

УДК 581.1

## ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ВАКУОЛЯРНОЙ $H^+$ -АТФазы В КОРНЯХ ПРОРОСТКОВ ЯЧМЕНЯ РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ДЕЙСТВИИ КАДМИЯ

© 2013 г. Н. М. Казнина, А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева, Г. Ф. Лайдинен, Ю. В. Батова

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии  
Карельского научного центра РАН, Петрозаводск

Поступила в редакцию 01.03.2012 г.

Изучена экспрессия двух генов (*HvVHA E* и *HvVHA c*) вакуолярной  $H^+$ -АТФазы в клетках корней проростков ячменя (*Hordeum vulgare* L., сорт Зазерский 85) разного возраста в присутствии кадмия (100 мкМ). 3-дневные проростки выдерживали в течение 4 дней на растворе с кадмием, что приводило к торможению роста корня, которое сопровождалось усилением экспрессии гена *HvVHA E*. При этом содержание восстановленного глутатиона (GSH) снижалось. В том случае, когда на раствор кадмия помещали 7-дневные проростки и также выдерживали их в течение 4 дней, несмотря на более высокое содержание металла в корне его рост не тормозился, а экспрессия обоих изученных генов резко усиливалась. Увеличивалось также количество GSH, очевидно, способствуя поддержанию высокой активности фермента. Сопоставив уровень экспрессии генов двух субъединиц вакуолярной  $H^+$ -АТФазы и устойчивость проростков разного возраста к кадмию, мы пришли к выводу об участии фермента в механизме повышения устойчивости к нему растений ячменя.

*Ключевые слова:* *Hordeum vulgare* – проростки – кадмий – вакуолярная  $H^+$ -АТФаза – экспрессия генов

DOI: 10.7868/S001533031301003X

### ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее важных механизмов детоксикации тяжелых металлов (ТМ), в том числе кадмия, в клетке является их хелатирование в цитоплазме и транспорт в вакуоль [1]. Изоляция токсичных ионов в вакуоли осуществляется благодаря функционированию различных транспортных систем тонопласта [2], среди которых известные в настоящее время транспортеры SAХ2 и SAХ4, работающие как  $Cd^{2+}/H^+$ -антипортеры и способные, как полагают, перемещать свободные ионы металла через вакуолярную мембрану из цитоплазмы в вакуоль [3, 4]. Работу этих антипортеров обеспечивают протонные помпы тонопласта, в частности, вакуолярная  $H^+$ -АТФаза, создающая электрохимический градиент, необходимый для сопряженного (вторичного) транспорта ионов металлов через тонопласт [5, 6].

По современным представлениям, вакуолярная  $H^+$ -АТФаза высших растений является белковым комплексом, состоящим из нескольких субъединиц, кодируемых разными генами [7, 8].

*Сокращения:* ТМ – тяжелые металлы; GSH – восстановленный глутатион.

*Адрес для корреспонденции:* Казнина Наталья Мстиславовна. 185910 Петрозаводск, Пушкинская ул., 11. Институт биологии Карельского научного центра РАН. Электронная почта: kaznina@krc.karelia.ru

При этом выявлено, что увеличение экспрессии генов некоторых из них в условиях действия стрессовых факторов сопровождается увеличением количества соответствующего фермента и, следовательно, его активности [9–11]. В свою очередь, повышение активности вакуолярной  $H^+$ -АТФазы сопровождается усилением транспорта ионов ТМ в вакуоль [12], в том числе и ионов кадмия [8]. Было высказано предположение о том, что за счет увеличения активности антипортеров вакуолярная  $H^+$ -АТФаза может повышать устойчивость растений к ТМ. Однако экспериментальных данных, подтверждающих это, крайне мало. Вместе с тем, изучение экспрессии генов отдельных субъединиц вакуолярной  $H^+$ -АТФазы в присутствии кадмия может способствовать лучшему пониманию механизма изоляции металла в вакуоли клеток и его детоксикации.

Исходя из вышеизложенного, целью нашего исследования явилось изучение экспрессии генов двух субъединиц вакуолярной  $H^+$ -АТФазы (*HvVHA E* и *HvVHA c*) в корнях растений ячменя разного возраста в присутствии кадмия.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили с проростками ярового ячменя (*Hordeum vulgare* L.) сорта Зазерский 85. Се-

**Таблица 1.** Праймеры для проведения ПЦР в режиме реального времени

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
<i>HvVHA-E</i>	5'cgccgacgccaagatgaacgaca	5'agcactttgatacgggaagcatt
<i>HvVHA-c</i>	5'aatctacggcctcatcatcg	5'cacgggatgagaggatgatg

мена проращивали в сосудах с песком при температуре воздуха 20–22°C, освещенности 10 клк, фотопериоде 14 ч. По достижении растениями возраста 3 (фаза прорастания семян) и 7 (фаза всходов) дней их переносили в пластиковые контейнеры (объемом 2 л) на половинный раствор Кнопа с добавлением микроэлементов (контроль). В опытных вариантах к питательному раствору добавляли кадмий в форме сульфата (100 мкМ).

Через 4 суток экспозиции на растворе с кадмием в корнях проростков определяли его содержание, оценивали влияние на рост корня, а также рассчитывали индекс устойчивости проростка методом корневого теста [13]. Помимо этого, в клетках корня определяли уровень экспрессии генов *HvVHA E* и *HvVHA c* и измеряли количество восстановленного глутатиона (GSH).

Содержание кадмия в корнях и листьях определяли методом инверсионной вольтамперометрии с использованием полярографа АВС 1.1 (“Вольта”, Россия). Разложение растительных образцов проводили в смеси  $\text{HNO}_3$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  в соотношении 4 : 1 с использованием микроволновой системы подготовки проб марки МС-6 (“Вольта”).

Индекс устойчивости ( $I_t$ ) вычисляли по формуле:  $I_t = I_{\text{Cd}}/I_{\text{K}}$ , где  $I_{\text{Cd}}$  – прирост корня за 4 суток экспозиции в опытном варианте;  $I_{\text{K}}$  – прирост корня за это же время в контрольном варианте.

Уровень экспрессии генов определяли методом ПЦР. Тотальную РНК выделяли с помощью набора для выделения РНК YellowSolve (“Clonogene”). Препарат РНК обрабатывали ДНКазой. Первую цепь кДНК синтезировали, используя набор для обратной транскрипции со случайными праймерами (“Силекс”). Использованные

праймеры представлены в табл. 1. ПЦР в режиме реального времени проводили на приборе iCycler iQ5 (“Bio-Rad”, США) с оптической приставкой с использованием наборов с интеркалирующим красителем SYBR (“Синтол”). После амплификации для подтверждения специфичности ПЦР-продуктов осуществляли процедуру плавления.

Количество GSH определяли методом ВЭЖХ. После замораживания образцов корней в жидком азоте проводили экстракцию GSH. Для этого 20 мг материала гомогенизировали в 2 мл раствора ледяной 6.3 мМ диэтилтриаминпентауксусной кислоты (“Sigma”) и 0.1% трифторуксусной кислоты (“Merck”). Гомогенат центрифугировали при 10000 об./мин и 4°C. Полученные экстракты подвергали предколоночной дериватизации с монобромбинаме (“Sigma”) согласно методике Sneller с соавт. [14]. Разделение GSH проводили в аналитической колонке марки Phenomenex Luna 5u C18 при температуре колонки 37°C и скорости потока 0.5 мл/мин. Количество GSH определяли по его стандарту (“Sigma”). Расчет площадей пиков осуществляли с помощью компьютерной программы МультиХром (v. 1,5X).

Все представленные в статье данные являются средними из двух независимых опытов. Повторность в пределах одного варианта опыта для разных показателей составляла от 6 до 20 растений. В таблицах и на рисунках представлены средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при  $P < 0.05$ .

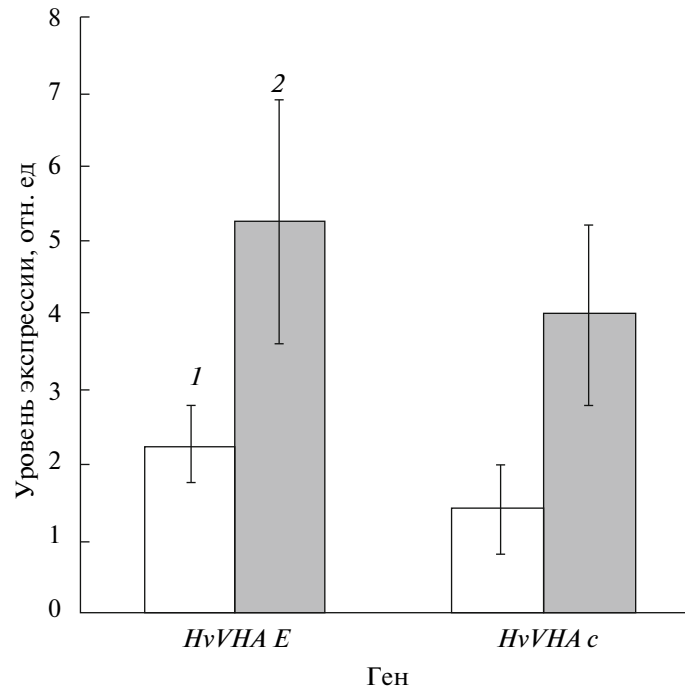
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенный анализ показал, что 4-дневная экспозиция 3- и 7-дневных проростков ячменя на растворе с кадмием приводила к значительному повышению его содержания в корнях. Причем у проростков, возраст которых до обработки составлял 7 дней, содержание кадмия в корнях было в 1.3 раза выше, чем у проростков, которым до обработки было 3 дня (табл. 2). Тем не менее, торможение роста корня наблюдалось только у более молодых: его прирост в опытном варианте был почти на 30% меньше, чем в контроле. Индекс устойчивости у них при этом составил 0.7. У более взрослых проростков негативное влияние кадмия на рост корня практически не наблюдалось, поэтому индекс устойчивости у них оказался близким к 1.0.

**Таблица 2.** Содержание кадмия в корнях проростков ячменя разного возраста после 4-суточной экспозиции на растворе с металлом (100 мкМ) и индекс их устойчивости

Возраст проростков до обработки и экспозиция	Содержание кадмия, мкг/г сырого веса	$I_t$ , усл. ед.
3-дневные + 4 суток с Cd	20.50 ± 0.68	0.71
7-дневные + 4 суток с Cd	27.02 ± 0.51	0.98

Примечание. В таблице представлены средние значения и их стандартные ошибки. Содержание кадмия в корнях растений контрольных вариантов составляет  $0.23 \pm 0.02$  и  $0.27 \pm 0.03$  мкг/г сырого веса соответственно.



**Рис. 1.** Уровень экспрессии генов *HvVHA E* и *HvVHA c* в корнях проростков ячменя разного возраста после их 4-дневной экспозиции на растворе с кадмием (100 мкМ).

1 – 3-дневные + 4 суток экспозиции с Cd; 2 – 7-дневные + 4 суток экспозиции с Cd. Уровень экспрессии генов у проростков контрольного варианта принят за единицу.

Обнаруженные различия в устойчивости проростков ячменя разного возраста к кадмию четко коррелировали с изменениями в уровне экспрессии изученных нами генов вакуолярной Н<sup>+</sup>-АТФазы. Так, после 4-дневной экспозиции проростков на растворе с металлом экспрессия гена *HvVHA E* в клетках корня резко возрастала, но ее уровень оказался значительно более высоким у более взрослых проростков и превышал контроль в 5 раз, тогда как у более молодых – только в 2.3 раза (рис. 1). Уровень экспрессии гена *HvVHA c* при действии кадмия существенно возрастал (в 4 раза) лишь в корнях более взрослых растений.

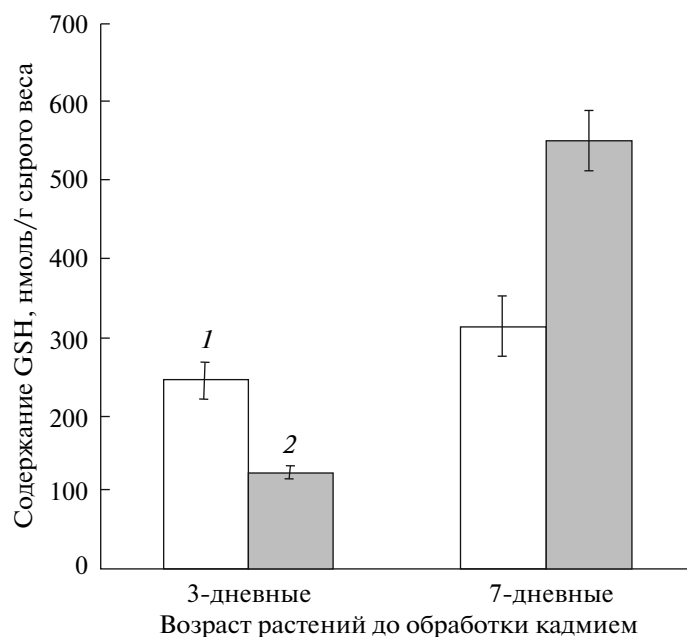
Наряду с этим, экспозиция проростков на растворе с кадмием приводила к двукратному снижению количества GSH в корне более молодых из них и, наоборот, к двукратному увеличению содержания GSH в корне более взрослых проростков (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Впервые наличие протон-зависимого транспорта кадмия в вакуоль было экспериментально доказано в опытах *in vivo* с везикулами тонопласта корней овса [15]. Авторы показали, что АТФазы V-типа, к которым относится и вакуолярная Н<sup>+</sup>-АТФаза, могут обеспечивать работу Cd<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-антипортера. Позднее в присутствии кадмия было

обнаружено увеличение экспрессии генов некоторых субъединиц вакуолярной Н<sup>+</sup>-АТФазы, в частности, субъединицы *c* (*HvVHA c*) в корнях огурца [16] и субъединицы *E* (*HvVHA E*) в корнях ячменя [17], что привело к повышению активности фермента. Аналогичный эффект был отмечен и при действии на растения других неблагоприятных факторов среды, в частности, засоления [18], засухи [19], низких и высоких температур [8]. При этом показано, что возрастание стрессовой нагрузки приводит не только к увеличению экспрессии генов отдельных субъединиц вакуолярной Н<sup>+</sup>-АТФазы и повышению активности фермента, но и сопровождается увеличением устойчивости растений. В наших опытах было установлено, что под влиянием кадмия в корнях более взрослых проростков ячменя резко повышалась экспрессия генов *HvVHA E* и *HvVHA c*, что соответствует их более высокой металлоустойчивости по сравнению с более молодыми проростками, при этом и количество кадмия в их корнях оказалось выше. На основании этого можно предположить, что более высокая устойчивость взрослых проростков к кадмию связана с увеличением активности вакуолярной Н<sup>+</sup>-АТФазы и, соответственно, с более активным транспортом ионов ТМ в вакуоль.

Как известно, на активность вакуолярной Н<sup>+</sup>-АТФазы в стрессовых условиях может оказывать



**Рис. 2.** Содержание GSH в корне проростков ячменя разного возраста после 4-дневной экспозиции на растворе с кадмием (100 мкМ).

1 – контроль; 2 – опыт.

заметное влияние изменение окислительно-восстановительного потенциала клетки, например, вследствие нарушения соотношения между окисленной и восстановленной формами глутатиона [20]. При этом увеличение содержания GSH способствует увеличению стабильности тонопласта и возрастанию активности протонных помп [21]. В нашем случае воздействие кадмия на более взрослые проростки ячменя приводило к заметному увеличению в корне содержания GSH, очевидно, связанного с усилением его синтеза [22], что, в свою очередь, могло способствовать активизации фермента и, как следствие, повышению металлоустойчивости растений.

Относительно причин выявленных у проростков возрастных различий в уровне экспрессии генов вакуолярной  $H^+$ -АТФазы под влиянием кадмия в известной нам литературе сведений нет. Хотя обнаружено, что онтогенетические изменения влияют на экспрессию генов вакуолярной  $H^+$ -АТФазы и могут приводить к изменению активности фермента [19]. Не исключено, что возрастные изменения в активности вакуолярной  $H^+$ -АТФазы могут быть связаны с онтогенетическими различиями в концентрации кальция в клетках корня, поскольку ионы  $Ca^{2+}$  играют одну из ключевых ролей в регуляции транспортных процессов на тонопласте [23].

Резюмируя результаты проведенной работы можно заключить, что кадмий оказывает значительное влияние на экспрессию генов вакуоляр-

ной  $H^+$ -АТФазы в корнях ячменя. При этом уровень экспрессии генов разных субъединиц фермента неодинаков и зависит от возраста растений и содержания металла в корне. У более молодых проростков после 4-дневной экспозиции на растворе с кадмием тормозился рост корня, который сопровождался увеличением экспрессии гена *HvVHA E*. Изменений в экспрессии гена *HvVHA c* при этом не происходило. У более взрослых проростков, несмотря на более высокое содержание в корнях кадмия, его негативного влияния на рост корня не наблюдалось. При этом экспрессия обоих изученных генов резко повышалась.

При сопоставлении уровня экспрессии генов и устойчивости проростков разного возраста к кадмию отчетливо выявляется прямая зависимость, что позволяет с большой долей уверенности говорить об участии вакуолярной  $H^+$ -АТФазы в механизме повышения устойчивости растений к ТМ. Возрастание же у более взрослых и более устойчивых проростков содержания GSH в клетках корня, очевидно, выступает в качестве дополнительного фактора, способствующего поддержанию в этих условиях высокой активности фермента.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hall J.L. Cellular Mechanisms for Heavy Metal Detoxification and Tolerance // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 1–11.
2. Kabała K., Janicka-Russak M. Differential Regulation of Vacuolar  $H^+$ -ATPase and  $H^+$ -PPase in *Cucumis sativus*

- vus* Roots by Zinc and Nickel // *Plant Sci.* 2011. V. 180. P. 531–539.
3. *Clemens S.* Toxic Metal Accumulation, Responses to Exposure and Mechanisms of Tolerance in Plants // *Biochimie.* 2006. V. 2006. P. 1707–1719.
  4. *Mendoza-Cózatl D.G., Jobe T.O., Hauser F., Schroeder J.I.* Long-Distance Transport, Vacuolar Sequestration, Tolerance, and Transcriptional Responses Induced by Cadmium and Arsenic // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2011. V. 14. P. 554–562.
  5. *Rea P.A., Sanders D.* Tonoplast Energization: Two H<sup>+</sup>-Pumps, One Membrane // *Physiol. Plant.* 1987. V. 71. P. 131–141.
  6. *Cooke D.T., Clarkson D.T.* Transport and Receptor Proteins of Plant Membranes. Molecular Structure and Function. New York: Plenum, 1992. V. 1/3. 213 p.
  7. *Sze H., Ward J.M., Lai S.* Vacuolar H<sup>+</sup>-Translocating ATPases from Plants: Structure, Function, and Isoforms // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1992. V. 24. P. 371–381.
  8. *Dietz K.J., Tavakoli N., Kluge C., Mimura T., Sharma S.S., Harris G.C., Chardonnens A.N., Golldack D.* Significance of the V-Type ATPase for the Adaptation to Stressful Growth Conditions and Its Regulation on the Molecular and Biochemical Level // *J. Exp. Bot.* 2001. V. 52. P. 1969–1980.
  9. *Dietz K.J., Rudloff S., Ageorges A., Eckerskorn C., Fischer K., Arbinger B.* Subunit E of the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase of *Hordeum vulgare* L.: cDNA Cloning, Expression and Immunological Analysis // *Plant J.* 1995. V. 8. P. 521–529.
  10. *Tsiantis M.S., Bartholomew D.M., Smith J.A.C.* Salt Regulation of Transcript Levels for the c Subunit of a Leaf Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the Halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* // *Plant J.* 1996. V. 9. P. 729–736.
  11. *Golldack D., Dietz K.-J.* Salt-Induced Expression of the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in the Common Ice Plant Is Developmentally Controlled and Tissue Specific // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 1643–1654.
  12. *Kluge C., Lahr C., Hanitzsch M., Bolte S., Golldack G., Dietz K.-J.* New Insight into the Structure and Regulation of the Plant Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2003. V. 35. P. 377–388.
  13. *Wilkins D.S.* The Measurement of Tolerance to Edaphic Factors by Means of Root Growth // *New Phytol.* 1978. V. 80. P. 623–633.
  14. *Sneller F.E.S., van Heerwaarden L.M., Koevoets P.L.M., Vooijs R., Schat H., Verkleij A.C.* Derivatization on Phytochelatins from *Silene vulgaris*, Induced upon Exposure to Arsenate and Cadmium: Comparison of Derivatization with Ellman's Reagent and Monobromobimane // *J. Agric. Food Chem.* 2000. V. 48. P. 4014–4019.
  15. *Salt D.E., Wagner G.J.* Cadmium Transport across Tonoplast of Vesicles from Oat Roots // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 12 297–12 302.
  16. *Kabała K., Janicka-Russak M., Kłobus G.* Different Responses of Tonoplast Proton Pumps in Cucumber Roots to Cadmium and Copper // *J. Plant Physiol.* 2010. V. 167. P. 1328–1335.
  17. *Finkemeier I., Kluge C., Metwally A., Georgi N., Grotjohann N., Dietz K.-J.* Alterations in Cd-Induced Gene Expression under Nitrogen Deficiency in *Hordeum vulgare* // *Plant Cell Environ.* 2003. V. 26. P. 821–833.
  18. *Janicka-Russak M., Kłobus G.* Modification of Plasma Membrane and Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in Response to NaCl and ABA // *J. Plant Physiol.* 2007. V. 164. P. 295–302.
  19. *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<sup>+</sup>-ATPase Genes in Roots and Leaves of *Mesembryanthemum crystallinum* // *Plant Physiol.* 1996. V. 110. P. 259–265.
  20. *Cipriano D.J., Wang Y., Bond S., Hinton A., Jefferies K.C., Qi J., Fargas M.* Structure and Regulation of the Vacuolar ATPases // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1777. P. 599–604.
  21. *Ozolina N.V., Kolesnikova E.V., Nurminsky V.N., Nesterkina I.S., Dudareva L.V., Tretyakova A.V., Salyaev R.K.* Redox Dependence of Transport Activity of Tonoplast Proton Pumps: Effects of Nitric Oxide Exposure during Ontogenesis and under Hypoosmotic and Hyperosmotic Stress // *Membr. Cell Biol.* 2011. V. 5. P. 258–262.
  22. *Metwally A., Safronova V.I., Belimov A.A., Dietz K.J.* Genotypic Variation of Response to Cadmium Toxicity in *Pisum sativum* L. // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P. 1267–1279.
  23. *Ozolina N.V., Kolesnikova E.V., Nurminsky V.N., Nesterkina I.S., Dudareva L.V., Donskaya L.I., Salyaev R.K.* Influence of Exogenous NO Donator and Variations in the Ca<sup>2+</sup> Content on Transport Activity Related to Tonoplast Proton Pumps in Ontogenesis and under Hyperosmotic Stress // *Membr. Cell Biol.* 2010. V. 4. P. 297–301.