

## ИЗМЕНЕНИЕ ГИДРОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И УРОВНЯ БЕЛКА ПРОТОННЫХ НАСОСОВ ТОНОПЛАСТА КЛЕТОК СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЫ ВУ-2 В ХОДЕ РОСТА РАСТЯЖЕНИЕМ

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

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, *mshishova@mail.ru*

**Аннотация.**  $H^+$ -АТФаза и  $H^+$ -пирофосфатаза тонопласта используют энергию, освобождающуюся при гидролизе АТФ и пирофосфата. Эти ферменты являются компонентами протонной сигнальной системы и рН-стата клетки. В связи с тем, что данные о возможном соподчинении активности  $H^+$ -помп тонопласта, а также зависимости такового от физиологического статуса клетки фрагментарны, данное исследование нацелено на анализ изменения активности протонных помп тонопласта в ходе роста растяжением на примере клеток суспензионной культуры табака ВУ-2 дикого типа и линии NAS.

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

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1427-1430

В клетках растений имеется большое число ферментов, которые катализируют разнообразные биохимические процессы. Среди этих ферментов особое место принадлежит  $H^+$ -АТФазе плазмалеммы и тонопласта.  $H^+$ -АТФаза использует энергию, освобождающуюся при гидролизе АТФ для того, чтобы переносить через клеточную мембрану ионы водорода. Тем самым, создается электрохимический градиент ионов водорода, который имеет огромное значение в поддержании жизнеспособности растительной клетки. Аналогично,  $H^+$ -пирофосфатаза тонопласта использует энергию, освобождающуюся при гидролизе пирофосфата, для генерации электрохимического градиента ионов водорода на вакуолярной мембране. Совместно с  $H^+$ -АТФазой плазмалеммы эти ферменты являются важнейшими компонентами протонной сигнальной системы и рН-стата растительной клетки. Предполагается совместное участие протонных помп тонопласта и плазмалеммы в реализации специфичного для растительных клеток роста растяжением. Хорошо известно, что ауксин специфично стимулирует работу  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы, однако данные о регуляции протонной АТФазы тонопласта отсутствуют.

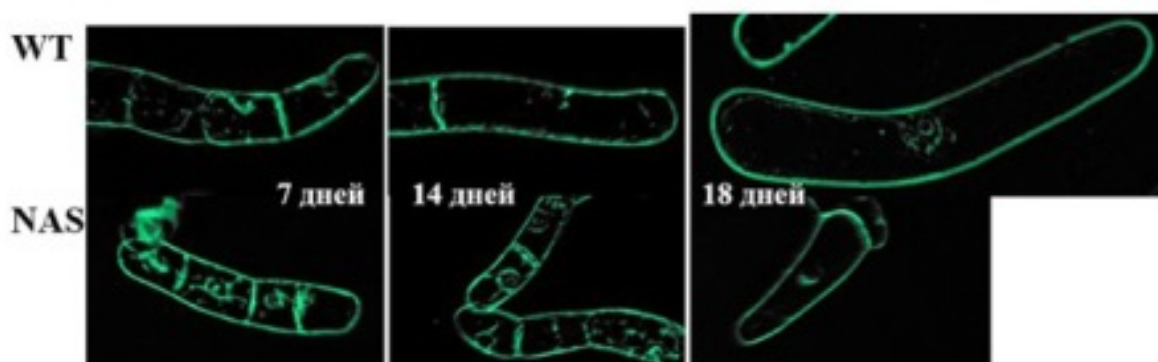
У растений протонная V-АТФаза тонопласта осуществляет целый ряд функций, в первую очередь, поддержание ионного и метаболического гомеостаза посредством генерации трансмембранного потенциала на тонопласте [Dettmer et al., 2006; Schumacher, 2006]. Данный фермент идентифицируется в мембранах провакуолей, эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи и т.д. Растительные V-АТФазы принимают участие в процессах эндо- и экзоцитоза и играют важную роль в регуляции эмбрионального развития и роста клеток растяжением [Strompen et al., 2005; Dettmer et al., 2006; Schumacher, 2006]. Она представляет собой широко распространенный  $H^+$ -транспортирующий фермент эукариотических клеток и состоит из нескольких субъединиц, образующих два домена: периферический надмембранный (V1) и мембранный интегральный (Vo). Домен Vo обеспечивает транспорт протонов, а V1 осуществляет гидролиз АТФ [Beyenbach, Wiczorek, 2006; Martinoia et al., 2007]. Предполагают, что сначала происходит сборка доменов, а затем их объединение с образованием функционально активного фермента.  $H^+$ -пирофосфатаза использует энергию пирофосфата для генерации протонного градиента [Maeshima, 2000]. Для ряда

организмов, включая растения, было показано наличие двух типов пиррофосфатаз, различающихся своей активностью, значением и локализацией в клетке [Drozdowicz, Rea, 2001]. К сожалению, достаточно долго этот протон-транспортирующий фермент исследовался не столь активно, как уже рассмотренные выше представители протонных АТФаз. В связи с этим особый интерес представляет анализ изменения активности вакуолярных протонных насосов в ходе роста растяжением.

Исследование проведено на клетках суспензионной культуры табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Bright Yellow*) дикого типа и линии NAS (рис. 1), характеризующейся пониженным содержанием ауксинсвязывающего белка 1 (АСБ1). Этот белок, предположительно, участвует в рецепции и/или трансдукции ауксинового сигнала. Однако механизм его участия достаточно дискусионен.

Поэтому в нашей работе были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать интенсивность работы протонных помп тонопласта в ходе роста растяжением;
2. Оценить экспрессию генов, кодирующих  $H^+$ -пиррофосфатазу тонопласта и субъединицы вакуолярной  $H^+$ -АТФазы, в ходе роста растяжением;
3. Выявить роль АСБ1 в регуляции работы протонных насосов тонопласта в ходе роста растяжением.

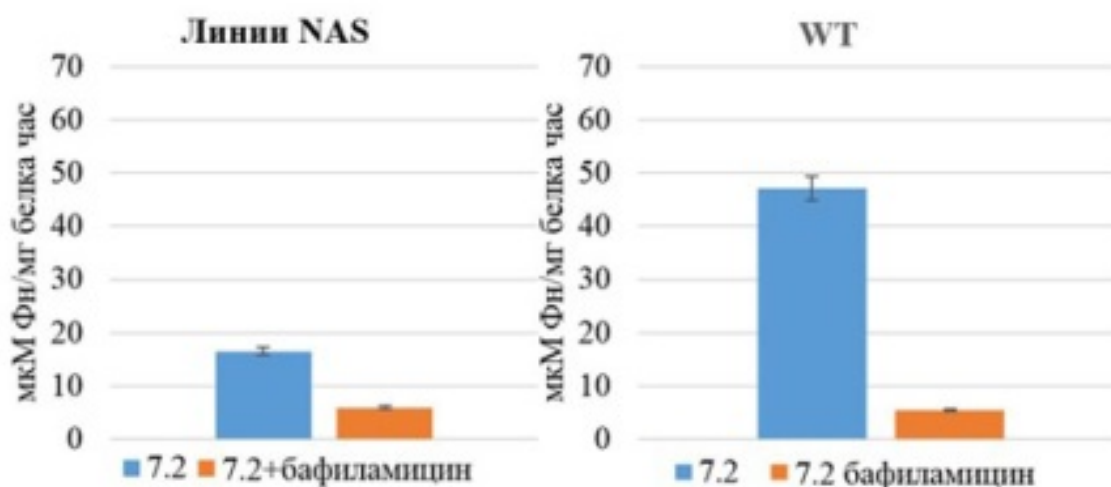


**Рис. 1. Фотографии клеток суспензионной культуры.**

В результате наших экспериментов показано усиление экспрессии генов, кодирующих субъединицы G1 и В  $H^+$ -АТФазы тонопласта, на 14 день развития культуры табака ВУ-2 дикого типа. Именно этот этап развития характеризовался максимальным ростом растяжения. Усиление экспрессии согласуется с увеличением содержания субъединиц в составе тонопласта, что подтверждается блотт-анализом. Дальнейшие эксперименты были проведены с использованием очищенной фракции тонопласта, полученной разделением с помощью сахароза/сорбит градиента. Чистота фракции доказана в присутствии специфичного ингибитора – бафиломицина, который практически полностью ингибировал гидролитическую активность фракции (рис. 2). Последующий анализ интенсивности гидролиза  $H^+$ -АТФазы тонопласта показал, что функция фермента была максимальной именно на 14 день развития культуры и, как видно из рис. 1, на этапе интенсивного роста растяжением.

Совершенно иной была закономерность для клеток линии NAS. Показано отсутствие существенного усиления роста растяжением у этих клеток. Показано также отсутствие усиления экспрессии генов, кодирующих субъединицы  $H^+$ -АТФазы тонопласта, что коррелировало с отсутствием увеличения содержания соответствующих белков в составе вакуолярной мембраны. Следует отметить и то, что

усиление гидролитической активности фермента на 14 день развития выявить не удалось.



**Рис. 2.** Ингибиторный анализ  $H^+$ -АТФазы тонопласта клеток суспензионной культуры табака.

У клеток табака пирофосфатаза кодируется несколькими генами. Полученные результаты указывают, что 2 из 3-х проанализированных генов отличаются снижением уровня накопления транскриптов у культуры клеток табака дикого типа. Это снижение экспрессии полностью согласуется с данными об уменьшении числа ферментов в составе тонопласта и линейным снижением гидролитической активности фермента.

Клетки линии NAS характеризовались, напротив, усилением интенсивности экспрессии генов, кодирующих ферменты и гидролитической активности самого фермента на 2 неделю, что больше соответствовало изменениям  $H^+$ -АТФазы.

Таким образом, на модельной системе, представленной синхронизированными клетками суспензионной культуры табака ВУ-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv. *Bright Yellow*), выявлены различия в характере экспрессии генов, кодирующих субъединицы  $H^+$ -АТФазы тонопласта и пирофосфатазы, согласующиеся с накоплением белков в составе соответствующих мембран и их гидролитической активности в ходе роста растяжением. Впервые показано участие АСБ1 в регуляции работы протонных помп тонопласта.

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ № 16-04-00743, с использованием оборудования Ресурсного центра СПбГУ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».*

#### Литература

Beyenbach K.W., Wieczorek H. The V-type  $H^+$  ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation // *J. Exp. Biol.* – 2006. – V. 209. – P. 577–589.

Dettmer J., Hong-Hermesdorf A., Stierhof Y.-D., Schumacher K. Vacuolar  $H^+$ -ATPase activity is regulated for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* – 2006. – V. 18. – P. 715–730.

Drozdowicz Y.M., Rea P. Vacuolar  $H^+$  pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream // *Trends Plant Sci.* – 2001. – V. 6, No. 5. – P. 206–211.

Gruber G., Wieczorek H., Harvey W.R. Muller V. Structure-function relationship of A-, F- and V-ATPases // *J. Exp. Biol.* – 2001. – V. 204. – P. 2597–2605.

Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H. E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism // J. Exp. Bot. – 2007. – V. 58, No. 1. – P. 83–102.

Maeshima M. Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase // Biochim. Biophys. Acta. – 2000. – V. 1465, No. 1-2. – P. 37–51.

Strompen G., Dettmer J., Stierhof Y.-D. et al. Arabidopsis vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase subunit E isoform is required for golgi organization and vacuole function in embryogenesis // Plant J. – 2005. – V. 41. – P. 125–132.

Schumacher K. Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport // Curr. Opin. Plant Biol. – 2006. – V. 9. – P. 595–600.

### **THE SHIFT IN HYDROLYTIC ACTIVITY AND PROTEIN LEVEL OF TONOPLAST PROTON PUMPS IN TOBACCO CELLS OF A SUSPENSION CULTURE BY-2 DURING ELONGATION GROWTH**

T. Chen, A.A. Kirpichnikova, S.Teplyakova, D. Romanyuk, V. Yemelyanov, M. Shishova

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Saint-Petersburg State University», St. Petersburg, Russia, *mshishova@mail.ru*

**Abstract.** Tonoplast H<sup>+</sup>-ATPase and H<sup>+</sup>-pyrophosphatase use energy released during hydrolysis of ATP and pyrophosphate. These enzymes are components of the proton signaling and pH-stat system of plant cells. A possible mechanism of cross-regulation of these enzymes during physiological changes in tested cells is still under discussion. This investigation is focused on changes in tonoplast proton pumps activity during elongation growth and was provided with tobacco suspension culture By-2 (wt and NAS lines).

**Keywords:** *elongation growth, H<sup>+</sup>-ATPase, pyrophosphatase, tonoplast*