Ashley (1982 m.), tvirtai nustatytas $[Ca^{2+}]_{cyt}$ pokytis *Nitella* ir *Chara* veikimo potencialo metu. Šie tyrimai buvo pirmieji ir kelerius metus išliko įtakingiausiu Ca^{2+} pokyčių reguliavimo augaluose pavyzdžiu.

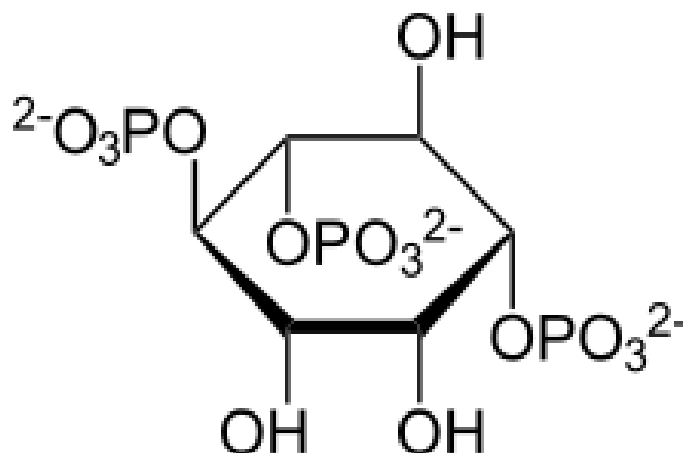
Žinoma, kad Ca^{2+} koncentracijų pokyčiai yra atsakingi už signalizavimo kelius, tačiau vis dar nėra aiški Ca^{2+} kanalų, kurie inicijuoja veikimo potencialus, tapatybė. Didelė dalis augalų atsakų į skirtingus mechaninius dirgiklius yra jau aprašyti prieš daugiau nei 100 metų (Darwin, 1880), tačiau molekuliniam lygmenyje, mechanizmai, kurie aprėpia ląstelėje vykstančius pokyčius, vis dar nėra iki galo ištirti (Alova ir kt., 2020).

Pirmieji tariamai Ca^{2+} pralaidūs augalų kanalai buvo identifikuoti pagal numanomą gyvūninių kanalų genų sekų homologiją. Vėliau ciklinių nukleotidų valdomi kanalai (CNGC), atrasti iš augalų genų bibliotekos ir pripažinti panašūs į tokius pačius kanalus gyvūnų ląstelėse. CNGC kanalai dalyvauja augalų imuninėje sistemoje. Glutamato tipo receptoriniai kanalai (GLRs), kurie atlieka svarbų vaidmenį augalo gynybinėse bei reprodukciniuose funkcijose, buvo identifikuoti pagal sekų panašumą į gyvūnų jonotropinius glutamato receptorius. Panašiai kaip GLRs buvo identifikuoti ir mechanškai jautrūs PIEZO kanalai augaluose. Augalų PIEZO kanalų pralaidumas nėra nuodugniai ištirtas, tačiau ekstrapoliacija iš gyvūnų homologų ir funkciškai defektyvių fenotipų rodo, kad jie greičiausiai yra pralaidūs Ca^{2+} . Kadangi dauguma augalų kanalų yra identifikuojami pagal sekų numatomumą ir lyginant su homologiniais kanalais ir už jų produkciją atsakingais genais, nėra aišku, ar kanalai yra susiję su elektrinių signalų generavimu. Ieškoma panašumų giminingose arba homologinėse augalų ir gyvūnų sistemose, tačiau šią informaciją sunkiau interpretuoti, nes fenotipai gali atsirasti dėl transkripcijos veiksmų, šaperonų arba reguliavimo veiksmų mutacijų (Kleist & Wudick, 2022). Net heterologinės raiškos sistemos gali turėti netiesioginį poveikį endogeniniams ląstelių komponentams arba atvirkščiai.

Todėl augalų kanalų identifikavimas ir aprašymas įprastai yra sudėtingas procesas reikalaujantis daug tyrimų bei skirtingų metodų.

1.3. Inozitolio trisfosfatas

Inozitolio 1,4,5-trisfosfatas (IP_3) yra antrinė signalinė molekulė, kuri kontroliuoja daugelį ląstelių procesų, inicijuodama vidinius kalcio signalus (**1.3.1 pav.**). IP_3 gyvūninėse ląstelėse veikia per receptorių, kurių molekulinės ir fiziologinės savybės labai panašios į raumenų kalcio mobilizuojančius rianodino receptorių. Ši bendra viduląstelinio kalcio kanalų šeima pasižymi dalyvavimu Ca^{2+} signaluose, sukeliančiuose raumenų susitraukimą ir svyruojančias Ca^{2+} bangas arba aktyvuojančiuose transkripcijos veiksmus. Toks dinamiškas signalizavimo kelias kontroliuoja daugelį ląstelinio procesų, įskaitant apvaisinimą, ląstelių augimą, transformaciją, sekreciją, lygiųjų raumenų susitraukimą, jutiminį suvokimą ir neuronų signalizavimą.

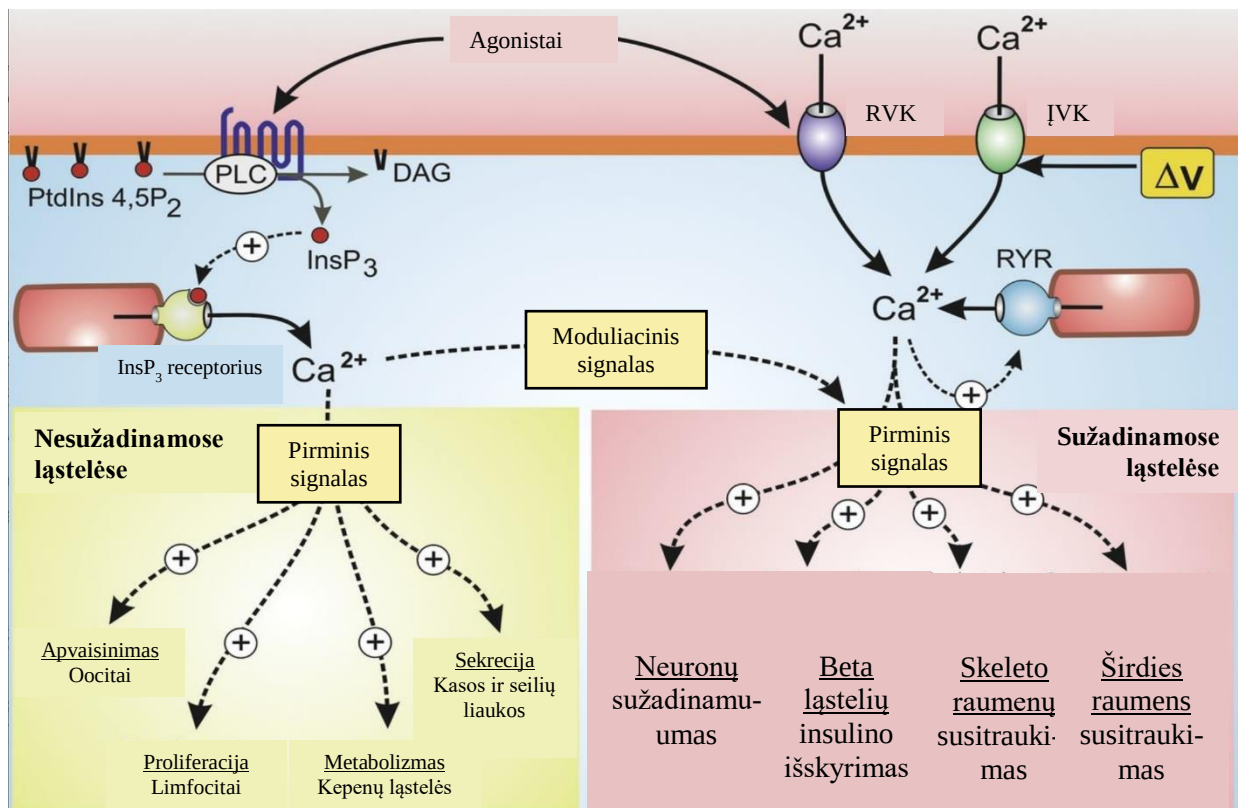


1.3.1 pav. Inozitolio 1,4,5-trisfosfato molekulė.

Prieš keturis dešimtmečius buvo įrodyta, kad inozitolio trisfosfatas susidaro aktyvuojant paviršiaus membranos receptorių (M. J. Berridge, R. Dawson, 1983). Tuo metu buvo įsivaizduojamas gana paprastas biocheminis kelias, kuriame dalyvavo IP_3 nuoseklus defosforilinimas iki IP_2 ir IP ir galiausiai į laisvą inozitolį. Beveik visose nagrinėtose sistemose receptorių aktyvuota kalcio mobilizacija apima pradinę kalcio išsiskyrimo iš viduląstelinio atsargų fazę, po kurios seka ilgesnė kalcio patekimo fazė (Putney, 1987). Turimi duomenys tvirtai rodo, kad vidinį išsiskyrimą valdo IP_3 . Ca^{2+} išsiskiria iš atskiros viduląstelinės talpyklos, į kurią įeina ne visi nemitochondriškai sekvestruoti Ca^{2+} (C. Taylor, J. Putney, 1985), ir yra įrodymų, kad šios talpyklos dydis ląstelėse gali būti reguliuojamas nuo GTP priklausomų mechanizmų (J. M. Mullaney, 1988). Iš pradžių manyta, kad organelė, iš kurios IP_3 išskiria Ca^{2+} , yra

endoplazminio tinklo sudedamoji dalis, tačiau pastaruoju metu manoma, kad Ca^{2+} patenka iš naujos į IP_3 reaguojančios organelės, vadinamos „kalciosoma“ (Volpe ir kt., 1988). Mechanizmas, kuriuo IP_3 išlaisvina Ca^{2+} , yra susijęs su sąveika su specifiniu membraniniu receptoriu (Supattapone ir kt., 1988)

IP_3 gyvūninėse ląstelėse veikia per receptorius ir dalyvauja Ca^{2+} signalinimo keliuose. Pagrindinis IP_3 vaidmuo akivaizdus nesužadintamose ląstelėse, kur jis generuoja Ca^{2+} signalus, kontroliuojančius skirtingus procesus (Berridge, 2008; Mikoshiba, 2015). Sužadintamose ląstelėse pirminis Ca^{2+} signalas priklauso nuo Ca^{2+} patekimo per įtampos valdomus kanalus, kuris gali būti sustiprintas Ca^{2+} išsiskyrimu per vidinių saugyklų rianodino receptorius (RVR) (1.3.2 pav.).



1.3.2 pav. Inozitolio trisfosfato reguliuojami signalinimo keliai gyvūninėse ląstelėse adaptuota pagal M. Berridge, 2016. RVK – receptorių valdomi kanalai, IVK – įtampos valdomi kanalai. IP_3 – inozitolio trisfosfatas. IP_3 receptorius – receptorius prie kurio jungiasi IP_3 molekulė

Per pastaruosius tris dešimtmečius išsiplėtė suvokimas apie tai, kaip ląstelės naudoja kalcį savo veiklai reguliuoti. Antrinė signalinė molekulė IP_3 atlieka svarbų vaidmenį kontroliuojant tiek vidinių kalcio atsargų mobilizaciją, tiek išorinio kalcio patekimą. Inozitolio trisfosfatas paprastai susidaro per procesą, vadinamą fosfolipazės C (PLC) signaliniu keliu. Užląstelinės signalinės molekulės, pavyzdžiui, hormonai ar neuromediatoriai, prisijungia prie specifinių ląstelių membranos receptorių. Šie receptoriai dažnai būna sujungti su G baltymu, kuris inicijuoja signalinę kaskadą. Suaktyvėjus receptoriui, su

receptoriumi susijęs G baltymas stimuliuoja PLC aktyvinimą. PLC yra fermentas, skaldantis specifinį fosfolipidą, vadinamą fosfatidilinozitolio 4,5-bisfosfatu (PIP₂), esantį ląstelės membranoje. PLC skaldo PIP₂ į du produktus: diacilglicerolį (DAG) ir inozitolio trisfosfatą. IP₃ išsiskiria į citozolį kaip tirpi molekulė. IP₃ difunduoja citoplazmoje ir prisijungia prie specifinių IP₃ receptorių, esančių ant endoplazminio tinklo (ET). Dėl šio prisijungimo atsidaro ET esantys kalcio kanalai, todėl kalcio jonai (Ca²⁺) iš endoplazminio tinklo vidaus patenka į citozolį. Inozitolio trisfosfato susidarymas yra pagrindinis viduląstelinės signalizavimo etapas, leidžiantis ląstelėms reaguoti į ekstraląstelinius stimulus ir koordinuoti įvairius fiziologinius procesus.

Ląstelės IP₃ naudoja dviem pagrindiniais keliais fosfolipazės C-beta (PLC-β) ir fosfolipazės C-gama (PLC-γ). Tiek PLC-β, tiek PLC-γ keliai pabrėžia IP₃, kaip antrinės signalinės molekulės, kuri skatina kalcio išsiskyrimą iš viduląstelių atsargų, svarbą, inicijuojant viduląstelių signalų veiksmus. Šie keliai turi skirtingus aktyvavimo būdus ir tolesnius taikinius, todėl ląstelės gali reaguoti į įvairius ekstraląstelinius signalus ir reguliuoti įvairius ląstelinius procesus. Kai pagrindiniai IP₃ kalcio signalizavimo aspektai jau aprašyti, pradedama domėtis molekulės vaidmeniu konkrečiose ląstelių reakcijose (Berridge, 1995).

1.4. Inozitolio trisfosfatas augaluose

Inozitolio 1,4,5-trisfosfato signalizavimo keliai augaluose lyginami su analogiškais keliais gyvūninėse ląstelėse. Nepaisant visų tyrimų įrodymų augaluose apie IP₃ veikiamus kelius negalime teigti, kad poveikio mechanizmai yra vienodi, nes augaluose nėra atrastas homologiškas IP₃ receptorius, kuris atlieka svarbų vaidmenį gyvūninėse ląstelėse inicijuodamas jonų kanalų atsivėrimą (Krinke ir kt., 2007). Inozitolio trisfosfato signalinimas augaluose nėra taip plačiai ištirtas, palyginti su gyvūnais, tačiau yra įrodymų, kad IP₃ signalinimas taip pat atlieka svarbų vaidmenį augalų fiziologijoje. Augaluose IP₃ dalyvauja įvairiuose procesuose, įskaitant hormonų signalinimą, atsaką į stresą ir vystymąsi.

Augaluose pastebėtas IP₃ sukeltas Ca²⁺ išsiskyrimas iš vakuolių (Ranjeva ir kt., 1988), tonoplastų pūslelių (K.S. Schumaker & H. Sze, 1987) ir mikrosomų (Drøbak ir kt., 1988) jau buvo nagrinėtas, tačiau tiesioginis ryšys tarp IP₃ ir kalcio jonų signalizavimo inicijavimo nėra įrodytas.

IP₃ yra susijęs su kelių augalinių hormonų, pavyzdžiui, abscizinės rūgšties (ABA) ir auksino, signalinimo keliais. Pavyzdžiui, ABA gali paskatinti IP₃ susidarymą, todėl padidėja citozolinio kalcio kiekis ir vėliau pasireiškia fiziologinės reakcijos, pvz., žiotelių užsivėrimas vandens trūkumo/sausros metu (Fedoroff, 2002). Fitohormonas auksinas yra svarbus augalų vystymuisi. Inozitolio trisfosfatas yra

susijęs su Ca^{2+} signalizavimu ir kryptingo auksino pernešimo kontrole, kurią vykdo poliniai PIN auksino nešikliai (Zhang ir kt., 2011).

IP_3 taip pat yra susijęs su augalų augimu ir vystymusi. IP_3 dalyvauja įvairiuose procesuose, pavyzdžiui, dulkiadaigio augime, šakniaplaukių susidaryme ir sėklų dygime (Xu ir kt., 2005). Žinoma, kad IP_3 valdomas kalcio signalinimas reguliuoja ląstelių augimą, diferenciaciją ir ląstelių tarpusavio ryšį augalų vystymosi metu.

IP_3 yra susijęs su augalų atsaku į įvairius aplinkos veiksnius, įskaitant sausrą, druskingumą ir patogenus. Manoma, kad jis dalyvauja kalcio valdomuose streso signalinimo keliuose, sukeldamas adaptyvias reakcijas, padedančias augalams prisitaikyti prie esančių nepalankių sąlygų (H. Du, 2011).

Inozitolio trisfosfatas aptiktas kaip endogeninė medžiaga įvairių rūšių dumbliuose ir manoma, kad jis atlieka svarbų vaidmenį jų fiziologijoje ir ląsteliniuose procesuose. Nepaisant morfologinių ir fiziologinių skirtumų tarp dumblių ir aukštesniųjų augalų, IP_3 vaidmuo dumbliuose yra analogiškas. IP_3 dalyvauja dumblių kalcio valdomuose signalų perdavimo keliuose. Panašiai kaip ir kituose organizmuose, IP_3 gali paskatinti kalcio jonų (Ca^{2+}) išsiskyrimą iš viduląstelių saugyklų, pavyzdžiui, endoplazminio tinklo arba vakuolių, ir dėl to keičiasi citozolio kalcio koncentracija. Kalcis yra labai svarbi antrinė signalinė molekulė, reguliuojanti įvairius dumblių ląstelių procesus, įskaitant augimą, fotosintezę ir reakciją į aplinkos dirgiklius.

IP_3 yra susijęs su kalcio jonų išsiskyrimu iš viduląstelių atsargų. Nors konkretus IP_3 dalyvavimas *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialuose nėra išsamiai ištirtas, tikėtina, kad IP_3 veikia kaip antrinė signalinė molekulė ir inicijuoja kalcio išsiskyrimą iš viduląstelių atsargų, pavyzdžiui, endoplazminio tinklo, ir gali prisidėti prie kalcio koncentracijos pokyčių veikimo potencialų metu. Remiantis literatūra, *Chara* dumblių veikimo potencialai, manoma, yra generuojami antrinės signalinės molekulės pagalba. Kol kas nėra aišku, kokia yra ši antrinė signalinė molekulė, bet tai galėtų būti inozitolio trisfosfatas (Beilby ir kt., 2016). IP_3 sukeltas kalcio išsiskyrimas galėtų keisti viduląstelinę kalcio koncentraciją ir galimai daryti įtaką sužadinamumui ir veikimo potencialo savybėms. Viename tyrime su *Nitella* ląstelėmis veikiant IP_3 nustatyta, jog IP_3 padidina ląstelių sužadinamumą (Thiel ir kt., 1990), tačiau kitame analogiškame tyrime medžiagos poveikio ląstelių sužadinamumui nebuvo pastebėta (Tazawa & Kikuyama, 2003).

Nors mūsų supratimas apie IP_3 dumbliuose vis dar tobulėja, yra duomenų, kad jis atlieka svarbų vaidmenį kalcio reguliuojamose signalinimo keliuose, nuo fototaksio priklausomuose procesuose,

reakcijoje į stresą, augime ir vystymesi. Būtina atlikti tolesnius tyrimus, kad būtų išsiaiškinti konkretūs IP₃ signalo komponentai ir mechanizmai skirtingose dumblių grupėse ir atskleistas visas jo funkcijų spektras dumblių biologijoje.

1.5. *Nitellopsis obtusa*

Nitellopsis obtusa yra gėlavandenis makrodumblis geriau žinomas bendrinio pavadinimu žvaigždėtasis maurašakis. Žvaigždėtasis maurašakis morfologiškai primena aukštesniuosius augalus, turi į stiebą panašią centrinę ašį (*thallus*), sudarytą iš pakaitomis išsidėsčiusių ilgų tarpubamblinių ląstelių ir trumpų bamblų. Dumblis užauga iki daugiau kaip 1,5 m ilgio, yra ryškiai permatomos žalios spalvos. Nuo kitų Characeae šeimos dumblių jį lengva atskirti pagal rizoidų ląsteles atskiriančius žvaigždės formos bamblus (**1.5.1 pav.**), kurie leidžia vegetatyviai daugintis.

Nitellopsis obtusa turi ilgas, gana tiesias šakas, išsidėsčiusias menturiškai, kurios iš bamblų išauga smailiu kampu. Ir stiebas, ir šakos yra maždaug 1 mm skersmens. Stiebai gali būti iki 80 cm ar net ilgesni ir sudaryti tankią masę. Aktyvaus augimo metu jie būna šviesiai žalios spalvos. Rizoidai įtvirtina dumblių substrate ir yra permatomi, nes neturi chlorofilo. Augalai būna vyriški arba moteriški. Oogonijos (moteriškos dauginimosi struktūros) susiformuoja viršutinių šakelių pagrinduose, gali būti oranžinių ar raudonų oocitų, kurie padeda atskirti šį dumblių nuo gana panašių muskusinių žolių ir trapiųjų gysločių.



1.5.1 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* žvaigždės formos bamblys. Interneto prieiga prie paveikslo: <https://www.invasivespeciescentre.ca/invasive-species/meet-the-species/invasive-aquatic-plants/starry-stonewort/>

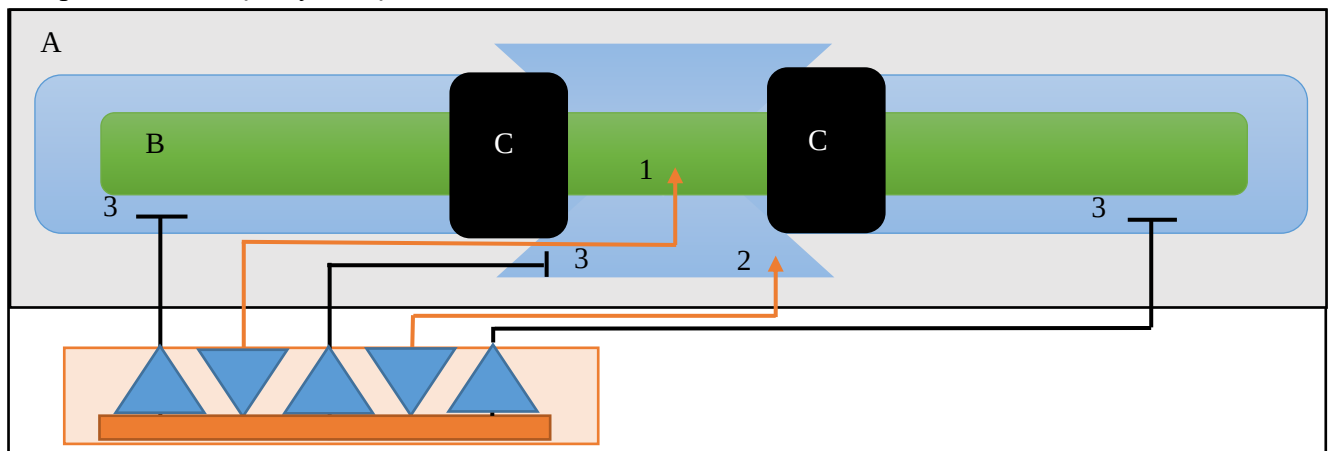
Žvaigždėtasis maurašakis auga gėlame vandenyje iki daugiau kaip 4 m gylio ant minkšto substrato, pavyzdžiui, dumblo, smėlio. Paprastai auga giliame, lėtai tekančiame vandenyje, kur kitų augalų yra nedaug, paprastai netoli prieplaukų. Žvaigždėtasis maurašakis jautriai reaguoja į vandens kokybės pokyčius ir gali būti aplinkos sąlygų indikatorinė rūšis. Jis klesti švariame, gerai deguonimi prisotintame vandenyje (Larkin ir kt., 2018).

Nitellopsis obtusa dėl savo unikalių savybių dažnai naudojamas kaip modelinis organizmas moksliniuose tyrimuose. Jis plačiai tyrinėtas dėl fiziologinių, morfologinių ir vystymosi savybių. Šio makrodumblio tyrimai suteikė žinių apie ląstelių biologiją, citoskeleto dinamiką, jonų pernešimą ir ląstelių tarpusavio ryšį (Findlay, 1970; MacRobbie & Dainty, 1958).

2. TYRIMO METODAI

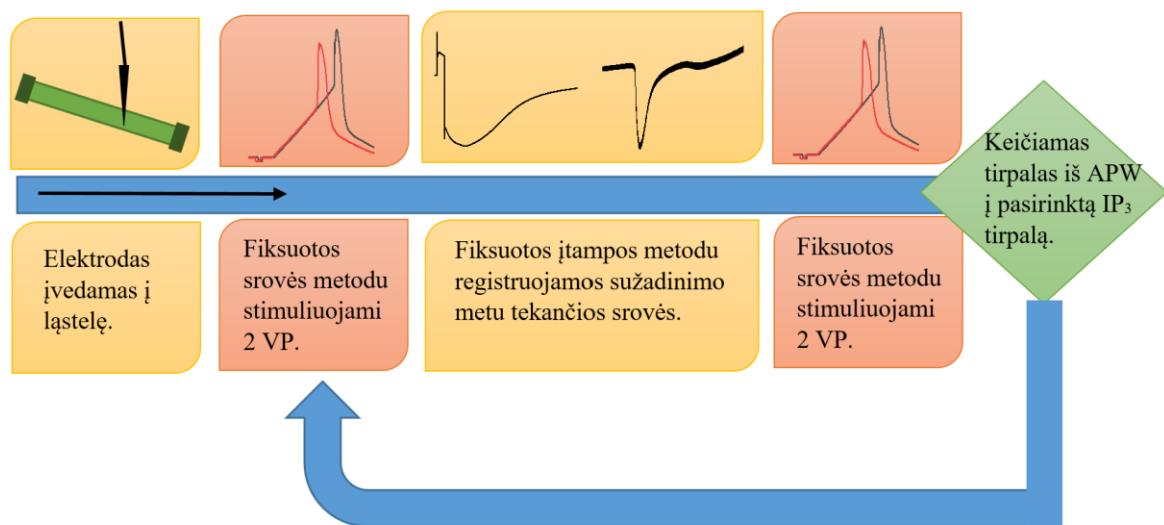
Nitellopsis obtusa ląstelių gniužulai buvo surinkti spalio – lapkričio mėnesiais iš Stankos ežero Trakų rajone. Dumbliai ištraukti iš 4 – 8 metrų gylio ir transportuoti ežero vandenyje. Dumblių ląstelės laboratorijoje laikytos akvariumuose kambario temperatūroje (20 ± 1 °C), užpildtos vandentiekio vandeniu ir apšviestos 12 val. per parą standartiniu apšvietimu ($95 \pm 0,19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dieną prieš eksperimentą tarpubamblinės ląstelės yra atkerpamos nuo gretimų ląstelių. Atskirtos ląstelės sudedamos į kamerėlę, kurioje ląstelės užpilamos kontroliniu tirpalu (APW).

Bioelektriniams signalams registruoti tarpubamblinėse žvaigždėtųjų maurašakių ląstelėse buvo naudota viduląstelinė mikroelektrodinė technika. Taikyti dviejų porų elektrodų fiksuotos įtampos ir fiksuotos srovės metodai. Elektrodų išdėstymas bei registravimo kameros schema vaizduojama (**2.1 pav.**). Naudojant stakles (Sutter Instrument P-1000) buvo gaminami viduląsteliniai mikroelektrodai iš borosilikatinių stiklo kapiliarų (World Precision Instruments). Viduląsteliniai elektrodai pildyti 3 M KCl tirpalu. Referentinis elektrodas pildytas 3 M KCl ir agar – agaru (2,5 %) tirpalu. Laikikliai elektrodams gaminti iš kalomelio (Hg_2Cl_2) ir pildyti 3 M KCl tirpalu. Elektros srovė leista išoriniais chlorsidabriniais elektrodais tarp atskirų kameros dalių. Registavimui naudotas stiprintuvas TEC-10CX (NPI Electronic), analogas-kodas keitiklis Digidata 1440A (Molecular Devices), kontroliuojamas pCLAMP 10.2 (Molecular Devices) programine įranga. Naudojamas diskretizavimo dažnis: 100-1000 Hz, signalo stiprinimas $10\times$. Tirpalų pratekėjimas (~ 1 ml/min) centrinėje kameros dalyje palaikomas naudojant vakuuminį siurbį (Scientifica PPS) ir peristaltinę pompą. Mikroelektrodas į ląstelę įvedamas manipulatoriumi (PatchMan, Eppendorf), stebint pro binokuliarą ($7\times$ didinimas). Mikroelektrodas įprastai įvedamas į vakuolę, taigi, registruojami membranos potencialai atspindi tiek plazmalemos, tiek tonoplasto elektrinį aktyvumą.



2.1 pav. Registravimo kameros principinė schema ir elektrodų išdėstymas: A – organinio stiklo kamera, B – tarpubamblinė ląstelė, C – centrinę kameros dalį izoliuojantys vazelininiai tilteliai, 1 – viduląstelinis stiklinis elektrodas, 2 – referentinis stiklinis elektrodas, 3 – išoriniai stimuliuojamieji elektrodai (Ag/AgCl).

Eksperimentai atliekami dienos metu esant standartiniui apšvietimui ($95 \pm 0,19 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) kambario temperatūroje ($20 \pm 1^\circ\text{C}$). Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* ląstelė paguldoma registruojamoje kameroje. Centrinė kameros dalis iš abiejų pusių izoliuojama vazelino tilteliais. Visos kameros dalys užpildomos kontroliniu tirpalu (APW). Centrinėje kameros dalyje tirpalas perfuzuojamas. Šalia ląstelės centrinėje kameros dalyje tvirtinamas referentinis elektrodas, o viduląstelinis elektrodas į ląstelę įvedamas manipulatoriumi. Po elektrodo įvedimo ląstelė perfuzuojama kontroliniu tirpalu ir laukiama trumpiausiai valandą kol nusistovi ramybės potencialas (RP). Eksperimentai atliekami tik su ląstelėmis, kurių RP buvo neigiamesnis nei -175 mV . Tokį RP turinčios ląstelės po elektrodo įvedimo pasižymi aktyvios protonų pompos būseną, kuri palaiko neigiamą RP aktyviai pernešdamos protonus į užląstelinę erdvę. Bioelektrinių signalų matavimai atlikti kaip nurodyta **2.2 pav.**: trumpais srovės stimulais įvertinama membranos varža, tuomet 2 veikimo potencialai sužadinami nuolatine tolydžiai kylančia srove ($0,02 \mu\text{A/s}$) 5 min. intervalu; kai VP sužadinamas, stimulus nutraukiamas. Po 10 min ramybės periodo taikomas fiksuotos įtampos metodas (VC), po kurio seka ~ 10 min ramybės laikotarpis ir vėl sužadinami 2 VP. Po paskutinių 2 VP sužadinimų praėjus 10-15 min ramybės periodo centrinėje kameros dalyje kontrolinis tirpalas pakeičiamas pasirinktu tirpalu. Pakeitus tirpalą laukiama 30 min ir registravimų serija kartojama.



2.2 pav. Menturdumblio tarpubamblinės ląstelės elektrinių signalų registravimo eiga. Po elektrodo įvedimo laukiama mažiausiai valandą, tuomet kartojamos identiškos registravimo serijos. Viena registravimo serija susideda iš 2 VP (5 min intervalais.), po to 10 min ramybės periodo ir po jo seka fiksuotos įtampos metodu registruojamos įtekančios srovės sužadinimo metu. Tada seka 5 min ramybės periodas po to fiksuotos įtampos metodu matuojamas maksimalus membranos potencialo laidumas. Toliau seka 10 min. ramybės periodas, tuomet stimuliuojami 2 VP. Praėjus 10 min. ramybės periodui centrinėje kameros dalyje tirpalas keičiamas į pasirinktą ir ląstelė ramybės būsenoje paliekama 30 min. Vieno eksperimento metu atliekamos 2-3 registravimų serijos.

Naudoti tirpalai

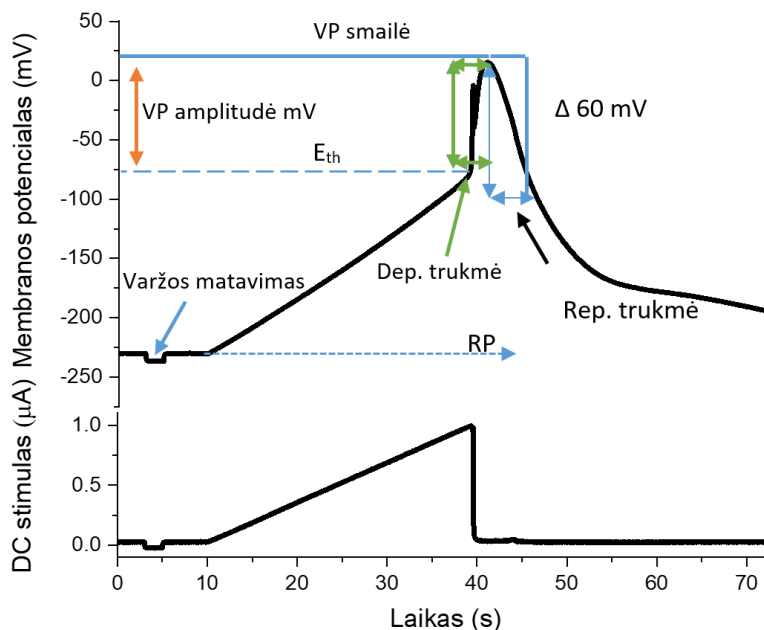
Kontrolinis tirpalas: APW (0,1 mM CaCl_2 , 0,1 mM KCl, 1,0 mM NaCl, 3 mM TRIS ir HEPES naudojamas sureguliuoti pH iki 7,2). IP_3 75 μM ir 150 μM buvo naudoti tyrimams. IP_3 ištirpintas APW tirpale.

Menturdumblio ląstelės buvo veikiamos šiais tirpalais ir jų koncentracijomis:

- IP_3 75 μM ;
- IP_3 150 μM .

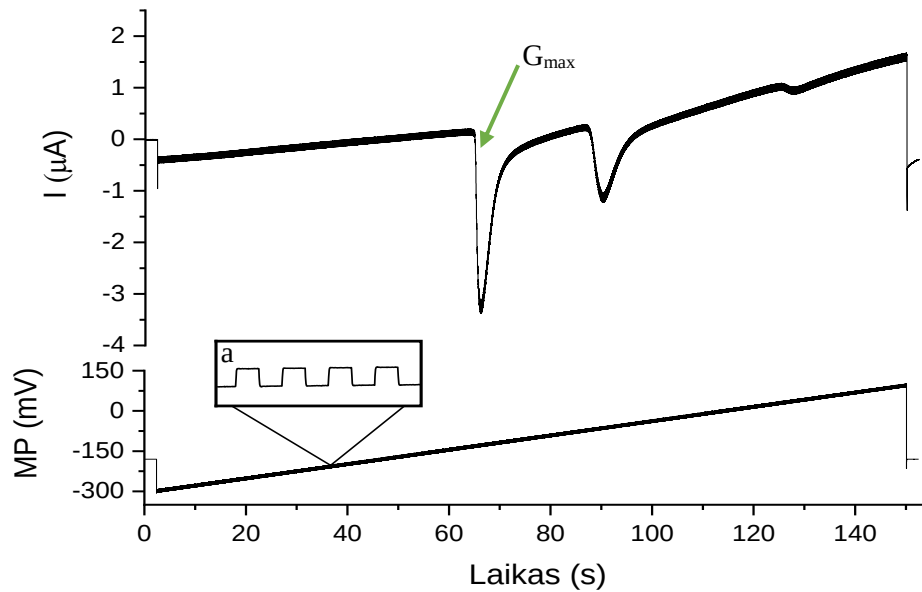
Vertinti elektrofiziologiniai parametrai (**2.3 pav**):

- Ramybės potencialas vertintas prieš sukeliant VP.
- Membranos laidumas vertintas ląstelę stimuliuojant trimis 2 s trukmės hiperpolarizuojančiais srovės impulsais prieš sukeliant VP.
 - VP sužadinimo slenkstis.
 - VP smailė.
 - VP depolarizacijos trukmė vertinta kaip laiko tarpas nuo VP sužadinimo slenksčio iki VP smailės.
 - VP repolarizacijos trukmė vertinta kaip laiko tarpas tarp VP smailės ir per 60 mV repolarizavusio membranos potencialo vertės
 - VP amplitudė.



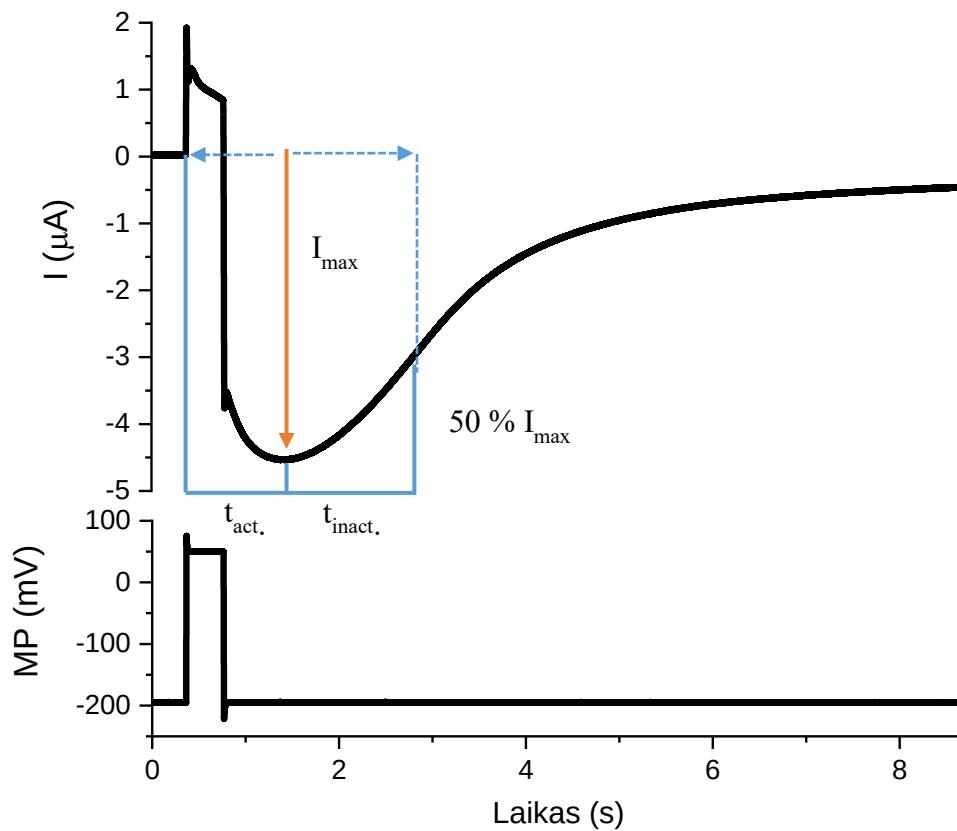
2.3 pav. Veikimo potencialo parametrai. RP – ramybės potencialas, Rep. trukmė – repoliarizacijos trukmė, kai membranos potencialas repoliarizuojasi per 60 mV nuo smailės, Dep. trukmė – depoliarizacijos trukmė nuo sužadinimo slenksčio iki smailės, E_{th} – VP sužadinimo slenksstis, VP amplitudė – VP smailės ir VP slenksčio verčių skirtumas, VP smailė – didžiausia VP vertė, varžos matavimas – atliekamas prieš sužadinant ląstelės membraną.

Fiksuotos įtampos metodu registruotos įtekančios srovės sužadinimo metu. Remiantis (Tsutsui ir kt., 1987) nurodymais vertintas maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu G_{max} (**2.4 pav**). Ląstelių membranos potencialo vertė buvo tolygiai depoliarizuojama intervale nuo -300 mV iki 150 mV (greitis 3 mV/s). Šis signalas buvo moduluotas trumpais 0,1 s 10 mV amplitudės kvadratiniais impulsais, leidusiais nustatyti membranos laidumą. Maksimalus membranos laidumas sužadinimo metu skaičiuotas į membranos ploto vienetą.



2.4 pav. Membranos maksimalaus laidumas registravimo protokolai. Fiksuotos įtampos metodu membranos potencialas 150 s tolygiai depoliarizuojamas nuo -300 mV iki 150 mV. Signalas moduluotas trumpais 0,1 s 10 mV amplitudės kvadratiniais impulsais (a). Membranos sužadavimo metu stebimas maksimalus laidumas – G_{max} .

Fiksuotos įtampos metodu taip pat registruotos sužadavimo metu tekančios srovės laikinės charakteristikos ir amplitudės (**2.5 pav.**). Remiantis nurodymais (Zherelova ir kt., 2009) membranos potencialas fiksuojamas ties ląstelės ramybės potencialu, tuomet trumpu 0,4 s impulsu membranos potencialo vertę fiksuojant ties 50 mV sužadinama ląstelės membrana. Impulsui pasibaigus palaikoma ląstelės membranos ramybės potencialo vertė likusias 9,6 s, kad būtų galima stebėti sužadavimo metu tekančio srauto aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmes.



2.5 pav. Sužadinimo metu tekančio srauto registravimo protokolas. Membranos potencialas fiksuojamas ties ramybės potencialo verte, tuomet trumpu 0,4 s impulsu membranos potencialo vertę fiksuojant ties 50 mV sužadinama ląstelės membrana. Stimului pasibaigus palaikoma ląstelės membranos ramybės potencialo vertė. Vertinami parametrai: $I_{\max}$ – maksimalaus srauto amplitudė; $t_{\text{act.}}$ – srauto aktyvacijos trukmė; $t_{\text{inact.}}$ – srauto inaktyvacijos trukmė.

Vertinti parametrai:

- $I_{\max}$ – maksimalaus srauto amplitudė;
- $t_{\text{act.}}$ – srauto aktyvacijos trukmė – laiko atkarpa nuo sužadinančio impulso pradžios iki maksimalios srauto vertės;
- $t_{\text{inact.}}$ – srauto inaktyvacijos trukmė – laiko atkarpa, per kurią srauto amplitudė sumažėja 50 % nuo maksimalios vertės.

Statistiniai metodai

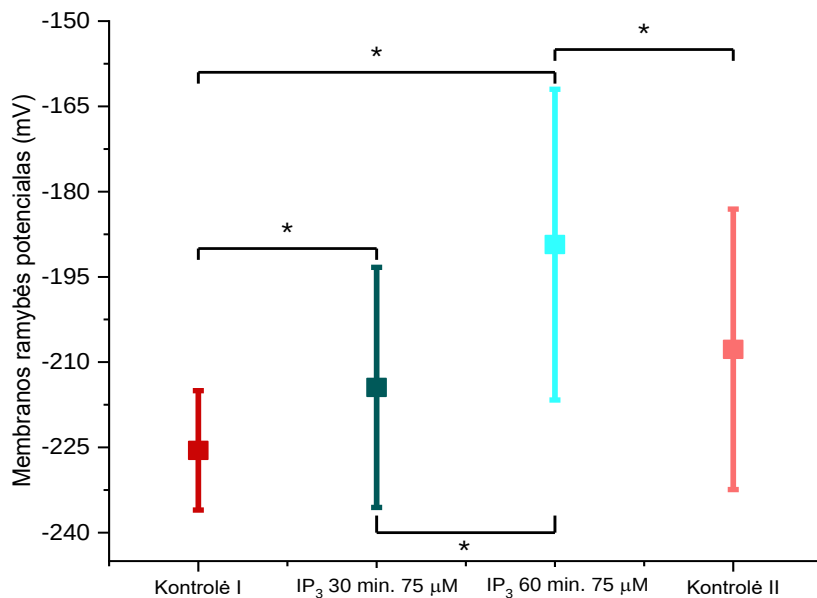
Eksperimentai tiriant inozitolio trisfosfato 75 μM ir 150 μM koncentracijų 30 min ir 60 min poveikį buvo kartojami 4-9 kartus. Duomenų normalumui įvertinti naudotas Shapiro-Wilk'o testas. Parametrų vertės po IP_3 poveikio buvo lyginamos su vertėmis kontroliniame tirpale toje pačioje ląstelėje. Vertinti pirmi fiksuotos srovės metodu stimuliuoti veikimo potencialai. Porinis Stjudento t – testas buvo naudotas įvertinti pokyčius tarp normalių duomenų. Pokyčiams duomenyse, kuriems buvo atmesta normalumo prielaida, taikytas Wilksono testas. Visais atvejais skirtumai laikyti statistiškai reikšmingais, kai $p < 0,05$, paveikslėliuose žymėti žvaigždutėmis, n – eksperimentų skaičius. Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis. Duomenų apdorojimas ir statistinė analizė atlikta naudojantis:

- Clampfit (Molecular Devices Corporation),
- OriginPro (OriginLab Corporation).

3. REZULTATAI

3.1. Inozitolio trisfosfato 75 μM poveikis membranos ir VP parametrams

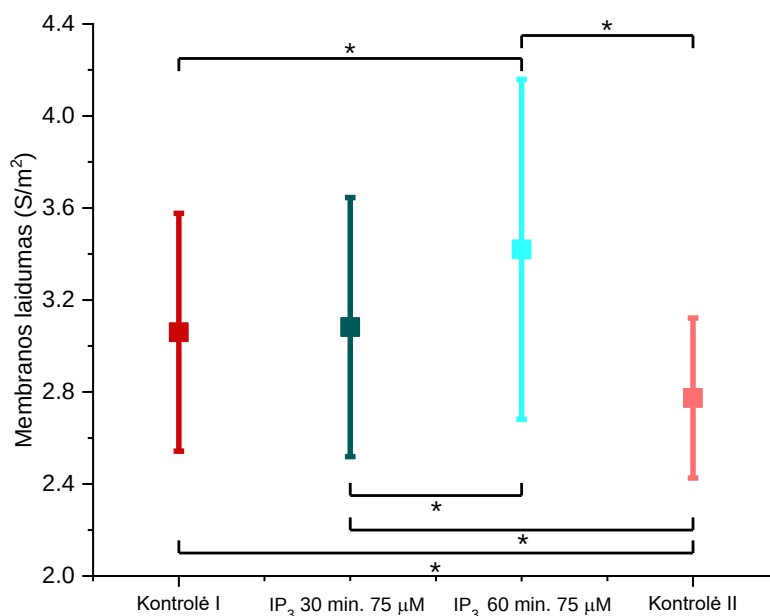
75 μM 30 min. ir 60 min IP_3 tirpalo poveikis *Nitellopsis obtusa* ląstelių elektrinių signalų parametrams buvo tiriamas kaip nurodyta tyrimų metodų skyriuje. 75 μM 30 min IP_3 poveikis depoliarizavo ląstelės membranos ramybės potencialą nuo $-225,52 \pm 17,15$ mV iki $-214,44 \pm 17,15$ mV ($p = 0,03$). 75 μM 60 min. IP_3 poveikis dar labiau depoliarizavo ląstelės membranos ramybės potencialą iki $-189,32 \pm 27,39$ mV ($p < 0,01$). Membranos ramybės potencialas taip pat statistiškai reikšmingai skyrėsi priklausomai nuo medžiagos poveikio trukmės ($p < 0,01$). Po 60 min. poveikio 75 μM IP_3 pakeitus tirpalą atgal į kontrolinį (APW) buvo pastebėtas membranos ramybės potencialo neigiamėjimas iki $-207,75 \pm 27,88$ mV ($p = 0,04$). Taigi, tiek 30 min., tiek 60 min poveikis 75 μM IP_3 tirpalu sukėlė reikšmingus pokyčius membranos ramybės potencialui (**3.1.1 pav.**)



3.1.1 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos ramybės potencialo vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP_3 tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus kai $p < 0,05$, $n = 9$.

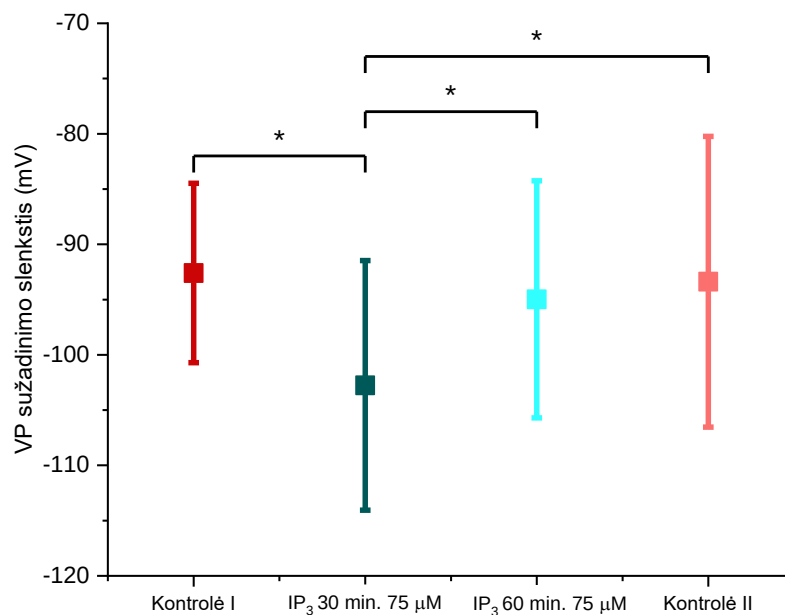
75 μM 60 min IP_3 poveikis padidino membranos laidumą ramybės būsenoje nuo $3,06 \pm 0,64$ S/m² iki $3,42 \pm 0,64$ S/m² ($p = 0,04$). Membranos laidumas ląsteles veikiant ilgiau negu 75 μM 30 min IP_3 taip

pat reikšmingai padidėjo nuo $3,08 \pm 0,66 \text{ S/m}^2$ iki $3,42 \pm 0,66 \text{ S/m}^2$ ($p = 0,03$). Ląsteles po poveikio $75 \mu\text{M}$ IP_3 sugrąžinus į kontrolines sąlygas, pastebėtas reikšmingas laidumo sumažėjimas nuo $3,10 \pm 0,50 \text{ S/m}^2$ iki $2,77 \pm 0,50 \text{ S/m}^2$ po 30 min. poveikio ($p < 0,01$) ir dar didesnis laidumo sumažėjimas nuo $3,41 \pm 0,67 \text{ S/m}^2$ iki $2,77 \pm 0,67 \text{ S/m}^2$ po 60 min poveikio ($p < 0,01$). Taip pat buvo pastebėta, kad $75 \mu\text{M}$ IP_3 tirpalu paveiktų *Nitelloopsis obtusa*, gražintų į kontrolines sąlygas, membranos laidumas yra mažesnis negu prieš atliekant eksperimentą. Po poveikio gražintų ląstelių laidumas sumažėjo nuo $3,07 \pm 0,47 \text{ S/m}^2$ iki $2,77 \pm 0,47 \text{ S/m}^2$ ($p = 0,02$) (**3.1.2 pav.**).



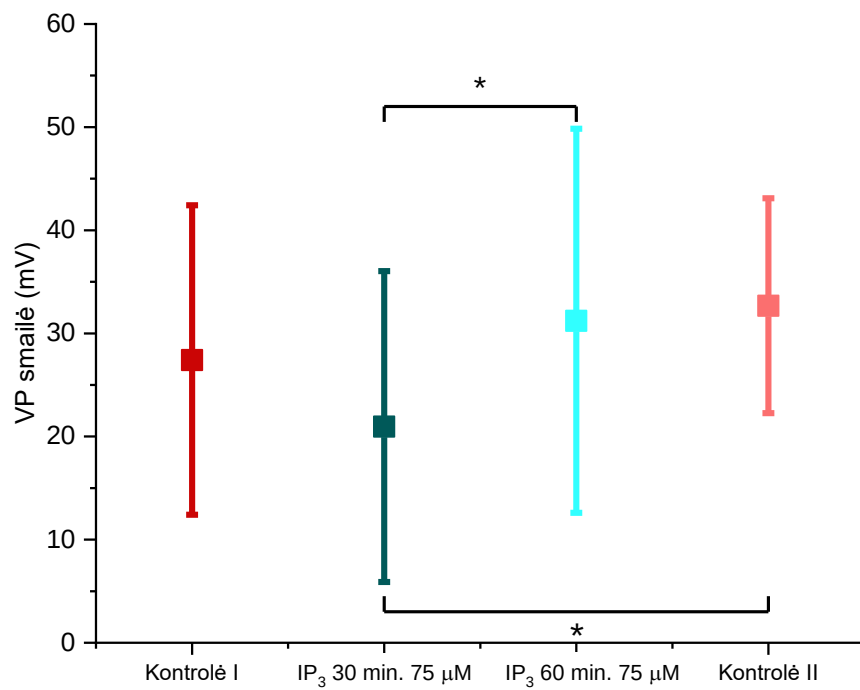
3.1.2 pav. Menturdumblio *Nitelloopsis obtusa* membranos laidumo vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus $75 \mu\text{M}$ IP_3 tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus kai $p < 0,05$, $n = 9$.

$75 \mu\text{M}$ IP_3 tirpalo 30 min poveikis reikšmingai hiperpolarizavo VP sužadinimo slenksčius. Lyginant su ląstelėmis prieš $75 \mu\text{M}$ IP_3 30 min poveikį slenkstis buvo hiperpolarizuotas nuo $-92,59 \pm 10,88 \text{ mV}$ iki $-102,76 \pm 10,88 \text{ mV}$ ($p = 0,04$). Lyginant su 30 min poveikiu, paveikus ląsteles $75 \mu\text{M}$ IP_3 tirpalu 60 min slenkstis depolarizavosi iki $-94,97 \pm 11,41 \text{ mV}$ ($p = 0,04$). Ši vertė reikšmingai nesiskyrė nuo VP slenkščio vertės kontrolinėmis sąlygomis. Ląsteles grąžinus į kontrolines sąlygas po $75 \mu\text{M}$ IP_3 poveikio VP sužadinimo slenkstis depolarizuojausi nuo $-103,66 \pm 13,15 \text{ mV}$ iki $-93,3 \pm 13,15 \text{ mV}$ ($p < 0,01$) (**3.1.3 pav.**).



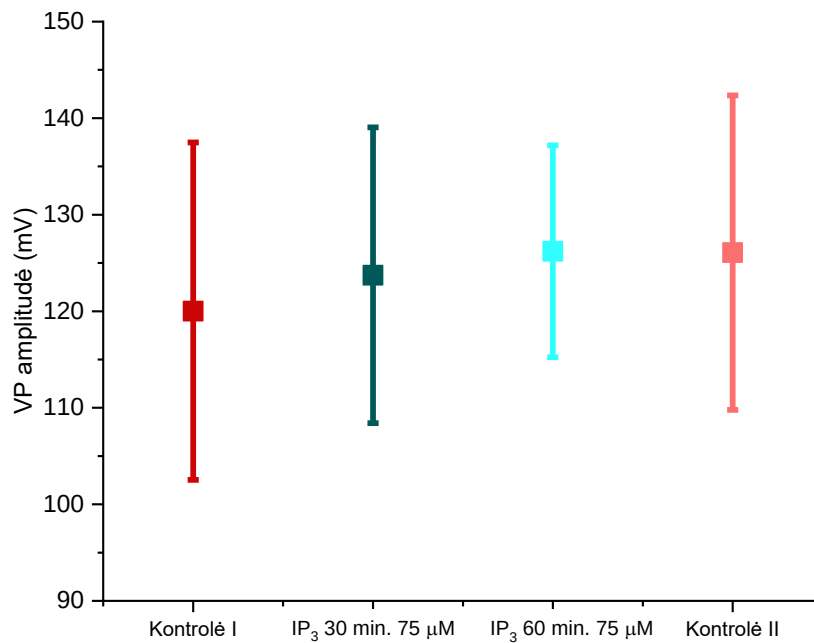
3.1.3 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* VP sužadavimo slenkščio vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus kai $p < 0,05$, $n = 9$.

VP smailė paveikus 75 μM IP₃ tirpalu padidėjo nuo $20,95 \pm 17,26$ mV iki $31,22 \pm 17,26$ mV ($p = 0,03$), kuomet poveikio trukmė buvo 60 min. Statistiškai reikšmingas VP smailės padidėjimas pastebėtas lyginant 75 μM IP₃ 30 min poveikį ir ląsteles po poveikio grąžinus į kontrolines sąlygas. VP smailė padidėjo nuo $18,30 \pm 13,90$ mV iki $32,68 \pm 13,90$ mV ($p < 0,01$) (**3.1.4 pav.**).



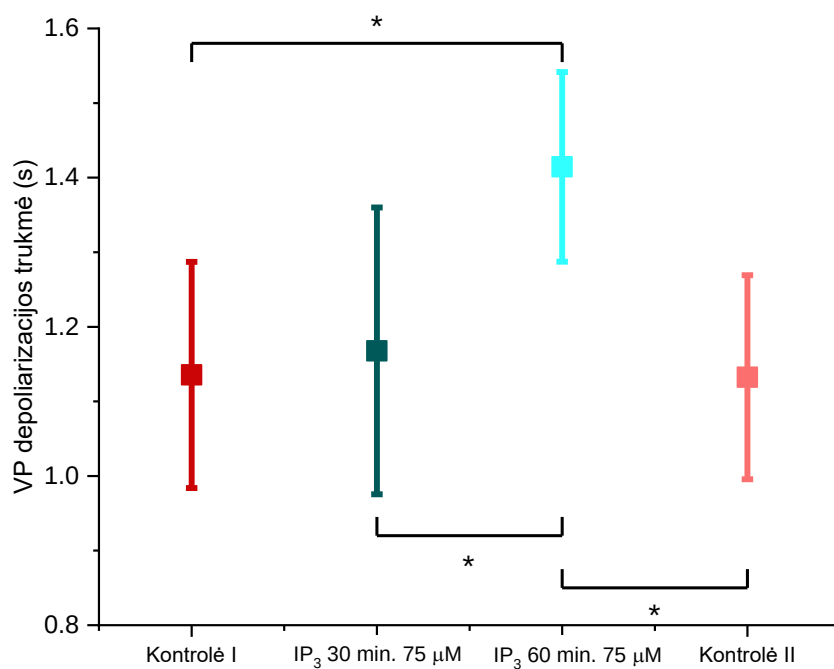
3.1.4 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* VP smailės vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus kai $p < 0,05$, $n = 9$.

Vertinant VP amplitudę kontrolinėse sąlygose ir paveikus 75 μM IP₃ tirpalu 30 min ir 60 min, jokio poveikio nepastebėta (**3.1.5 pav.**).



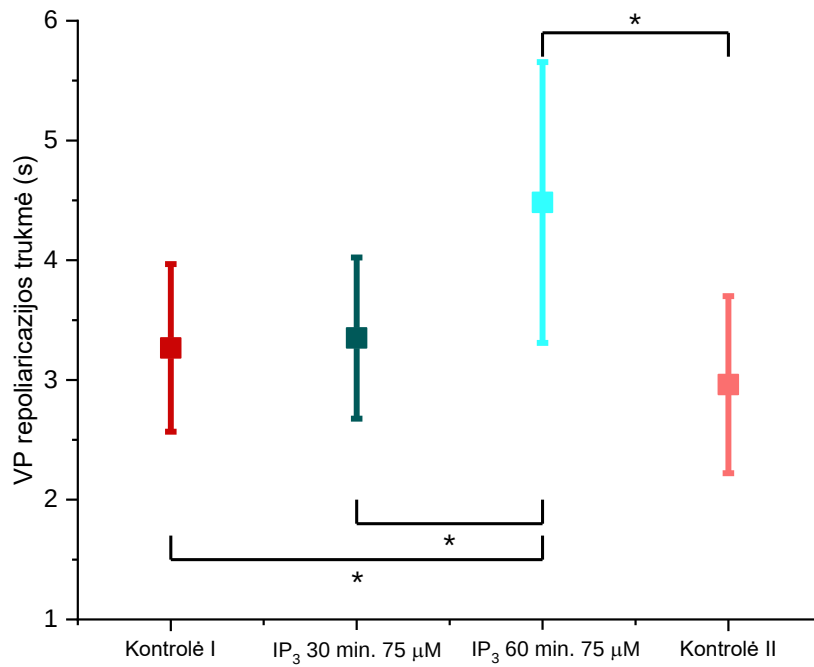
3.1.5 pav. Menturdumblio *Nitelloopsis obtusa* VP amplitudės vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis n = 9.

Kontrolinėse sąlygose paveikus ląsteles 75 μM IP₃ 60 min tirpalu VP depoliarizacijos fazės trukmė reikšmingai pailgėjo nuo $1,13 \pm 0,19$ s iki $1,41 \pm 0,19$ s ($p < 0,01$). Ši vertė taip pat buvo ilgesnė už vertę, užregistruotą ląstelę gražinus į kontrolines sąlygas: depoliarizacijos trukmė sutrumpėjo iki $1,42 \pm 0,19$ s ($p < 0,01$). Ląsteles veikiant ilgiau nei 30 min 75 μM IP₃ tirpalu depoliarizacijos trukmė pailgėjo nuo $1,16 \pm 0,20$ s iki $1,41 \pm 0,20$ s ($p < 0,01$) (**3.1.6 pav.**).



3.1.6 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* VP depoliarizacijos trukmės vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus kai $p < 0,05$, $n = 9$.

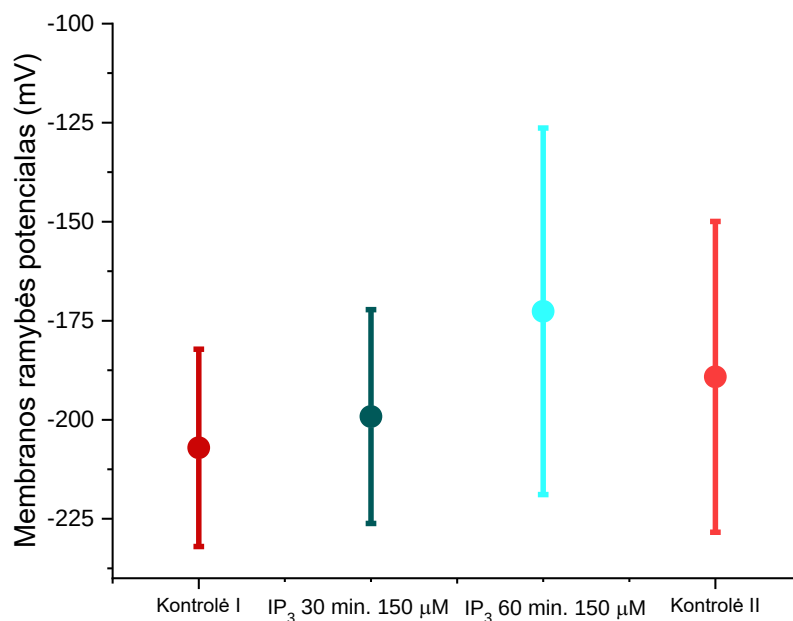
VP repoliarizacijos fazės trukmė paveikus ląsteles 75 μM IP₃ tirpalu 60 min reikšmingai pailgėjo nuo $3,26 \pm 1,12$ s iki $4,48 \pm 1,12$ s ($p = 0,02$) lyginant su ląstelių duomenimis kontrolinėse sąlygose prieš poveikį. Ilgesnis nei 30 min IP₃ poveikis reikšmingai prailgino repoliarizacijos trukmę nuo $3,35 \pm 1,09$ s iki $4,48 \pm 1,09$ s ($p < 0,01$) (**3.1.7 pav.**)



3.1.7 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* VP repoliarizacijos trukmės vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus kai $p < 0,05$, $n = 9$.

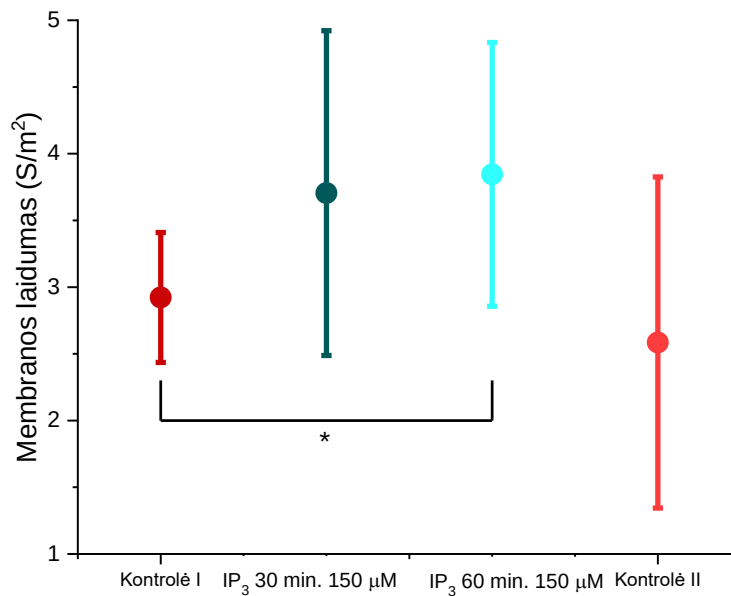
3.2 Inozitolio trisfosfato 150 μM poveikis membranos ir VP parametrams

Padidinę IP₃ koncentraciją stebėjome ar poveikis suintensyvės paveikus ląsteles. Membranos ramybės potencialui IP₃ 150 μM poveikis tiek 30 min tiek 60 min reikšmingo pokyčio nesukėlė (**3.2.1 pav**).



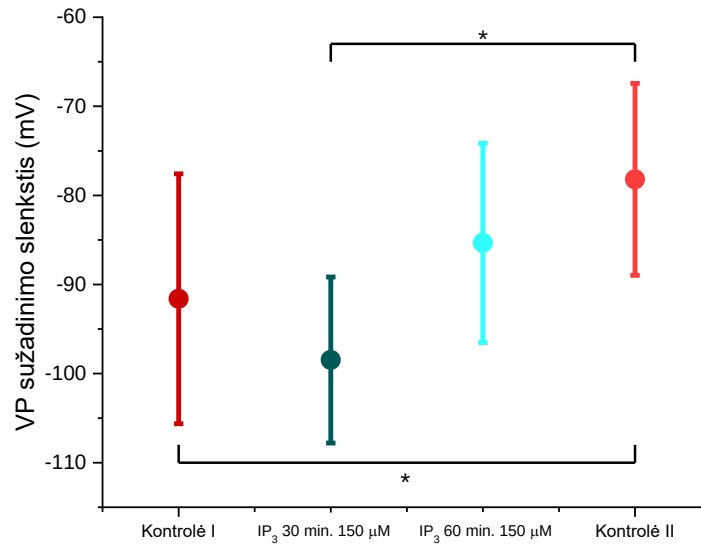
3.2.1 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos ramybės potencialo vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis n = 4.

Veikiant ląsteles 150 μM IP₃ tirpalu 60 min pastebėtas membranos laidumo padidėjimas nuo $2,92 \pm 0,48 \text{ S/m}^2$ iki $3,84 \pm 0,48 \text{ S/m}^2$ ($p = 0,03$) (**3.2.2 pav.**).



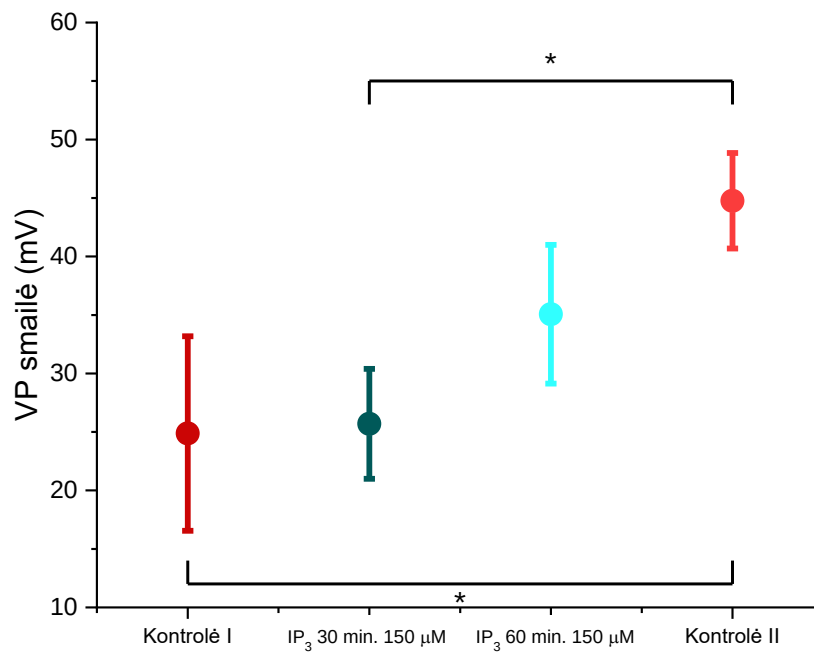
3.2.2 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos laidumo vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 µM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus kai $p < 0,05$, $n = 4$.

Nors tarp kontrolinių sąlygų 150 µM IP₃ tirpalo poveikio reikšmingų skirtumų neaptikta, lyginant VP sužadavimo slenksčio vertę po 150 µM IP₃ tirpalo 30 min. poveikio su verte, užregistruota ląstelės grąžinus į kontrolinį tirpalą, stebėta VP sužadavimo slenksčio depoliarizacija nuo $-98,47 \pm 11,49$ mV iki $-78,19 \pm 11,49$ mV ($p = 0,03$). Aptikta, kad VP sužadavimo slenksčiai depoliarizavosi nuo $-78,19 \pm 6,58$ mV iki $-91,60 \pm 6,58$ mV ($p = 0,02$) lyginant vertes kontrolinėmis sąlygomis prieš IP₃ 150 µM tirpalo poveikį ir po jo (**3.2.3 pav**).



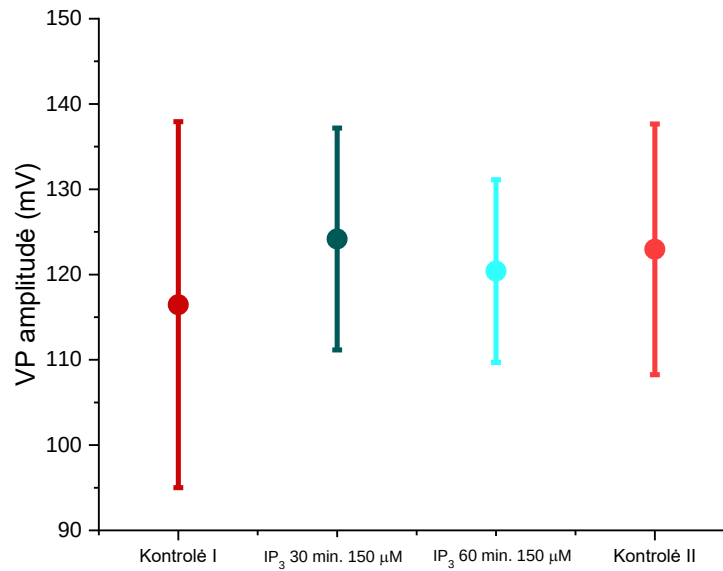
3.2.3 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* VP sužadavimo slenkščio vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus kai $p < 0,05$, $n = 4$.

VP smailės vertės nebuvo paveiktos 150 μM IP₃ tirpalo, lyginant su kontrolinėmis sąlygomis. Vis dėlto, veikimo potencialo smailė reikšmingai padidėjo lyginant 150 μM IP₃ tirpalu 30 min paveiktas ląsteles ir ląsteles, grąžintas į kontrolines sąlygas. VP smailė padidėjo nuo $25,69 \pm 4,08$ mV iki $44,76 \pm 4,08$ mV ($p < 0,01$). Paveikus ląsteles 150 μM IP₃ tirpalu poveikis buvo negrįžtamas ir smailės vertė padidėjo nuo $24,86 \pm 6,57$ mV iki $-44,76 \pm 6,57$ mV ($p < 0,01$) (**3.2.4 pav.**).



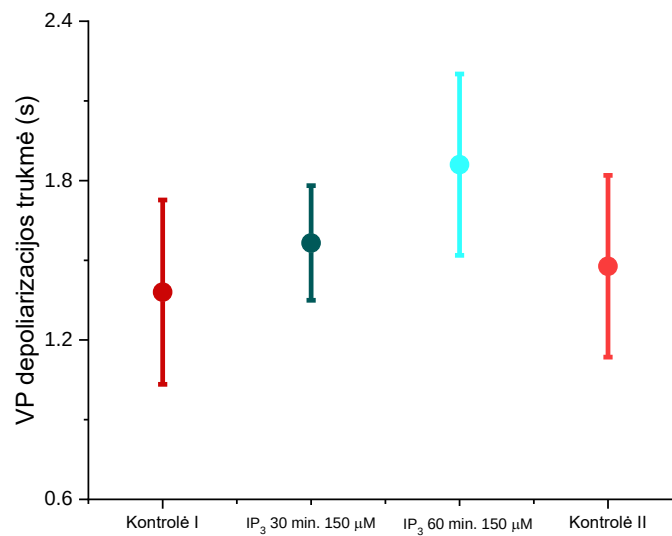
3.2.4 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* VP smailės vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis. Žvaigždutės žymi reikšmingus skirtumus kai $p < 0,05$, $n = 4$.

150 μM IP₃ tirpalas veikiant tiek 30 min, tiek 60 min nesukėlė jokio poveikio veikimo potencialo amplitudei (3.2.5 pav.).



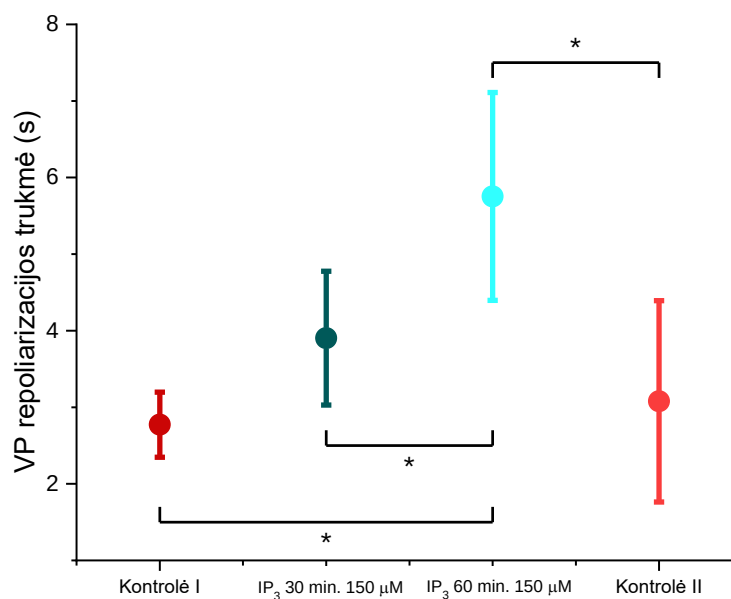
3.2.5 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* VP amplitudės vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μM IP₃ tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis n = 4.

Veikimo potencialo depoliarizacijos trukmei 150 μM IP₃ tirpalas reikšmingo poveikio neturėjo (**3.2.6 pav.**)



3.2.6 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* VP depoliarizacijos trukmė kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μM IP_3 tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis $n = 4$.

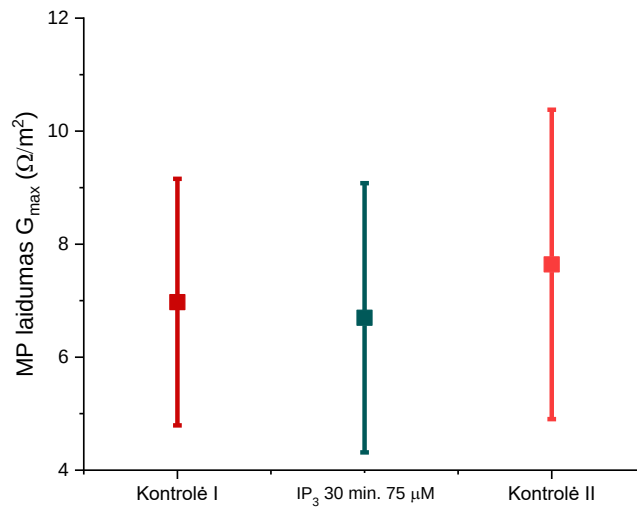
IP_3 150 μM tirpalu veikiant ląsteles 60 min repoliarizacijos trukmė pailgėjo nuo $2,77 \pm 1,35$ s iki $5,75 \pm 1,35$ s ($p = 0,01$) lyginant su ląstelėmis esančiomis kontrolinėmis sąlygomis. Reikšmingai pailgėjo repoliarizacijos trukmė ląsteles paveikus IP_3 150 μM tirpalu ilgiau nei 30 min. IP_3 150 μM 60 min poveikis buvo grįžtamas ir gražintų ląstelių į kontrolines sąlygas repoliarizacijos trukmė sutrumpėjo nuo $5,75 \pm 1,31$ s iki $3,07 \pm 1,31$ s ($p < 0,01$) (**3.2.7 pav.**).



3.2.7 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* VP repoliarizacijos trukmė kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μM IP_3 tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis $n = 4$.

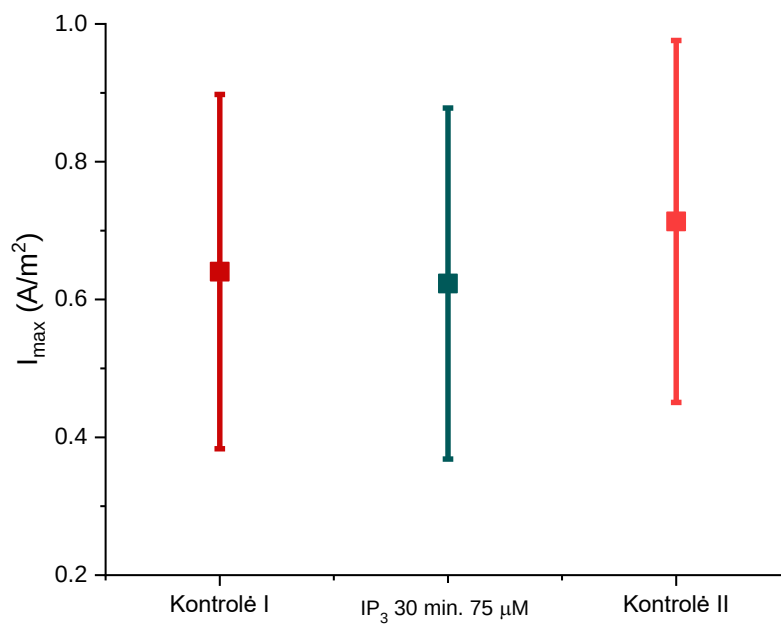
3.3. IP_3 75 μM 30 min poveikis sužadavimo metu tekančio srauto parametrams

Maksimaliam membranai laidumui 75 μM 30 min IP_3 poveikis nesukėlė jokių reikšmingų pokyčių (**3.3.1 pav.**).



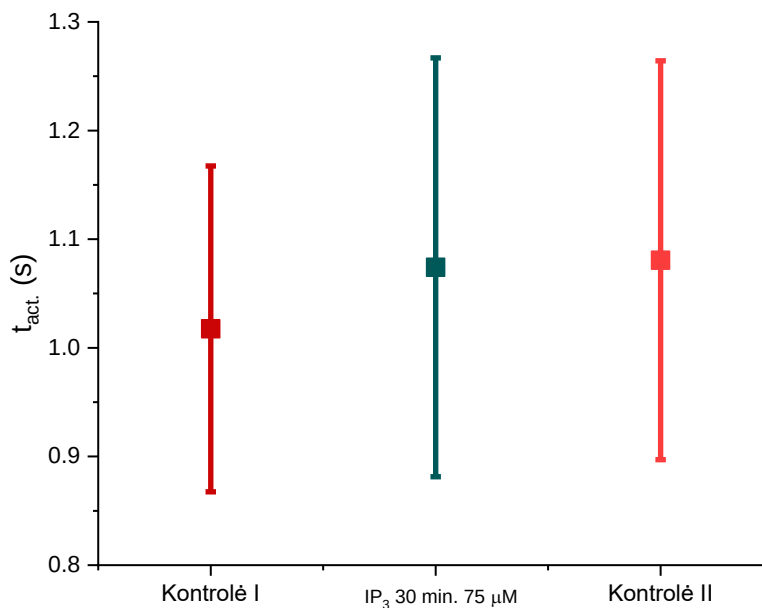
3.3.1 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos laidumo sužadavimo metu maksimalios vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP_3 tirpalu (poveikio trukmė 30 min ir 60 min). Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis $n = 9$.

Inozitolio trisfosfato 75 μM 30 min poveikis neturėjo įtakos maksimaliai srauto amplitudei (**3.3.2 pav.**).

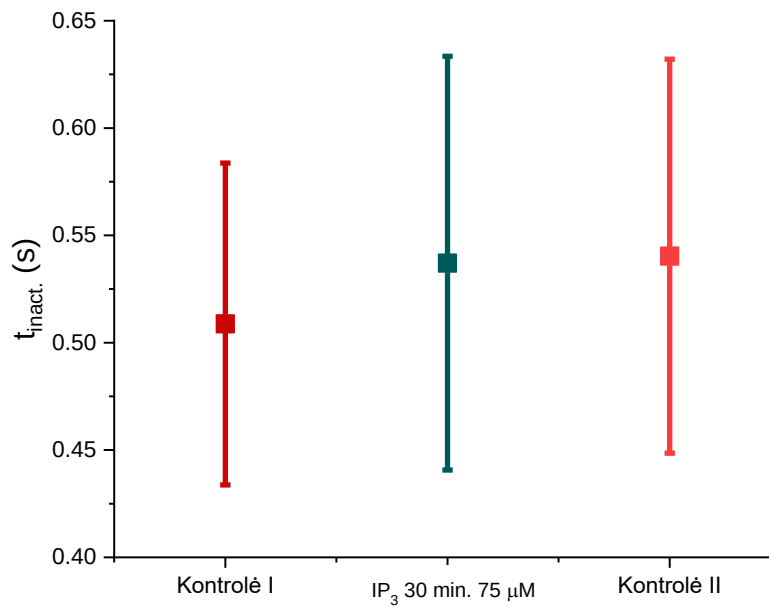


3.3.2 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* maksimalaus srauto amplitudės vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP_3 tirpalu 30 min. Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis $n = 9$.

Nepastebėtas 75 μM IP_3 tirpalo 30 min poveikis ir sužadavimo metu tekančio srauto aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmėms (**3.3.3 pav.**)(**3.3.4 pav.**).



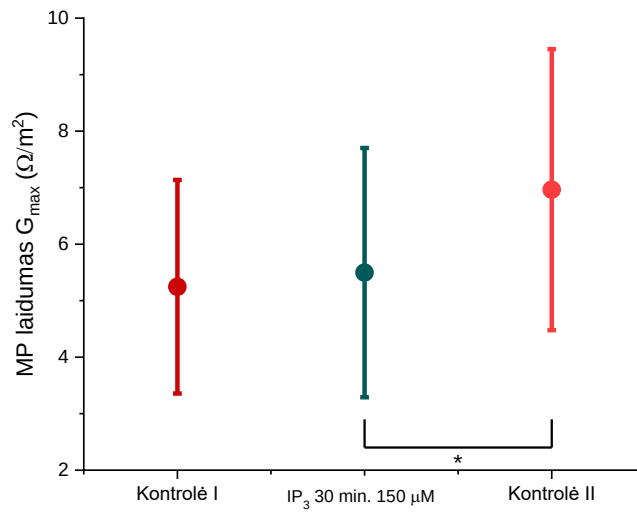
3.3.3 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos srauto aktyvacijos trukmė kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP_3 tirpalu 30 min. Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis $n = 9$.



3.3.4 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos srauto inaktyvacijos trukmė kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 75 μM IP₃ tirpalu 30 min. Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis n = 9.

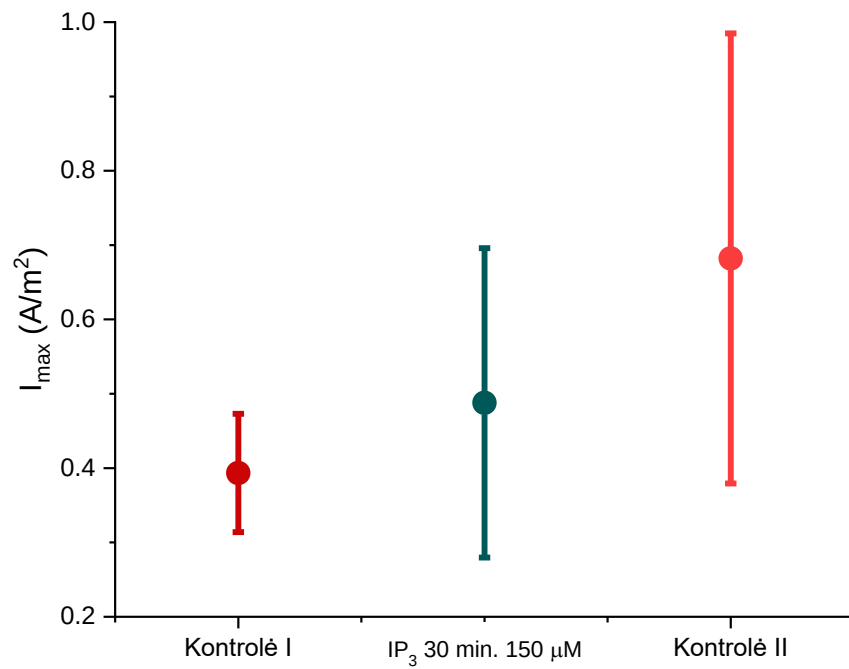
3.4. IP₃ 150 μM 30 min poveikis sužadavimo metu tekančio srauto parametrams

Ląsteles 30 min paveikus 150 μM IP₃ tirpalu poveikis membranos maksimaliam laidumui sužadavimo metu pasirodė esąs negrįžtamas: maksimalus membranos laidumas sužadavimo metu reikšmingai padidėjo nuo $5,49 \pm 2,20$ S/m² iki $6,96 \pm 2,20$ S/m² ląsteles grąžinus į kontrolines sąlygas.



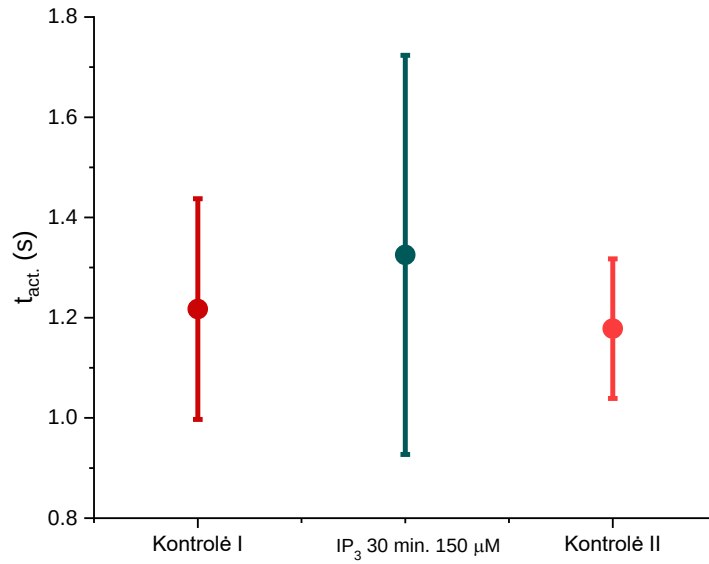
3.3.3 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos maksimalaus laidumo sužadavimo metu vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μM IP_3 tirpalu 30 min. Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis $n = 4$. Žvaigždutėmis pažymėti reikšmingi skirtumai.

150 μM IP_3 30 min. poveikis neturėjo reikšmingos įtakos maksimalaus srauto sužadavimo metu amplitudei (**3.3.4 pav.**)

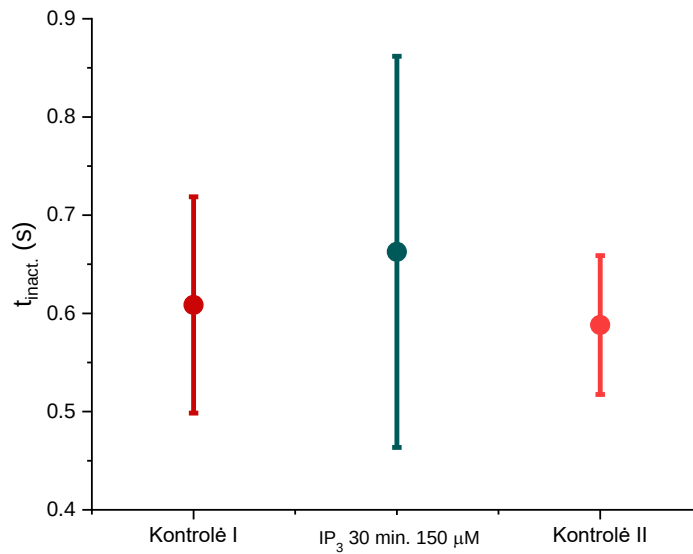


3.3.4 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos maksimalaus laidumo vertės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μM IP₃ tirpalu 30 min. Duomenys pateikiami kaip vidurkis ± standartinis nuokrypis n = 4.

Įvertinus registruotas membranos sužadavimo metu tekančio srauto aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmes veikiant ląsteles 150 μM IP₃ tirpalu 30 min. reikšmingų pokyčių nepastebėta (**3.3.5 pav.**)(**3.3.6 pav.**).



3.3.5 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos sužadavimo metu tekančio srauto aktyvacijos trukmės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μ M IP₃ tirpalu 30 min. Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis $n = 4$.



3.3.5 pav. Menturdumblio *Nitellopsis obtusa* membranos sužadavimo metu tekančio srauto inaktyvacijos trukmės kontrolinėmis sąlygomis (APW) ir paveikus 150 μ M IP₃ tirpalu 30 min. Duomenys pateikiami kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis $n = 4$.

4. REZULTATŲ APTARIMAS

Kalcio kanalai yra labai svarbūs augalų kalcio signalų komponentai, leidžiantys įtekėti kalcio jonams į citoplazmą iš ekstraląstelinės erdvės arba iš viduląstelių saugyklų. Šiame tyrime augalines *Nitellopsis obtusa* ląsteles veikė medžiaga, kuri gyvūninėse ląstelėse yra atsakinga už Ca^{2+} išskyrimą iš ląstelės saugyklų. Kadangi VP yra inicijuojamas kalcio jonų koncentracijos citoplazmoje padidėjimo, kaip buvo tikėtasi, IP_3 hiperpolarizavo VP sužadinimo slenkstį, kas rodo, jog IP_3 aktyvuoja kalcio kanalus. Spėjama, kad medžiagos, kurios hiperpolarizuoja VP sužadinimo slenkstį (pvz. aminorūgštys) veikia per būtent kalcio kanalų aktyvaciją (Lapeikaite ir kt., 2020). Hiperpolarizuotas VP sužadinimo slenkstis lemia ląstelės didesnę sužadinamumą. Nors *Nitellopsis obtusa* makrodumbliai neturi homologinių gyvūnams IP_3 receptorių, tačiau įvertinti parametrai, kuriais atspindimas Ca^{2+} kanalų aktyvumas, todėl tikėtina, kad IP_3 gali veikti kaip antrinė signalinė molekulė veikianti panašius dar molekulinės biologijos metodais neidentifikuotus augalinius IP_3 receptorių.

Tikėtina, kad IP_3 neveikia chloro kanalų, nes nepastebėjome reikšmingų VP amplitudžių ar membranos laidumo G_{max} , registruoto fiksuotos įtampos metodu, pokyčių.

IP_3 poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių ramybės potencialui ir membranos laidumui bei elektrinių signalų laikinoms charakteristikoms galima būtų paaiškinti IP_3 sąveika su K^+ kanalais ir / arba H^+ -ATPazėmis, tačiau vienareikšmiškų išvadų daryti negalima.

Medžiagos veikimu įsitikinome pastebėję pakitusias VP parametrų vertes (pvz. VP sužadinamumo slenkstį), tačiau kaip veikia IP_3 augalinėse ląstelėse nėra aišku. Tirtos medžiagos poveikio priklausomybė nuo koncentracijos nebuvo nustatyta, tačiau pastebėta, kad 1 *Nitellopsis obtusa* ląstelė iš 9, paveikta 75 μM IP_3 tirpalu bei 1 ląstelė iš 4, paveikta 150 μM IP_3 tirpalu, sugeneravo spontaninių veikimo potencialų serijas, todėl galima teigti, kad IP_3 gali lemti ląstelių sužadinamumo padidėjimą. *Nitellopsis obtusa* veikimo potencialus lemiantys mechanizmai vis dar tyrinėjami, todėl reikia tolesnių tyrimų, kad būtų galima visapusiškai suprasti IP_3 signalinių kelių vadimenį šių organizmų veikimo potencialų susidaryme ir reguliavime.

IŠVADOS

1. 75 μM IP_3 tirpalas depoliarizuoja membranos ramybės potencialą ir padidina membranos laidumą. 150 μM IP_3 tirpalas neturi poveikio membranos ramybės potencialui, tačiau padidina membranos laidumą.
2. IP_3 abiejų koncentracijų (75 μM ir 150 μM) tirpalai išoriškai veikiant ląsteles reikšmingai hiperpolarizuoja veikimo potencialo sužadinimo slenkstį.
3. VP smailė padidėja veikiant menturdumblių ląstelę 30 min. bei 60 min. tiek IP_3 75 μM tiek 150 μM tirpalu.
4. IP_3 75 μM 60 min. poveikis prailgina veikimo potencialo depoliarizacijos bei repoliarizacijos trukmes. IP_3 150 μM 60 min. poveikis prailgina veikimo potencialo repoliarizacijos trukmes.
5. IP_3 (75 μM ir 150 μM) tirpalai neturi poveikio maksimaliai membranos laidumo vertei G_{max} .
6. Veikiant ląsteles 75 μM ir 150 μM IP_3 tirpalais maksimalaus sužadinimo metu tekančio srauto amplitudė reikšmingai nekinta.
7. Sužadinimo metu tekančio srauto aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmės, ląsteles veikiant 75 μM ir 150 μM IP_3 tirpalais reikšmingai nekinta.

VILNIAUS UNIVERSITETAS
GYVYBĖS MOKSLŲ CENTRAS

Judita Janužaitė

Bakalauro baigiamasis darbas

**INOZITOLIO TRISFOSFATO (IP₃) POVEIKIS MENTURDUMBLIO
NITELLOPSIS OBTUSA LĄSTELIŲ ELEKTRINIŲ SIGNALŲ
PARAMETRAMS**

SANTRAUKA

Augalai nuolatos turi prisitaikyti prie besikeičiančių aplinkos sąlygų. Sėkli prigimtis privertė augalus išvystyti greitus informacijos perdavimo būdus – elektrinius signalus. Veikimo potencialai (VP) yra geriausiai aprašyti ir universaliausi elektriniai signalai generuojami augaluose (Sukhov ir kt., 2019). VP sužadinami „viskas arba nieko“ principu, inicijuojami Ca²⁺ koncentracijos citoplazmoje padidėjimu. Inozitolio trisfosfatas (IP₃) reguliuoja kalcio išskyrimą iš ląstelės saugyklų gyvūninėse ląstelėse, tačiau augalų ląstelėse IP₃ vaidmuo dar nėra aiškus.

Šio bakalauro darbo tikslas įvertinti inozitolio trisfosfato (IP₃) poveikį menturdumblių ląstelių elektrinių signalų parametrams. Darbo uždaviniai: nustatyti IP₃ poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių membranos laidumui ir ramybės potencialui, nustatyti IP₃ poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių veikimo potencialų parametrams: veikimo potencialo sužadinimo slenksčiui, amplitudei, smailei bei depoliarizacijos ir repoliarizacijos trukmėms, nustatyti IP₃ poveikį *Nitellopsis obtusa* ląstelių sužadinimo metu tekančio srauto parametrams: maksimaliam membranos laidumui, maksimalaus srauto amplitudei bei aktyvacijos ir inaktyvacijos trukmėms.

Įvertinti šiuos parametrus naudojome dviejų porų mikroelektrodų technika. Taikėme fiksuotos srovės/įtampos metodus. Palyginti gautus rezultatus naudojome literatūrą bei sukaupias žinias eksperimentų metu.

Rezultatų duomenimis nustatėme, kad IP₃ veikia augalų kalcio kanalus hiperpoliarizuodamas VP sužadinimo slenksčius. Nors IP₃ veikimo mechanizmas augalinėse ląstelėse nėra atrastas turime pagrindo manyti, kad augalinėse *Nitellopsis obtusa* ląstelėse gali būti neatrastų tik augalams būtingų IP₃ receptorių.

VILNIUS UNIVERSITY

LIFE SCIENCES CENTER

Judita Janužaitė

Bachelor thesis

**THE EFFECT OF INOSITOL TRISPHOSPHATE (IP₃) ON ALGA
NITELLOPSIS OBTUSA CELL ELECTRICAL SIGNAL PARAMETERS**

SUMMARY

Plants must constantly adapt to changing environmental conditions. Their sedentary nature has led plants to develop fast ways of transmitting information - electrical signals. Action potentials (OPs) are the best described and most versatile electrical signals generated in plants (Sukhov et al., 2019). VPs are elicited on an all-or-nothing basis, initiated by an increase in Ca²⁺ concentration in the cytoplasm. Inositol trisphosphate (IP₃) regulates calcium release from intracellular stores in animal cells, but the role of IP₃ in plant cells is not yet clear.

The aim of this bachelor thesis is to evaluate the effect of inositol trisphosphate (IP₃) on the electrical signal parameters of menthumdula cells. The objectives of the thesis are: to determine the effect of IP₃ on the membrane conductance and resting potential of *Nitellopsis obtusa* cells and to determine the effect of IP₃ on the action potential parameters of *Nitellopsis obtusa* cells: to determine the effect of IP₃ on the parameters of the flux during excitation of *Nitellopsis obtusa* cells: maximum membrane conductance, maximum flux amplitude and activation and inactivation times.

We used a two-pair microelectrode technique to assess these parameters. We applied fixed current/voltage techniques. We used the literature and the knowledge gained from experiments to compare the results obtained.

The results showed that IP₃ acts on plant calcium channels by hyperpolarising the VP excitation thresholds. Although the mechanism of action of IP₃ in plant cells has not been discovered, we have reason to believe that there may be undiscovered plant-specific IP₃ receptors in *Nitellopsis obtusa* cells.

1. LITERATŪROS SĄRAŠAS

2. Alova, A., Erofeev, A., Gorelkin, P., Bibikova, T., Korchev, Y., Majouga, A., & Bulychiev, A. (2020). Prolonged oxygen depletion in microwounded cells of *Chara corallina* detected with novel oxygen nanosensors. *Journal of Experimental Botany*, 71(1), 386–398.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz433>
3. Beilby, M. J. (2007). Action Potential in Charophytes. *International Review of Cytology* (T. 257, p. 43–82). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(07\)57002-6](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(07)57002-6)
4. Beilby, M. J. (2019). *Chara braunii* genome: A new resource for plant electrophysiology. *Biophysical Reviews*, 11(2), 235–239. <https://doi.org/10.1007/s12551-019-00512-7>
5. Beilby, M. J., Khazaaly, S. A., Beilby, M. J., & Khazaaly, S. A. (2016). Re-modeling *Chara* action potential: I. from Thiel model of Ca^{2+} transient to action potential form. *AIMS Biophysics*, 3(3), 431–449. <https://doi.org/10.3934/biophy.2016.3.431>
6. Berridge, M. J. (1995). Inositol Trisphosphate and Calcium Signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 766(1 Receptor Acti), 31–43. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1995.tb26646.x>
7. Berridge, M. J. (2008). Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *The Journal of Physiology*, 586(21), 5047–5061. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.160440>
8. Bois-Reymond, E. D. (1884). *Untersuchungen über thierische elektricität: Bd. , 2. abth. III. Untersuchung. (Fortsetzung.) 1860-84.* G. Reimer.
9. Bratislav Stanković. (1996). Both action potentials and variation potentials induce proteinase inhibitor gene expression in tomato. *FEBS Letters*, 390(3), 275–279.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00672-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00672-2)
10. Buchanan, B. B., Gruissem, W., & Jones, R. L. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley & Sons.
11. C. Plieth. (1999). Temperature Sensing by Plants: Calcium-Permeable Channels as Primary Sensors—A Model. *The Journal of Membrane Biology*, 172, 121–127.
<https://doi.org/10.1007/s002329900590>

12. C. Taylort, J. Putney. (1985). Size of the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive calcium pool in guinea-pig hepatocytes | Biochemical Journal | Portland Press. *Biochemical Journal*, 232(2), 435–438. <https://doi.org/10.1042/bj2320435>
13. Darwin, C. (1875). *The Movements and Habits of Climbing Plants*. John Murray.
14. Darwin, C. (1880). *The Power of Movement in Plants*.
15. Drøbak, B. K., Ferguson, I. B., Dawson, A. P., & Irvine, R. F. (1988). Inositol-Containing Lipids in Suspension-Cultured Plant Cells: An Isotopic Study. *Plant Physiology*, 87(1), 217–222. <https://doi.org/10.1104/pp.87.1.217>
16. Dziubińska, H., Trębacz, K., & Zawadzki, T. (1989). The effect of excitation on the rate of respiration in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Physiologia Plantarum*, 75(3), 417–423. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1989.tb04648.x>
17. Fedoroff, N. V. (2002). Cross-Talk in Absciscic Acid Signaling. *Science's STKE*, 2002(140), re10–re10. <https://doi.org/10.1126/stke.2002.140.re10>
18. Feng, W., Lindner, H., Robbins, N. E., & Dinnyen, J. R. (2016). Growing Out of Stress: The Role of Cell- and Organ-Scale Growth Control in Plant Water-Stress Responses[OPEN]. *The Plant Cell*, 28(8), 1769–1782. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00182>
19. Findlay, G. P. (1970). Membrane Electrical Behaviour in *Nitellopsis Obtusa*. *Australian Journal of Biological Sciences*, 23(4), 1033–1046. <https://doi.org/10.1071/bi9701033>
20. Findlay, G. P., & Hope, A. B. (1964). Ionic Relations of Cells of *Chara Australis* IX. Analysis of Transient Membrane Currents. *Australian Journal of Biological Sciences*, 17(2), 400–411. <https://doi.org/10.1071/bi9640400>
21. H. Du. (2011). Characterization of an inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase gene that is essential for drought and salt stress responses in rice. *Plant Molecular Biology*, 77, 547–563. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9830-9>
22. J. Fromm, R. Spanswick. (1993). Characteristics of Action Potentials in Willow (*Salix viminalis* L.). *Journal of Experimental Botany*, 44(7), 1119–1125. <https://doi.org/10.1093/jxb/44.7.1119>

23. J. Fromm, W. Eschrich. (1988). Transport processes in stimulated and non-stimulated leaves of *Mimosa pudica*. *Trees*, 2, 7–17. <https://doi.org/10.1007/BF00196974>
24. J. M. Mullaney. (1988). Calcium entry into the inositol 1,4,5-trisphosphate-releasable calcium pool is mediated by a GTP-regulatory mechanism. *PNAS*, 85(8), 2499–2503. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.8.249>
25. John Scott Burdon-Sanderson. (1873). I. Note on the electrical phenomena which accompany irritation of the leaf of *Dionaea muscipula*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 21(139–147), 495–496. <https://doi.org/10.1098/rspl.1872.0092>
26. Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., Pupkis, V., & Beilby, M. J. (2019). Modeling the Action Potential in Characeae *Nitellopsis obtusa*: Effect of Saline Stress. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2019.00082>
27. Kisnieriene, V., Trębacz, K., Pupkis, V., Koselski, M., & Lapeikaite, I. (2022). Evolution of long-distance signalling upon plant terrestrialization: Comparison of action potentials in Characean algae and liverworts. *Annals of Botany*, 130(4), 457–475. <https://doi.org/10.1093/aob/mcac098>
28. Kleist, T. J., & Wudick, M. M. (2022). Shaping up: Recent advances in the study of plant calcium channels. *Current Opinion in Cell Biology*, 76, 102080. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2022.102080>
29. Krinke, O., Novotná, Z., Valentová, O., & Martinec, J. (2007). Inositol trisphosphate receptor in higher plants: Is it real? *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 361–376. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl220>
30. Król, E., Dziubińska, H., & Trębacz, K. (2010). WHAT DO PLANTS NEED ACTION POTENTIALS FOR? *Action Potential: Biophysical and Cellular Context, Initiation, Phases and Propagation.*, 1–26.
31. K.S. Schumaker & H. Sze. (1987). *Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca²⁺ from vacuolar membrane vesicles of oat roots*. 262(9), 3944–3946. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61292-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61292-X)
32. L, G. (1791). De viribus electricitatis in motu musculari commentarius. *De Bononiensi scientiarum et arrium instituto at que academia*, 7, 363–418.

33. Lapeikaite, I., Pupkis, V., Neniskis, V., Ruksenas, O., Kisnieriene, V., Lapeikaite, I., Pupkis, V., Neniskis, V., Ruksenas, O., & Kisnieriene, V. (2020). Glutamate and NMDA affect cell excitability and action potential dynamics of single cell of macrophyte *Nitellopsis obtusa*. *Functional Plant Biology*, 47(12), 1032–1040. <https://doi.org/10.1071/FP20074>
34. Larkin, D. J., Monfils, A. K., Boissezon, A., Sleith, R. S., Skawinski, P. M., Welling, C. H., Cahill, B. C., & Karol, K. G. (2018). Biology, ecology, and management of starry stonewort (*Nitellopsis obtusa*; Characeae): A Red-listed Eurasian green alga invasive in North America. *Aquatic Botany*, 148, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2018.04.003>
35. M. J. Berridge, R. Dawson. (1983). Changes in the levels of inositol phosphates after agonist-dependent hydrolysis of membrane phosphoinositides. *The Biochemical Journal*, 212(2), 473–482. <https://doi.org/10.1042/bj2120473>
36. M. Kikuyama & M. Tazawa. (1983). Transient increase of intracellular Ca²⁺ during excitation of tonoplast-free *Chara* cells. *Protoplasma*, 117, 62–67. <https://doi.org/10.1007/BF01281785>
37. MacRobbie, E. A. C., & Dainty, J. (1958). ION TRANSPORT IN NITELLOPSIS OBTUSA. *Journal of General Physiology*, 42(2), 335–353. <https://doi.org/10.1085/jgp.42.2.335>
38. 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(4), 1646–1667. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1646>
39. Mikoshiba, K. (2015). Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases. *Advances in Biological Regulation*, 57, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.10.001>
40. Oksana Sherstneva, Vladimir Vodeneev. (2015). *Variation potential influence on photosynthetic cyclic electron flow in pea*. 5. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00766>
41. Osterhout, W. J. V. (1936). Electrical phenomena in large plant cells. *Physiological Reviews*, 16(2), 216–237. <https://doi.org/10.1152/physrev.1936.16.2.216>
42. Pickard, B. G. (1973). Action potentials in higher plants. *The Botanical Review*, 39(2), 172–201. <https://doi.org/10.1007/BF02859299>

43. Putney, J. W. (1987). Calcium-mobilizing receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 8(12), 481–486. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(87\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0165-6147(87)90043-5)
44. R. Wayne. (1993). Excitability in Plant Cells. *American Scientist*, 81(2), 140–151. <https://www.jstor.org/stable/29774870>
45. Ranjeva, R., Carrasco, A., & Boudet, A. m. (1988). Inositol trisphosphate stimulates the release of calcium from intact vacuoles isolated from Acer cells. *FEBS Letters*, 230(1–2), 137–141. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(88\)80657-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(88)80657-4)
46. Sukhov, V. (2016). Electrical signals as mechanism of photosynthesis regulation in plants. *Photosynthesis Research*, 130(1), 373–387. <https://doi.org/10.1007/s11120-016-0270-x>
47. Sukhov, V., Sukhova, E., & Vodeneev, V. (2019). Long-distance electrical signals as a link between the local action of stressors and the systemic physiological responses in higher plants. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 146, 63–84. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.11.009>
48. Supattapone, S., Worley, P. F., Baraban, J. M., & Snyder, S. H. (1988). Solubilization, purification, and characterization of an inositol trisphosphate receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 263(3), 1530–1534. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)57336-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)57336-7)
49. T. Hayama, T. Shimmen. (1979). Participation of Ca²⁺ in cessation of cytoplasmic streaming induced by membrane excitation in Characeae internodal cells. *Protoplasma*, 99, 305–321. <https://doi.org/10.1007/BF01275803>
50. T. Shiina, M. Tazawa. (1986). Action Potential in Luffa cylindrica and its Effects on Elongation Growth. *Plant and Cell Physiology*, 27(6), 1081–1089. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a077191>
51. Tazawa, M., & Kikuyama, M. (2003). Is Ca²⁺ Release from Internal Stores Involved in Membrane Excitation in Characean Cells? *Plant and Cell Physiology*, 44(5), 518–526. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg065>
52. Thiel, G., MacRobbie, E. a., & Hanke, D. e. (1990). Raising the intracellular level of inositol 1,4,5-trisphosphate changes plasma membrane ion transport in characean algae. *The EMBO Journal*, 9(6), 1737–1741. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08297.x>

53. Trebacz, K., Dziubinska, H., & Krol, E. (2006). Electrical Signals in Long-Distance Communication in Plants. F. Baluška, S. Mancuso, & D. Volkmann (Sud.), *Communication in Plants: Neuronal Aspects of Plant Life* (p. 277–290). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28516-8_19
54. Tsutsui, I., Ohkawa, T., Nagai, R., & Kishimoto, U. (1987). Role of calcium ion in the excitability and electrogenic pump activity of the *Chara corallina* membrane: II. Effects of La^{3+} , EGTA, and calmodulin antagonists on the current-voltage relation. *The Journal of Membrane Biology*, 96(1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/BF01869336>
55. Umrath, K. (1930). Untersuchungen über Plasma und Plasmaströmung an Characeen. *Protoplasma*, 9(1), 576–597. <https://doi.org/10.1007/BF01943373>
56. Volpe, P., Krause, K. H., Hashimoto, S., Zorzato, F., Pozzan, T., Meldolesi, J., & Lew, D. P. (1988). "Calciosome," a cytoplasmic organelle: The inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store of nonmuscle cells? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(4), 1091–1095. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.4.1091>
57. White, P. J. (2000). Calcium channels in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1465(1), 171–189. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00137-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00137-1)
58. Williamson, R. E., & Ashley, C. C. (1982). Free Ca^{2+} and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. *Nature*, 296(5858), Art. 5858. <https://doi.org/10.1038/296647a0>
59. Xu, J., Brearley, C. A., Lin, W.-H., Wang, Y., Ye, R., Mueller-Roeber, B., Xu, Z.-H., & Xue, H.-W. (2005). A Role of Arabidopsis Inositol Polyphosphate Kinase, AtIPK2 α , in Pollen Germination and Root Growth. *Plant Physiology*, 137(1), 94–103. <https://doi.org/10.1104/pp.104.045427>
60. Zhang, J., Vanneste, S., Brewer, P. B., Michniewicz, M., Grones, P., Kleine-Vehn, J., Löffke, C., Teichmann, T., Bielach, A., Cannoot, B., Hoyerová, K., Chen, X., Xue, H.-W., Benková, E., Zažímalová, E., & Friml, J. (2011). Inositol Trisphosphate-Induced Ca^{2+} Signaling Modulates Auxin Transport and PIN Polarity. *Developmental Cell*, 20(6), 855–866. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.05.013>
61. Zherelova, O. M., Kataev, A. A., Grishchenko, V. M., Knyazeva, E. L., Permyakov, S. E., & Permyakov, E. A. (2009). Interaction of antitumor α -lactalbumin—Oleic acid complexes with

artificial and natural membranes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 41(3), 229–237.
<https://doi.org/10.1007/s10863-009-9222-x>

62. Zimmermann, M. R., Maischak, H., Mithöfer, A., Boland, W., & Felle, H. H. (2009). System Potentials, a Novel Electrical Long-Distance Apoplastic Signal in Plants, Induced by Wounding. *Plant Physiology*, 149(3), 1593–1600. <https://doi.org/10.1104/pp.108.133884>