

ORIGINAL ARTICLE

The influence of osmotic stress on the content of calcium ions in the red beet vacuoles and on the transport activity of tonoplast proton pumps.

Ozolina N.V., E.V. Kolesnikova, V.N. Nurminsky, I.S. Nesterkina,
L.V. Dudareva, T.I. Lapteva, R.K. Salyaev

Siberian Institute of Plant Physiology & Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia

*E-mail: ozol@sifibr.irk.ru

Received April 4 2012

The contents of calcium ions in the isolated vacuoles and in intact red beets under the conditions of dormancy and osmotic stress was determined. It is demonstrated that the content of calcium ions in the red beet vacuoles not exposed to osmotic stress makes 13.3% of the total content these ions in intact red beets. Under the conditions of osmotic stress, this indicator increases substantially. Furthermore, under the conditions of hyperosmotic stress, the content of calcium ions in the vacuoles was 30%, while under hypoosmotic stress it was 49% of the total content of these ions in the intact red beet. The transition of calcium ions from the cytoplasm and other compartments into the vacuole under the conditions of osmotic stress is, probably, one of forms of participation of the vacuole in adaptation processes of the plant cell under this kind of abiotic stress. It has been demonstrated for the first time that tonoplast proton pumps, which actively participate in provision of calcium homeostasis in cytoplasm, substantially activate their transport activity under osmotic stress, what allows one to speak about their important role in the cell's protective programs. Under normal (no stress) conditions, artificial elevation of the content of calcium ions led to inhibition of activity of the tonoplast proton pumps, while under gipoosmotic stress the activity of tonoplast proton pumps increased, what might aid to restoring homeostasis with respect to calcium ions in cytoplasm.

Key words: calcium ions, vacuoles, tonoplast proton pumps, osmotic stress.

ORIGINAL ARTICLE

**Влияние осмотического стресса на содержание ионов
кальция в вакуолях столовой свёклы и на
транспортную активность протонных помп
тонопласта**

Озолина Н.В. *, Е.В. Колесникова, В.Н. Нурминский, И.С. Нестёркина,

Л.В. Дударева, Т.И. Лаптева, Р.К. Саляев

Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук (СИФИБР СО РАН); 664033 Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Россия

*E-mail: ozol@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 4 апреля 2012 г.

Измеряли содержание ионов кальция в изолированных вакуолях и в целом корнеплоде столовой свёклы в норме и при осмотическом стрессе. Показано, что содержание ионов кальция в вакуолях корнеплодов, не подвергнутых стрессовому воздействию, составляет 13.3% от содержания этого иона в целом корнеплоде. В условиях осмотического стресса происходило существенное возрастание этого показателя. Причём при гиперосмотическом стрессе содержание кальция в вакуолях составляло 30%, а при гипоосмотическом 49% от всего содержания этих ионов в целом корнеплоде. Выявленное перемещение ионов кальция из цитоплазмы и других компартментов в вакуоль при осмотическом стрессе, по-видимому, является одним из способов участия вакуоли в адаптационных процессах растительной клетки при этом виде абиотического стресса. Впервые показано, что протонные помпы тонопласта, принимающие активное участие в обеспечении кальциевого гомеостаза в цитоплазме, существенно повышают свою транспортную активность в условиях осмотического стресса, что позволяет говорить об их важной роли в защитных программах клетки. Искусственное повышение содержания ионов кальция в нормальных условиях приводило к ингибированию активности протонных помп тонопласта, тогда как при гипоосмотическом стрессе активность протонных помп увеличивалась, что могло способствовать восстановлению гомеостаза по ионам кальция в цитоплазме.

Key words: ионы кальция, вакуоли, протонные помпы тонопласта, осмотический стресс

В настоящее время известно, что вакуоль растительной клетки является одним из главных компартментов для запасаания внутриклеточного кальция (Gelli, Blumwald, 1993). Но кроме

вакуоли свободный кальций может накапливаться и в других органеллах. Например, в эндоплазматическом ретикулуме, в митохондриях. Известно, что в митохондриях

концентрация кальция в 2 раза выше, чем в цитоплазме и при разных видах абиотического стресса она существенно возрастает (Logan, Knight, 2003). В ответ на действие стрессора свободный кальций из всех клеточных депо выходит в цитоплазму, где играет роль вторичного мессенджера в процессах сигнальной трансдукции и запускает целый ряд процессов, направленных на защиту клетки (Carafoli, 1987; Knight, 2003; Tuteja, Sopory, 2008). Но поскольку ионы кальция в больших концентрациях токсичны для цитоплазмы (White, Broadley, 2003; Cerella et al., 2010), после запуска необходимых процессов кальций должен покинуть цитоплазму и большая его часть, по-видимому, поступает в вакуоль через Ca^{2+} -АТФазу и $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ антипортер (Hirschi, 2001). Целью данной работы было проверить это предположение и изучить влияние осмотического стресса на изменение содержания ионов кальция во фракции изолированных вакуолей и в корнеплодах столовой свёклы. Кроме того была поставлена задача изучить влияние этого иона на активность основных компонентов активного транспорта (H^{+} -АТФазы и H^{+} -пирофосфатазы) на вакуолярной мембране в норме и при осмотическом стрессе. Поскольку именно эти протонные помпы обеспечивают работу $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ антипортера отвечающего за восстановление содержания ионов кальция в клетке после стрессового воздействия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили корнеплоды столовой свеклы (*Beta vulgaris* L.) сорт Бордо. В экспериментах были использованы корнеплоды в период активного роста и накопления метаболитов и в период покоя. В период покоя корнеплоды находились в овощехранилище в течение нескольких

месяцев при 4-5°C. Гипер- и гипоосмотическому стрессу подвергали только покоящиеся корнеплоды. Из ткани корнеплодов проводили выделение изолированных вакуолей и вакуолярных мембран по описанной ранее методике (Саяев и др., 1981). Для создания *гиперосмотического стресса* корнеплоды в течение 3-х суток выдерживали (подсушивали) на открытом воздухе при комнатной температуре, что приводило к частичной потере веса корнеплодов и увеличению осмотической концентрации клеточного сока. Для создания *гипоосмотического стресса* очищенные корнеплоды выдерживали в течение суток в дистиллированной воде, в результате чего осмотическая концентрация клеточного сока уменьшалась (рис. 1). Величину осмотического давления оценивали на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Россия). Характеристики стрессов приведены на рис. 1.

Определение содержания кальция проводили в корнеплодах и во фракции изолированных вакуолей в нормальных и стрессированных условиях методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (Optima 2000 DV (Perkin Elmer, USA)). Этот метод позволяет определять общее содержание (свободного и связанного) кальция в образце. Подготовка образцов для анализа осуществлялась по общепринятой методике (Ермаков и др., 1987).

Транспортную функцию протонных помп тонопласта оценивали по изменению рН везикул тонопласта флуоресцентным методом с использованием зондов. За сдвигами рН следили по изменению флуоресценции акридинового оранжевого при длине волны возбуждающего и испускаемого света 493 и 540 нм, соответственно. Эксперименты проводили на спектрофлуориметре (RF-5301PC, Shimadzu).

В кювету поэтапно вносили 2.5 мл инкубационного раствора и 0.05 мл осадка везикул тонопласта. Инкубационный раствор содержал: 20 мМ Трис/МЭС, 50 мМ КСl, 280 мМ маннита, 5 мкМ акридинового оранжевого, 3 мМ MgCl₂, pH 7.3. Содержание белка определяли по методу Бредфорда (Bradford, 1976). В среднем на 0.05 мл образца приходилось 30-50 мкг белка. В среду инкубации вносили 3 мМ пиродифосфата или 3 мМ АТФ (Трис), в качестве источника ионов кальция CaCl₂ в концентрации 2 мМ, в качестве поглотителя ионов кальция вводили 2 мМ ЭГТА (этиленгликоль-бис(2-аминоэтил)N,N,N,N-тетрауксусная кислота). Для доказательства специфичности проводимых исследований во всех экспериментах использовали общепринятые ингибиторы KNO₃ (50 мМ), KF (50 мМ) и протонифор карбонилцианид 3-хлорофенилгидразон (СССР) (10 мкМ). Транспортная активность измерялась в общепринятых единицах (%ΔF/ мг белка/мин), где ΔF- тушение флуоресценции акридинового оранжевого (Braun et al., 1986).

В работе применяли следующие реактивы фирмы "Sigma": 2-N-морфолиноэтансульфоновую кислоту (МЭС), аденозинтрифосфат (АТФ) (натриевая соль), пиродифосфат (калиевая соль), Трис, 2-меркаптоэтанол, карбонил цианид 3-хлорофенилгидразон (СССР). Акридиновый оранжевый фирмы "Aldrich". Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ХЧ.

На графиках представлены средние арифметические значения и их стандартные отклонения, которые были получены в пяти независимых экспериментах, подсчитанные с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты изучения динамики содержания ионов кальция показали, что в период активных ростовых процессов и в период покоя корнеплоды столовой свёклы содержали одинаковое количество кальция. Вакуоли, выделенные из корнеплодов на разных фазах онтогенеза, также существенных отличий в содержании кальция не показали (рис. 2). По литературным данным известно, что вакуоли высших растений содержат от 0,1 до 1 мМ Ca²⁺ (Tuteja, Soroju, 2008). По нашим данным вакуоли столовой свёклы содержали 0,1 мМ Ca²⁺ в период покоя и 0,08 мМ в период активных ростовых процессов.

В корнеплодах в условиях гиперосмотического стресса содержание Ca²⁺ не изменялось (рис. 3), но снижалось на 13,5% после гипоосмотического стресса, что, по-видимому, связано с выходом Ca²⁺ при инкубации корнеплодов в дистиллированной воде.

Более существенные различия в содержании Ca²⁺ были отмечены в вакуолях, выделенных из корнеплодов подвергнутых осмотическому стрессу. Так, в условиях гиперосмотического стресса содержание Ca²⁺ в вакуолях увеличивалось в 2,2 раза, а при гипоосмотическом стрессе в 3,2 раза. Известно, что при разных видах стрессового воздействия в цитоплазме происходит увеличение содержания ионов кальция (Rudd, Franklin-Tong, 1999), необходимое для сигнальной трансдукции, однако оно должно быть кратковременным. Доказано, что длительное увеличение содержания Ca²⁺ смертельно для клетки (White, Broadley, 2003). Отток ионов кальция из цитоплазмы осуществляется, главным образом, во внутриклеточные депо. Так, недавно показано (Logan, Knight, 2003), что в митохондриях, выделенных из проростков

арабидопсис, происходит увеличение содержания свободного кальция с 208 нМ до 504 нМ в условиях гиперосмотического стресса.

Такая же картина наблюдалась и при холодовом (526 нМ) и окислительном (495 нМ) стрессах.

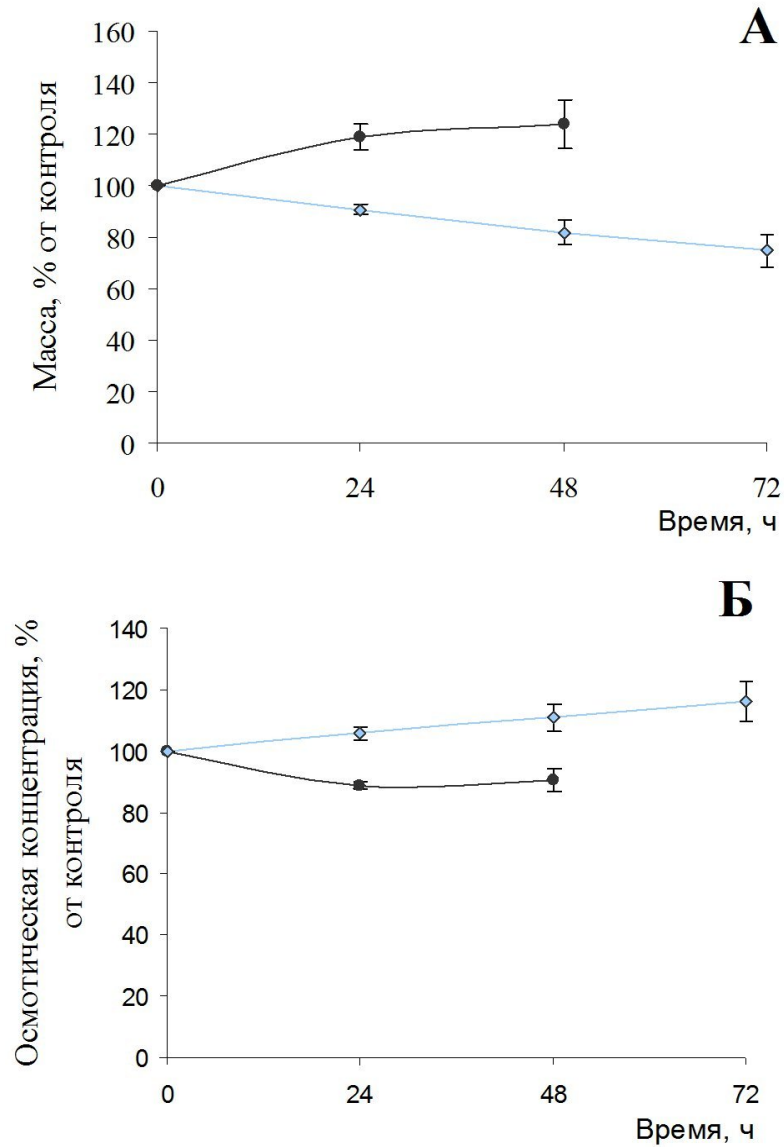


Рис. 1. Характеристика гипо- и гиперосмотического стрессов. Изменение массы корнеплода (А) и осмотической концентрации (Б) клеточного сока при разных видах осмотического стресса.

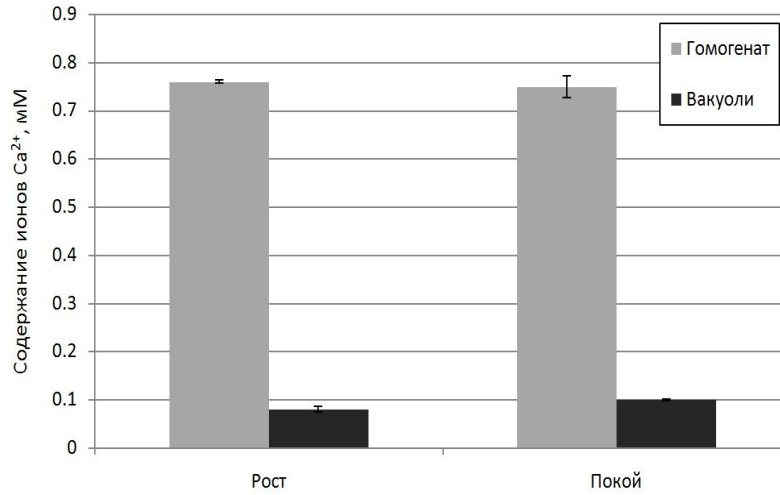


Рис. 2. Динамика содержания ионов кальция в корнеплодах столовой свёклы (гомогенат) и во фракции изолированных вакуолей на разных фазах онтогенеза.

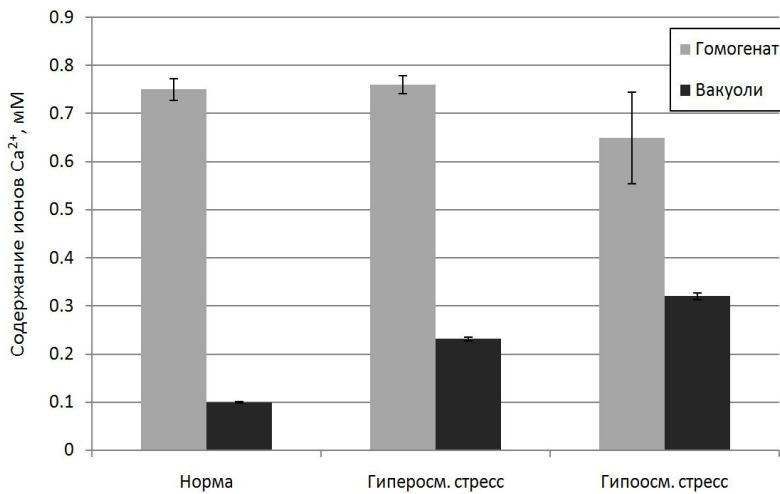


Рис. 3. Динамика содержания ионов кальция в корнеплодах столовой свёклы (гомогенат) и во фракции изолированных вакуолей в норме, при гиперосмотическом и гипоосмотическом стрессах.

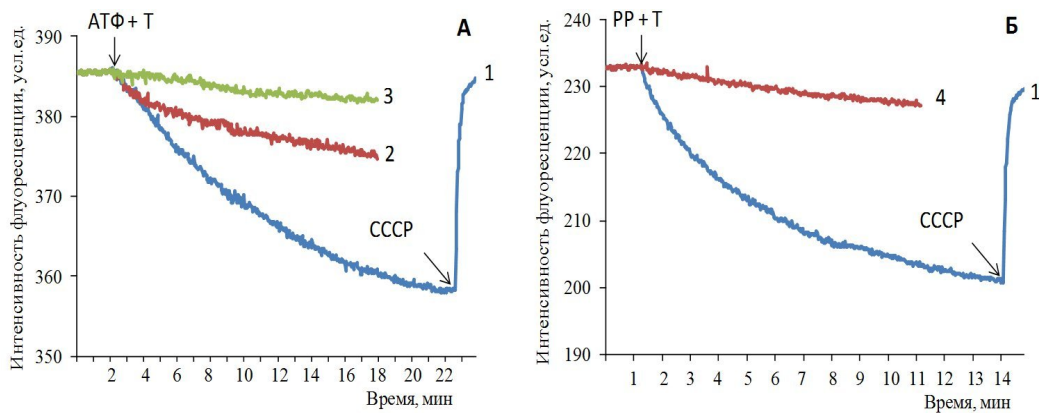


Рис. 4. АТФ-зависимый (А) и пирофосфат (РР)-зависимый (Б) транспорт Н⁺ в везикулы тонопласта (Т) без специфических ингибиторов (1) в присутствии 50 мМ КNO₃ (2), 20 нМ бафиломицина А₁ (3), 50 мМ КF (4). CCCP использовали в концентрации 10 мкМ.

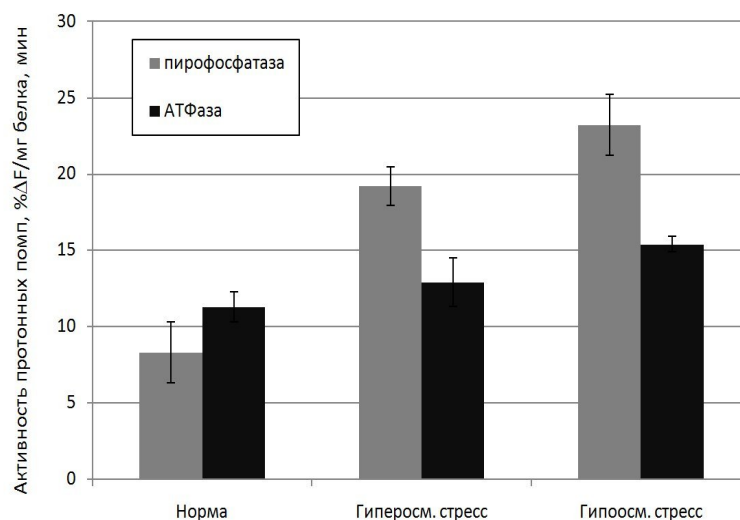


Рис. 5. Динамика транспортной активности протонных помп тонопласта в норме, при гиперосмотическом и гипоосмотическом стрессах.

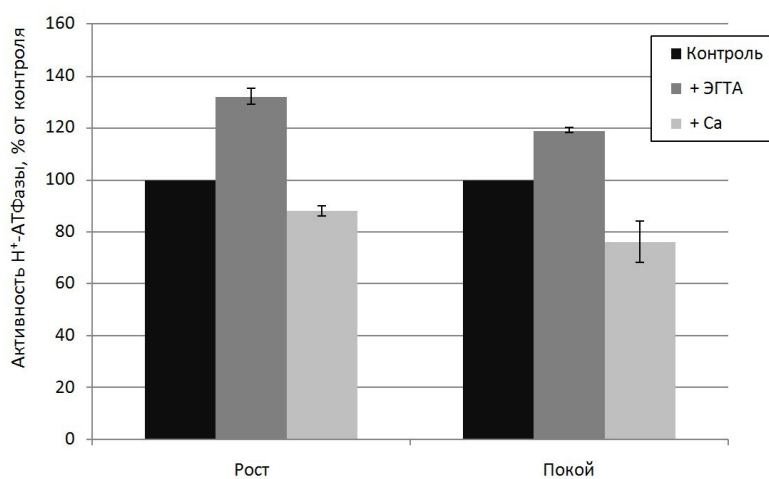


Рис. 6. Динамика изменения транспортной активности H⁺-АТФазы при изменении содержания ионов кальция на разных фазах онтогенеза.

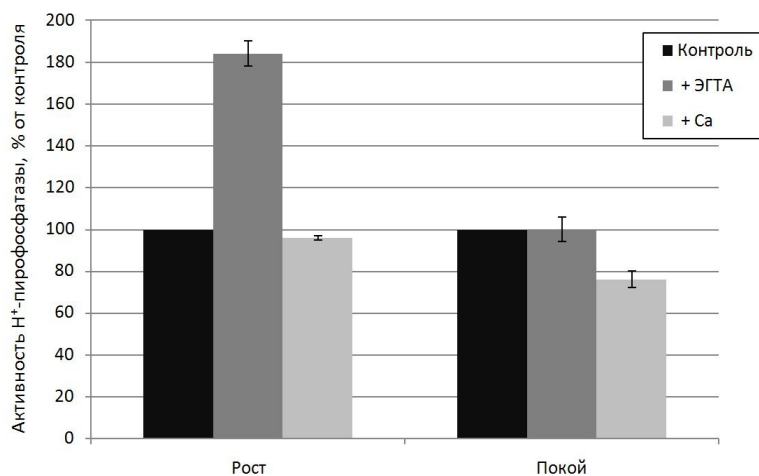


Рис. 7. Динамика изменения транспортной активности H⁺-пирофосфатазы при изменении содержания ионов кальция на разных фазах онтогенеза.

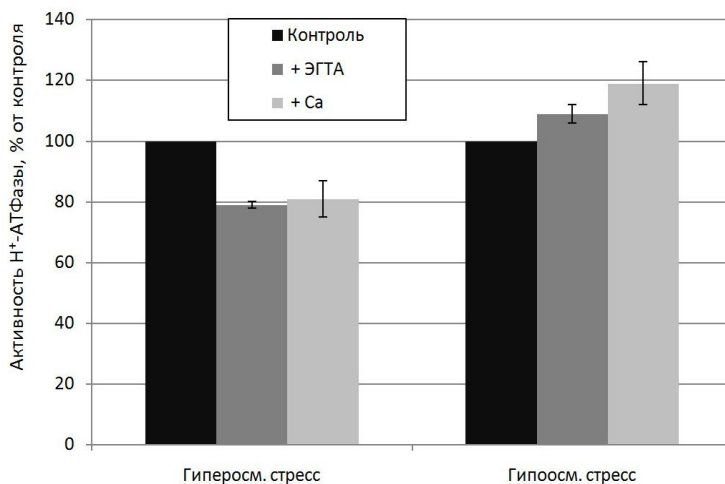


Рис. 8. Динамика изменения транспортной активности H⁺-АТФазы при изменении содержания ионов кальция в норме (контроль), при гиперосмотическом и гипоосмотическом стрессах.

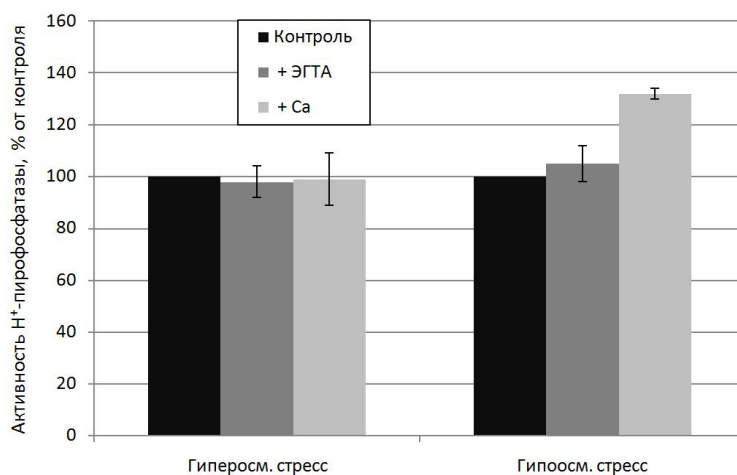


Рис. 9. Динамика изменения транспортной активности H⁺-пирофосфатазы при изменении содержания ионов кальция в норме (контроль), при гиперосмотическом и гипоосмотическом стрессах.

Мы исследовали другое клеточное депо, которое может принимать кальций из цитоплазмы после стресса. Так же, как в митохондриях, в вакуолях в условиях стресса содержание кальция увеличивалось в 2-3 раза, но в наших экспериментах это увеличение при разных видах стресса заметно различалось. При гипоосмотическом стрессе оно было на 40% выше, чем в условиях гиперосмотического. Это может быть связано с тем, что условия гипоосмотического стресса были более жёсткими, так как при инкубации корнеплодов в

воде мы неизбежно усугубляем его гипоксией, которую не испытывали корнеплоды при гиперосмотическом стрессе.

Ещё один интересный момент можно отметить, анализируя данные представленные на рис. 3. Так, в покое содержание ионов кальция во фракции вакуолей составляет 13,3% от его содержания в корнеплоде. Следовательно, 86,7% ионов кальция содержится в цитоплазме и других компартментах растительной клетки. В условиях осмотического стресса содержание кальция в вакуолях увеличивалось. При

гиперосмотическом стрессе вакуоли содержали 30% ионов кальция от его содержания в корнеплоде, а при гипоосмотическом 49%. Разница содержания ионов кальция в целом корнеплоде и во фракции изолированных вакуолей позволяет оценить содержание ионов кальция в цитоплазме и в других, кроме вакуолей, компартментах растительной клетки. Выявленное перемещение ионов кальция из цитоплазмы и других компартментов в вакуоль при осмотическом стрессе может являться одним из способов участия вакуоли в адаптационных процессах растительной клетки при этом виде абиотического стресса.

Протонные помпы тонопласта играют важную роль в поддержании гомеостаза ионов кальция в цитоплазме, особенно при увеличении концентрации этого иона в ответ на стрессовое воздействие. Это утверждение связано с тем, что протонные помпы обеспечивают работу H^+/Ca^{2+} антипортера, который имеет низкую аффинность ($K_m=10-15 \mu M$) но более высокую способность к транспорту ионов кальция по сравнению с Ca^{2+} -АТФазой ($K_m=1-10 \mu M$; Evans, Williams, 1998). При резком увеличении концентрации ионов кальция в стрессовых условиях именно H^+/Ca^{2+} антипортер обеспечивает быстрое восстановление физиологической концентрации ионов кальция в цитоплазме. Это было подтверждено исследователями, которые показали, что при гипертоническом шоке у дрожжей именно H^+/Ca^{2+} антипортер, но не Ca^{2+} -АТФаза регулировал содержание Ca^{2+} в цитоплазме (Denis, Cyert, 2002). Поэтому роль протонных помп очень важна в поддержании гомеостаза Ca^{2+} в цитоплазме.

Изучение механизмов регуляции транспортной активности протонных помп тонопласта проводили методом флуоресцентных зондов. На рис. 4 представлены АТФ- и

пирофосфатиндуцированное изменение флуоресценции акридинового оранжевого в везикулах тонопласта, выделенных из корнеплодов столовой свёклы. Специфические ингибиторы протонных помп подавляли транспортную активность изучаемых ферментов, а используемые для контроля протонофоры полностью снимали тушение флуоресценции.

На рис. 5 представлена динамика изменения транспортной активности протонных помп тонопласта при разных видах осмотического стресса. Хорошо видно, что в условиях осмотического стресса наблюдалось увеличение активности обеих протонных помп. Причем активность H^+ -пирофосфатазы была значительно выше нормы (в 2,3 и 2,7 раз при гипер- и гипоосмотическом стрессах, соответственно). Уровень активности H^+ -АТФазы при гиперосмотическом стрессе менялся незначительно, а при гипоосмотическом стрессе увеличивался, но несущественно (в 1,5 раза). Такой характер изменения активности протонных помп позволяет говорить о важной роли этих ферментов, и особенно H^+ -пирофосфатазы, в условиях осмотического стресса. Особая роль H^+ -пирофосфатазы при стрессе отмечалась и другими исследователями. Так, на везикулах тонопласта столовой свёклы было показано, что при охлаждении и гипоксии активность H^+ -пирофосфатазы увеличивалась, а активность H^+ -АТФазы уменьшалась (Davies, 1997). Такие же результаты были получены после обработки проростков фасоли низкими положительными температурами: гидролитическая и транспортная активность H^+ -пирофосфатазы увеличивалась, а уровень активности H^+ -АТФазы снижался. Было высказано предположение об особой роли пирофосфатазы тонопласта при низкотемпературном стрессе (Darley et al., 1995).

Аналогичные результаты были получены при солевом стрессе (Ballesteros et al., 1996).

В дальнейших экспериментах была прослежена зависимость транспортной активности протонных помп тонопласта от изменения содержания ионов кальция на разных фазах онтогенеза и при осмотическом стрессе. На рис. 6 и 7 хорошо видно, что увеличение содержания ионов кальция и в период роста и в период покоя приводило к снижению активности обеих протонных помп, тогда как удаление с помощью хелатора ЭГТА этого иона стимулировало активность протонных помп, особенно существенно (до 180%) увеличивалась активность H^+ -пирофосфатазы в период роста. В условиях осмотического стресса изменение содержания кальция не оказывало влияния на транспортную активность H^+ -пирофосфатазы (рис. 9) и на 20% снижало активность H^+ -АТФазы (рис. 8). При гипоосмотическом стрессе отмечено небольшое увеличение активности протонных помп, которое было более существенным (до 130%) при добавлении ионов кальция. Таким образом, если у нестрессированных корнеплодов повышение содержания кальция вызывает ингибирование активности протонных помп, то при гиперосмотическом стрессе это происходит не всегда. А при гипоосмотическом стрессе транспортная активность протонных помп активируется, что и должно происходить для обеспечения большей активности H^+/Ca^{2+} антипортера, отвечающего за восстановление кальциевого гомеостаза в растительной клетке. Эти данные подтверждаются работами других исследователей (Zhang et al., 1998), которые показали, что увеличение содержания ионов кальция стимулировало транспортную активность H^+ -АТФазы только в условиях солевого стресса.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что содержание ионов кальция в вакуолях корнеплодов в обычных условиях не является высоким, но существенно возрастает после стрессового воздействия. Выявленное перемещение ионов кальция из цитоплазмы и других компартментов в вакуоль после осмотического стресса может являться одним из способов участия вакуоли в адаптационных процессах растительной клетки. Протонные помпы тонопласта, обеспечивающие посредством H^+/Ca^{2+} антипортера поддержание гомеостаза ионов кальция в цитоплазме, существенно повышали свою активность при осмотическом стрессе, что позволяет говорить о важной роли этих ферментов, и особенно H^+ -пирофосфатазы, в защитных программах растительной клетки. В нормальных условиях повышение содержания ионов кальция приводило к ингибированию активности протонных помп тонопласта, тогда как при гипоосмотическом стрессе активность обеих протонных помп увеличивалась, что могло способствовать восстановлению гомеостаза ионов кальция в цитоплазме и успешному преодолению последствий стресса.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект №09-04-00396).

ЛИТЕРАТУРА

- Ермаков А.И., Арасимович В.В., Ярош Н.П. и др. (1987) Методы биохимического исследования растений. Л.: Агропромиздат, Ленингр. отд-ние. 430 с.
- Салаяев Р.К., Кузеванов В.Я., Хаптагаев С.Б., Копытчук В.Н. (1981) Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений. *Физиология растений*. **28**:1295-1305.

- Ballesteros E., Dnaire J., Belver A. (1996) Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Physiol. Plant.* **97**:249-268.
- Bradford D.P. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilising the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Braun Y., Hassidim M., Lerner H., Reinhold L. (1986) Studies on H⁺-translocating ATPases in plants of varying resistance to salinity. *Plant Physiol.* **81**:1050-1056.
- Carafoli E. (1987) Intracellular calcium homeostatic. *Annu. Rev. Biochem.* **56**:395-433.
- Cerella C., Diederich M., Ghibelli L. (2010) The dual role of calcium as messenger and stressor in cell damage, death, and survival. *International Journal of Cell Biology*. Article ID 546163, 14 p. doi:10.1155/2010/546163.
- Darley C., Davies J., Sanders D. (1995) Chill-induced changes in the activity and abundance of the vacuolar proton-pumping pyrophosphatase from mung bean hypocotyls. *Plant Physiol.* **109**(2):659-665.
- Davies J. (1997) Vacuolar energization: pumps, shunts and stress. *J. Exp. Botany.* **48**(308): 633-641.
- Denis V., Cyert M. (2002) Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *Journal of Cell Biology* **156**:29-34.
- Evans D., Williams L. (1998) P-type calcium ATPases in higher plants – biochemical, molecular and functional properties. *Biochemica et Biophysica Acta.* **1376**:1-25.
- Gelli A., Blumwald E.(1993) Calcium retrieval from vacuolar pools. *Plant Physiol.* **102**: 1139-1146.
- Hirschi K. (2001) Vacuolar H⁺/Ca²⁺transport: who's directing the traffic? *Trends in Plant Science* **6**(3):100-104
- Knight H. (2003) Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* **195**:269-324.
- Logan D., Knight M. (2003) Mitochondrial and cytosolic calcium dynamics are differentially regulated in plants. *Plant Physiol.* **133**: 21-24.
- Rudd J., Franklin-Tong V. (1999) Calcium signaling in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* **55**:214-232.
- Tuteja N., Sopory S. (2008) Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant Signaling & Behavior.* **3**:525-536.
- White P., Broadley M. (2003) Calcium in Plants. *Annals of Botany.* **92**:487-511.
- Zhang W., Diao F., Yu B., Liu Y. (1998) H⁺-ATPase and H⁺-transport activities in tonoplast vesicles from Barley roots under salt stress and influence of calcium and abscisic acid. *J. of Plant Nutrition.* **21**(3):447-458.