

УДК 581.1

## ИЗМЕНЕНИЕ ТРАНСПОРТНОЙ АКТИВНОСТИ ПРОТОННЫХ НАСОСОВ КЛЕТОК КОЛЕОПТИЛЕЙ НА РАННИХ ЭТАПАХ РАЗВИТИЯ ПРОРОСТКОВ КУКУРУЗЫ

© 2012 г. М. Ф. Шишова\*, О. В. Танкелюн\*, Е. Л. Рудашевская, В. В. Емельянов, Н. В. Шахова, А. А. Кирпичникова

Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034 Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9  
E-mail: mshishova@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.11 г.  
Окончательный вариант получен 01.04.12 г.

Проведен сравнительный анализ транспортной активности протонных насосов ( $H^+$ -АТФазы плазмалеммы,  $H^+$ -АТФазы вакуолярного типа и  $H^+$ -пирофосфатазы вакуолярного типа) в мембранных препаратах из клеток колеоптилей этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L.). Показано, что начальные этапы развития колеоптиля при инициации роста растяжением характеризуются наиболее высокой активностью вакуолярной пирофосфатазы. В процессе дальнейшего роста все больший вклад в транспорт ионов водорода вносят АТФазные насосы как тонопласта, так и плазмалеммы с преобладающей активностью последней. При остановке роста активность протонных помп значительно снижается. Тем не менее, их субстратная специфичность и чувствительность к ингибиторам не изменяются, что может свидетельствовать о сохранении физиологического значения насосов в поддержании гомеостаза клетки.

**Ключевые слова:** *Zea mays*, колеоптиль,  $H^+$ -АТФазы Р-типа и V-типа,  $H^+$ -пирофосфатаза V-типа, транспорт протонов, везикулы.

### ВВЕДЕНИЕ

Универсальным свойством живых клеток является активное поддержание внутриклеточного гомеостаза, в первую очередь постоянного уровня рН цитозоля. Тем не менее, как показывают многочисленные исследования, концентрация протонов в цитоплазме не является величиной строго постоянной. Изменение внутриклеточного рН может служить признаком перехода клеток к новой стадии онтогенеза, что свойственно как для животных, так и для растительных клеток (Busa, Niccittelli, 1984; Aerts et al., 1985; Галкина и др., 1991). Примером могут служить изменения рН цитозоля растительных клеток при поляризации яйцеклеток водорослей (Gibbon, Kropf, 1993), а также при завершении клеточного цикла, при переходе клетки к программируемой клеточной смерти (Drew et al., 2000). Кратковременные и пролонгированные (в ряде случаев осцилляцион-

ного характера) изменения рН возникают и в результате действия широкого спектра внешних и внутренних факторов. Резкие сдвиги рН цитозоля регистрируются при изменении состава и интенсивности освещенности (Felle, Bertl, 1986), снижении уровня кислорода (Felle, 2005), при недостатке воды (Wilkinson, 1999) и действия патогенов (Mathieu et al., 1996). Кроме того, способностью индуцировать изменения рН обладают фитогормоны. Так, закисление цитозоля регистрируется при действии ауксина (Felle, 1988; Shishova, Lindberg, 1999), а защелачивание при обработке абсцизовой кислотой (Gering et al., 1990; Blatt, Armstrong, 1993). Участие протонов в развитии широкого спектра физиологических реакций позволяет рассматривать их в качестве компонентов протонной сигнальной системы (Полевой, 1986; Felle, 2001; Тарчевский, 2002), использующей ионы водорода в качестве вторичных посредников.

Хорошо известно, что ионы  $H^+$  выполняют в живой клетке важную регуляторную функцию. Изменение рН водных растворов приводит к изменению соотношения протонированных и непротонированных кислотных и основных групп биологически активных молекул, а, следовательно, модифицирует такие их свойства, как, например, поверхностный заряд, сродство к лиганду и т.д. Даже кратковременные сдвиги концентрации ионов  $H^+$  в цитозоле могут привести к изме-

\* Авторы внесли равноценный вклад в данную работу.  
Сокращения: АО – акридиновый оранжевый, DCCD – дициклогексил карбодимид, FCCP – карбонилцианид 4-(трифлуорометокси)фенилгидразон, FITC – флуоресцеин изо-тио-цианат.  
Адрес для корреспонденции: Мария Федоровна Шишова. 199034 Санкт-Петербург. Университетская наб. 7/9, Санкт-Петербургский государственный университет, биолого-почвенный факультет, кафедра физиологии и биохимии растений. Факс: 007 (812) 328-44-32; e-mail: mshishova@mail.ru.

нению активности целого ряда ферментов (в связи с различиями в рН-оптимумах, изменения сродства к субстрату, связывания с регуляторными белками, в первую очередь на уровне белок-белковых взаимодействий, и т.д.). Кроме того, протон-зависимые сигнальные каскады могут быть тесно сопряжены с другой важнейшей сигнальной системой – кальциевой, так как связывание  $\text{Ca}^{2+}$  с регуляторными белками (такими как, кальмодулин) зависит от концентрации свободных протонов.

Возвращение системы к первоначальному состоянию может осуществляться с помощью различных механизмов, включающих ряд метаболических реакций, потребляющих или продуцирующих протоны, а также процессов трансмембранного транспорта ионов  $\text{H}^+$  между цитоплазмой, внутриклеточными компартментами и апопластом. Активную транслокацию протонов в растительных клетках обеспечивают такие  $\text{H}^+$ -насосы, как  $\text{H}^+$ -АТФазы плазмалеммы и тонопласта, а также  $\text{H}^+$ -пирофосфатаза вакуолярного типа.

$\text{H}^+$ -АТФаза плазмалеммы, характерная для клеток растений и грибов, относится к АТФазам Р-типа, т.е. фосфорилируется при катализе реакции расщепления АТФ, (ЕС 3.6.3.6.), является  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимой и  $\text{K}^+$ -стимулируемой, играет важную биоэнергетическую и регуляторную роль в физиологии клеток (Полевой, 1986; Gaxiola et al., 2007). За счет энергии гидролиза АТФ фермент переносит протоны из цитоплазмы через плазматическую мембрану клетки, создавая электрохимический градиент протонов, который необходим для поддержания живого состояния клетки в целом, так как обеспечивает движущую силу для вторичного транспорта веществ через плазмалемму.  $\text{H}^+$ -АТФаза участвует в развитии ответных реакций клеток на различные воздействия внешней и внутренней среды, такие как свет, грибные токсины, регуляторы роста (Serrano, 1989; Palmgren, 1991). Одним из важных физиологических процессов, в которых принимает участие  $\text{H}^+$ -АТФаза плазмалеммы, является активируемый ауксином специфичный для растительных клеток рост растяжением (Rayle, 1973; Полевой, 1986; Nager, 2003). Активность  $\text{H}^+$ -АТФазы одновременно создает условия для двух процессов необходимых для роста клеток: поступления осмотических веществ в клетку и, следовательно, увеличения ее объема, а также увеличения растяжимости клеточной стенки (Serrano, 1993).

$\text{H}^+$ -АТРаза вакуолярного типа (V-типа; ЕС 3.6.1.3) – широко распространенный у эукариотических клеток протонный насос внутриклеточных мембран. Она организована как мультисубъединичный комплекс, образованный надмембранным каталитическим и трансмембранным  $\text{H}^+$ -проводящим доменами общей молеку-

лярной массой около 750 кДа (Merzendorfer et al., 1997; Ratajczak, 2000). По строению V-АТФаза эволюционно родственна АТФ-синтазам F-типа (Gruber et al., 2001; Kluge et al., 2003), но присутствует в мембранах, ограничивающих различные внутриклеточные компартменты с более кислым, чем цитоплазма содержанием. В клетках растений основным местом локализации V-АТРаза является вакуолярная мембрана. Кислые значения рН содер-жимого литических вакуолей и секреторных везикул, поддерживаемые  $\text{H}^+$ -АТФазами, требуются для активности гидролитических ферментов. Экспериментально установлено участие V-АТФаз в процессах эндо- и экзоцитоза (Dettmer et al., 2006; Schumacher, 2006). Исследования последних лет показали, что V-АТФаза играет важную роль в регуляции эмбрионального развития и роста растяжением (Strompen et al., 2005).

$\text{H}^+$ -пирофосфатаза вакуолярного типа (ЕС 3.6.1.1.) обнаружена в клетках высших растений, некоторых зеленых водорослей и одноклеточных паразитических организмов, родственной ей формой считают обратимую пирофосфат-синтазу несерных пурпурных бактерий (Rea, Poole, 1993; Maeshima, 2000). кДНК V-пирофосфатазы, клонированные из ряда растений, бактерий и некоторых протист обладали очень высокой степенью гомологии (86–91%) (Lin et al., 2005; Van et al., 2005). Она представляет собой гомодимерный белок, с молекулярной массой субъединицы 75–81 кДа и 14 трансмембранными доменами.  $\text{H}^+$ -пирофосфатаза V-типа локализована в вакуолярной мембране, в мембранах аппарата Гольджи, у некоторых объектов – в плазматической мембране (Baltscheffsky et al., 1999). Установлено, что помимо регуляции рН вакуоли, она играет важную роль в регуляции интенсивности везикулярного транспорта, и тем самым оказывает влияние на количество ряда физиологически значимых белков, таких как  $\text{H}^+$ -АТФаза и переносчики ауксина PIN1 на плазмалемме (Li et al., 2005).

Таким образом, все рассмотренные протонные насосы играют огромную роль в обеспечении жизнедеятельности растительной клетки, а также в ее способности воспринять сигнал и сформировать адаптивный физиологический ответ. Не вызывает сомнения, что они служат наиважнейшим звеном такого процесса, как рост растяжением, заключающегося в многократном увеличении размеров клетки и ее вакуолизации. Тем не менее, остается дискуссионным вопрос о вкладе каждого из трех протонных насосов в этот процесс и о возможном перераспределении их ролей в ходе развития. Проведенное ранее исследование свойств  $\text{H}^+$ -АТФазы плазмалеммы выявило изменение гидролитической активности фермента в ходе онтогенеза клетки (Рудашевская и др., 2005, 2009). В связи с этим цель настоящего исследования заключалась в сравнительном анализе протон-

транспортирующей активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы, а также протонных насосов тонопласта в процессе роста растяжением.

В качестве модельного объекта в исследовании роста клеток растяжением часто используют колеоптили злаков, которые представляют собой быстро развивающиеся органы ювенильного проростка: за несколько суток они проходят период быстрого роста и переход к завершению своей физиологической функции. У кукурузы при выращивании проростков при 26–27°C в темноте все клетки колеоптиля переходят от деления к росту растяжением на третьи сутки развития проростка (Москалева, Полевой, 1987). К пятым суткам, когда настоящий лист выходит наружу из-под защиты колеоптиля, происходит значительное снижение активности роста клеток колеоптиля и снижается чувствительность ростовой реакции к ауксину (Рудашевская и др., 2002). В настоящем исследовании нами оценивалось изменение транспортной активности  $H^+$ -АТФазы плазматической мембраны, а также  $H^+$ -АТРАЗы и  $H^+$ -пирофосфатазы эндомембран из колеоптилей 3-, 4- и 5-суточных проростков кукурузы, клетки которых находятся на разных стадиях роста растяжением.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили 3-, 4- и 5-суточные проростки кукурузы (*Zea mays* L.), выращенные в темноте (с кратковременной засветкой не более 5 мин в сутки для синхронизации роста колеоптилей) при 27°C на разбавленном в 10 раз питательном растворе Чеснокова. Проростки гибрида ЗПТК-196 и Нарт-150 имели синхронное развитие, характеризующиеся средней длиной колеоптилей  $24.0 \pm 1.5$  мм,  $44.9 \pm 2.4$  мм,  $51.3 \pm 3.7$  мм для 3-, 4- и 5-суточных проростков соответственно.

Для выделения фракции плазмалеммы использовали декапитуированные на 4 мм колеоптили проростков кукурузы (гибрид ЗПТК-196). Везикулярную фракцию плазмалеммы получали дифференциальным центрифугированием с очисткой в градиенте плотности сахарозы, как описано ранее (Рудашевская и др., 2005). По данным биохимического анализа маркерных ферментов, полученная фракция обогащена плазмалеммой. Везикулы загружали с использованием осмотического шока (при 10-кратном понижении концентрации сахарозы) средой следующего состава: 150 мМ  $K_2SO_4$ , 1 мМ Трис-МЕС, 150 мМ сахарозы, рН 6.8–7.0 (в зависимости от величины рН везикулярной фракции), и пересаждали при 99500 g 1 ч. При необходимости введения флуоресцентного зонда в везикулы их загружали средой того же состава с добавлением рН-зависимого

зонда FITC-декстран (остаток декстрана обеспечивал внутривезикулярную локализацию зонда).

АТФ-зависимый транспорт протонов через мембрану везикул плазмалеммы оценивали с использованием флуоресцентных зондов diS-C<sub>3</sub>-(5) (0.7 мкМ) (по изменению трансмембранного потенциала) и FITC-декстран (0.8 мг/мл) (по изменению рН внутри везикулярной среды), на спектрофлуориметре при длине волны возб./фл. 580/665 нм и 480/520 нм соответственно. Объем инкубационной смеси 300 мкл. Везикулы (1–5 мкг белка) инкубировали в среде – 150 мМ  $Na_2SO_4$ , 1 мМ Трис-МЕС, 150 мМ сахарозы, рН 6.8–7.0 (в зависимости от величины рН везикулярной фракции во избежание исходного градиента рН на мембранах везикул). Реакцию запускали введением  $MgCl_2 + Na_2ATP$  в конечной концентрации 3 мМ. Активность транспорта протонов через мембрану везикул в случае использования потенциал-зависимого зонда diS-C<sub>3</sub>-(5) выражали в % от величины трансмембранного потенциала, генерируемого в данной системе при внесении  $K^+$ -ионофора валиномицина (0.03 мкМ), и рассчитывали на единицу белка фракции мембран. Валиномицин-зависимое изменение флуоресценции зонда нами рассматривалось в качестве калибровочного стандарта. Расчеты показывают, что в используемой нами модельной системе добавление  $K^+$ -каналоформера приводит к генерации  $K^+$  диффузионного потенциала, равного по величине –110 мВ (Батов и др., 1995). Интенсивность тушения зонда при внесении валиномицина несколько варьирует, отражая свойства мембранного препарата, поэтому эта величина была использована в качестве внутреннего стандарта для каждого эксперимента. При работе с рН-чувствительным зондом FITC-декстран, загруженным в везикулы, определяли изменение рН среды внутри везикул и также относили его на содержание белка. Калибрование зонда, загруженного в везикулы, проводили, изменяя величину рН инкубационной среды, содержащей везикулярную фракцию и протонофор.

Для выделения фракций внутриклеточных мембран использовали гибрид F1 Нарт-150. Расщепленные ткани (отрезки колеоптилей без 4 мм верхушки, длиной 10–15 мм) гомогенизировали в среде, содержащей 0.4 М сахарозы, 50 мМ Трис-НСl (рН 7.8), 5 мМ ЭДТА, 2.5 мМ дитиотрейтола (ДТТ), 10 мМ 2-меркаптоэтанола, 0.1% бычьего сывороточного альбумина (в отношении 3 мл среды на 1 г ткани для 3-суточных проростков и 2 мл/1 г для 4- и 5-суточных проростков). Гомогенат фильтровали через нейлон и центрифугировали при 3400 g 10 мин. Супернатант наносили на градиент плотности сахарозы, состоящий из слоев с плотностью 1.055 и 1.12 г/см<sup>3</sup> (14 и 28% сахарозы), приготовленных на растворе 5 мМ Трис-МЕС (рН 7.3), 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ ЭДТА. После

центрифугирования при 96000 *g* 2 ч фракцию на границе слоев отбирали, разбавляли в буферной смеси, содержащей 0.2 М сахарозу, 5 мМ Трис-MES, 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ ЭДТА, и осаждали при 96000 *g* 1 ч. По данным анализа активности маркерных ферментов, фракция содержала преимущественно мембраны вакуолей и эндоплазматического ретикула (ЭР). Отделения ЭР от тонопласта не производили в связи с тем, что у 3-суточных проростков кукурузы, в отличие от 4–5-суточных, клетки колеоптилей находятся в основном в начальной стадии растяжения и формирования вакуолей, при этом комплексы АТФазы V-типа могут быть локализованы и в тонопласте и в ЭР (как это показано для клеток кончика корня овса (Herman et al., 1994)).

АТФ- и пиродифосфат-зависимый транспорт ионов  $H^+$  в мембранные везикулы фракции внутриклеточных мембран оценивали по снижению поглощения моноаминного оптического зонда акридинового оранжевого (АО) на спектрофотометре СФ-46 при 495 нм. Инкубационная смесь объемом 800 мкл включала 10 мкМ АО, 5 мМ Трис-MES (рН 7.0), 0.2 М сахарозу, 1 мМ  $MgSO_4$ , 50 мМ KCl, 1 мМ ДТТ, 0.1 мМ ЭДТА, везикулярный препарат (10–30 мкг мембранного белка). Измерения начинали с добавления 1 мМ  $Na_2ATP$  или 0.5 мМ  $Na_4P_2O_7$ . Определяли начальную скорость изменения поглощения АО и значение  $\Delta A_{495}$  при достижении реакцией состояния равновесия, соответствующее максимальному градиенту рН, создаваемому при работе  $H^+$ -насосов. Проницаемость мембран для протонов оценивали по росту поглощения АО (при выходе протонов из везикул) после остановки реакции добавлением 2 мМ ЭДТА. Определяли отношение между изменениями поглощения АО при выходе  $H^+$  и при АТФ/пиродифосфат-зависимом входе  $H^+$  в везикулы:  $\Delta A_{495 out} / \Delta A_{495 in}$ .

Содержание белка в мембранных препаратах определяли по методу Бредфорд (Bradford, 1976).

В работе представлены средние арифметические значения и ошибки среднего, полученные по результатам экспериментов, проведенных в 3–7 биологических повторностях.

В работе использовали: Трис (“Reanal”, Венгрия; “Sigma”, США); Mes, Трис, ДТТ, АТФ, валиномицин, DCCD, FCCP (“Sigma”, США); ЭДТА (Fluka, Германия); FITC-декстран (Molecular Probes) остальные реактивы – отечественного производства (хч).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

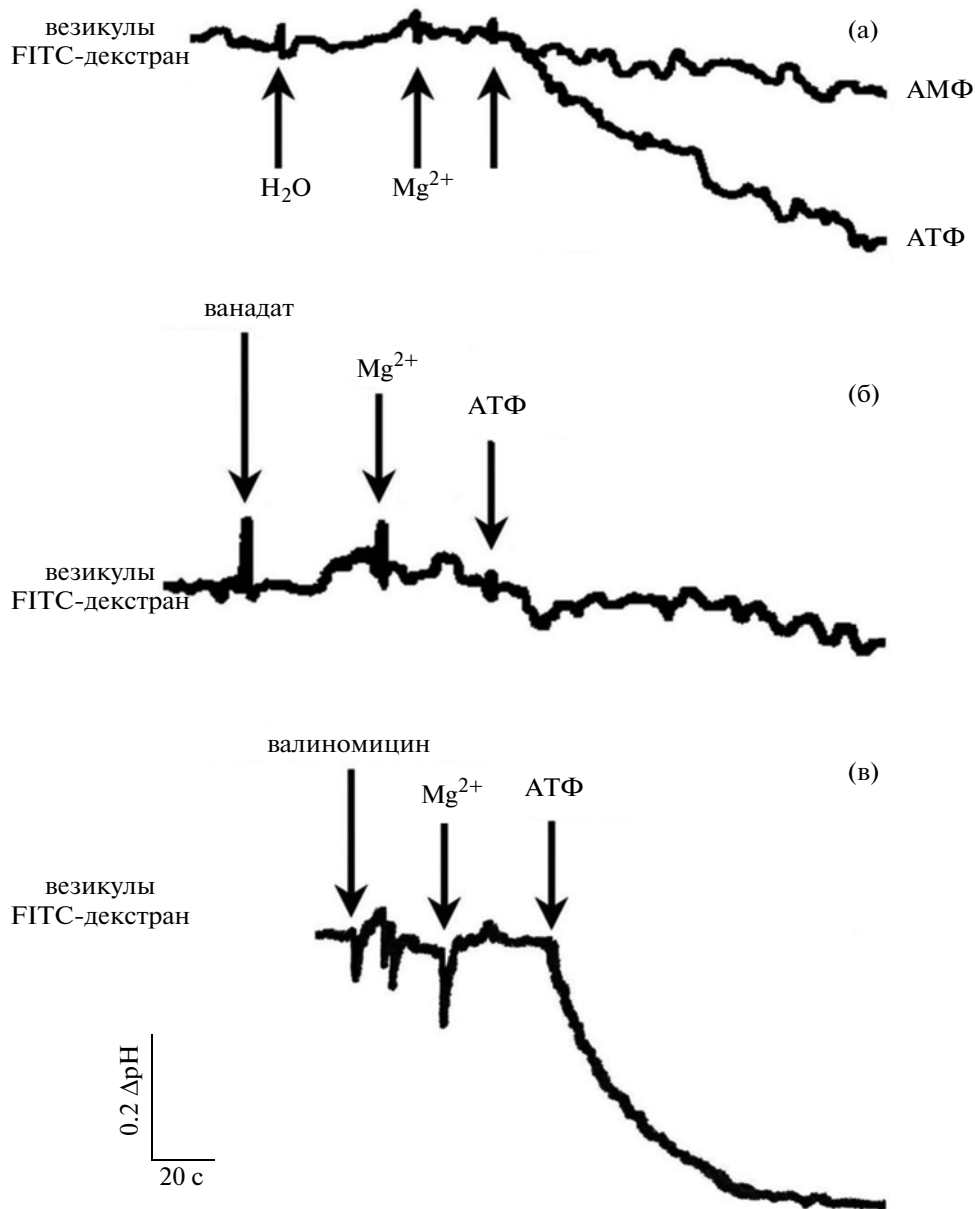
### *Анализ активности $H^+$ -АТФазы плазмалеммы*

При центрифугировании в градиенте плотности сахарозы на границе слоев с плотностью 34 и 45% получали фракцию мембран, которая по дан-

ным ингибиторного анализа биохимических маркеров обогащена плазмалеммой (Рудашевская и др., 2005). В этой фракции обнаруживалась высокая  $Mg^{2+}$ -зависимая  $K^+$ -стимулируемая АТФазная гидролитическая активность, ингибируемая ванадатом, что характерно для АТФаз Р-типа, к которым относится  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы.

В наших экспериментах с использованием фракции, обогащенной плазмалеммой из клеток колеоптилей кукурузы, показана АТФ-зависимая генерация электрохимического потенциала ионов  $H^+$ . Величину протонного градиента, генерируемого на мембранах везикул плазмалеммы, анализировали по сдвигу рН внутри везикул, который оценивался по изменению флуоресценции зонда FITC. Внутривезикулярная локализация зонда во время эксперимента обеспечивалась остатком высокомолекулярного декстрана (мол. м. 40000), структурно соединенного с молекулой FITC и препятствующего транспорту зонда из везикул. Выявлено изменение интенсивности флуоресценции зонда при введении комплекса  $Mg$ -АТФ в среду инкубации, что свидетельствует об изменении значения рН среды внутри везикул (рис. 1а). Введение АТФ активирует только инвертированные везикулы с обращенным в инкубационную среду активным центром фермента и индуцирует транспорт протона внутрь везикул, что приводит к понижению рН в везикулах и соответствующему изменению флуоресценции зонда. Наблюдаемый эффект специфичен для АТФ по отношению к АМФ, добавление которого приводит лишь к незначительному изменению флуоресценции (рис. 1а). Ванадат, специфичный ингибитор  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы, снижал амплитуду АТФ-индуцируемого изменения флуоресценции (рис. 1б), что доказывает участие  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы в изменении рН внутри везикул. Предварительное внесение валиномицина к везикулам приводило к более сильному и быстрому АТФ-зависимому изменению флуоресценции (рис. 1в). Наблюдаемый эффект активации, создаваемый валиномицином, согласуется с тем, что  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы активируется деполяризацией плазмалеммы, а также ионами  $K^+$  со стороны активного центра фермента.

Как видно из рис. 1, АТФ-зависимая генерация электрохимического потенциала ионов водорода развивается быстро и достигает максимума менее, чем за 5 мин. Сравнительный анализ амплитуды генерируемого потенциала везикулярными фракциями плазмалеммы, полученными из клеток колеоптилей проростков разного возраста, выявил изменение транспортной активности фермента в онтогенезе проростка. При использовании рН-зависимого зонда FITC наибольшая  $H^+$ -транспортирующая активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы была показана для фракции 4-су-

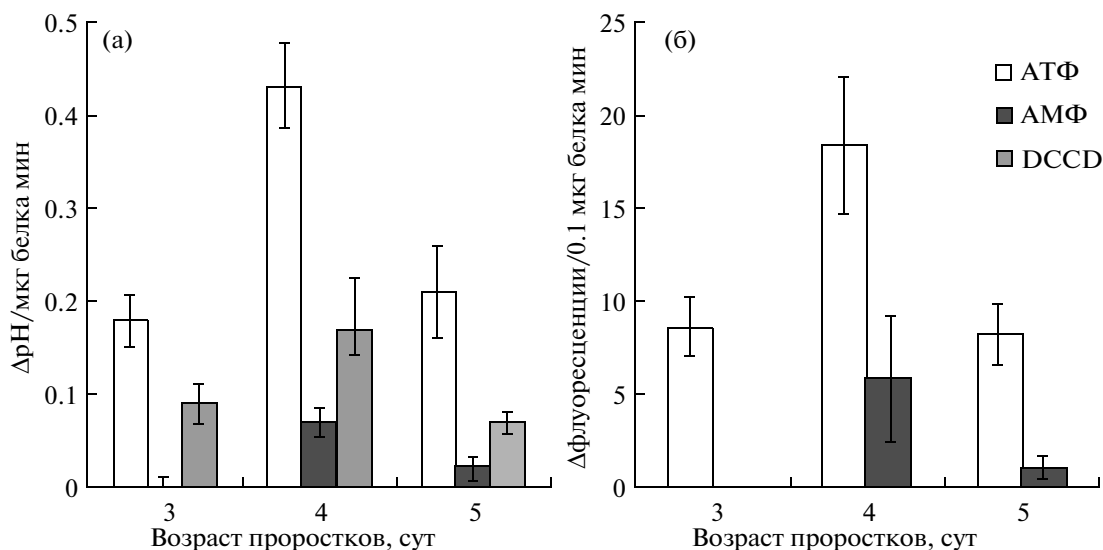


**Рис. 1.** АТФ-индуцируемое изменение интенсивности флуоресценции рН-зависимого зонда FITC-декстран в препаратах везикул плазмалеммы клеток coleoptiles кукурузы.  
 а – АТФ- и АМФ-зависимое изменение флуоресценции зонда FITC-декстран.  
 б – Влияние ванадата на величину АТФ-зависимого изменения флуоресценции зонда FITC-декстран.  
 в – Влияние валиномицина (0.03 мкМ) на величину АТФ-зависимого изменения флуоресценции зонда FITC-декстран.

точных проростков, которая значительно превышала активность фермента на 3 и 5 сутки развития (рис. 2а). Аналогичная зависимость была выявлена и при определении электрической составляющей генерируемого протонного градиента, которая регистрировалась по изменению интенсивности флуоресценции потенциал-зависимого зонда diS-C<sub>3</sub>-(5). Максимальное изменение было характерно для мембран, полученных из клеток ко-

леоптилей 4-суточных этиолированных проростков (рис. 2б).

Для всех исследуемых этапов развития использование АМФ в качестве аналога АТФ вызывало лишь очень незначительное изменение свечения зонда diS-C<sub>3</sub>-(5), которое можно считать неспецифичным (рис. 2). Применение ингибитора DCCD (1.7 мкМ) во всех проведенных экспериментах снижало регистрируемую FITC активность фракции плазмалеммы на 50, 60 и 67% у



**Рис. 2.** Изменение АТФ-зависимой  $H^+$ -транспортирующей активности везикулярной фракции плазмалеммы из клеток колеоптилей проростков кукурузы разного возраста.

а – Активность транспорта протона оценивали с использованием FITC-декстран и выразили в изменении значения рН внутривезикулярной среды.

б – Активность транспорта протонов оценивали с использованием diS-C<sub>3</sub>-(5) и выразили в процентах от величины потенциала, генерируемого в данной системе валиномицином.

На диаграмме (а, б): белые столбики – в инкубационную среду, содержащую везикулы и ионы Mg, вносили АТФ; серые столбики – АМФ; заштрихованные столбики – при оценке АТФ-зависимого транспорта фракцию мембран предварительно инкубировали с DCCD (1.7 мкМ).

фракций, полученных из 3-, 4- и 5-суточных проростков, соответственно (рис. 2а).

#### *Анализ активности вакуолярных пиррофосфатазы и $H^+$ -АТФазы*

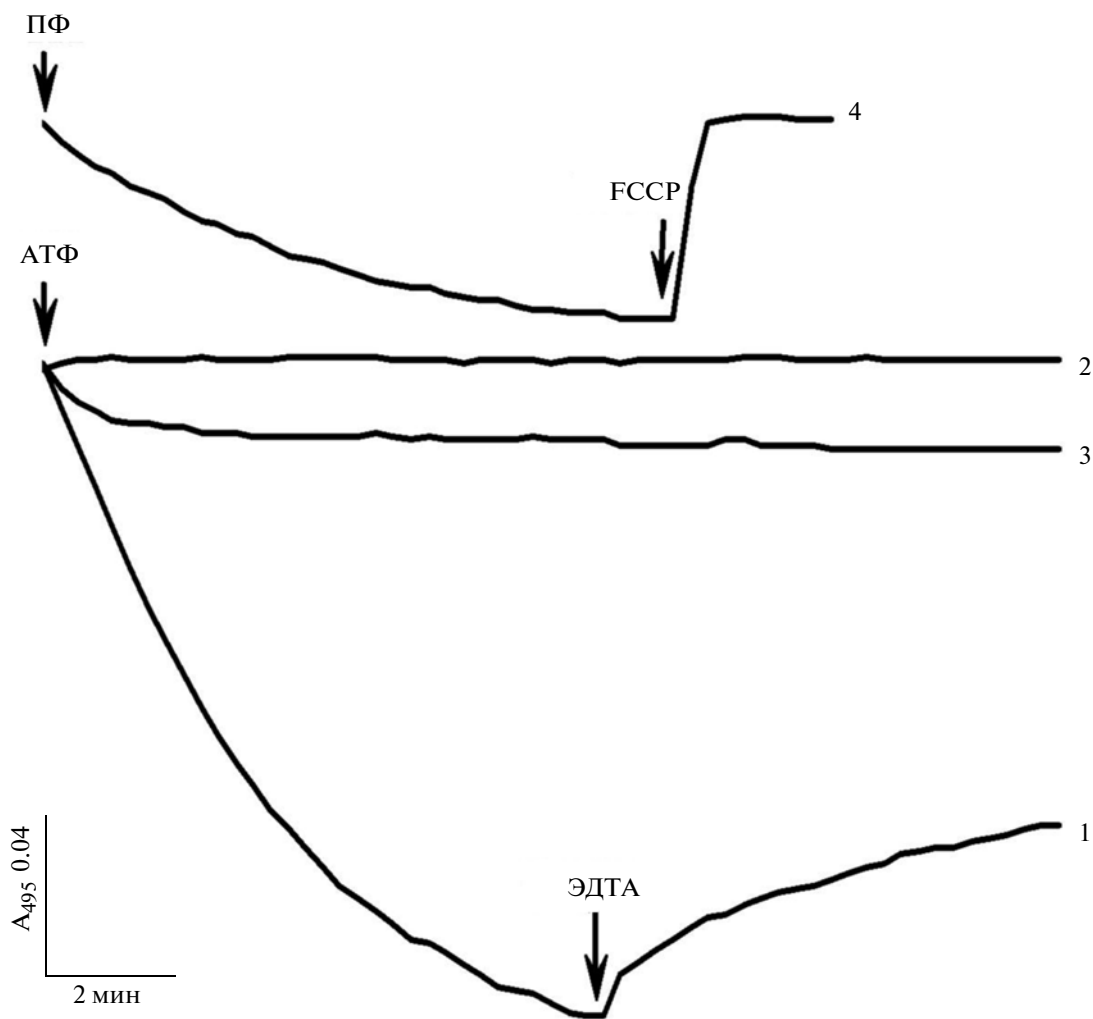
Фракция мембран, выделяемая из гомогената клеток колеоптилей кукурузы на границе слоев градиента плотности сахарозы 14 и 28%, по данным анализа биохимических маркеров обогащена фрагментами тонопласта и эндоплазматического ретикулума. В ней обнаруживалась значительная нитрат-ингибируемая АТФазная активность, присущая АТФазе вакуолярного (V) типа, пиррофосфатазная активность с высоким уровнем стимуляции KCl, характерная для пиррофосфатазы V-типа, азид-нечувствительная НАДН-цитохром C-редуктазная активность (маркер ЭР), а также незначительная ванадат-чувствительная АТФазная активность.

В исследуемой фракции, обозначенной как фракция эндомембран, показан АТФ- и пиррофосфат-зависимый транспорт  $H^+$ , который регистрировали спектрофотометрически по снижению поглощения проникающего моноаминного зонда акридинового оранжевого (рис. 3). Величина адсорбции АО возвращалась на исходный уровень после добавления протонофора FCCP (5 мкМ), а также тритона X-100 (0.01%) и  $NH_4Cl$  (15 мМ), что свидетельствует о рассеивании протонного градиента. АТФ-зависимое накачивание  $H^+$  в вези-

кулы эндомембран осуществлялось за счет работы АТФазы V-типа, так как оно полностью подавлялась бафиломицином А1 (5 нМ) и на 80% ингибировалось  $KNO_3$  (50 мМ) и не обнаруживало чувствительности к ванадату.

Сравнительный анализ активности АТФ- и пиррофосфат-зависимого транспорта ионов  $H^+$  в везикулы препаратов эндомембран клеток проростков разного возраста показал, что АТФ-зависимое снижение поглощения АО имело наибольшую начальную скорость у растущих растяжением колеоптилей 4-суточных проростков (рис. 4а), тогда как в присутствии пиррофосфата эта величина была максимальной у 3-суточных проростков, клетки которых находятся в начале фазы растяжения (рис. 4б). Сходные изменения наблюдались, когда  $H^+$ -транспортирующую активность выражали как максимальный градиент рН между внутренней средой везикул и инкубационной средой, достигаемый в ходе реакции ( $\Delta A_{495}/\text{мг белка}$ ).

Уровень регистрируемого снижения поглощения АО зависит не только от активности  $H^+$ -насосов, обеспечивающих вход  $H^+$  в везикулы, но и от выхода  $H^+$  в инкубационный раствор, который, возможно, связан с наличием каналов и котранспортеров для протонов и других ионов или молекул (в данной системе  $Cl^-$ ) и неспецифической проницаемостью мембран, зависящей от свойств липидно-белкового матрикса мембран, температуры и состояния мембран после их выделения. Чтобы оценить проницаемость мембран к прото-



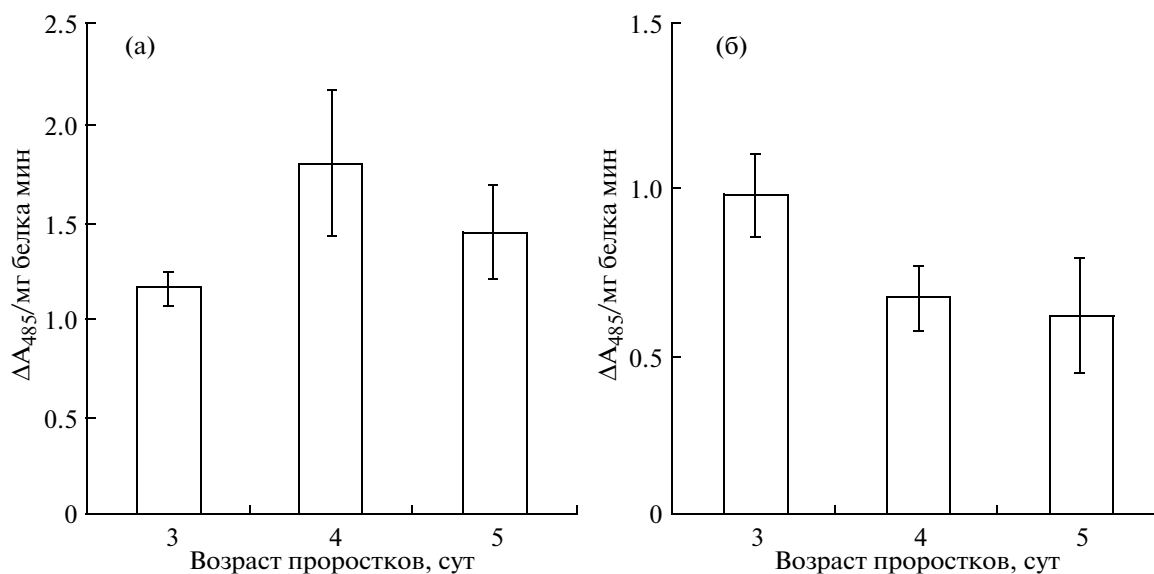
**Рис. 3.** АТФ-зависимое (1, 2, 3) и пирофосфат-зависимое (4) снижение поглощения акридинового оранжевого в препаратах эндомембран, выделенных из клеток колеоптилей 4-суточных проростков кукурузы. Бафиломицин А<sub>1</sub> (2 нМ) (2), КНО<sub>3</sub> (50 мМ) (3) добавлены перед началом АТФ-зависимой реакции, FCCP (5 мкМ), ЭДТА (2 мМ) – как указано стрелками.

нам после достижения равновесного уровня  $\Delta pH$ , при котором вход и выход  $H^+$  уравновешены, в среду реакции добавляли ЭДТА (2 мМ) для остановки реакции и анализировали выделение  $H^+$  (рис. 3). Было установлено, что величина повышения поглощения АО после добавления ЭДТА существенно не различалась для препаратов мембран из проростков разного возраста (рис. 5а). Однако при расчете процентного отношения величины возврата поглощения АО на его исходный уровень  $\Delta A_{495}$  (выход  $H^+$ ) к величине АТФ-зависимого снижения поглощения АО  $\Delta A_{495}$  (вход  $H^+$ ) было выявлен наиболее низкий “процент возврата” в препаратах мембран из 4-суточных проростков кукурузы (рис. 5б). Это свойство мембранного транспорта у 4-суточных проростков отсутствовало при анализе пирофосфат-зависимого закисления везикул (данные не приводятся).

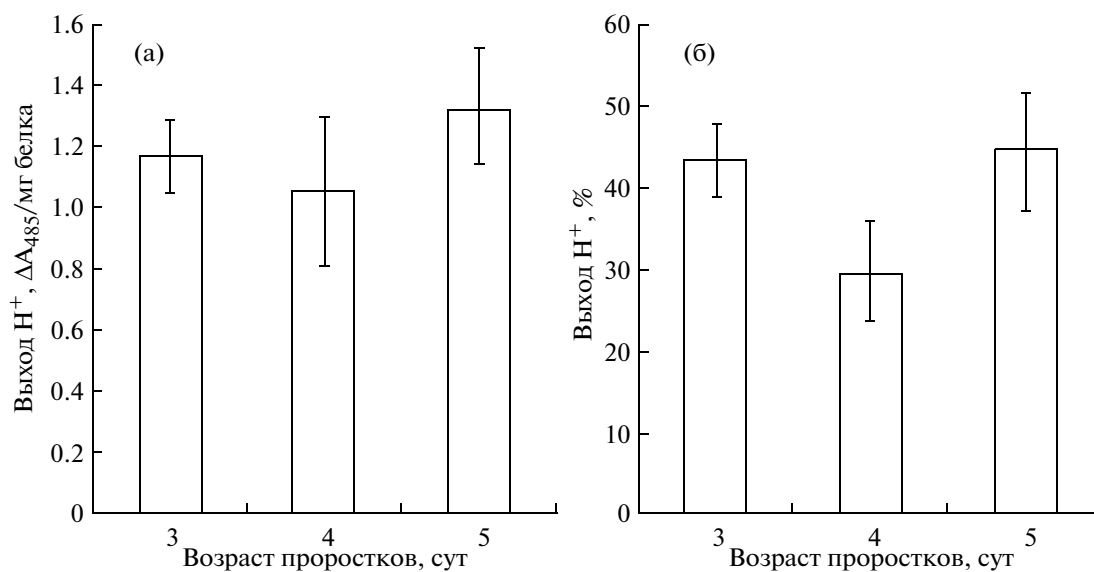
Можно предположить, что различия в проницаемости мембран к ионам  $H^+$  связаны непосредственно с состоянием АТФазы вакуолярного типа и/или сопряженными с ней транспортными механизмами.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Рост растяжением представляет собой универсальное свойство растительных клеток, хорошо идентифицируемое как у многоклеточных водорослей, так и у высших растений. Возникнув на ранних этапах эволюции, данный процесс обеспечивает при минимальных энергетических затратах достижение максимального объема, что является основополагающим критерием растительного организма – максимальное соприкосновение с окружающей средой в целях получения наилучшего доступа к источникам питания (По-



**Рис. 4.**  $\text{H}^+$ -транспортирующая активность АТФазы (а) и пирофосфатазы (б) эндомембран из клеток coleoptилей кукурузы, выраженная как начальная скорость снижения поглощения акридинового оранжевого в расчете на мг мембранного белка.



**Рис. 5.** Уровень выхода ионов  $\text{H}^+$  из везикул эндомембран на фоне АТФ-зависимого градиента рН после остановки АТФазной реакции ЭДТА (2 мМ).

а – Выход  $\text{H}^+$ , выраженный как изменение поглощения АО в расчете на мг мембранного белка.

б – Отношение роста поглощения АО при выходе  $\text{H}^+$  к снижению поглощения АО при АТФ-зависимом переносе  $\text{H}^+$  в везикулы, в процентах.

левой, 1986). Хорошо известно, что данный процесс находится под контролем фитогормона ауксина. Предложенная в 70-х годах теория “кислого роста” предполагает, что ауксин вызывает целый каскад событий, одним из элементов которого является активация  $\text{H}^+$ -АТФазы плазмалеммы (Cleland et al., 1971; Hager et al., 1971; Полевой, 1986). Процесс роста растяжением включает в себя интенсивную вакуолизацию клетки, следовательно, можно предположить активное участие и ряда ва-

куолярных транспортных систем, в первую очередь вакуолярных  $\text{H}^+$ -АТФазы и пирофосфатазы.

В клетках coleoptилей кукурузы, все три типа  $\text{H}^+$ -насосов проявляют значительную гидролитическую и транспортную активность. Тем не менее, полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что интенсивность транспорта протонов варьирует в ходе развития клеток ювенильного органа проростка. Так, у 3-суточных проростков в мембранах везикул тонопласта и эндо-



плазматического ретикулула наиболее высокий уровень имеет активность  $H^+$ -пирофосфатазы. В ходе дальнейшего развития, характеризующегося постепенным замедлением ростовых процессов, транспортная функция данного фермента постепенно снижается. Динамика активности  $H^+$ -АТФаз как плазмалеммы, так и тонопласта была иной. Максимальный уровень транспорта протонов обе АТФазы обнаруживали на 4-е сутки развития проростка, т.е. при ослаблении интенсивности роста. У 5-суточных проростков, на этапе завершения физиологической функции колептиля (первый настоящий лист выходит за пределы колеоптиля) и полной остановке роста, основные протон-транспортирующие насосы, тем не менее, сохраняли свою активность, чувствительность к ингибиторам и субстратную специфичность.

Таким образом, в фазе завершения деления и перехода клеток колеоптиля к растяжению наибольший вклад в энергизацию внутриклеточных компартментов вносит V-пирофосфатаза. На стадии поддержания интенсивности роста растяжением возрастает значение АТФаз в энергизации мембран растительной клетки и регуляции ее метаболизма.

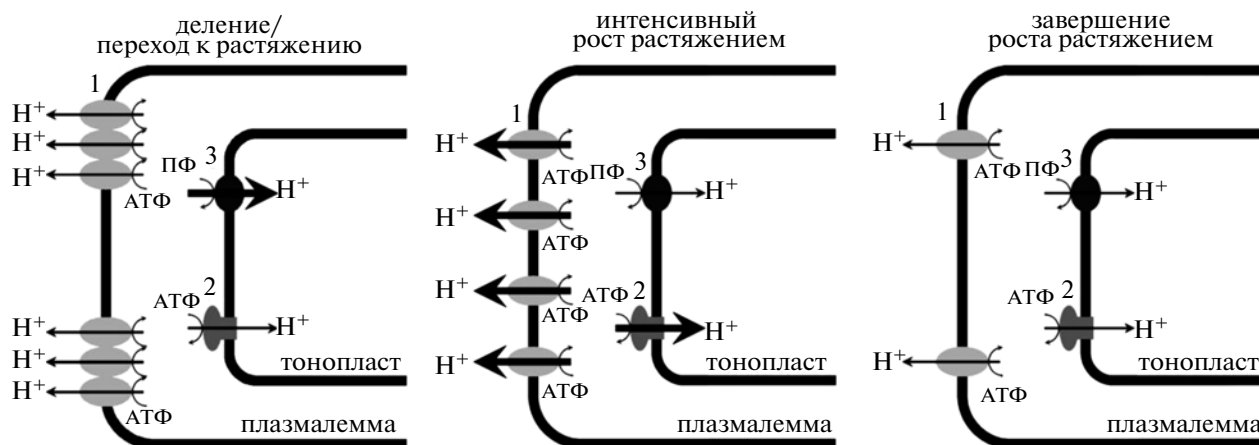
Эти результаты согласуются с литературными данными для других растительных объектов. В гипокотылях маша наибольшая пирофосфатазная активность, высокий уровень мРНК и молекул фермента обнаруживался в зоне делящихся клеток. Напротив, в зонах интенсивного роста растяжением и, особенно, дифференцированных клеток возрастала активность АТФазы V-типа (Maeshima et al., 1996; Nacanishi, Maeshima, 1998). В созревающих плодах груши также на начальных этапах развития, характеризующихся увеличением размера клеток, преобладала активность пирофосфатазы. На поздних этапах созревания основным  $H^+$ -насосом тонопласта становилась АТФаза (Shiratake et al., 1997). Ряд исследований свидетельствует о нелинейном изменении активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы. Так временное увеличение активности работы протонной помпы плазмалеммы характеризовало инициацию прорастания семян кукурузы (Sanchez-Nieto et al., 1998), индукцию развития почек персика (Aue et al., 1999), а также период инициации цветения растений табака (Santoni et al., 1991).

Можно отметить некоторые особенности физиологии клеток в фазе деления, которые обеспечивают приоритетную роль  $H^+$ -пирофосфатазы на ранних этапах онтогенеза. Молодые клетки растений до перехода к растяжению малы, подобно клеткам животных, они имеют более низкую интенсивность дыхания, а внутренние клетки меристем могут находиться в состоянии частичного анаэробноза (Саламатова, 1983). Это сочетается с пониженным уровнем АТФ и увеличивает значе-

ние пирофосфата как источника энергии и субстрата для транспорта  $H^+$ . Преобладание анаболических реакций над катаболическими характерно для клеток в фазе деления. Многие биосинтетические процессы, в том числе синтезы нуклеиновых и жирных кислот, белков и полисахаридов, сопровождаются образованием пирофосфата. Одна из функций  $H^+$ -пирофосфатазы состоит в утилизации пирофосфата, что обеспечивает направленность обратимых реакций в сторону биосинтезов (Rea, Poole, 1993; Maeshima et al., 1996). Показана также возможность использования создаваемого в результате работы  $H^+$ -пирофосфатазы  $\Delta\mu H^+$  для синтеза АТФ в результате сопряженной работы вакуолярной  $H^+$ -АТФазы с обращением ее энергетической функции (Fasaha, de Meis, 1998), что может иметь важное значение для снабжения клеток дополнительной энергией в форме АТФ.

При переходе клеток к росту растяжением возрастает интенсивность дыхания, накапливаются низкомолекулярные вещества, увеличивается содержание АТФ, которое поддерживается на миллимолярном уровне, как и у дифференцированных клеток (Саламатова, 1983). Содержание пирофосфата у большинства видов на порядок ниже (Rea, Poole, 1993). Тем самым создаются благоприятные условия для активации работы  $H^+$ -АТФаз как плазмалеммы, так и тонопласта.

Перераспределение функций между АТФазами в фазе роста растяжением может находиться под контролем целого ряда факторов. Регуляторное значение могут иметь в первую очередь временные изменения кислотности цитоплазмы.  $H^+$ -АТФазы имеют отличающиеся оптимумы рН (Hager, Biber, 1984). Для вакуолярной  $H^+$ -АТФазы оптимум рН – около 7.0 и, как правило, сглажен, а для фермента плазмалеммы он гораздо более узок с максимумом равном 6.5. Следовательно, факторы, приводящие к закислению рН цитозоля, будут инициировать активацию работы в первую очередь  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы. Рассматривая рост растяжением, следует отметить, что индолилуксусная кислота (природный ауксин), индуцирующая данный тип роста, вызывает именно закисление цитоплазмы (Felle, 1988; Gering et al., 1990; Shishova, Lindberg, 1999). Кроме того показано, что ауксин обладает способностью усиливать экспрессию одной из изоформ  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы кукурузы МНА2, в непроводящих тканях (Frias et al., 1996), а, следовательно, не имеющей прямого отношения к транспорту метаболитов. Данный факт свидетельствует о том, что в процессе инициации и поддержания роста растяжением число ферментативных единиц  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы может увеличиваться, что подтверждается в работах А. Hager (Hager et al., 1991; Hager, 2003). Кроме того, фермент может быть орга-



**Рис. 6.** Гипотетическая модель перераспределения функций между основными протон-транспортирующими насосами растительной клетки в процессе роста растяжением. 1 –  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы, 2 –  $H^+$ -АТФаза тонопласта, 3 –  $H^+$ -пирофосфатаза тонопласта.

низован в мембране в виде димера и даже олигомера (Sondergaard et al., 2004), что также может отражаться на активности фермента или сопряжении его гидролитической и транспортной функций. Следовательно, при переходе от деления к росту растяжением и особенно на этапе поддержания роста будет возрастать роль именно  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы. И действительно, по нашим результатам более чем 2-кратное усиление транспортной активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы характеризует 4 сутки развития проростка кукурузы. Усиление транспортной функции АТФазы ПМ, выявленное в представленной работе, полностью соответствует повышению (более чем в 2 раза) ее гидролитической активности на данном этапе развития проростка (Рудашевская и др., 2005, Shishova et al., 2007). Результаты, полученные с использованием везикулярной фракции плазмалеммы, подтверждаются цитохимическим исследованием, проведенным на том же объекте – колеоптилях разновозрастных проростков кукурузы (Рудашевская и др., 2009). Показано, что наибольшей АТФ-гидролизующей способностью отличаются клетки 4-суточных проростков. Данные электронной микроскопии позволяют предположить, что фермент у наиболее молодых клеток (3-суточные проростки) организован в форме мультимерного комплекса, тогда как к 4 суткам значительно возрастает число мономеров фермента.

Особо следует отметить возможность существования и гораздо более сложных механизмов кросс-регуляции активности  $H^+$ -насосов в процессе роста. Так показано, что  $H^+$ -пирофосфатаза может участвовать в процессе регуляции роста за счет изменения интенсивности полярного транспорта ауксина в результате перераспределения транспортеров PIN1 (Li et al., 2005). Известно, что белок PIN1 находится в постоянном “движении”

между плазмалеммой и эндомембранами. Усиление активности  $H^+$ -пирофосфатазы интенсифицирует везикулярный транспорт между эндомембранами и плазмалеммой, что увеличивает число переносчиков ауксина в составе плазмалеммы, и сказывается на ауксин-зависимых процессах развития, в том числе росте растяжением. В связи с этим следует подчеркнуть, что еще одним белком плазмалеммы, осуществляющим достаточно быстрый обмен с эндомембранами является  $H^+$ -АТФаза Р-типа. Следовательно, усиление работы  $H^+$ -пирофосфатазы тонопласта может непосредственно регулировать активность транспорта протонов через плазмалемму за счет увеличения числа молекул фермента  $H^+$ -АТФазы в составе плазматической мембраны.

Суммируя данные опубликованные в литературе и полученные нами можно высказать предположение о том, что на этапах деления и инициации роста растяжением в клетках колеоптилей кукурузы преобладающее значение имеет вакуолярная  $H^+$ -пирофосфатаза (рис. 6). В силу ряда регуляторных механизмов постепенно все большее значение приобретают  $H^+$ -АТФазы как тонопласта, так и плазмалеммы с преобладающей функцией последней, что обеспечивает протекание наиболее интенсивной фазы клеточного роста. На этапе завершения физиологической функции ювенильного органа, характеризующемся практически полной неспособностью клеток, как к эндогенному, так и ауксин-индуцированному росту, активность всех трех  $H^+$ -транспортеров снижается, тем не менее, они продолжают осуществлять функцию поддержания гомеостаза клетки о чем свидетельствует их субстратная специфичность и чувствительность к ингибиторам.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского Фонда Фундаменталь-

ных Исследований (гранты №№ 03-04-48167, 07-04-01056, 10-04-01035).

Авторы выражают глубокую признательность член-корр. РАН А.Г. Габирову за помощь в начале работы с зондом FITC-декстран, а также Н.И. Инге-Вечтомовой за многолетнюю поддержку и помощь в освоении методов получения мембранных фракций и работы с флуоресцентными зондами.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Батов А.Ю., Юрконе С.В., Маркова И.В. и др. Определение содержания ионов кальция с помощью флуоресцентного зонда Индо-1 в везикулах плазмалеммы, выделенных из растительных клеток // Физиология растений. 1995. Т. 42. С. 144–148.
- Галкина С.И., Будунова И.В., Судьина Г.Ф. и др. Внутриклеточная сигнализация и межклеточные контакты // Биологические мембраны. 1991. Т. 8. С. 1151–1152.
- Москалева О.В., Полевой В.В. Влияние фитогормонов на митотическую активность органов проростков кукурузы // Вестник Ленингр. ун-та. Сер. 3. 1987. Вып. 2 (№ 10). С. 118–121.
- Полевой В.В. Роль ауксина в системах регуляции у растений. Л.: Наука, 1986. 80 с.
- Рудаевская Е.Л., Емельянов В.В., Кирпичникова А.А. и др. Зависимость возрастных изменений ростовой активности колеоптилей и мезокотилей кукурузы от содержания индоллил-3-уксусной кислоты // Вестник СПб ун-та. Сер. 3. 2002. Вып. 3 (№ 19). С. 99–106.
- Рудаевская Е.Л., Кирпичникова А.А., Шишова М.Ф. Активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток колеоптилей в процессе развития проростка кукурузы // Физиология растений. 2005. Т. 52. С. 1–7.
- Рудаевская Е.Л., Яковлев А.Ю., Яковлева О.В., Шишова М.Ф. Цитохимическое выявление активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы и ее изменения у клеток колеоптилей проростков кукурузы разного возраста // Цитология. 2009. Т. 51. С. 149–154.
- Саламатова Т.С. Физиология растительной клетки. Л.: изд. ЛГУ, 1983. 232 с.
- Тарчевский И.А. Сигнальные системы клеток растений. М.: Наука, 2002. 294 с. 123–126.
- Aerts R.J., Durston A.J., Moolenaar W.H. Cytoplasmic pH and the regulation of dictyostellium cell cycle // Cell. 1985. V. 43. P. 653.
- Aue H.-L., Lecomte I., Gendraud M., Petel G. Change in plasma membrane ATPase activity during dormancy release of vegetative peach-tree buds // Physiol. Plant. 1999. V. 106. P. 41–46.
- Baltscheffsky M., Schultz A., Baltscheffsky H.  $H^+$ -PPases: a tightly membrane-bound family // FEBS Lett. 1999. V. 457. P. 527–533.
- Blatt M.R., Armstrong F.  $K^+$ -channels of stomatal guard cells: abscisic acid-evoked control of the outward rectifier mediated by cytoplasmic pH // Planta. 1993. V. 191. P. 330–341.
- Bradford M.M. A Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Anal. Biochem. 1976. V. 72. P. 115–143.
- Busa W.B., Niccittelli R. Metabolic regulation via intracellular pH // Amer. J. Physiol. 1984. V. 246. P. 409–438.
- Cleland R.E. Cell wall extension // Annu. Rev. Plant Physiol. 1971. V. 22. P. 197–222.
- 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.
- Drew M.C., He C.J., Morgan P.W. Programmed cell death and aerenchyma formation in roots // Trends Plant Sci. 2000. V. 5. P. 123–127.
- Facanha A.R., de Meis L. Reversibility of  $H^+$ -ATPase and  $H^+$ -pyrophosphatase in tonoplast vesicles from maize coleoptiles and seeds // Plant Physiol. 1998. V. 166. P. 1487–1495.
- Felle H. Auxin causes oscillations of cytosolic free calcium and pH in *Zea mays* coleoptiles // Planta. 1988. V. 174. P. 495–99.
- Felle H. pH Regulation in anoxic plants // Ann. Bot. 2005. V. 96. P. 519–532.
- Felle H. pH: Signal and messenger in plant cells // Plant Biol. 2001. V. 3. P. 577–591.
- Felle H., Bertl A. Light induced cytoplasmic pH changes and their interrelation to the activity of the electrogenic proton pump in *Riccia fluitans* // Biochim. Biophys. Acta. 1986. V. 848. P. 176–182.
- Frias I., Caldeira M.T., Perez-Castineira J.R. et al. Major isoform of the maize plasma membrane  $H^+$ -ATPase: characterization and induction by auxin in coleoptiles // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1533–1544.
- Gaxiola R.A., Palmgren M.G., Schumacher K. Plant proton pumps // FEBS Lett. 2007. V. 581. P. 2204–2214.
- Gering C.A., Irving H.R., Parish R.W. Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. V. 87. P. 9645–9649.
- Gibbon B.C., Kropf D.L. Intracellular pH and its regulation in pelvetia zygotes // Developmental Biology. 1993. P. 259–268.
- Gruber G., Wiczorek H., Harvey W.R., Muller V. Structure-function relationship of A-, F- and V-ATPases // J. Exp. Biol. 2001. V. 204. P. 2597–2605.
- Hager A. Role of the plasma membrane  $H^+$ -ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects // J. Plant Res. 2003. V. 116. P. 483–505.
- Hager A., Biber W. Functional and regulatory properties of  $H^+$  pumps at the tonoplast and plasma membranes of *Zea mays* coleoptiles // Z. Naturforsch. 1984. V. 39. P. 927–937.
- Hager A., Debus G., Edel H.-G. et al. Auxin induces exocytosis and rapid synthesis of plasma-membrane  $H^+$ -ATPase // Planta. 1991. V. 185. P. 527–537.
- Hager A., Menzel H., Krauss A. Versuche und hypothese zur primarwirkung des auxins beim streckungswachstum // Planta. 1971. V. 100. P. 47–75.
- Herman H.M., Li X., Su R.T. et al. Vacuolar-type  $H^+$ -ATPases are associated with the endoplasmic reticulum and provacuoles of root tip cells // Plant Physiol. 1994. V. 106. P. 1313–1324.
- Kluge C., Lahr J., Hanitzsch M. et al. New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar  $H^+$ -ATPase // J. Bioenerget. Biomembr. 2003. V. 35. P. 377–388.

- Li J., Yang H., Peer W.A. et al. Arabidopsis H<sup>+</sup>-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development // *Science*. 2005. V. 310. P. 121–125.
- Lin H.H., Pan Y.J., Hsu S.H. et al. Deletion mutation analysis on C-terminal domain of plant vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase // *Arch. Biochem. Biophys.* 2005. V. 442. P. 206–213.
- Maeshima M. Vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1465. P. 37–51.
- Maeshima M., Nacanishi L., Matsuura-Endo Ch., Tanaka Y. Proton pumps of the vacuolar membrane in growing plant cells // *J. Plant Res.* 1996. V. 109. P. 119–125.
- Mathieu Y., Lapous D., Thomine S.C., Guern J. Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors // *Planta*. 1996. V. 199. P. 416–424.
- Merzendorfer H., Gräf R., Huss M. et al. Regulation of proton translocating V-ATPases // *J. Exp. Biol.* 1997. V. 200. P. 225–235.
- Nacanishi Y., Maeshima M. Molecular cloning of vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean // *Plant Physiol.* 1998. V. 116. P. 589–597.
- Palmgren M.G. Regulation of plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase // *Physiol. Plant.* 1991. V. 83. P. 314–323.
- Ratajczak R. Structure, Function and regulation of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-translocating ATPase // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1465. P. 17–36.
- Rayle D.L. Auxin induced hydrogen-ion excretion in *avena* coleoptiles and its implications // *Planta*. 1973. V. 114. P. 63–73.
- Rea P.A., Poole R.J. Vacuolar H<sup>+</sup>-translocating pyrophosphatase // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 1993. V. 44. P. 157–180.
- Sanchez-Nieto S., de Gomez-Puyou M.T., Rodriguez-Sortes R. et al. Comparison of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity in vesicles obtained from dry and hydrated maize embryos // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1414. P. 175–187.
- Santoni V., Vansuyt G., Rossignol M. The changing sensitivity to auxin of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: relationship between plant development and ATPase content of membranes // *Planta*. 1991. V. 185. P. 227–232.
- Schumacher K. Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2006. V. 9. P. 595–600.
- Serrano R. Structure and function of plasma membrane ATPase // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1989. V. 40. P. 61–94.
- Serrano R. Structure, function and regulation of plasma membrane ATPase // *FEBS Lett.* 1993. V. 325. P. 108–111.
- Shiratake K., Kanayama Y., Maeshima M., Yamaki Sh. Changes in H<sup>+</sup>-pumps and tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit // *Plant Cell Physiol.* 1997. V. 38. P. 1039–1045.
- Shishova M., Lindberg S. Auxin-induced cytosol acidification in wheat leaf protoplasts depends on external concentration of Ca<sup>2+</sup> // *J. Plant Physiol.* 1999. V. 155. P. 190–196.
- Shishova M., Yemelyanov V., Rudashevskaya E., Lindberg S. A shift in sensitivity to auxin within development of maize seedlings // *J. Plant Physiol.* 2007. V. 164. P. 1323–1330.
- Sondergaard T.E., Schulz A., Palmgren M.G. Energization of transport processes in plants. roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase // *Plant Physiol.* 2004. V. 136. P. 2475–2482.
- 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.
- Van R.C., Pan Y.J., Hsu S.H. et al. Role of transmembrane segment 5 of the plant vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase // *Biochim. Biophys. Acta*. 2005. V. 1709. P. 84–94.
- Wilkinson S. pH as a stress signal // *Plant Growth Regul.* 1999. V. 29. P. 87–89.

## Alteration of Transport Activity of Proton Pumps in Coleoptile Cells during Early Development Stages of Maize Seedlings

M. F. Shishova, O. V. Tankelyun, E. L. Rudashevskaya, V. V. Yemelyanov, N. V. Shakhova, and A. A. Kirpichnikova

*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

*e-mail: mshishova@mail.ru*

**Abstract**—Comparative analysis of the transport activity of proton pumps (plasmalemma H<sup>+</sup>-ATPase, vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase, and vacuolar H<sup>+</sup>-pyrophosphatase) in the membrane preparations obtained from coleoptile cells of etiolated maize seedlings (*Zea mays* L.) was carried out. The highest level of vacuolar pyrophosphatase activity was observed during the early development of coleoptile cells under growth intensification through the elongation. The role of ATPase pumps of tonoplast and plasmalemma in the transport of hydrogen ions increases during further development. The plasmalemma activity in this process is higher. When the growth stops, the activity of proton pumps becomes significantly lower. Nevertheless, their substrate specificity and sensitivity to proton pump inhibitors do not change, which can be an evidence of physiological significance of pumps in the maintenance of cell homeostasis.

**Keywords:** *Zea mays*, coleoptile, P-type and V-type H<sup>+</sup>-ATPases, V-type H<sup>+</sup>-pyrophosphatase, proton transport, vesicles.