

## **MODYFIKACJE POMP PROTONOWYCH PLAZMOLEMY I TONOPLASTU W WARUNKACH STRESU SOLNEGO**

*Małgorzata Janicka-Russak, Grażyna Kłobus*

Instytut Botaniki, Uniwersytet Wrocławski we Wrocławiu

### **Wstęp**

Kompartymencja jonów sodu i chloru w apoplacie i wakuoli komórek korzeni jest zasadnicza dla wzrostu roślin w warunkach stresu solnego. Usuwanie nadmiaru jonów z cytoplazmy wymaga wzmożonej aktywności pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu. Stymulacja aktywności ATPazy może wynikać ze zwiększonej ekspresji genów kodujących obydwa enzymy, lub ze specyficznych modyfikacji białek enzymatycznych. Celem pracy było określenie mechanizmu potranslacyjnej modyfikacji pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu w warunkach stresu solnego.

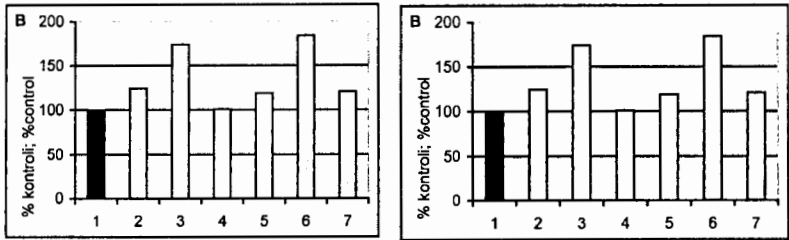
### **Metodyka badań**

Badania wykonano na korzeniach tygodniowych siewek ogórka *Cucumis sativus* L. Pęcherzyki plazmolemy uzyskano w wyniku wirowania mikrosomów z korzeni ogórka w układzie dwufazowym PEG/Dextran wg KŁOBUS [1995], a pęcherzyki tonoplastu w wyniku wirowania osadów mikrosomów w skokowym gradiencie sacharozy (20, 28, 32 i 42% w/w) wg KABAŁY i KŁOBUS [2001]. Aktywność H<sup>+</sup>-ATPazy i V-ATPazy była mierzona w dwojaki sposób: jako aktywność hydrolityczna enzymów (katalizowana przez ATPazy hydroliza ATP) oraz jako zmiany absorbancji oranżu akrydyny w wyniku katalizowanego przez enzymy transportu protonów do pęcherzyków błonowych [KABAŁA, KŁOBUS 2001].

### **Omówienie wyników badań**

Z literatury wiadomo, że w trakcie stresu solnego zmienia się poziom mRNA pomp protonowych. Ciekawym wydawało się zbadać, czy w stresie solnym mają miejsce również potranslacyjne modyfikacje aktywności ATPazy. W tym celu analizowano wpływ frakcji cytosolowej pochodzącej z komórek korzeni ogórka poddanych działaniu NaCl, na aktywność obu zależnych od ATP pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu izolowanych z roślin nietraktowanych solą. Uzyskane wyniki wyraźnie pokazywały silną stymulację aktywności obydwu enzymów (około 70%) przez frakcję cytosolową (seria doświadczalna nr 3, rys. 1 A, B).

Okazało się, że frakcja cytosolowa, otrzymana z komórek korzeni nietraktowanych solą również podwyższała aktywność  $H^+$ -ATPaz (seria doświadczalna nr 2, rys. 1 A, B). Stymulacja była jednak zdecydowanie mniejsza i stanowiła tylko około 20%. Takie wyniki sugerują, że czynnik stymulujący ATPazy nie pojawia się w komórkach *de novo* w trakcie stresu solnego, lecz jego ilość lub aktywność w tych warunkach wyraźnie rośnie.



- 1 – kontrola (plazmolema – PM lub tonoplast – T); control (plasma membrane – PM or tonoplast – T)
- 2 – PM lub T + ekstrakt z korzeni nietraktowanych solą; PM or T + extract from unstressed roots
- 3 – PM lub T + ekstrakt z korzeni traktowanych NaCl; PM or T + extract from NaCl treated roots
- 4 – PM lub T + zagotowany ekstrakt z korzeni traktowanych solą; PM or T + boiled extract from NaCl treated roots
- 5 – PM lub T + ekstrakt z korzeni roślin traktowanych solą + staurosporyna; PM or T + extract from NaCl treated roots + staurosporine
- 6 – PM lub T + ekstrakt z nietraktowanych solą korzeni ogórka + 2 mmol  $Ca^{2+} \cdot dm^{-3}$ ; PM or T+ extract from unstressed cucumber roots + 2 mmol  $Ca^{2+} \cdot dm^{-3}$
- 7 – PM lub T + ekstrakt z nietraktowanych solą korzeni +2 mmol  $Ca^{2+} \cdot dm^{-3}$  +50  $\mu mol \cdot dm^{-3}$  W7 (antagonista kalmoduliny); PM or T+ extract from unstressed cucumber roots +2 mmol  $Ca^{2+} \cdot dm^{-3}$  +50  $\mu mol \cdot dm^{-3}$  W7 (an antagonist of calmodulin)

Rys. 1. Wpływ frakcji cytosolowej otrzymanej z korzeni ogórków nietraktowanych i traktowanych solą na aktywność plazmolemowych (A) i tonoplastowych (B) ATPaz izolowanych z roślin nietraktowanych solą

Fig. 1. Effect of the soluble fraction obtained from both, unstressed and NaCl stressed roots on the ATPase activity in plasma membrane (A) and tonoplast (B) vesicles isolated from unstressed plants

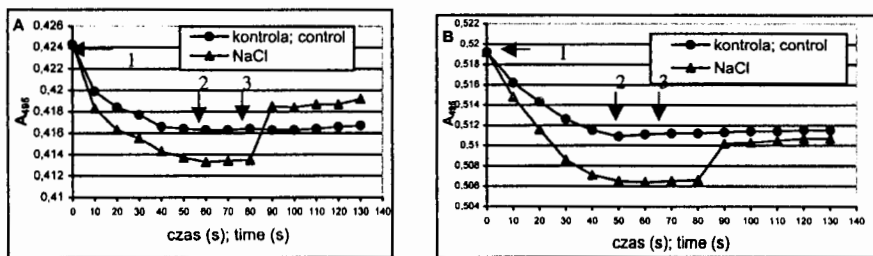
Celem dalszych doświadczeń stało się określenie natury czynnika stymulującego pompy protonowe. W pierwszej kolejności sprawdzono, czy wysoka temperatura może w jakiś sposób zmienić działanie omawianego czynnika. Okazało się, że umieszczenie frakcji cytosolowej na około 5 min we wrzątku, zupełnie eliminowało jej stymulujący efekt (seria doświadczalna nr 4, rys. 1 A, B). Nasuwało to sugestię, że czynnik ma naturę białkową.

W potranslacyjnych modyfikacjach wielu enzymów, w tym również ATPaz, ważną rolę odgrywają procesy fosforylacji i defosforylacji enzymu. Wyniki badań własnych potwierdziły, że fosforylacja białka ATPazy jest zasadnicza w potranslacyjnej modyfikacji pomp protonowych w trakcie stresu solnego. Bowiem zastosowanie staurosporyny, powszechnie znanego inhibitora kinaz, obniżało stymulujący efekt frakcji cytosolowej izolowanej z komórek korzeni poddanych działaniu soli jak i z roślin kontrolnych na aktywność ATPaz plazmolemy i tonoplastu (seria

doświadczalna nr 5, rys. 1 A, B). Wyniki doświadczeń sugerowały, że czynnik stymulujący pompy obecny we frakcji cytosolowej jest kinazą białkową.

Okazało się, że dodanie jonów wapnia do mieszaniny reakcyjnej zawierającej błony plazmolemy lub tonoplastu oraz frakcję cytosolową z komórek korzeni kontrolnych (niepoddanych działaniu soli) bardzo wyraźnie stymulowało (około 80%) aktywność ATPaz (seria doświadczalna nr 6, rys. 1 A, B). Dodatkowo wprowadzenie W7, antagonisty kalmoduliny, do preparatów zawierających pęcherzyki plazmolemy lub tonoplastu i frakcję cytosolową z korzeni roślin nietraktowanych solą oraz jony wapnia niwelowało efekt  $Ca^{2+}$  na aktywność ATPaz (seria doświadczalna nr 7, rys. 1A, B). Prawdopodobnie więc charakteryzowana kinaza jest zależna od wapnia i kalmoduliny, bądź też posiada domenę podobną do kalmoduliny.

ATPaza plazmolemowa jest enzymem posiadającym charakterystyczną domenę autoinhibitorową na tzw. C-końcu. W stanie niskiej aktywności, C-koniec wchodzi w interakcję z domeną katalityczną. Ogranicza to dostęp substratu (ATP) oraz blokuje kanał protonowy. Przyłączenie aktywatora powoduje modyfikację położenia C-końca, pozwalającą na przyjęcie przez enzym aktywnej konformacji. Fosforylacja odpowiednich reszt seryny lub treoniny na C-końcu plazmolemowej ATPazy umożliwiała asocjację kompleksu białka 14-3-3 z  $H^+$ -ATPazą. Po przyłączeniu białka 14-3-3 do domeny autoinhibitorowej znajdującej się na C-końcu następuje zmiana stanu aktywności ATPazy. Z formy nieaktywnej enzym przechodzi w stan wysokiej aktywności [PORTILLO 2000]. Niewiele wiadomo na temat fosforylacji tonoplastowej ATPazy. Jednak MAGNIN i in. [1995] pokazali, że 66 kDa podjednostka V-ATPazy może ulegać fosforylacji. Autorzy sugerowali, że fosforylacja tonoplastowej pompy protonowej mogłaby być dotychczas nieznanym sposobem potranslacyjnej regulacji tych pomp. Wyniki naszych badań również potwierdziły, że obie badane pompy protonowe, generujące gradient  $H^+$ , ulegają fosforylacji, której skutkiem jest wzrost aktywności enzymów.



Gradient pH w pęcherzykach plazmolemy (A) lub tonoplastu (B), izolowanych z korzeni roślin kontrolnych lub traktowanych NaCl, był inicjowany przez dodanie 3,75 mM ATP i  $MgSO_4$  (1). Kiedy gradient pH ustalił się, do prób wprowadzano heksokinazę w ilości 10 jednostek na  $cm^3$  (2). Następnie wprowadzano Na-glukonian  $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  (3) i obserwowano zmiany absorbancji  $A_{495}$

The formation of a pH gradient in plasma membrane (A) or tonoplast (B) vesicles, isolated from control or NaCl treated plants, was initiated by addition of 3.75 mM ATP and  $MgSO_4$  (1). When the pH gradient reached a steady state, 10 units per  $cm^3$  of hexokinase were added (2), followed by addition of  $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$  Na-glucuronate (3) and changes in absorbance at  $A_{495}$  were observed

Rys. 2. Antyporter  $Na^+/H^+$  w pęcherzykach plazmolemy (A) i tonoplastu (B) izolowanych z korzeni ogórka

Fig. 2.  $Na^+/H^+$  antiport in plasma membrane (A) and tonoplast (B) vesicles isolated from cucumber roots

Kompartymencja jonów sodu i chloru w apoplacie i w wakuoli jest zasadnicza dla wzrostu roślin w warunkach stresu solnego. Wycofywanie nadmiaru jonów sodu z cytoplazmy do apoplastu i wakuoli jest możliwe dzięki obecności w błonach białka transportującego sód na zasadzie antyportu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Wiadomo, że funkcjonuje on tylko w warunkach odpowiednio dużego transbłonowego gradientu elektrochemicznego  $\text{H}^+$ .

W doświadczeniach porównano zmiany absorpcji oranżu akrydyny wywołane obecnością glukonianu sodu w preparatach z pęcherzyków plazmolemy lub tonoplastu izolowanymi z siewek ogórków (glikofit) kontrolnych lub poddanych działaniu soli. W próbach z błonami pochodzącymi z roślin poddanych działaniu soli obserwowano wzrost absorpcji oranżu akrydyny, natomiast w preparatach z roślin kontrolnych wprowadzenie glukonianu sodu nie powodowało takich zmian (rys. 2 A, B). Wzrost absorpcji oranżu akrydyny sugerował obecności antyportu sodowo-protonowego w błonach roślin traktowanych NaCl. U halofitów antyporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  ulega ekspresji konstytucyjnej i jest obecny zarówno w roślinach poddanych działaniu NaCl, jak i w roślinach rosnących w środowisku bez NaCl, natomiast u glikofitów pojawia się on indukcyjnie, w odpowiedzi na stres solny [FUKUDA i in. 1998].

Antyport sodowo-protonowy odgrywa istotną rolę w adaptacji roślin do zasolenia. Wysoka aktywność pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu może kontrolować stężenie jonów sodu w cytoplazmie, generuje bowiem gradient protonów, który jest źródłem siły protomotorycznej dla antyportu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Dzięki temu możliwe jest wyrzucanie jonów sodu z cytoplazmy do apoplastu i wakuoli.

## Wnioski

1. W warunkach stresu solnego pompy protonowe plazmolemy i tonoplastu podlegają fosforylacji, w której uczestniczy białkowa kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny, czego skutkiem jest wzrost aktywności enzymów.
2. Wysoka aktywność pomp protonowych plazmolemy i tonoplastu może kontrolować stężenie jonów sodu w cytoplazmie. Generuje bowiem gradient protonów, który jest źródłem siły protomotorycznej dla antyportu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . Antyporter sodowo protonowy obecny jest w błonach komórek korzeni ogórka poddanych działaniu NaCl.

## Literatura

- FUKUDA A., YAZAKI Y., ISHIKAWA T., KOIKE S., TANAKE Y. 1998.  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter in tonoplast vesicles from rice roots. *Plant Cell* 39: 196–201.
- KABAŁA, K., KŁOBUS G. 2001. Characterisation of the proton pump in tonoplast membranes isolated from *Cucumis sativus* L. roots. *Acta Physiol. Plant.* 23(1): 55–63.
- KŁOBUS G. 1995. The role of membrane bound activities in the nitrate transport into sealed plasma membrane vesicles from *Cucumis sativus* L. roots, in: *Developments in Plant and Soil Science. Structure and function of Roots*. Kluwer Academic Publishers 58: 133–141.
- MAGNIN T., FRAICHARD A., TROSSAT C., PUGIN A. 1995. The tonoplast  $\text{H}^+$ -ATPase of

*Acer pseudoplatanus* is a vacuolar type ATPase that operates with a phosphoenzyme intermediate. *Plant Physiol.* 109: 285–292.

PORTILLO F. 2000. Regulation of plasma membrane  $H^+$ -ATPase in fungi and plants. *Biochim. Biophys. Acta* 1469: 31–42.

**Słowa kluczowe:**  $H^+$ -ATPaza, V-ATPaza, regulacja pomp protonowych, stres solny

### Streszczenie

W pracy wykazano, że frakcja cytosolowa z korzeni ogórków traktowanych NaCl, stymulowała plazmolemową i tonoplastową ATPazę izolowaną z roślin nie poddanych działaniu soli. Stymulujący efekt frakcji cytosolowej był eliminowany przez wysoką temperaturę i staurosporinę. Wprowadzenie jonów wapnia z ekstraktem z roślin niepoddanych działaniu soli, do zawiesiny błon izolowanych z roślin również nietraktowanych solą, stymulowało pompy protonowe. Takie rezultaty sugerowały udział specyficznych białkowych kinaz, zależnych od wapnia w aktywacji ATPaz błonowych w warunkach stresu solnego. Doświadczenia z zastosowaniem W7, antagonisty kalmoduliny, zawężyły szeroką grupę kinaz do tych zależnych od kompleksu wapń-kalmodulina.

Dodatkowo wykazano, że w błonach izolowanych z korzeni ogórków traktowanych NaCl funkcjonuje antyport  $Na^+/H^+$ , który wyrzuca nadmiar jonów sodu z cytoplazmy.

### THE MODIFICATION OF PLASMA MEMBRANE AND TONOPLAST PROTON PUMPS UNDER THE SALT STRESS CONDITIONS

*Małgorzata Janicka-Russak, Grażyna Kłobus*  
Institute of Botany, University of Wrocław, Wrocław

**Key words:**  $H^+$ -ATPase, V-ATPase, regulation of proton pumps, salt stress

### Summary

The extract from NaCl treated cucumber roots stimulated both, the plasma membrane and tonoplast ATPases isolated from unstressed plants. Stimulatory effect of the extract from NaCl treated plants was eliminated by high temperature and staurosporine. On the other hand, addition of  $Ca^{2+}$  together with extract from unstressed plants to the membrane prepared from unstressed roots stimulated both proton pumps. Such results suggested a participation of specific Ca-dependent kinases in activation of the membrane ATPases under salt stress conditions. Experiments with W7, an antagonist of calmodulin, restricted a wide

group of kinases to those dependent on the calcium-calmodulin complex.

Furthermore, it was found that in membranes isolated from NaCl stressed cucumber roots operated the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport, which excluded sodium ions from cytoplasm.

Dr Małgorzata **Janicka-Russak**  
Zakład Fizjologii Roślin  
Uniwersytet Wrocławski  
ul. Kanonia 6/8  
50-328 WROCLAW  
e-mail: russak@biol.uni.wroc.pl