

# РОЛЬ АВР1 В РЕГУЛЯЦИИ ПРОТОН-ТРАНСПОРТИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ $H^+$ -АТФазы ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ТАБАКА ВУ-2 ДИКОГО ТИПА И NAS

С.Б. Теплякова, Т. Чэнь, А.А. Кирпичникова, В.В. Емельянов, М.Ф. Шишова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский государственный университет", Санкт-Петербург, Россия, [serafima.teplyakova@mail.ru](mailto:serafima.teplyakova@mail.ru)

**Аннотация.** На модельном объекте, представляющем суспензионную культуру клеток табака линии ВУ-2 дикого типа Wt и NAS, изучали ацидофицирующую активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы по изменению окрашивания индикатора бромкрезолового пурпурового. Впервые показана роль АВР1 в регуляции работы протонной помпы плазмалеммы в ходе роста растяжением.

**Ключевые слова:** рост растяжением,  $H^+$ -АТФаза, плазмалемма, АВР1

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1388-1391

Ауксин-связывающий белок1 (АВР1) длительное время рассматривался в качестве одного из доменов рецептора ауксина на плазмалемме. Однако ряд современных данных (создание мутантов *abr1-c1*) поставило под сомнение физиологическое значение АВР1 в механизмах рецепции и трансдукции ауксинового сигнала [Gao, 2015]. Однако накоплены данные о том, что внесение извне АВР1 приводит к увеличению чувствительности протопластов и клеток к ауксину [Barbier-Brygoo et al., 1991], увеличивает амплитуду гиперполяризации [Venis et al., 1992]. Также было выявлено, что АВР1 участвует в регуляции экспрессии генов, кодирующих белки, определяющие пластичность клеточной стенки [Raque et al., 2014]. Показано, что АВР1 принимает участие в реорганизации цитоскелета в процессе роста, регулирует везикулярную секрецию и, посредством этого процесса, определяет перераспределение белков-переносчиков ауксина PIN [Robert et al., 2010; Murphy, Peer, 2012]. Кроме того, АВР1 оказывает влияние на рост клеток, а недостаток АВР1 приводит к нарушениям роста [Braun et al., 2008]. Эти данные косвенным образом указывают на возможность участия АВР1 в регуляции работы  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы.

$H^+$ -АТФаза плазмалеммы обеспечивает изменение концентрации протонов в клеточной стенке, что лежит в основе роста растяжением согласно теории кислотороста. Активность  $H^+$ -АТФазы регулируется рядом факторов, в том числе, фитогормоном ауксином. Как именно сигнал передается от ауксина к  $H^+$ -АТФазе плазмалеммы до сих пор не ясно. Согласно одной из гипотез, одним из звеньев в данной передаче сигнала может служить ауксин-связывающий белок1.

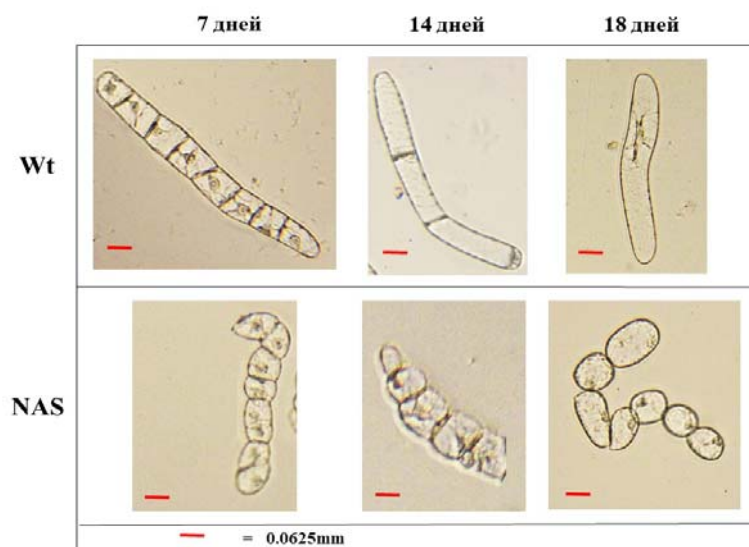
Цель работы: выявить роль белка АВР1 в регуляции работы  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы в ходе роста растяжением.

Задачи работы: 1) охарактеризовать интенсивность роста растяжением клеток суспензионных культур Ву2 дикого типа и NAS; 2) оценить изменение протон-транспортирующей активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы в ходе роста растяжением клеток суспензионных культур Ву2 дикого типа и NAS.

**Материалы и методы.** Исследование проходило на клетках суспензионной культуры табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow*) линии дикого типа и линии NAS (рис. 1), являющейся антисенс трансформантом по АВР1 и характеризующейся пониженной интенсивностью роста растяжением.

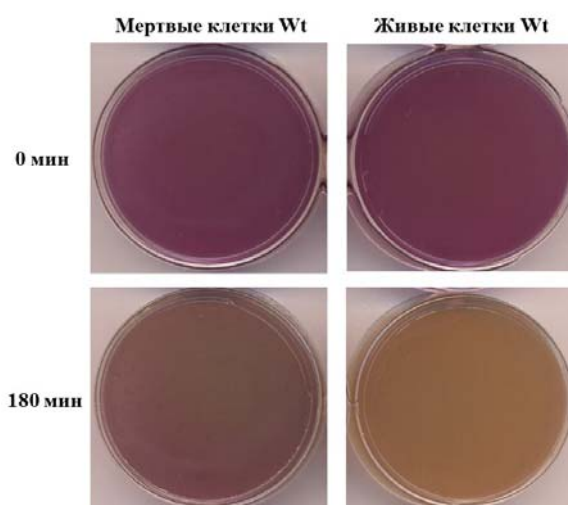
Развитие культуры Ву2 заключается в последовательной смене этапов деления, интенсивного роста растяжением и завершения роста. В работе были

проанализированы клетки в возрасте 7, 14 и 18 суток, характеризующим основные этапы роста клеток суспензионной культуры табака.



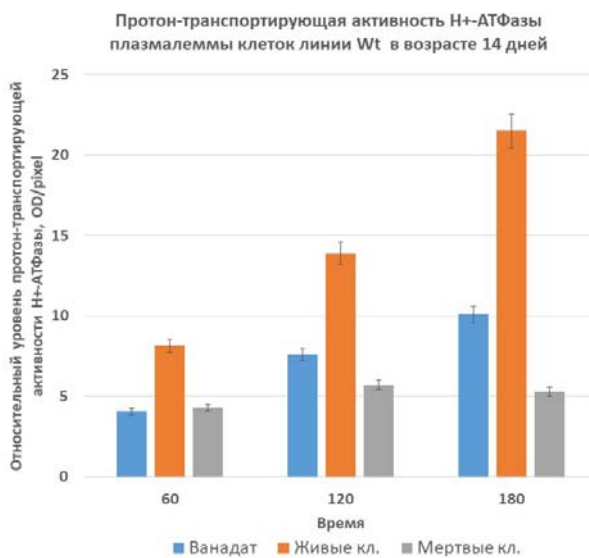
**Рис. 1. Клетки суспензионной культуры Ву2 (WT и NAS) в ходе развития.**

Для определения интенсивности подкисления экстраклеточного пространства протонными помпами плазмалеммы клеток суспензионной культуры табака был использован индикатор кислотности бромкрезоловый пурпуровый, диапазон использования которого составляет от pH 5,0 до pH 7,0. 100 мг красителя бромкрезолового пурпурового растворяли в 3,7 мл 0,05н NaOH. Затем довели водой до 250 мл. Затем готовили необходимый объем 10% раствора бромкрезолового пурпурового в культуральной среде с добавлением 0,7% агара (pH 7,0). Конечный раствор с индикатором заливали по 4 мл в стерильные чашки Петри (диаметром 40 мм). Затем после остывания и затвердевания среды на поверхность добавляли по 3 гр. клеток (живых/мертвых/с ванадатом натрия). Клетки убивали нагреванием в микроволновой печи. Фиксацию изменение окраски чашек во времени производили путем сканирования чашек (HP ScanJet G2710) через каждые 15 минут в течение трех часов. Далее изображение конвертировали в черно-белое и определяли интенсивность окрашивания при помощи программы ImageJ. Пример изменения окрашивания индикатора приведен на рис. 2.



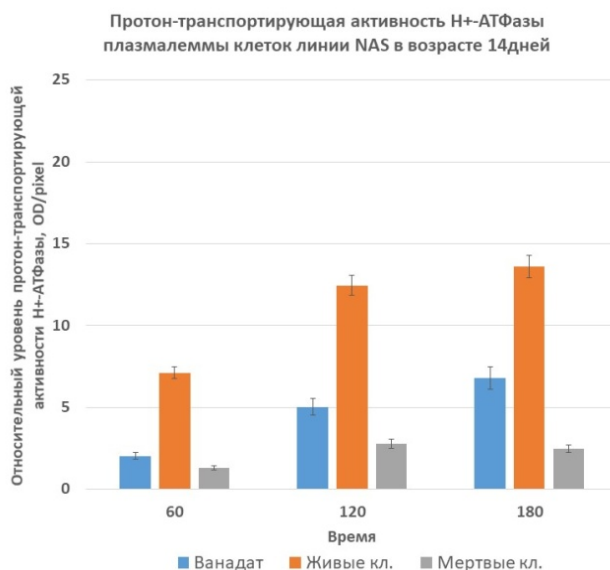
**Рис. 2. Изменение протон-транспортирующей активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы живых и мертвых клеток (линии Wt) через 180 минут.**

**Результаты.** В ходе наших экспериментов показано неравное изменение интенсивности ацидофицирующей активности клеток. Для клеток дикого типа максимум детектировали в фазу интенсивного роста растяжением на 14 день развития. Причем закисление продолжалось и на завершающем этапе измерений, через 3 часа после начала эксперимента (рис. 3). Клетки на 7 и 18 день, т.е. при инициации и торможении роста, отличались меньшей амплитудой закисления. Выявленное снижение pH инкубационной среды было свойственно только живым клеткам и опосредовано работой  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы, так как на всех проанализированных этапах развития клеток эта функция в значительной степени блокировалась ингибитором протонной помпы – ванадатом натрия.



**Рис. 3. Протон-транспортирующая активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток линии Wt в возрасте 14 дней.**

Ацидофицирующая активности клеток линии NAS также менялась неравномерно. Ее амплитуда была значительно меньше, чем у клеток дикого типа. Однако максимальное значение достигалось на 14 день на этапе роста растяжением (рис. 3 и 4), как и у клеток дикого типа. Клетки сохраняли чувствительность к ванадату, что указывает на участие в развитии закисления  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы.



**Рис. 4. Протон-транспортирующая активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток линии NAS в возрасте 14 дней.**

Таким образом, на модельной системе, представленной синхронизированными клетками суспензионной культуры табака BY-2 (*Nicotiana tabacum L. cv. Bright Yellow*) дикого типа и NAS, выявлено нелинейное изменение протон-транспортирующей активности H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы в ходе развития. Показано, что снижение количества ABP1 приводит к понижению интенсивности роста, амплитуды закисляющей способности клеток, опосредованной работой протонной помпы плазмалеммы.

*Работа финансируется из средств гранта РФФИ 16-04-00743-а и проводилась с использованием ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».*

#### Литература

Barbier Brygoo H., Ephritikhine G., Klämbt D., Maurel C., Palme K., Schell J., Guern J. Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts // *The Plant Journal*. – 1991. – V. 1, No. 1. – P. 83–93.

Braun N., Wyrzykowska J., Muller P., David K., Couch D., Perrot-Rechenmann C., Fleming A.J. Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in Arabidopsis and tobacco // *The Plant Cell*. – 2008. – V. 20, No. 10. – P. 2746–2762.

Gao Y., Zhang Y., Zhang D., Dai X., Estelle M., Zhao Y. Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or Arabidopsis development // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – V. 112, No. 7. – P. 2275–2280.

Murphy A.S., Peer W.A. Vesicle trafficking: ROP–RIC roundabout // *Current Biology*. – 2012. – V. 22, No. 14. – P. R576–R578.

Paque S., Mouille G., Grandont L., Alabadí D., Gaertner C., Goyallon A., Perrot-Rechenmann C. AUXIN BINDING PROTEIN1 links cell wall remodeling, auxin signaling, and cell expansion in Arabidopsis // *The Plant Cell*. – 2014. – V. 26, No. 1. – P. 280–295.

Robert S., Kleine-Vehn J., Barbez E., Sauer M., Paciorek T., Baste, P. & Hayashi K. ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis // *Cell*. – 2010. – V. 143, No. 1. – P. 111–121.

Venis M.A., Napier R.M., Barbier-Brygoo H., Maurel C., Perrot-Rechenmann C., Guern, J. Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin agonist activity // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1992. – V. 89, No. 15. – P. 7208–7212.

### THE ROLE OF ABP1 IN REGULATION OF PLASMA MEMBRANE H<sup>+</sup>-ATPase PROTON-TRANSPORTING ACTIVITY OF SUSPENSION CULTURE OF TOBACCO By-2 CELLS WILD TYPE AND NAS

S.B. Teplyakova, T. Chen, A.A. Kirpichnikova, V.V. Emelyanov, M.F. Shishova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Saint-Petersburg State University", St. Petersburg, Russia, [serafima.teplyakova@mail.ru](mailto:serafima.teplyakova@mail.ru)

**Abstract.** The model system represented by tobacco suspension cell culture By-2 wild type and line NAS was used for the investigation of H<sup>+</sup>-ATPase acidifying activity, detected with bromocresol purple. It is shown that ABP1 is important for regulation of plasma membrane proton pump activity during elongation growth.

**Keywords:** *elongation growth, H<sup>+</sup>-ATPase, plasma membrane, ABP1*