

УДК 577.352.5

ЭЛЕКТРОГЕНЕЗ ВО ФРАКЦИИ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ИЗ ГАЛОТОЛЕРАНТНОЙ МИКРОВОДОРОСЛИ *Dunaliella maritima* И ЭФФЕКТЫ *N,N'*-ДИЦИКЛОГЕКСИЛКАРБОДИИМИДА*

© 2020 Л.Г. Попова**, Д.А. Маталин, Ю.В. Балнокин

ФГБУН Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН,
127276 Москва, Россия; электронная почта: lora_gp@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2020

После доработки 22.06.2020

Принята к публикации 26.06.2020

В опытах на везикулярных препаратах плазматической мембраны, выделенных из клеток зеленой галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima*, исследовали влияние *N,N'*-дициклогексилкарбодиимида (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, DCCD) – неспецифического ингибитора транспортных систем, функционирующих в биологических мембранах, – на Na^+ -транспортирующую АТФазу Р-типа этого организма. Исследовали эффекты DCCD на электрогенную/ион-транспортирующую функцию фермента и его АТФ-гидролазную активность. Электрогенную/ион-транспортирующую функцию фермента регистрировали с помощью потенциал-чувствительного зонда оксонол VI по Na^+ -зависимой генерации электрического потенциала на везикулярных мембранах. Найдено, что, в отличие от множества других ион-транспортирующих АТФаз, Na^+ -АТФаза *D. maritima* нечувствительна к действию DCCD. Этот агент не подавлял ни гидролиз АТФ, катализируемый данным ферментом, ни его транспортную активность. Вместе с тем, DCCD влиял на способность везикулярных мембран поддерживать электрический потенциал, создаваемый Na^+ -АТФазой *D. maritima*. Наблюдаемые эффекты объясняются, исходя из предположения, что DCCD взаимодействует с Na^+/H^+ антипортером в плазматической мембране *D. maritima*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: *Dunaliella maritima*, Na^+ -АТФаза, *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид, микроводоросли, мембранный потенциал, плазматическая мембрана.

DOI: 10.31857/S0320972520080084

ВВЕДЕНИЕ

Животные и растительные клетки различаются по способу энергизации плазматической мембраны. В животных клетках основную роль в энергизации клеточной мембраны играет активный транспорт Na^+ и K^+ , осуществляемый Na^+ , K^+ -АТФазой. Этот фермент поддерживает неравновесное распределение Na^+ и K^+ по обе стороны мембраны и создает отрицательный со стороны цитоплазмы электрический потенциал на мембране [1, 2]. Создаваемый АТФазой градиент электрохимического потенциала Na^+

обеспечивает движущую силу для процессов пассивной диффузии других ионов, а также процессов вторично-активного ко-транспорта различных веществ через мембрану. В растительных клетках транспортные процессы на плазматической мембране обусловлены наличием протонного градиента, который создает электрогенная H^+ -помпа – H^+ -АТФаза [3]. Она выводит протоны из клетки в окружающую среду/апопласт с затратой метаболической энергии, что также сопровождается генерацией на мембране отрицательного со стороны цитоплазмы электрического потенциала.

Однако и у представителей растительного царства – галотолерантных зеленых микроводорослей *Tetraselmis viridis* и *Dunaliella maritima* – в плазматической мембране были обнаружены электрогенные Na^+ -помпы [4, 5]. Na^+ -помпы микроводорослей принадлежат семейству АТФаз Р-типа, к которому также относятся протонная помпа высших растений и Na^+ , K^+ -АТФаза животных клеток [6, 7]. Интересно отметить, что у данных видов микроводорослей Na^+ -АТФазы в плазмалемме сосуществуют с H^+ -помпами – АТФазами Р-типа, что было показана

Принятые сокращения: СССР – карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон (carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine); DCCD – *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide); ETH157 – sodium ionophore II (*N,N'*-dibenzyl-*N,N'*-diphenyl-1,2-phenylenedioxidiacetamide); $\Delta\psi$ – трансмембранный электрический потенциал; ПМ – плазматическая мембрана.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-173, 30.07.2020.

** Адресат для корреспонденции.

но в экспериментах на выделенных из клеток водорослей везикулярных препаратах плазматической мембраны [5, 8]. Эти экспериментальные данные согласуются с результатами, полученными при анализе секвенированных геномов зеленых (*Chlophyta*) микроводорослей *Ostreococcus tauri* и *Chlamydomonas reinhardtii*, которые также показывают сосуществование у этих организмов Na^+ -АТФаз и H^+ -АТФаз Р-типа [9].

Зеленые микроводоросли рода *Dunaliella* являются удобными модельными объектами в исследованиях физиологии устойчивости растительных организмов к абиотическим стрессам. Они способны выдерживать экстремальные условия окружающей среды, включая высокую соленость [10]. У этих водорослей отсутствует крупная центральная вакуоль, и, следовательно, за ионное гомеостатирование цитоплазмы отвечают исключительно механизмы, локализованные в плазматической мембране. В частности, у галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima* в плазматической мембране обнаружена электрогенная Na^+ -транспортирующая АТФаза, которая, по-видимому, и отвечает за Na^+ -гомеостатирование клеток этой водоросли [5]. Представленная работа продолжает исследование свойств Na^+ -АТФазы *D. maritima*.

В первичной структуре Na^+ -транспортирующих мембранных белков отсутствуют консервативные последовательности, ответственные за связывание ионов Na^+ , а способность к переносу Na^+ обусловлена особенностями трехмерной архитектуры белков. В трансмембранной области она консервативна и сходна со структурой краун-эфира, где роль центрального координирующего иона играет Na^+ [11, 12]. Для формирования подобной структуры, способной избирательно связывать ионы Na^+ , могут быть важными отдельные аминокислотные остатки, занимающие соответствующее положение в белке. На примере Na^+ , K^+ -АТФазы животных клеток и Na^+ -специфичных бактериальных F_1F_0 -АТФаз установлено, что специфичность этих ферментов по отношению к переносимым катионам может быть изменена единичными аминокислотными заменами в белке [13, 14]. Первым шагом в идентификации подобных аминокислотных остатков может быть исследование взаимодействия белка с определенными ингибиторами, механизм действия которых известен. Примером подобного ингибитора является *N,N'*-дициклогексилкарбодиимид (*N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide, DCCD) – неспецифический ингибитор различных транспортных систем, функционирующих в биологических мембранах,

включая АТФазы разных типов: F-типа [15–17], V-типа [18, 19], Р-типа [20, 21]. Хорошо установлен механизм подавления транспортной активности белков этим ингибитором. DCCD – карбоксилмодифицирующий агент, который ковалентно связывается с определенным аминокислотным остатком (как правило, это Glu или Asp) в трансмембранном участке транспортной системы, в сайте, по которому осуществляется связывание переносимого катиона, и тем самым ингибирует активность транспортной системы [15, 19].

В данной работе представлены результаты экспериментов по исследованию возможного взаимодействия Na^+ -АТФазы *D. maritima* с DCCD, а именно: исследовали влияние DCCD на электрогенную/ион-транспортирующую функцию этого фермента и его АТФ-гидролазную активность. Эксперименты проведены на обогащенной плазматической мембраной (ПМ) фракции мембранных везикул, выделенных из клеток *D. maritima*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования и условия выращивания.

Исследования проводили на зеленой галотолерантной микроводоросли *Dunaliella maritima* Massjuk [22]. Водоросль культивировали в однолитровых стеклянных цилиндрах (средняя толщина слоя суспензии водорослей 5 см) в среде следующего состава (мМ): NaCl – 500, NaNO_3 – 10, KH_2PO_4 – 5, MgSO_4 – 6, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – 1,5, FeSO_4 – 0,01, EDTA – 0,1, раствор микроэлементов по Абдуллаеву и Семенову [23] в количестве 1 мл/л; pH доводили до 8,0 раствором NaOH . Культуру непрерывно продували воздухом с 1,5%-ной CO_2 и освещали белым светом люминесцентных ламп ЛБ-20 при освещенности 15 000 лк 14 ч в сутки.

Выделение везикул плазматической мембраны из клеток *D. maritima*. Выделение везикул плазматической мембраны (ПМ) из клеток микроводоросли осуществляли согласно методу, описанному в работе [5]. Мембранную фракцию, обогащенную плазмалеммой, получали дифференциальным центрифугированием и центрифугированием в ступенчатом (30/38%) сахарозном градиенте. Во всех экспериментах, включая определение АТФ-гидролазной активности фермента, использовали свежевыделенную фракцию ПМ.

Полученные препараты ПМ водоросли представляли смесь инвертированных (цитоплазматическая сторона обращена в наружную среду) и нормально ориентированных везикул.

В экспериментах наблюдали активность только инвертированных везикул, в которых активные центры АТФазы были экспонированы в наружную среду

Регистрация электрогенной активности Na^+ -АТФазы *D. maritima*. Электрогенную активность Na^+ -АТФазы в выделенных везикулах ПМ регистрировали по Na^+ - и АТФ-зависимой генерации электрического потенциала на везикулярной мембране, как это описано в работе [5]. Генерацию электрического потенциала на везикулярной мембране наблюдали по изменениям дифференциальной абсорбции ($A_{621}-A_{582}$) потенциал-чувствительного оптического зонда оксонол VI. Измерения, осуществляемые в двухволновом режиме (длина волны измерения $\lambda_2 = 621$, длина волны сравнения $\lambda_1 = 582$ нм), проводили с помощью спектрофотометра Hitachi 557. Стандартная реакционная среда (в спектрофотометрической кювете объемом 2 мл) имела следующий состав: 0,4 М сахараза, 5 мМ MgSO_4 , 1 мМ EGTA, 20 мМ Mes/ВТР-буфер, pH 7,5, 2 мкМ оксонол VI, ~100 мкг мембранного белка. Генерацию электрического потенциала на везикулярных мембранах инициировали внесением АТФ (конечная концентрация 2 мМ; АТФ использовали в форме Tris-соли) и ионов Na^+ (в виде Na_2SO_4).

Аналитические методы. АТФ-гидролазную активность мембранных фракций определяли по высвобождению P_i из добавленного АТФ. Гидролиз АТФ фракциями ПМ осуществлялся в среде следующего состава: 0,4 М сахараза, 20 мМ Mes/ВТР-буфер (pH 5,5–9,0), 1 мМ MgSO_4 , 1 мМ EGTA, 50 мкМ СССР, 10–15 мкг мембранного белка. Реакцию инициировали внесением 0,5 мМ $\text{Na}_2\text{АТФ}$ и останавливали через 20 мин. Остальные добавки указаны в подписи к рисунку. Высвобожденный P_i определяли по методу Carter и Karl [24].

Белок в получаемых препаратах определяли методом Simpson и Sonne [25] для определения микроколичеств белка в мембранных фракциях. Метод основан на дезинтеграции мембран в щелочной среде и определении интенсивности окрашивания комплекса белок-Кумасси G-250.

В работе использовали свежеприготовленные спиртовые растворы DCCD. Конечная концентрация вносимого с DCCD этанола в реакционных смесях при измерениях активности АТФазы не превышала 0,2%. Контрольные варианты содержали этанол в таких же концентрациях.

На рисунках и графиках представлены данные репрезентативных экспериментов из (по крайней мере) трех независимых повторностей.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В плазматической мембране микроводоросли *D. maritima* функционирует электрогенная Na^+ -транспортирующая АТФаза, как было показано ранее в экспериментах на выделенных из клеток водоросли везикулах ПМ [5]. Работу электрогенной Na^+ -АТФазы *D. maritima* иллюстрирует рис. 1, а. Внесение АТФ в суспензию везикул ПМ индуцирует генерацию электрического потенциала ($\Delta\psi$) на везикулярных мембранах, обусловленную работой H^+ -АТФазы *D. maritima* [5]. Добавка ионов Na^+ приводит к существенной стимуляции генерации $\Delta\psi$ на везикулярных мембранах, которая, очевидно, обусловлена переносом ионов Na^+ в везикулярный люмен, осуществляемым Na^+ -АТФазой. Генерация $\Delta\psi$ на везикулах ПМ может быть индуцирована также Li^+ , но не K^+ (не представлено). Подобная ионная специфичность характерна для многих мембранных Na^+ -транспортирующих механизмов, которые, наряду с ионами Na^+ , способны переносить и Li^+ [26, 27].

В отсутствие ионов Na^+ внесение DCCD в реакционную смесь в ходе АТФ-зависимой генерации $\Delta\psi$ на везикулярных мембранах приводило к распаду сформированного потенциала (рис. 1, б, трек 1). Однако при добавлении DCCD к суспензии везикул ПМ в ходе АТФ- и Na^+ -зависимой генерации $\Delta\psi$, скорость генерации $\Delta\psi$ не только не уменьшалась (чего следовало бы ожидать при ингибировании Na^+ -зависимой АТФазы), а даже возрастала (рис. 1, б, трек 2).

Известно, что переносимый ион защищает транспортную систему от ингибирования DCCD [16, 17, 28]. Для того, чтобы предотвратить возможное протекторное действие ионов Na^+ на Na^+ -АТФазу, везикулы ПМ предварительно инкубировали с DCCD в течение 15 мин в отсутствие Na^+ , после чего генерацию $\Delta\psi$ на везикулярной мембране индуцировали последовательным внесением АТФ и Na^+ . В этом случае, в зависимости от концентрации присутствующего в реакционной смеси DCCD, начальная скорость АТФ- и Na^+ -индуцируемой генерации $\Delta\psi$ также возрастала (рис. 2, а, б), но величина $\Delta\psi$, создаваемого Na^+ -АТФазой на мембране везикул, уменьшалась (рис. 2, а, в).

Возрастание начальной скорости генерации $\Delta\psi$ говорит об отсутствии ингибирующего действия DCCD на Na^+ -АТФазу. Последнее подтверждается результатами экспериментов по исследованию АТФ-гидролазной активности этого фермента.

Фракция ПМ *D. maritima* катализирует гидролиз АТФ в широком диапазоне pH; АТФ-гидролазную активность Na^+ -АТФазы отражает

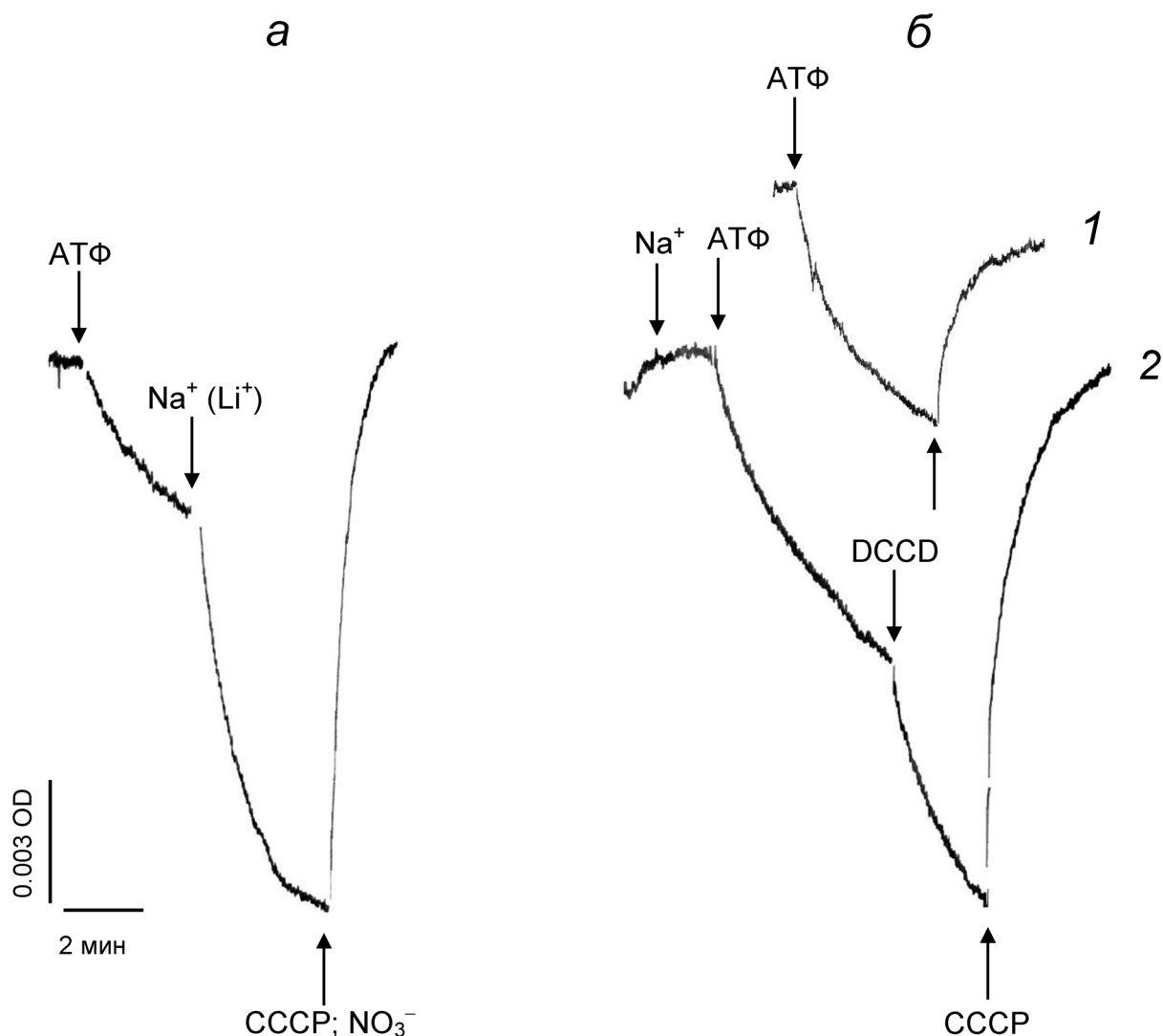


Рис. 1. АТФ- и Na^+ -зависимая генерация электрического потенциала на везикулах плазматической мембраны *D. maritima*. Эффекты DCCD. О генерации электрического потенциала ($\Delta\psi$) на везикулярных мембранах («+» в везикулярном люмене) свидетельствует уменьшение дифференциальной абсорбции потенциал-чувствительного зонда оксонол VI. Генерацию $\Delta\psi$ инициировали добавлением АТФ (в форме Трис-соли) до конечной концентрации 1 мМ. Моменты внесения добавок отмечены стрелками. *a* – Исходно: стандартная реакционная среда без Na^+ . Добавка Na^+ (в виде 10 мМ Na_2SO_4) ускоряет генерацию $\Delta\psi$ (аналогичный эффект наблюдается при внесении Li^+). Протонофор CCCP (50 мкМ) или проникающий анион NO_3^- (50 мМ, в форме соли VTPNO_3 , pH 7,5) возвращают дифференциальную абсорбцию зонда к исходному уровню, что говорит о распаде сформированного $\Delta\psi$ (соответственно вследствие выхода H^+ из везикул или вследствие компенсации избыточного положительного заряда внутри везикул анионом); *б* – эффекты DCCD (100 мкМ), добавленного в реакционную смесь в ходе генерации $\Delta\psi$ на везикулярных мембранах. Трек 1: стандартная реакционная среда без Na^+ . Трек 2: стандартная реакционная среда содержала Na^+ (в виде 1 мМ Na_2SO_4)

Na^+ -стимулируемый прирост гидролиза АТФ, максимум которого наблюдается при pH 7,5–8,0 (рис. 3, *a*, кривая 2). Преинкубация везикул ПМ с DCCD до добавления АТФ и Na^+ не приводит к существенным изменениям величины Na^+ -стимулируемого прироста гидролиза АТФ (рис. 3, *a*, сравните попарно кривые 1 и 2, кривые 3 и 4; рис. 3, *б*). Последнее, очевидно, свидетельствует об отсутствии ингибирования Na^+ -АТФазы этим агентом.

Уменьшение стационарной величины $\Delta\psi$, создаваемого Na^+ -АТФазой на мембране везикул, преинкубированных с DCCD, может объясняться увеличением ионной проводимости мембраны вследствие взаимодействия DCCD с каким-то другим (не Na^+ -АТФазой) ион-транспортующим белком в ПМ *D. maritima*. Возможными претендентами на эту роль являются H^+ -АТФаза и/или Na^+/H^+ антипортер, которые также функционируют в этой мембране [5, 29].

Как H^+ -АТФаза, так и Na^+/H^+ антипортер могут взаимодействовать с DCCD [30–32].

Предположение о том, что преинкубация везикул ПМ с DCCD приводит к увеличению ионной проводимости мембраны, было проверено в экспериментах, где электрический потенциал на везикулярной мембране создавали АТФ-независимым образом в виде Na^+ - или K^+ -диффузионного потенциала, внося в суспензию везикул катион и соответствующий ионофор — ЕТН157 для Na^+ и валиномицин для K^+ (рис. 4).

DCCD, добавленный к везикулам, на мембране которых предварительно был создан Na^+ -диффузионный потенциал, не оказывал видимого влияния на последний (рис. 4, а). Однако если везикулы были преинкубированы с DCCD до добавления Na^+ , Na^+ -диффузионный потенциал, который формировался на везикулярной

мембране при внесении Na^+ , быстро и самопроизвольно распадался (рис. 4, б). Если на мембране везикул, преинкубированных с DCCD, создавали K^+ -диффузионный потенциал, последний достаточно долго сохранялся и распадался только при внесении протонифора СССР (рис. 4, в). Вместе с тем, K^+ -диффузионный потенциал, созданный на везикулах ПМ, преинкубированных с DCCD, распадался при добавлении ионов Na^+ (рис. 4, г). Эти результаты приводят к выводу, что диссипация электрического потенциала на везикулярных мембранах, преинкубированных с DCCD, зависит от наличия Na^+ в реакционной смеси.

Отметим, что в описанных экспериментах электрический потенциал на везикулярных мембранах распадался вследствие выхода из везикулярного люмена катионов, отличных от Na^+

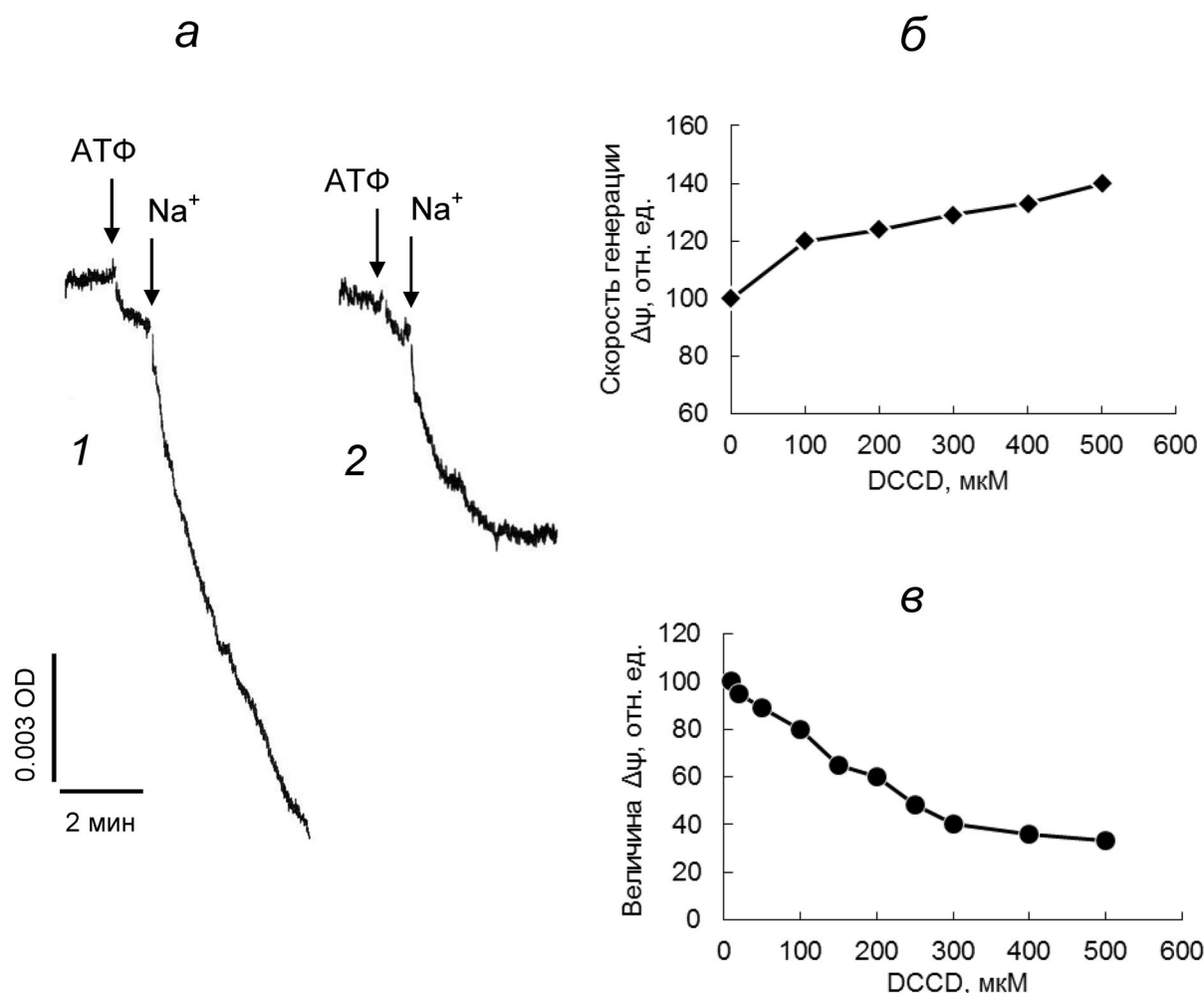


Рис. 2. Влияние DCCD на создаваемый Na^+ -АТФазой на везикулах ПМ *D. maritima* электрический потенциал. Везикулы инкубировали (15 мин, 22 °С) в стандартной реакционной смеси, содержащей DCCD, после чего инициировали генерацию $\Delta\psi$ последовательным добавлением АТФ и Na^+ (10 мМ Na_2SO_4). а — Кинетика генерации $\Delta\psi$ в отсутствие DCCD (трек 1) и в присутствии 300 мкМ DCCD (трек 2). Зависимость начальной скорости генерации $\Delta\psi$ (б) и стационарной величины создаваемого $\Delta\psi$ (в) от концентрации DCCD, присутствующего в реакционной смеси

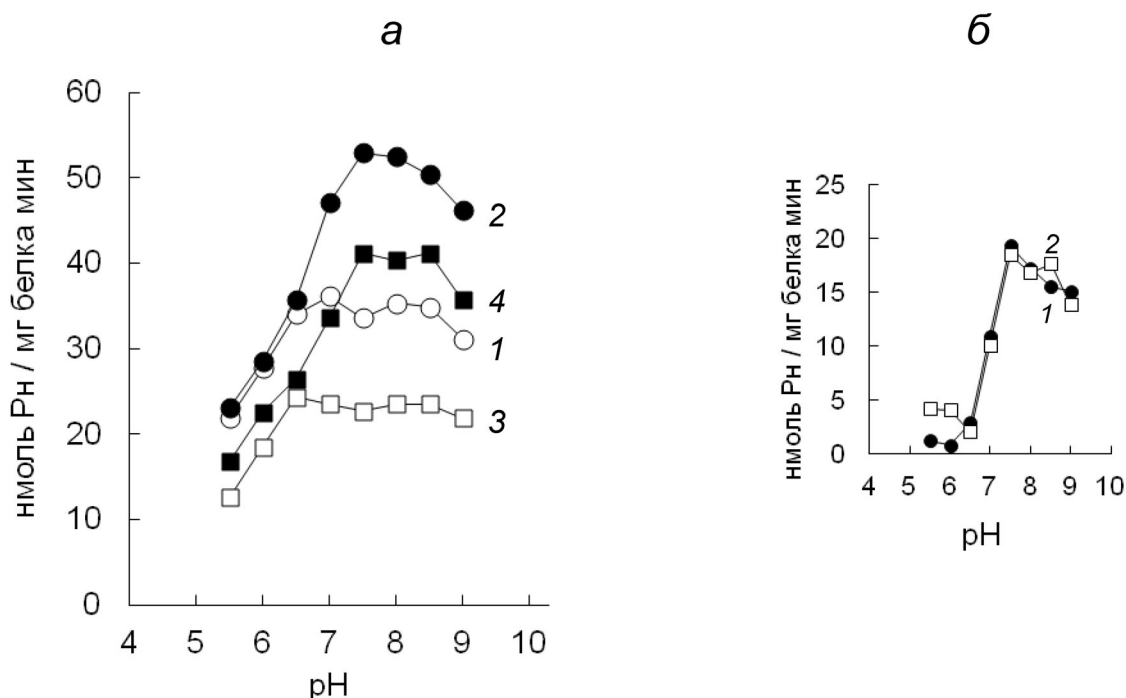


Рис. 3. pH-Зависимость гидролиза АТФ фракциями плазматической мембраны (ПМ) *D. maritima* и эффекты DCCD. *а* – Стандартная реакционная среда содержала дополнительно: 1 (светлые кружки) – 25 мМ KNO₃; 2 (черные кружки) – 25 мМ NaNO₃; 3 (светлые квадраты) – 25 мМ KNO₃, 100 мкМ DCCD; 4 (черные квадраты) – 25 мМ NaNO₃, 100 мкМ DCCD. В вариантах с DCCD везикулы были преинкубированы в стандартной реакционной среде, содержащей дополнительно DCCD, в течение 15 мин до добавления Na⁺ и АТФ; *б* – Na⁺-индуцируемое увеличение гидролиза АТФ фракциями ПМ в отсутствие (кривая 1, черные кружки) и в присутствии DCCD (кривая 2, светлые квадраты)

(или соответственно K⁺), поскольку в присутствии ЕТН157 (соответственно валиномицина), обеспечивающего высокую проводимость везикулярной мембраны для Na⁺ (или K⁺), последний находится в состоянии электрохимического равновесия по обе стороны везикулярной мембраны («+» внутри везикул) и, следовательно, отсутствуют движущие силы для выхода Na⁺ (или K⁺) из везикул. Наиболее вероятно, что в данном случае избыточный положительный заряд из везикулярного люмена уносит протон, движущей силой для выхода которого служит Na⁺-диффузионный (или K⁺-диффузионный) потенциал. Путь утечки H⁺, очевидно, формируется вследствие взаимодействия DCCD с некоторым белком/белками везикулярной мембраны и является потенциал-зависимым, поскольку Na⁺-диффузионный потенциал мог быть создан на мембране везикул, преинкубированных с DCCD, и лишь при достижении определенной величины потенциала начинался его распад (рис. 4, б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что: 1) Na⁺-АТФаза *D. maritima* нечувствительна к DCCD; 2) в отсутствие ионов Na⁺ DCCD взаимодействует с неким белком/белками везикулярной мембраны; 3) Na⁺ защищает этот белок от взаимодействия с DCCD; 4) взаимодействие DCCD с этим белком приводит к увеличению H⁺-проводимости везикулярной мембраны, причем последнее требует наличия ионов Na⁺; 5) для осуществления DCCD-индуцируемой Na⁺-зависимой H⁺-проводимости мембраны необходимо также наличие электрического потенциала на мембране.

Наиболее очевидным является предположение, что наблюдаемые эффекты обусловлены взаимодействием DCCD с Na⁺/H⁺ антипортером в ПМ *D. maritima*. Последний способен связывать и переносить через мембрану как Na⁺, так и H⁺. Взаимодействие с DCCD приводит к тому, что антипортер сохраняет способность переносить H⁺, но не Na⁺. Тем не менее, наличие иона Na⁺, вероятно, связанного в определенном сайте белка, необходимо для осуществления переноса H⁺. Другими словами, при взаимодействии с DCCD электронейтральный Na⁺/H⁺ антипортер из катион-обменного механизма превращается в потенциал-чувствительный H⁺-унипортер.

Остается открытым вопрос, почему на везикулах ПМ *D. maritima*, преинкубированных с

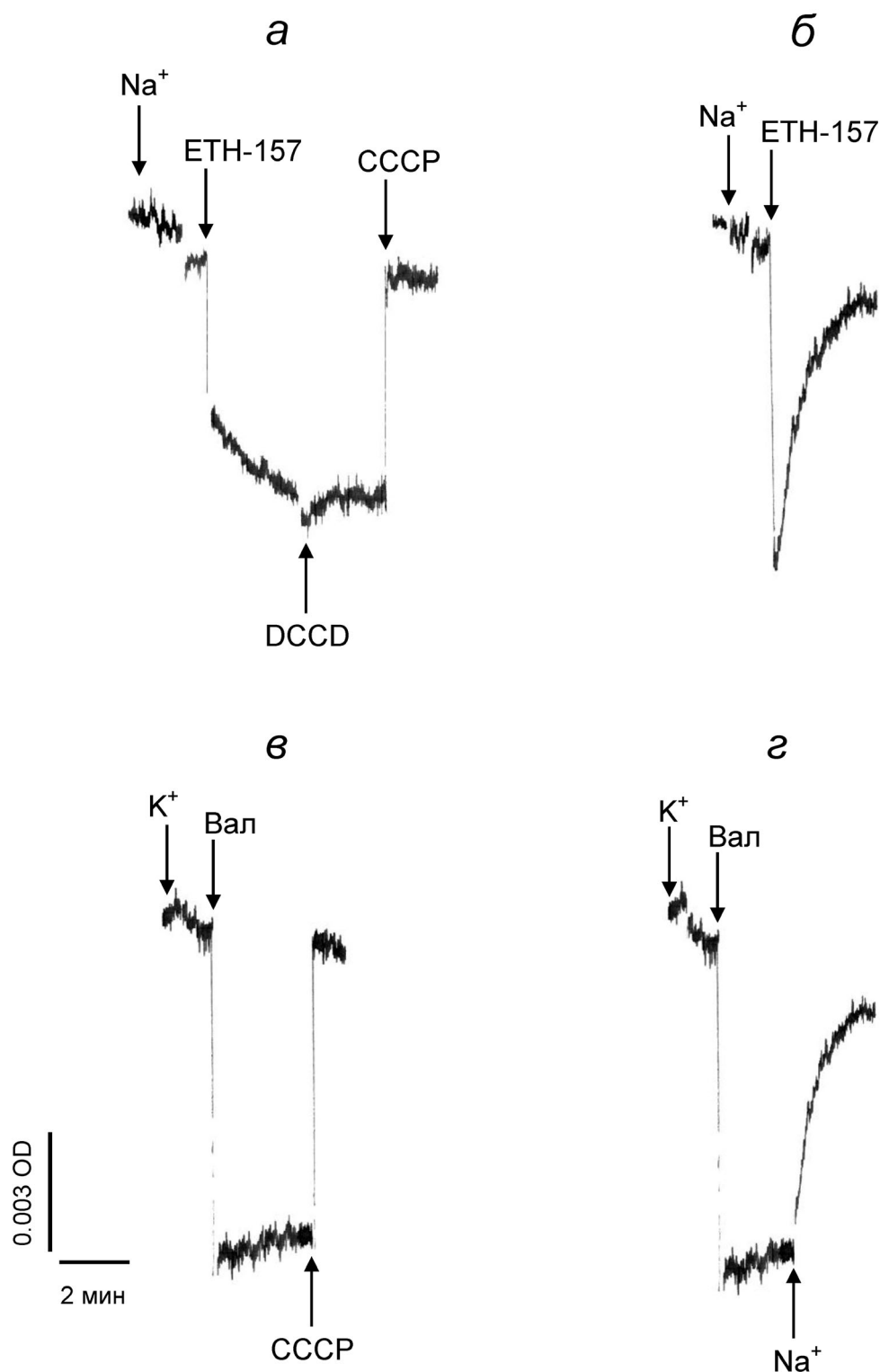


Рис. 4. Влияние DCCD на Na⁺- или K⁺-диффузионный потенциал, созданный на везикулах плазматической мембраны (ПМ) *D. maritima*. Генерацию Δψ на везикулярных мембранах («+» в везикулярном люмене) инициировали внесением 10 мМ Na₂SO₄ + 3 мкМ ETH-157 (а, б) либо 10 мМ K₂SO₄ + 3 мкМ валиномицин (в, г). Концентрация DCCD в реакционной смеси составляла 100 мкМ. а) DCCD добавлен после формирования Na⁺-диффузионного потенциала. (б–г): везикулы ПМ были преинкубированы в течение 15 мин в стандартной реакционной смеси, содержащей 100 мкМ DCCD, до внесения остальных добавок (10 мМ Na₂SO₄ + 3 мкМ ETH-157 либо 10 мМ K₂SO₄ + 3 мкМ валиномицин). Внесение протонифора CCCP (50 мкМ) (а, в) возвращает дифференциальную абсорбцию оксонола VI к исходному уровню, что говорит о распаде сформированного Δψ. г) Внесение 10 мМ Na₂SO₄ приводит к распаду сформированного Δψ

DCCD, начальная скорость генерации потенциала при добавлении АТФ и Na^+ увеличивается (рис. 2, б), при том, что DCCD не оказывает стимулирующее действие на АТФ-гидролазную активность Na^+ -АТФазы (рис. 3).

Одним из возможных объяснений этого явления может быть следующее. По-видимому, Na^+/H^+ антипортер не единственный белок в ПМ *D. maritima*, с которым связывается DCCD. DCCD может связаться с H^+ -помпой, функционирующей в этой мембране. Известно, что DCCD инактивирует H^+ -АТФазу, блокируя транслокацию протонов этим ферментом [15, 19, 30]. Таким образом, взаимодействие DCCD с H^+ -АТФазой (а также, вероятно, и с определенными ионными каналами) приводит к уменьшению общей протонной проводимости мембраны, что, в свою очередь, в условиях эксперимента приводит к снижению ионных (протонных) утечек из везикулярного люмена и росту величины электрического потенциала, генерируемого на везикулярной мембране при включении Na^+ -АТФазы. По мере работы Na^+ -АТФазы, при достижении определенных значений $\Delta\psi$ на везикулярной мембране, протонная проводимость мембраны резко возрастает вследствие увеличения протонной проводимости Na^+/H^+ антипортера, который, предположительно, в результате взаимодействия с DCCD превратился из электронейтрального катион-обменного механизма в потенциал-чувствительный H^+ -унипортер.

В плазматической мембране галотолерантной микроводоросли *D. maritima* (отдел Chlo-

phyta, класс Chlorophyceae) функционирует первичный Na^+ -насос, электрогенная Na^+ -транспортирующая АТФаза Р-типа, которая определяет Na^+ -гомеостаз у этого организма [5]. Найдено, что, в отличие от множества других ион-транспортирующих АТФаз, этот фермент является нечувствительным к действию DCCD. DCCD не подавляет ни гидролиз АТФ, катализируемый данным ферментом, ни его транспортную активность. По своей нечувствительности к действию DCCD Na^+ -АТФаза *D. maritima* сходна с Na^+ -АТФазой другой галотолерантной микроводоросли, *Tetraselmis viridis* (отд. Chlorophyta, класс Prasinophyceae) [4]. Для Na^+ -АТФазы *T. viridis* также ранее было продемонстрировано, что DCCD не оказывает ингибирующее действие на этот фермент [8]. Нечувствительность Na^+ -транспортирующих АТФаз, найденных у двух видов водорослей, к DCCD может отражать структурное сходство этих ферментов, обусловленное их эволюционной близостью.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 20-04-00903).

Конфликт интересов. У авторов отсутствует конфликт интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boldyrev, A. A. (2001) Na/K-ATPase as an oligomeric ensemble, *Biochemistry (Moscow)*, **66**, 821-831, doi: 10.1023/a:1011964832767.
- Scheiner-Bobis, G. (2002) The sodium pump, *Eur. J. Biochem.*, **269**, 2424-2433, doi: 10.1046/j.1432-1033.2002.02909.x.
- Gaxiola, R. A., Palmgren, M. G., and Schumacher, K. (2007) Plant proton pumps, *FEBS Lett.*, **581**, 2204-2214, doi: 10.1016/j.febslet.2007.03.050.
- Balnokin, Y. V., and Popova, L. G. (1994) The ATP-driven Na^+ -pump in the plasma membrane of the marine unicellular alga *Platymonas viridis*, *FEBS Lett.*, **343**, 61-64, doi: 10.1016/0014-5793(94)80607-1.
- Popova, L. G., Shumkova, G. A., Andreev, I. M., and Balnokin, Y. V. (2005) Functional identification of electrogenic Na^+ -translocating ATPase in the plasma membrane of the halotolerant microalga *Dunaliella maritima*, *FEBS Lett.*, **579**, 5002-5006, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.087.
- Axelsen, K., and Palmgren, M. G. (1998) Evolution and substrate specificities in the P-type ATPase superfamily, *J. Mol. Evol.*, **46**, 84-101, doi: 10.1007/pl00006286.
- Palmgren, M. G., and Nissen, P. (2011) P-type ATPases, **40**, 243-266, doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131331.
- Pagis, L. Y., Popova, L. G., Andreev, I. M., and Balnokin, Y. V. (2003) Comparative characterization of the two primary pumps, H^+ -ATPase and Na^+ -ATPase, in the plasma membrane of the marine alga *Tetraselmis viridis*, *Physiol. Plant.*, **118**, 514-522, doi: 10.1034/j.1399-3054.2003.00113.x.
- Pedersen, Ch. N. S., Axelsen, K. B., Harper, J. F., and Palmgren, M. G. (2012) Evolution of plant P-type ATPases, *Front. Plant Sci.*, **3**, doi: 10.3389/fpls.2012.00031.
- Oren, A. (2005) A hundred years of *Dunaliella* research: 1905-2005, *Saline Systems*, **1**, 1-14, doi: 10.1186/1746-1448-1-2.
- Gouaux, E., and MacKinnon, R. (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps, *Science*, **310**, 1461-1465, doi: 10.1126/science.1113666.
- Meier, T., Krah, A., Bond, P. J., Pogoyelov, D., Diederichs, K., and Faraldo-Gomez, J. D. (2009) Complete ion-coordination structure in the rotor ring of Na^+ -dependent F-ATP synthases, *J. Mol. Biol.*, **391**, 498-507, doi: 10.1016/j.jmb.2009.05.082.
- Imagawa, T., Yamamoto, T., Kaya, Sh., Sakaguchi, K., and Taniguchi, K. (2005) Thr-774 (transmembrane segment M5), Val-920 (M8), and Glu-923 (M9) are involved in Na^+ -transport, and Gln-923 (M8) is essential for Na^+ , K^+ -

- ATPase activity, *J. Biol. Chem.*, **280**, 18736-18744, doi: 10.1074/jbc.M500137200.
14. Kaim, G., and Dimroth, P. (1994) Construction, expression and characterization of a plasmid-encoded Na⁺-specific ATPase hybrid consisting of *Propionigenium modestum* F₀-ATPase and *Escherichia coli* F₁-ATPase, *Eur. J. Biochem.*, **222**, 615-623, doi: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18904.x.
 15. Toei, M., and Noji, H. (2013) Single-molecule analysis of F₀F₁-ATP synthase inhibited by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, *J. Biol. Chem.*, **288**, 25717-25726, doi: 10.1074/jbc.M113.482455.
 16. Ferguson, S., Keis, S., and Cook, G. M. (2006) Biochemical and molecular characterization of a Na⁺-translocating F₁F₀-ATPase from the thermoalkaliphilic bacterium *Clostridium paradoxum*, *J. Bacteriol.*, **188**, 5045-5054, doi: 10.1128/JB.00128-06.
 17. Soontharapirakkul, K., and Incharoensakdi, A. (2010) Na⁺-stimulated ATPase of alkaliphilic halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica* translocates Na⁺ into proteoliposomes via Na⁺ uniport mechanism, *BMC Biochemistry*, **11**, doi: 10.1186/1471-2091-11-30.
 18. Murata, T., Kawano, M., Igarashi, K., Yamato, I., and Kakinuma, Y. (2001) Catalytic properties of Na⁺-translocating V-ATPase in *Enterococcus hirae*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 75-81, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00278-4.
 19. Yokoyama, K., Nakano, M., Imamura, H., Yoshida, M., and Tamakoshi, M. (2003) Rotation of the proteolipid ring in the V-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **278**, 24255-24258, doi: 10.1074/jbc.M303104200.
 20. Corbalan-Garsia, S., Teruel, J. A., and Gomez-Fernandez, J. C. (1992) Characterization of Ruthenium Red-binding sites of the Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum and their interaction with Ca²⁺-binding sites, *Biochemistry*, **287**, 767-774, doi: 10.1042/bj2870767.
 21. Wiangnon, K., Raksajit, W., and Incharoensakdi, A. (2007) Presence of a Na⁺-stimulated P-type ATPase in the plasma membrane of the alkaliphilic halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytica*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **270**, 139-145, doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00667.x.
 22. Massyuk, N. P. (1973) *Morphology, taxonomy, ecology and geographic distribution of the genus Dunaliella Teod. and prospects for its potential utilization*, Naukova Dumka, Kiev, p. 244.
 23. Abdullaev, A. A., and Semenenko, V. E. (1974) Intensive cultivation and certain physiological characteristics of *Dunaliella salina* Teod., *Soviet Plant Physiol.*, **21**, 947-955.
 24. Carter, S. G., and Karl, D. W. (1982) Inorganic phosphate assay with malachite green: an improvement and evaluation, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **7**, 7-13, doi: 10.1016/0165-022x(82)90031-8.
 25. Simpson, I. A., and Sonne, O. (1982) A simple, rapid and sensitive method for measuring protein concentration in subcellular membrane fractions prepared by sucrose density ultracentrifugation, *Anal. Biochem.*, **119**, 424-427, doi: 10.1016/0003-2697(82)90608-x.
 26. Krulwich, T. A. (1983) Na⁺/H⁺ antiporters, *Biochim. Biophys. Acta*, **726**, 245-264, doi: 10.1016/0304-4173(83)90011-3.
 27. Pagis, L. Ya., Popova, L. G., Andreev, I. M., and Balnokin, Yu. V. (2001) Ion specificity of Na⁺-transporting systems in the plasma membrane of the halotolerant alga *Tetraselmis (Platymonas) viridis*, *Russ. J. Plant Physiol.*, **48**, 281-286, doi: 10.1023/A:1016645829002.
 28. Kluge, C., and Dimroth, P. (1993) Specific protection by Na⁺ or Li⁺ of the F₁F₀-ATPase of *Propionigenium modestum* from the reaction with dicyclohexylcarbodiimide, *J. Biol. Chem.*, **268**, 14557-14560.
 29. Popova, L. G., Shumkova, G. A., Andreev, I. M., and Balnokin, Yu. V. (2000) Na⁺-dependent electrogenic ATPase from the plasma membrane of the halotolerant microalga *Dunaliella maritima*, *Doklady Biochemistry*, **375**, 235-238, doi: 10.1023/A:1026675923730.
 30. Sussman, M. R., and Slayman, C. W. (1983) Modification of the *Neurospora crassa* plasma membrane H⁺-ATPase with N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, *J. Biol. Chem.*, **258**, 1839-1843.
 31. Kinsella, J. L., Wehrle, J., Wilkins, N., and Sacktor, B. (1987) Inhibition of Na⁺-H⁺-exchange by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide in isolated rat renal brush border membrane vesicles, *J. Biol. Chem.*, **262**, 7092-7097.
 32. Murakami, N., and Konishi, T. (1989) Mechanism of function of dicyclohexylcarbodiimide-sensitive Na⁺/H⁺-antiporter in *Halobacterium halobium*: pH effect, *Arch. Biochem. Biophys.*, **271**, 515-523, doi: 10.1016/0003-9861(89)90303-2.

ELECTROGENESIS IN PLASMA MEMBRANE FRACTIONS ISOLATED FROM HALOTOLERANT MICROALGA *Dunaliella maritima* AND N,N'-DICYCLOHEXYLCARBODIIMIDE EFFECTS*

L. G. Popova**, D. A. Matalin, and Y. V. Balnokin

Timiryazev Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, 127276 Moscow, Russia; E-mail: lora_gp@mail.ru

Received June 22, 2020

Revised June 22, 2020

Accepted June 26, 2020

The effects of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), non-specific inhibitor of various transport systems functioning in biological membranes, on Na⁺-transporting P-type ATPase of the green halotolerant microalga *Dunaliella maritima* were studied in the experiments with vesicular plasma membranes isolated from the alga cells. The effects of DCCD on electrogenic/ion transport function of the enzyme and its ATP hydrolase activity were investigated. Electrogenic/ion transport function of the enzyme was recorded as a Na⁺-dependent generation of electric potential on the vesicle membranes with the help of the potential-sensitive probe oxonol VI. It was found that unlike many other ion-transporting ATPases, the Na⁺-ATPase of *D. maritima* is insensitive to DCCD. This agent did not inhibit either ATP hydrolysis catalyzed by this enzyme or its transport activity. At the same time DCCD affected the ability of the vesicle membranes to maintain electric potential generated by the *D. maritima* Na⁺-ATPase. The observed effects can be explained based on the assumption that DCCD interacts with the Na⁺/H⁺ antiporter in the plasma membrane of *D. maritima*.

Keywords: *Dunaliella maritima*, Na⁺-ATPase, N,N'-dicyclohexylcarbodiimide, microalgae, membrane potential, plasma membrane