

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.17,576.32/.36

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

ОСОБЕННОСТИ РЕГУЛЯЦИИ ВАКУОЛЯРНОЙ H^+ -АТФАЗЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК*

Обзорная статья

Вакуолярная H^+ -АТФаза является одним из наиболее важных и широко распространенных протон-транспортирующих ферментов эукариотической клетки. Она выполняет жизненно важные функции и представляет собой мультисубъединичный комплекс, состоящий из двух функциональных доменов V_1 и V_0 . В представленном обзоре рассматриваются современные представления о многоуровневой регуляции V-АТФазы растительного организма. Целый ряд субъединиц кодируется более чем одним геном. В связи с этим рассматривается значение регуляции на транскрипционном уровне. Особое внимание уделено рассмотрению многочисленных способов регуляции работы фермента на посттрансляционном уровне. Библиогр. 60 назв. Табл. 1.

Ключевые слова: вакуолярная H^+ -АТФаза, семейство генов VHAs, регуляция активности.

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

PECULIAR FEATURES OF PLANT CELL VACUOLAR H^+ -ATPASE REGULATION

St. Petersburg State University, 7–9, Universitetskaya nab., St. Petersburg, 199034, Russian Federation; nastin1972@mail.ru, ctz1985@mail.ru, daria-rom@yandex.ru, bootika@mail.ru, mshishova@mail.ru

Vacuolar H^+ -ATPase is one of the most crucial and widely spread proton-transporting enzymes of eukaryotic cells. It fulfils many vital functions. The enzyme is represented as a multisubunit complex, organized in two domains, V_1 and V_0 . The review summarizes modern data on plant cell H^+ -V-ATPase. Regulation of proton pump activity is analyzed for different level of plant organism complicity. A number of vacuolar H^+ -ATPase subunits are encoded by more than one gene. Thus the importance of regulation at transcription level is discussed. Special attention is paid to analysis of different ways of regulating activity of the enzyme at post-translation level. Refs 60. Table 1.

Keywords: vacuolar H^+ -ATPase, VHAs gene family, activity regulation.

Введение

H^+ -АТФаза вакуолярного типа (V-типа; ЕС 3.6.1.3) широко распространена у эукариотических клеток. Этот протонный насос внутриклеточных мембран пред-

А. А. Кирпичникова (nastin1972@mail.ru), Т. Чэнь (ctz1985@mail.ru), Д. А. Романюк (daria-rom@yandex.ru), В. В. Емельянов (bootika@mail.ru), М. Ф. Шишова (mshishova@mail.ru): Санкт-Петербургский государственный университет, Российская Федерация, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9

* Работа выполнена при частичной финансовой поддержке РФФИ (гранты №№ 15-04-03090 и 16-04-00743) и гранта СПбГУ 1.37.534.2016

© Санкт-Петербургский государственный университет, 2016

ставляет собой мультисубъединичный комплекс, образованный надмембранным каталитическим и трансмембранным протон-транспортующим доменами общей молекулярной массой около 750 кДа [1, 2]. По строению V-АТФаза эволюционно родственна АТФ-синтазам F-типа и, возможно, эти ферменты имеют общего предшественника [3–6]. Гомология прослеживается как в отношении субъединичной организации, так и по принципу ротационного катализа. Протонная V-АТФаза была идентифицирована в мембранах, ограничивающих различные внутриклеточные компартменты с более кислым по сравнению с цитоплазмой содержанием. Кислая среда внутри литических вакуолей и секреторных везикул, обеспечиваемая протон-транспортующей АТФазой, необходима для создания оптимальных условий работы гидролитических ферментов. Тем самым она является ключевым регулятором огромного числа биологических процессов, таких как деградация белков, аутофагия, обмен мембран (мембранный трафик, везикулярная секреция), вторичный транспорт через внутриклеточные мембраны [7, 8]. Доказательством значимости вакуолярной АТФазы может служить развитие целого ряда заболеваний у человека (неврологические нарушения, аутоиммунные, метаболические и онкологические заболевания и т. п.) при нарушениях работы V-АТФазы и, как результат, формирования протонного градиента, изменения концентрации ионов водорода в полости внутриклеточных органелл [9].

У растений протонная V-АТФаза локализована на тонопласте, и ее основополагающая роль заключается в поддержании ионного и метаболического гомеостаза посредством создания мембранного потенциала на вакуолярной мембране [10, 11]. Наряду с тонопластом данный фермент идентифицируется в мембранах эндоплазматического ретикулама, аппарата Гольджи, провакуолей 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 [10–12].

Структура протонной V-АТФазы

Протонная V-АТФаза у эукариотических клеток характеризуется структурной консервативностью и состоит из цитоплазматического АТФ-гидролизующего комплекса V_1 (субъединицы А-Н) и трансмембранного канала V_0 (субъединицы а, с, с', с'', d и e). Показано, что у растений V-АТФаза состоит из 13 субъединиц, распределенных между V_1 - и V_0 -доменами [13]. V_1 -домен насчитывает 6 субъединиц: по 3 копии VНА-А и VНА-В. Они сопряжены с субъединицами VНА-Д и VНА-Е, которые трансформируют конформационные изменения при гидролизе АТФ в ротацию протеолипидного кольца. Субъединицы VНА-Е и VНА-Г формируют тетрамер (по 2 копии каждой), взаимодействующий с одиночными копиями VНА-С и VНА-Н. Центральное протеолипидное кольцо состоит из 4 или 5 копий VНА-с, одной VНА-с', которая, впрочем, до сих пор окончательно не идентифицирована у растений, и одной VНА-с''. Наряду с этим V_0 -домен содержит по одной копии VНА-а, VНА-е и VНА-d [13]. Вращение с-кольца относительно субъединицы а осуществляет перемещение протонов через мембрану. Совместное вращение интегрального и периферического доменов предотвращается с помощью четырех соединений между V_1 и V_0 , которые осуществляются субъединицами а, Е, G, С и Н [14].

Кодирование протонной V-АТФазы и регуляция на транскрипционном уровне

Суммарное количество генов субъединиц протонной АТФазы тонопласта составляет от 14 у *Chlamydomonas* до 54 у сои. У арабидопсиса идентифицировано 28 VHA-генов. Ряд субъединиц кодируется только одним геном, а некоторые — семействами до 5 генов (таблица). Доступность данных современных технологий секвенирования и реализация достаточно большого числа геномных проектов позволили провести анализ молекулярной эволюции каждой из субъединиц [15]. Было показано, что различные субъединицы V-АТФазы изменяются в ходе эволюции по-разному, хотя и являются структурными частями одного белка. На основе проведенного анализа можно охарактеризовать несколько основных особенностей эволюции, которые по-разному сочетаются у разных субъединиц этого фермента. Субъединицы периферического комплекса V_1 отличались высокой вариабельностью, за исключением субъединицы В. Наиболее консервативной была субъединица V_0 -с, формирующая протонный канал, тогда как субъединица а в ходе эволюции дублировалась несколько раз, что привело к появлению большого разнообразия изоформ [15].

Субъединицы H^+ -АТФазы и кодирующие их гены [13]

Субъединица домена V_1	Количество генов и их название	Субъединица домена V_0	Количество генов и их название
A	1 VHA-A	a	3 VHA-a1 VHA-a2 VHA-a3
B	3 VHA-B1 VHA-B2 VHA-B3	c	5 VHA-c1 VHA-c2 VHA-c3 VHA-c4 VHA-c5
C	1 VHA-C	c''	2 VHA-c''1 VHA-c''2
D	1 VHA-D	d	2 VHA-d1 VHA-d2
E	3 VHA-E1 VHA-E2 VHA-E3	e	2 VHA-e1 VHA-e2
F	1 VHA-F		
G	3 VHA-G1 VHA-G2 VHA-G3		
H	1 VHA-H		

На примере млекопитающих была доказана роль изоформ субъединиц в определении тканеспецифичности и компартмент-специфичности. Субъединичный и изоферментный состав V-АТФазы может рассматриваться как мощнейший регулятор ее активности, наряду с модуляцией сопряжения между интенсивностью гидролиза АТФ и транспортом протонов. У ряда организмов (например, у дрожжей и насекомых), наряду с полностью «собранными» комплексами V-АТФаз, могут быть отдельно представлены V₁- и V₀-субкомплексы, число которых регулируется внешними факторами. К сожалению, к настоящему времени только для немногих из изоформ растительной V-АТФазы проведен анализ изоформ-специфичной экспрессии. Например, показано, что экспрессия гена *VNA-c1* происходит в зоне растяжения корня арабидопсиса и кончика корня, в отличие от *VNA-c3*, экспрессируемого в клетках корневого чехлика и пыльце [16]. Сходные данные были получены на растениях хлопка, где накопление изоформ VNA-c было идентифицировано в быстро и интенсивно растягивающихся клетках [17]. Для арабидопсиса описано тканеспецифичное накопление изоформ VNA-E, выявленное на этапе эмбриогенеза [18]. На более поздних этапах развития оно сохранялось для VNA-E и распространялось на VNA-a, VNA-B и VNA-G [19]. Экспрессия *VNA-E2* оказалась специфичной для пыльцы, *VNA-E3* — преимущественно для эндосперма развивающихся семян, а *VNA-E1* — преимущественно для листьев. Следует отметить, что сравнительный анализ гомологии между тремя изоформами VNA-E показал, что специфичная для пыльцы VNA-E2 характеризуется наименьшей степенью гомологии и отсутствием цистеина в 121 положении. Именно этот остаток, возможно, вовлечен в редокс-регуляцию, следовательно, можно предположить наличие иного механизма, обуславливающего изменение активности изоформы. Наряду с этим, для изоформ VNA-E показано несоответствие между накоплением РНК-продукта и концентрацией белка [19]. Неравное распределение было показано и для изоформ VNA-G. *VNA-G1* и *VNA-G2* характеризовались экспрессией по всему организму, тогда как *VNA-G3* отнесен к группе из 162 генов, экспрессируемых только в пыльце. В отличие от перечисленных выше закономерностей, для изоформ VNA-a вместо тканеспецифичной показана оргanelлярная локализация: тонопласт или аппарат Гольджи.

Приведенные выше данные о характере кодирования изоформ H⁺-АТФазы тонопласта, а также идентифицированные ранее специфичные паттерны экспрессии не позволяют провести сопоставления активности фермента и его значимости в том или ином физиологическом процессе. Безусловно, характеристика таких мутантов, как *det3* является прекрасным примером использования молекулярно-биологического подхода для выявления значимости отдельных генов, кодирующих субъединицы фермента. Так, одиночная мутация в гене *VNA-C* у арабидопсиса, приводящая к нарушению сплайсинга мРНК одной из субъединиц, вызывала значительные изменения морфогенеза мутанта (приводила к развитию специфичного фенотипа). Мутант характеризовался замедлением развития в нормальных условиях [20]. Однако идентификация фенотипических проявлений при нарушении кодирования одного из генов одной из субъединиц — очень редкий пример, и требуется еще много исследований, чтобы расширить наши представления о роли каждого из генов *VNA-x* в развитии растений.

Генетическая регуляция функционирования V-АТФазы была в достаточной степени изучена при действии стрессовых факторов. Такой интерес определялся тем, что активность тонопластной протонной АТФазы регулируется многими факторами окружающей среды, ее даже называют «эко-ферментом» [21].

Изменения уровня транскриптов единичных субъединиц протонной АТФазы тонопласта в ответ на повышение солености были проанализированы у многих видов растений с того момента, как группой исследователей [22] было продемонстрировано повышение уровня мРНК *VHA-A* в культурах клеток табака, подверженных солевому стрессу. Повышение уровня транскриптов субъединицы А наблюдалось также при солевой обработке интактных растений *Lycopersicon esculentum* [23], *Beta vulgaris* [24, 25] и *Daucus carota* [26]. В культуре клеток *D. carota* уровни мРНК субъединиц А и с увеличивались в 2–3 раза по сравнению с контролем через 4 дня после обработки 100 мМ NaCl [27]. Возрастание уровня транскриптов с-субъединицы было продемонстрировано для *A. thaliana* [28], *B. vulgaris*, *D. carota* и *Mesembryanthemum crystallinum* [29, 30]. У *M. crystallinum* солевой стресс в течение нескольких часов приводил к увеличению количества транскриптов субъединицы с, в то время как количество транскриптов А- и В-субъединиц не изменялось [29]. Это было интерпретировано как свидетельство несоординированной регуляции субъединиц V-АТФазы. После продолжения солевой обработки в течение нескольких дней, наряду с уровнем транскриптов с-субъединицы, возрастал также уровень мРНК субъединиц А и В [31]. Интересно то, что степень увеличения количества транскриптов была различной для трех субъединиц V-АТФазы. После 12 дней солевой обработки количество мРНК для субъединиц А, В и с возросло в 2, 12 и 5 раз соответственно. Тот факт, что уровень мРНК субъединицы Е *M. crystallinum* не изменялся после 48 часов солевого стресса [32], может служить еще одним подтверждением несоординированной экспрессии генов субъединиц фермента. Позже было выяснено, что уровень транскриптов субъединицы Е *M. crystallinum* повышается в листьях после 72 часов солевого стресса [33]. Для *B. vulgaris* и *D. carota* индуцируемая солевым стрессом экспрессия генов субъединиц вакуолярной H⁺-АТФазы оказалась скоординированной.

Однако изучение контроля на транскрипционном уровне 12 разных субъединиц V-АТФазы *M. crystallinum* при непродолжительных стрессовых воздействиях показало, что для большинства *VHA*-генов изменения количества транскриптов были скоординированы. Например, наблюдалось возрастание уровней транскриптов большинства генов в листьях при засолении, отсутствие изменений в листьях при тепловом стрессе и в корнях при осмотическом стрессе, а также уменьшение количества транскриптов в корнях при засолении, корнях и листьях на холоде, корнях при тепловом стрессе и листьях при осмотическом стрессе [4]. В результате комплексного исследования был сделан вывод о том, что субъединицы, кодируемые несколькими генами, имеют большую предрасположенность к сильным изменениям количества транскриптов при стрессе, чем субъединицы, кодируемые единственным геном. Следовательно, гены либо кодируют формы субъединиц с различными свойствами, необходимыми или предпочтительными при определенных стрессовых условиях, либо находятся под контролем стресс-специфических промоторов, что позволяет осуществлять соответствующий ответ на определенное стрессовое воздействие.

Следует отметить, что регуляция на транскрипционном уровне появилась на достаточно ранних этапах эволюции.

Регуляция экспрессии генов субъединиц тонопластной H^+ -АТФазы может осуществляться и фитогормонами. Известно, что абсцизовая кислота влияет на экспрессию генов V-АТФазы некоторых видов растений. У мутанта томата с дефицитом гиббереллинов количество транскриптов генов субъединицы с и количество белка субъединиц А и В увеличивались в ответ на экзогенную гиббереллиновую обработку [34]. В то же время влияния цитокининов на активность V-АТФазы не было обнаружено [35].

Приведенные выше данные однозначно свидетельствуют об изменении экспрессии генов, кодирующих различные субъединицы тонопластной V-АТФазы. Интенсивность этих изменений определяется видом растения, стадией его онтогенеза, а также силой действия стрессового фактора. В результате этого процесса создаются условия появления фермента с новыми свойствами, а, следовательно, повышения адаптационных свойств растительного организма. Не менее важным механизмом транскрипционной регуляции работы H^+ -АТФазы тонопласта является изменение количества ферментных комплексов в составе тонопласта. Этот феномен был выявлен для *Suaeda salsa*, галофита из семейства Chenopodiaceae. Показано, что основной стратегией устойчивости к солевому стрессу у данного вида служит увеличение количества ферментных комплексов, а не изменения состава протонного насоса [36]. Изменение количества V-АТФазы при переходе от СЗ к САМ-фотосинтезу было установлено для *Kalanchoe blossfeldiana* [37]. Известно, что активность H^+ -АТФазы тонопласта при САМ-фотосинтезе играет важную роль для аккумуляции малата в вакуоли, а, следовательно, увеличение числа V-АТФаз — важное условие переключения метаболизма растения. У галофита *M. crystallinum* переход СЗ → САМ вызывается NaCl-засолением. При повышении солености наблюдалось увеличение количества фермента, что приводило к повышению его активности [38, 39].

Таким образом, получены неоспоримые данные о роли транскрипционной регуляции активности тонопластной протонной помпы в ходе онтогенеза растений, а также при развитии адаптационных механизмов при действии стрессовых факторов.

Регуляция протонной V-АТФазы на посттрансляционном уровне

Большое число исследований регуляции V-АТФазы было произведено на галофите *M. crystallinum*. При повышении солености и индукции САМ-метаболизма наблюдались некоторые изменения V-АТФазы. Как уже отмечалось выше, может увеличиваться количество фермента, что указывает на транскрипционный уровень регуляции. В то же время показано возможное изменение соотношения транспорта протонов и гидролиза АТФ [2]. Это, вероятно, происходило благодаря тому, что H^+ -АТФазе приходится перемещать протоны против более сильного электрохимического градиента при САМ-фотосинтезе. Такое уменьшение соотношения транспорта протонов и гидролиза АТФ увеличивает потребность в большем количестве фермента. Наряду с этим, увеличивался диаметр V_0 -внутримембранных частиц [40, 41], что сопровождалось возрастанием количества с-субъединиц и количества

их мРНК в начале световой фазы [31]. Кроме того, в стержне появлялись две новые субъединицы, одна из которых является продуктом расщепления субъединицы В специфической протеазой или активными формами кислорода [42, 43]. Наконец, головка V₁-домена на электронных микрофотографиях представляла собой как гексамерную структуру, так и пентамерную [44]. Таким образом, не всегда три копии каждой субъединицы (А и В) присутствуют в составе фермента. Неизвестно, копия какой из двух субъединиц отсутствует в составе пентамера. В этом случае представляется интересным то, что при засолении у *Citrus* происходит протеолитическое разрушение субъединицы А, а у *M. crystallinum* — субъединицы В.

Приведенные выше данные могут служить доказательством посттрансляционного механизма регуляции работы V-АТФазы растений. Тем не менее посттрансляционная регуляция может осуществляться следующими способами: слабощелочным оптимумом рН, стимуляцией хлоридом, чувствительностью к нитрату, умеренным сродством к АТФ, ингибированием АДФ и неорганическим фосфатом, а также фосфорилированием определенных субъединиц [45].

V-АТФаза чувствительна к окислению. Как было показано на листьях ячменя, H₂O₂ инактивирует гидролиз АТФ и транспорт протонов [46]. Подавление обеих активностей фермента снимается восстановленным глутатионом. До последнего времени считалось, что окислительное подавление H⁺-АТФазы тонопласта происходит благодаря формированию дисульфидной связи между консервативными остатками цистеина в каталитическом сайте субъединицы А. Однако недавно было установлено, что в окислительное ингибирование растительной V-АТФазы не вовлечено образование дисульфидных связей в структуре субъединицы А [47]. Субъединицы, каждая из которых содержала аминокислотную замену одного из трех консервативных остатков цистеина (Cys²⁵⁶, Cys²⁷⁹ и Cys⁵³⁵), были экспрессированы в мутантах *A. thaliana*, лишенных VНА-А. При этом было продемонстрировано, что для редокс-регуляции активности фермента важен только один из трех консервативных цистеиновых остатков (Cys²⁵⁶), а, следовательно, дисульфидные связи между этими аминокислотными остатками не являются необходимыми для ингибирования. Остаток Cys²⁷⁹ требуется для активности фермента, так как он вовлечен в фолдинг и стабилизацию субъединицы. Кроме того, было установлено, что окислительные условия не влияют на закисление вакуоли в клетках корней арабидопсиса. Таким образом, в окислительное ингибирование V-АТФазы растений вовлечен только остаток Cys²⁵⁶, и этот механизм, вероятно, в меньшей степени важен для регуляции активности фермента у растений, чем у дрожжей и млекопитающих.

Соотношение количества транспортируемых протонов и гидролизованных молекул АТФ может быть увеличено изменением размера ротора путем возрастания количества с-субъединиц в составе фермента [2]. При исследовании нитратного питания у табака были обнаружены различия в диаметре V₀-внутримембранных субъединиц тонопластной H⁺-АТФазы в среде с недостаточной концентрацией нитрата и в среде, обогащенной нитратом. В условиях низкого содержания нитрата в среде диаметр V₀ внутримембранных частиц увеличился. Структурные изменения на уровне домена V₀, вероятно, влияют на гидролиз АТФ и транспорт протонов [48].

Следует отметить, что значение АТФ заключается не только в предоставлении энергии, обеспечивающей генерацию электрохимического градиента ионов водорода. Этот нуклеотид имеет и регуляторную функцию. Показано, что VНА-С об-

ладает способностью связывать АТФ в системах *in vitro* и при этом менять свою конформацию [49]. В настоящее время не ясно, происходят ли сходные изменения в клетке и как это сможет повлиять на взаимодействие субъединиц VNA-C и VNA-E. Тем не менее применение дезоксиглюкозы, что меняет энергетический статус клетки, приводит к значительному снижению FRET-эффективности между VNA-C и VNA-E, так же как и FRET-эффективности между VNA-A-CFP и VNA-a-YFP, что свидетельствует об изменении взаимодействия между субъединицами ферментного комплекса [50].

Не менее интенсивный способ регуляции белков на посттрансляционном уровне представляет собой динамическое изменение статуса фосфорилирования/дефосфорилирования. Этот способ регуляции был продемонстрирован для животных и дрожжей, а затем установлен и для растительных клеток. Субъединица VNA-C является субстратом для WNK8-киназы, а субъединица VNA-A подвержена фосфорилированию тонопласт-ассоциированной киназой [51, 52]. Показано, что фосфорилирование приводит к активации работы фермента и может регистрироваться в течение очень короткого времени после воздействия (например, синего света). Кроме того, фосфорилирование субъединицы VNA-A приводит к инициации взаимодействия с 14-3-3 белками и последующему усилению в 3,5 раза работы протонной АТФазы тонопласта ячменя [52].

Белок-белковые взаимодействия были установлены не только между тонопластной H^+ -АТФазой и регуляторными 14-3-3 белками. Особое внимание следует уделить взаимодействию с белками-ферментами и белками-сенсорами. К последним можно отнести гистидинкиназу 1 (НХК1). Было показано образование комплекса НХК1 с VNA-B и RPTB5 (регуляторная частица протеосомной субъединицы 19S). Этот комплекс из трех белков имеет ядерную локализацию и, по-видимому, принимает участие в иницированном глюкозой сигналинге. Данный комплекс высокоспецифичен для изоформы VNA-B1, что указывает на ее уникальную функцию, возможно, не относящуюся непосредственно к регуляции работы самого фермента [53].

В исследованиях, проведенных на рисе, обнаружено влияние фосфолипидов и гликолипидов тонопласта на активность V-АТФазы [54]. Данный факт опосредован общим значением липидов в определении физико-химических свойств мембран, таких как текучесть, заряд и т.д. Липидный состав различных эндогенных мембран во многом варьирует, что не может не оказать влияния на активность многих белков-транспортёров и белков-ферментов [55]. На культуре клеток арабидопсиса было показано, что H^+ -АТФаза V-типа локализована в детергент-устойчивых микродоменах тонопласта, обогащенных стеролами и насыщенными жирными кислотами. Установлено, что фосфолипиды активируют H^+ -АТФазу тонопласта, а гликолипиды подавляют ее активность. Такая форма регуляции характерна, например, при температурном стрессе. Соотношение гликолипидов и фосфолипидов в вакуолярной мембране возрастает при холодовом стрессе, и это отражается на активности тонопластной протонной помпы.

В заключение хотелось бы остановиться на уникальном способе регуляции вакуолярной протонной помпы на посттрансляционном уровне — обратимая диссоциация доменов V_1 и V_0 [56]. Этот способ достаточно хорошо охарактеризован для H^+ -АТФаз V-типа дрожжей, насекомых и млекопитающих. У дрожжей этот процесс

происходит при истощении запасов глюкозы в среде, а у насекомых во время линьки для поддержания количества АТФ в клетке. У млекопитающих диссоциация доменов V-АТФазы происходит в клетках почечного эпителия также в ответ на изменения уровня глюкозы, однако физиологическое значение этого явления менее понятно. Кроме того, этот механизм вовлечен в регуляцию функционирования V-АТФазы в дендритных клетках млекопитающих. Наиболее подробно этот способ регуляции активности вакуолярной H^+ -АТФазы исследован у дрожжей. В этом случае диссоциация происходит быстро, обратимо и не требует синтеза белков. Активность разделенных периферического и интегрального доменов блокируется. Диссоциированный V_1 -домен не гидролизует АТФ, а свободный V_0 -домен не осуществляет пассивного переноса протонов через мембрану. Предотвращение функционирования компонентов ферментного комплекса очень важно, так как это позволяет избежать истощения энергетических запасов клетки и рассеяния протонного градиента. Ключевая роль в подавлении гидролиза АТФ свободным V_1 -доменом принадлежит его Н-субъединице, образующей мостик между центральным и периферическим стержнями [57]. При добавлении в среду глюкозы происходит сборка фермента. Диссоциация и сборка комплекса V-АТФазы — независимые друг от друга процессы. Так, для диссоциации требуется участие сети микротрубочек, а для сборки — гетеротримерный белковый комплекс RAVE, стабилизирующий свободный V_1 -комплекс в форме, пригодной для объединения с V_0 . Еще одним компонентом, участвующим в глюкозо-опосредованной сборке H^+ -АТФазы V-типа, может быть альдолаза, так как мутации по этому ферменту, предотвращающие его взаимодействие с V-АТФазой, подавляют сборку V-АТФазы *in vivo*. Кроме того, роль в модуляции стабильности V_1V_0 -комплекса может играть субъединица C, выступающая в качестве сенсора глюкозы [58]. В контроле диссоциации V-АТФазы при понижении количества глюкозы в среде участвует также экстраклеточный уровень pH: в щелочной среде диссоциации не происходит даже при низком уровне глюкозы, так как в этих условиях приоритетным процессом становится поддержание работы H^+ -АТФазы и закисление вакуоли [59]. Следует отметить, что обратимая диссоциация комплекса многократно была показана и для растительных клеток, так же как и доказана роль глюкозы в регуляции сборки V-АТФазы [50, 60].

Подводя итог, следует отметить, что столь сложно организованный ферментный комплекс, играющий огромное значение в функциональной активности растительной клетки, имеет многочисленные способы регуляции. Они хорошо прослеживаются как на транскрипционном, так и посттрансляционном уровне. Изменение характера экспрессии вызывает образование H^+ -АТФаз с новыми свойствами, нарушение кодирования даже одной субъединицы приводит зачастую к невозможности агрегации комплекса и определяет летальность. На посттрансляционном уровне проявляется значимость как белок-белковых, так и белок-липидных взаимодействий. Большое значение имеет цитоплазматический и внутривакуолярный pH. Особое влияние может оказывать энергетический и окислительный статус клетки. Все эти многочисленные системы регуляции, безусловно, могут варьировать как в ходе развития клетки и организма в целом, так и в ответ на изменение окружающей среды. Однако следует отметить, что несмотря на явный прогресс в накоплении данных о путях регуляции, остается еще большой простор для грядущих исследований.

References

1. Merzendorfer H., Gräf R., Huss M. et al. Regulation of proton translocating V-ATPases. *J. Exp. Biol.*, 1997, vol. 200, pp. 225-235.
2. Ratajczak R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, vol. 1465, pp. 17-36.
3. Gruber G., Wieczorek H., Harvey W.R., Muller V. Structure-function relationship of A-, F- and V-ATPases. *J. Exp. Biol.*, 2001, vol. 204, pp. 2597-2605.
4. Kluge C., Lahr J., Hanitzsch M., Bolte S., Gollmack D., Dietz K. J. New insight into the structure and regulation of the plant vacuolar H⁺-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2003, vol. 35, pp. 377-388.
5. Nelson N., Harvey W.R. Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases. *Physiol. Rev.*, 1999, vol. 79, pp. 361-385.
6. Ma B., Xiang Y., An L. Structural bases of physiological functions and roles of the vacuolar H⁺-ATPase. *Cell. Signalling*, 2011, vol. 23, pp. 1244-1256.
7. Dettmer J., Liu T. Y., Schumacher K. Functional analysis of Arabidopsis V-ATPase subunit VHA-E isoforms. *Eur. J. Cell Biol.*, 2010, vol. 89, pp. 152-156.
8. Mauvezin C., Nagy P., Gaborjuha S. Z., Neufeld T. P. Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nature Communications*, 2015, vol. 6. Art. 7007. DOI: 10.1038/ncomms8007.
9. Marshansky V., Futai M. The V-type H⁺-ATPase in vesicular trafficking: targeting, regulation and function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2008, vol. 20, pp. 415-426.
10. 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, vol. 18, pp. 715-730.
11. Schumacher K. Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2006, vol. 9, pp. 595-600.
12. Strompen G., Dettmer J., Stierhof Y. D., Schumacher K., Jürgens G., Mayer U. Arabidopsis vacuolar H⁺-ATPase subunit E isoform 1 is required for Golgi organization and vacuole function in embryogenesis. *Plant J.*, 2005, vol. 41, pp. 125-132.
13. Sze H., Schumacher K., Müller M. L., Padmanaban S., Taiz L. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Trends Plant Sci.*, 2002, vol. 7, pp. 157-161.
14. Schumacher K., Krebs M. The V-ATPase: small cargo, large effects. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2010, vol. 13, pp. 724-730.
15. Chen T., Mikhailova Iu. V., Shishova M. F. Molekuliarno-filogeneticheskii analiz sub'edinits H⁺-ATFazy tonoplasta [Molecular phylogenetic analysis of H⁺-ATPase subunits of tonoplast]. *Ekolog. genetika*, 2015, vol. 13, pp. 78-90. (In Russian)
16. Padmanaban S., Lin X., Perera I., Kawamura Y., Sze H. Differential expression of vacuolar H⁺-ATPase subunit c genes in tissues active in membrane trafficking and their roles in plant growth as revealed by RNAi. *Plant Physiol.*, 2004, vol. 134, pp. 1514-1526.
17. Hasenfratz M. P., Tsou C.-L., Wilkins T. A. Expression of two related vacuolar H⁺-ATPase 16 kD proteolipid genes is differentially regulated in a tissue-specific manner. *Plant Physiol.*, 1995, vol. 108, pp. 1395-1404.
18. Dettmer J., Schubert D., Calvo-Weimar O., Stierhof Y. D., Schmidt R., Schumacher K. Essential role of the V-ATPase in male gametophyte development. *Plant J.*, 2005, vol. 41, pp. 117-124.
19. Hanitzsch M., Schnitzer D., Seidel T., Gollmack D., Dietz K. J. Transcript level regulation of the vacuolar H⁺-ATPase subunit isoforms VHA-a, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*. *Molecul. Membr. Biol.*, 2007, vol. 24, pp. 507-518.
20. Allen G. J., Chu S. P., Schumacher K., Shimazaki C. T., Vafeados D., Kemper A., Hawke S. D., Tallman G., Tsien R. Y., Harper J. F., Chory J., Schroeder J. I. Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in Arabidopsis det3 mutant. *Science*, 2000, vol. 289, pp. 2338-2342.
21. Lüttge U., Fischer-Schliebs E., Ratajczak R. The H⁺-pumping V-ATPase of higher plants: a versatile eco-enzyme in response to environmental stress. *Cell. Biol. Mol. Lett.*, 2001, vol. 6, pp. 356-361.
22. Narasimhan M. L., Binzel M. L., Perez-Prat E., Chen Z., Nelson D. E., Singh N. K., Bressan R. A., Hasegawa P. M. NaCl Regulation of tonoplast ATPase 70-kilodalton subunit mRNA in tobacco cells. *Plant Physiol.*, 1991, vol. 97, pp. 562-568.
23. Binzel M. L. NaCl-induced accumulation of tonoplast and plasma membrane H⁺-ATPase message in tomato. *Physiol. Plant.*, 1995, vol. 94, pp. 722-728.
24. Kirsch M., An Z., Viereck R., Löw R., Rausch T. Salt stress induces an increased expression of V-type H⁺-ATPase in mature sugar beet leaves. *Plant Mol. Biol.*, 1996, vol. 32, pp. 543-547.

25. Lehr A., Kirsch M., Viereck R., Schiemann J., Rausch T. cDNA and genomic cloning of sugar beet V-type H⁺-ATPase subunit A and c isoforms: evidence for coordinate expression during plant development and coordinate induction in response to high salinity. *Plant Mol. Biol.*, 1999, vol. 39, pp. 463-475.
26. Rausch T., Kirsch M., Löw R., Lehr A., Viereck R., Zhigang A. Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and Na⁺/H⁺-antiporters. *J. Plant Physiol.*, 1996, vol. 148, pp. 425-433.
27. Löw R., Rausch T. In suspension-cultured *Daucus carota* cells salt stress stimulates H⁺-transport but not ATP hydrolysis of the V-ATPase. *J. Exp. Bot.*, 1996, vol. 47, pp. 1725-1732.
28. Perera Y., Li X., Sze H. Several distinct genes encode nearly identical to 16 kDa proteolipids of the vacuolar H⁺-ATPase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.*, 1995, vol. 29, pp. 227-244.
29. Löw R., Rockel B., Kirsch M., Ratajczak R., Hörtensteiner S., Martinoia E., Lüttge U., Rausch T. Early salt stress effects on the differential expression of vacuolar H⁺-ATPase genes in roots and leaves of *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.*, 1996, vol. 110, pp. 259-265.
30. Tsiantis M. S., Bartholomew D. M., Smith J. A. Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H⁺-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant J.*, 1996, vol. 9, pp. 729-736.
31. Rockel B., Lüttge U., Ratajczak R. Changes of message amount of V-ATPase subunits during salt-stress induced C3-CAM transition in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol. Biochem.*, 1998, vol. 36, pp. 567-573.
32. Dietz K. J., Arbing B. cDNA sequence and expression of subunit E of the vacuolar H⁺-ATPase in the inducible Crassulacean acid metabolism plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1996, vol. 1281, pp. 134-138.
33. Gollack D., Dietz K. J. Salt-induced expression of the vacuolar H⁺-ATPase in the common ice plant is developmentally controlled and tissue specific. *Plant Physiol.*, 2001, vol. 125, pp. 1643-1654.
34. Cooley M. B., Yang H., Dahal P., Mella R. A., Downie A. B., Haigh A. M., Bradford K. J. Vacuolar H⁺-ATPase is expressed in response to gibberellin during tomato seed germination. *Plant Physiol.*, 1999, vol. 121, pp. 1339-1347.
35. Kasai M., Yamamoto Y., Maeshima M., Matsumoto H. Effects of *in vivo* treatment with abscisic acid and/or cytokinin on activities of vacuolar H⁺-pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles prepared from barley roots. *Plant Cell Physiol.*, 1993, vol. 34, pp. 1107-1115.
36. Wang B., Lüttge U., Ratajczak R. Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *J. Exp. Bot.*, 2001, vol. 52, pp. 2355-2365.
37. Mariaux J. B., Fischer-Schliebs E., Lüttge U., Ratajczak R. Dynamics of activity and structure of the tonoplast vacuolar-type H⁺-ATPase in plants with different CAM expression and in a C3 plant under salt stress. *Protoplasma*, 1997, vol. 196, pp. 181-189.
38. Bremberger C., Lüttge U. Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of Crassulacean acid metabolism. *Planta*, 1992, vol. 188, pp. 575-580.
39. Ratajczak R., Richter J., Lüttge U. Adaptation of the tonoplast V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* to salt stress, C3-CAM transition and plant age. *Plant Cell Environm.*, 1994, vol. 17, pp. 1101-1112.
40. Klink R., Lüttge U. Quantification of visible structural changes of the V₀V₁-ATPase in the leaf tonoplast of *Mesembryanthemum crystallinum* by freeze-fracture replicas prepared during the C3-photosynthesis to CAM transition. *Bot. Acta*, 1992, vol. 105, pp. 414-420.
41. Rockel B., Ratajczak R., Becker A., Lüttge U. Changed densities and diameters of intra-membrane tonoplast particles of *Mesembryanthemum crystallinum* in correlation with NaCl-induced CAM. *J. Plant Physiol.*, 1994, vol. 143, pp. 318-324.
42. Zhigang A., Löw R., Rausch T., Lüttge U., Ratajczak R. The 32 kDa tonoplast polypeptide Di associated with the V-type H⁺-ATPase of *Mesembryanthemum crystallinum* L. in the CAM state: A proteolytically processed subunit B? *FEBS Letters*, 1996, vol. 389, pp. 314-318.
43. Krisch R., Rakowski K., Ratajczak R. Processing of V-ATPase subunit B of *Mesembryanthemum crystallinum* L. is mediated *in vitro* by a protease and/or active oxygen species. *Biol. Chem.*, 2000, vol. 381, pp. 583-592.
44. Kramer D., Mangold B., Hille A., Emig I., Hess A., Ratajczak R., Lüttge U. The head of a higher plant V-type H⁺-ATPase is not always a hexamer but also a pentamer. *J. Exp. Bot.*, 1995, vol. 46, pp. 1633-1636.
45. Neuhaus H. E., Trentmann O. Regulation of transport processes across the tonoplast. *Front. Plant Sci.*, 2014, vol. 5, Article 460, pp. 1-8.
46. Tavakoli N., Kluge C., Gollack D., Mimura T., Dietz K. J. Reversible redox control of plant vacuolar H⁺-ATPase activity is related to disulfide bridge formation in subunit E as well as subunit A. *Plant J.*, 2001, vol. 28, pp. 51-59.

47. Seidel T., Scholl S., Krebs M., Rienmüller F., Marten I., Hedrich R., Hanitzsch M., Janetzki P., Dietz K. J., Schumacher K. Regulation of the V-type ATPase by redox modulation. *Biochem. J.*, 2012, vol. 448, pp. 243–251.
48. Fischer-Schliebs E., Drobny M., Ball E., Ratajczak R., Luttge U. Variation in nitrate nutrition leads to changes in the performance of the V-ATPase and immunological differences of proteolipid subunit C in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves. *Austr. J. Plant Physiol.*, 2000, vol. 27, pp. 639–648.
49. Armbruster A., Hohl C., Hermesdorf A., Schumacher K., Borsh M., Gruber G. Evidence for major structural changes in subunit C of the vacuolar ATPase due to nucleotide binding. *FEBS Letters*, 2005, vol. 579, pp. 1961–1967.
50. Schnitzer D., Seidel Th., Sander T., Gollmack D., Dietz K.-J. The cellular energization state affects peripheral stalk stability of plant vacuolar H⁺-ATPase and impairs vacuolar acidification. *Plant Cell Physiol.*, 2011, 52, pp. 946–956.
51. Hong-Hermesdorf A., Brux A., Gruber A., Gruber G., Schumacher K. A WNK-kinase binds and phosphorylates V-ATP subunit C. *FEBS Letters*, 2006, vol. 580, pp. 932–939.
52. Klyachnikov O.I., Li K. W., Lill H., de Boer A. H. The V-ATPase from etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) shoots is activated by blue light and interacts with 14–3–3 proteins. *J. Exp. Bot.*, 2007, vol. 58, pp. 1013–1023.
53. Cho Y. H., Yoo S. D., Sheen J. Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell.*, 2006, vol. 127, pp. 579–589.
54. Yamaguchi M., Kasamo K. Modulation in the activity of purified tonoplast H⁺-ATPase by tonoplast glycolipids prepared from cultured rice (*Oryza sativa* L. var. Boro) cells. *Plant Cell Physiol.*, 2001, vol. 42, pp. 516–523.
55. Zhang C., Hicks G. R., Raikhel N. V. Molecular composition of plant vacuoles: important but less understood regulations and roles of tonoplast lipids. *Plants*, 2015, vol. 4, pp. 320–333.
56. Toei M., Saum R., Forgac M. Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochem.*, 2010, vol. 49, pp. 4715–4723.
57. Jefferies K. C., Forgac M. Subunit H of the vacuolar H⁺-ATPase inhibits ATP hydrolysis by the free V₁ domain by interaction with the rotary subunit F. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, pp. 4512–4519.
58. Beyenbach K. W., Wiczorek H. The V-type H⁺-ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.*, 2006, vol. 209, pp. 577–589.
59. Diakov T. T., Kane P. M. Regulation of vacuolar proton-translocating ATPase activity and assembly by extracellular pH. *J. Biol. Chem.*, 2010, vol. 285, pp. 23771–23778.
60. Ward J. M., Reinders A., Hsu H.-T., Sze H. Dissociation and reassembly of the vacuolar H⁺-ATPase complex from oat roots. *Plant Physiol.*, 1992, vol. 99, pp. 161–169.

Для цитирования: Кирпичникова А. А., Чэнь Т., Романюк Д. А., Емельянов В. В., Шишова М. Ф. Особенности регуляции вакуолярной H⁺-атфазы растительных клеток // Вестн. С.-Петерб. ун-та. Сер. 3. Биология. 2016. Вып. 2. С. 149–160. DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.212

For citation: Kirpichnikova A. A., Chen T., Romanyuk D. A., Yemelyanov V. V., Shishova M. F. Peculiar features of plant cell vacuolar H⁺-ATPase regulation. *Vestnik of Saint-Petersburg University. Series 3. Biology*, 2016, issue 2, pp. 149–160. DOI: 10.21638/11701/spbu03.2016.212

Статья поступила в редакцию 12 марта, принята 6 апреля 2016 г.

Сведения об авторах:

Кирпичникова Анастасия Алексеевна — младший научный сотрудник
 Чэнь Тинчжо — аспирант
 Романюк Дарья Андреевна — PhD
 Емельянов Владислав Владимирович — кандидат биологических наук, доцент
 Шишова Мария Федоровна — доктор биологических наук, профессор

Kirpichnikova Anastasia A. — researcher
 Chen T. — post graduate student
 Romanyuk Daria A. — PhD
 Yemelyanov Vladislav V. — PhD, Associate Professor
 Shishova Maria F. — Doctor of Biology, Professor