

КРАТКИЕ
СООБЩЕНИЯ

УДК 581.1

Ca²⁺-АТФаза СИМБИОСОМНОЙ МЕМБРАНЫ КОРНЕВЫХ КЛУБЕНЬКОВ БОБОВ: НОВЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОДТВЕРЖДАЮЩИЕ МЕХАНИЗМ ТРАНСМЕМБРАННОЙ ТРАНСЛОКАЦИИ Ca²⁺

© 2019 г. И. М. Андреев^а, В. В. Крылова^{а,1}, Р. Ф. Зартдинова^а, С. Ф. Измайлов^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.04.2018 г.

После доработки 19.06.2018 г.

Принята к публикации 16.07.2018 г.

На препаратах симбиосом, выделенных из корневых клубеньков бобов, исследована транспортная активность Ca²⁺-АТФазы симбиосомной мембраны (СМ), выражаемая в ИТФ- и Ca²⁺-зависимом щелочном сдвиге рН внутри этих структур как функция рН среды их инкубации и концентрации в ней кальция соответственно. Найденные рН- и концентрационная зависимости рассматриваются как новые свидетельства в пользу тесной сопряженности каталитической и транспортной активностей Ca²⁺-АТФазы и ее высокой аффинности для ионов Ca²⁺. Показано, что ионы Cd²⁺ и Mn²⁺, добавленные к среде инкубации симбиосом вместо Ca²⁺, но в той же концентрации, не вызывают диссипации ΔрН на СМ, генерируемого H⁺-АТФазой, что может говорить о неспособности кальциевого насоса осуществлять их транслокацию через СМ. Все эти данные обсуждаются в свете результатов, ранее полученных нами и другими авторами.

Ключевые слова: *Vicia faba* – симбиосомная мембрана – транспорт Ca²⁺ – Ca²⁺-АТФаза – Ca²⁺/H⁺-обмен – Cd²⁺ – Mn²⁺

DOI: 10.1134/S0015330319020040

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что биологическая фиксация азота в растениях происходит в симбиосомах, представляющих собой бактериоиды, окруженные симбиосомным пространством и симбиосомной мембраной (СМ) [1, 2]. К настоящему времени установлено, что функционирование симбиосом в сильной степени зависит от транспорта через СМ различных ионов и метаболитов, среди которых существенную роль способны играть ионы кальция как мощные регуляторы самых разнообразных процессов в животных и растительных клетках [3, 4]. Достаточно давно показано, что СМ снабжена системами активного транспорта ионов, представленными H⁺- и Ca²⁺-АТФазой, транслоцирующими ионы H⁺ и Ca²⁺, соответственно, внутрь симбиосом [5, 6]. Совсем недавно в ходе наших исследований было установлено, что локализованная на СМ Ca²⁺-АТФаза способна функцио-

нировать как Ca²⁺/nH⁺ антипортер, прямо энергизуемый за счет гидролиза АТФ [7–9].

Получены первые результаты в пользу такого механизма функционирования данного фермента [8, 9]. В частности, было показано, что Ca²⁺-индуцируемый щелочной сдвиг рН внутри симбиосом, развиваемый из-за активности Ca²⁺-АТФазы на СМ, можно наблюдать независимо от способа предварительной генерации на этой мембране ΔрН, то есть снижения рН внутри симбиосом в присутствии FCCP или за счет работы на СМ протонного насоса, H⁺-АТФазы. Кроме того, в исследованиях действия различных концентраций свободного кальция на гидролитическую активность этого фермента было установлено, что она характеризуется кажущейся K_м для Ca²⁺ в области 10⁻⁷ М [7], то есть величиной, как правило, свойственной Ca²⁺-АТФазам, характеризующимся высокой аффинностью для ионов Ca²⁺. Вместе с тем остается неясным вопрос о том, соответствует ли эта величина аффинности для Ca²⁺ транспортной активности фермента, поскольку, несмотря на ожидаемую здесь тесную сопряженность ее с гидролитической активностью, в определенных условиях, например, диктуемых слишком низкой и высокой концентрациями H⁺ и Ca²⁺, соответственно, внутри симбиосом, эти две актив-

Сокращения: АО – акридиновый оранжевый, СаМ – кальмодулин, СМ – симбиосомная мембрана, ИТФ – инозинтрифосфат, FCCP – карбонилцианид-*n*-трифторметокси-фенилгидразон.

¹ Адрес для корреспонденции: Крылова Валерия Валерьевна. 126276, Москва, Ботаническая ул., 35. Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Электронная почта: krylovavv@list.ru, nitrogenexchange@mail.ru

ности кальциевого насоса могут быть разобщены [10]. В этом случае они могут показывать различные концентрационные зависимости по отношению к Ca²⁺. Следует также иметь в виду то обстоятельство, что этот эффект может усугубляться действием ряда факторов внутри симбиосом, очевидно создающих экспериментальные трудности в изучении транспортных свойств такого рода ферментов в их нативном окружении *in vivo*. Другой важный аспект, касающийся транспортной активности исследуемой Ca²⁺-АТФазы и остающийся еще далеко не полностью исследованным, состоит в ее модуляции величиной рН среды инкубации симбиосом. В работе Krylova с соавт. [9] соответствующая рН-зависимость была выявлена в результате слежения за Са-зависимой диссипацией ΔрН на СМ, генерируемой активностью Н⁺-АТФазы на той же мембране, и оказалась сходной с ИТФ-гидролазной активностью фермента. Однако представляется существенным также выяснить, согласуется ли она с рН-зависимостью ИТФ-энергизованного щелочного сдвига рН внутри симбиосом, развиваемого как диссипация FCCP-индуцированного ΔрН на СМ в бескальевой среде. Очевидно, что из-за отсутствия в этом случае потенциально мешающего фактора в виде активности Н⁺-АТФазы интерпретация результатов экспериментов может быть более ясной и однозначной.

Принимая во внимание все сказанное выше, в настоящей работе, проведенной на симбиосомах, выделенных из корневых клубеньков бобов, мы попытались также проверить, в какой степени транспортная активность Ca²⁺-АТФазы на СМ соответствует ее каталитической активности, если иметь в виду ее зависимость от концентрации свободного кальция в среде. Иначе говоря, выяснить, сравнимы ли аффинности фермента для Ca²⁺, его каталитическая и транспортная активности как функции концентрации свободных ионов Ca²⁺ ([Ca²⁺]_{free}). Другая цель проведенных экспериментов состояла в том, чтобы выяснить, способен ли этот фермент транспортировать через СМ наряду с Ca²⁺ и другие катионы двухвалентных металлов, такие как Cd²⁺ и Mn²⁺, первый из которых по своему размеру очень близок к таковому Ca²⁺, но обладает токсическим действием, тогда как второй представляет собой существенный, то есть необходимый растениям микроэлемент, способный в некоторых случаях выступать в качестве альтернативного субстратного иона, переносимого Ca²⁺-АТФазами через клеточные мембраны [11, 12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты, проведенные в настоящей работе, выполнены на препаратах симбиосом, выделенных из корневых клубеньков кормовых бо-

бов (*Vicia faba* L., сорт Русские черные), выращенных после инокуляции растений эффективным штаммом *Rhizobium leguminosarum* HWM VF 3a, полученным из Института биохимии РАН. Симбиосомы были выделены согласно методике, основанной на дифференциальном центрифугировании гомогената корневых клубеньков с последующей очисткой полученного материала в градиенте плотности перкола [5].

За щелочным сдвигом рН внутри симбиосом, развивающимся в результате активности Ca²⁺-АТФазы на СМ, следили по изменению дифференциального (ΔA₄₉₂₋₅₄₀) или абсолютного (A₄₉₂) оптического поглощения акридинового оранжевого (АО), проникающего ΔрН-индикатора [13], предварительно индуцируя закисление симбиосомного пространства с использованием двух различных экспериментальных подходов. В первом из них к симбиосомам, инкубированным в бескальевой среде, добавляли протонофор FCCP, вызывающий ускорение эндогенного К⁺/Н⁺ обмена на СМ за счет увеличения ее протонной проводимости [14]. Второй экспериментальный подход включал в себя формирование ΔрН на СМ за счет активности на ней протонного насоса, Н⁺-АТФазы. Все измерения проводили на спектрофотометрах Hitachi-557 (Япония) или Specord M40 (Германия) в стандартных 1 см кюветах без непрерывного перемешивания образцов в процессе измерений. Инкубационная среда содержала 0.4 М сорбита, 20 мМ HEPES/ВТР (рН 7.0), 2 мМ MgSO₄, 9 мкМ АО и 200 мкг/мл общего симбиосомного белка. После достижения относительно стабильного градиента рН на СМ его диссипацию инициировали добавлением к симбиосомам 0.5 мМ ИТФ или CaCl₂ в той или иной концентрации, причем среда инкубации в последнем случае была дополнена 20 мМ KNO₃. За активностью Ca²⁺-АТФазы следили, оценивая начальную скорость (V₀) Ca²⁺-индуцируемой диссипации ΔрН, а ее зависимость от концентрации экзогенного кальция в среде использовали для оценки ее величины K_m для Ca²⁺. Концентрацию белка в препаратах оценивали согласно методу Бредфорда [15]. Исследования проводили в трех биологических и трех-пяти аналитических повторностях.

В работе использовали сорбит фирмы "Calbiochem" (США), ди- и тринатриевые соли АТФ и ИТФ, соответственно, а также буферы HEPES и ВТР фирмы "Sigma" (США), АО фирмы "Serva" (Германия). Ионы Ca²⁺, Cd²⁺ и Mn²⁺ были добавлены к среде инкубации симбиосом в виде солей CaCl₂, CdCl₂ и MnCl₂ квалификации ОСЧ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано нами ранее [9], щелочной сдвиг рН, развиваемый внутри симбиосом в результате ИТФ-зависимой трансмембранной

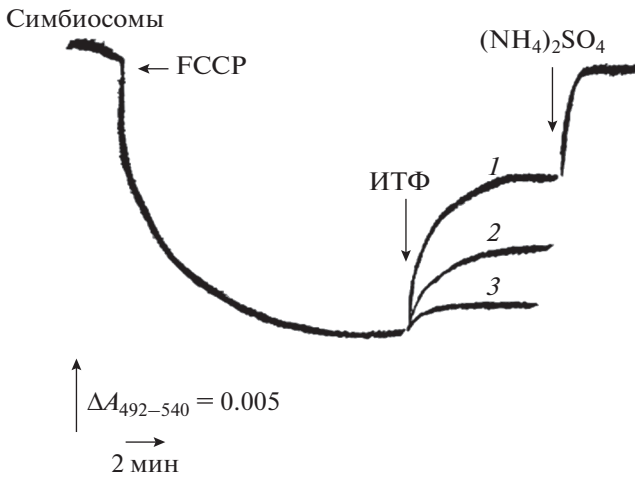


Рис. 1. Кинетика ИТФ-зависимой диссипации ΔpH на СМ, генерируемого FCCP при разных значениях pH 7.0 (1), 8.0 (2), 6.5 (3) среды инкубации симбиосом. Где указано, добавлено 2 мкМ FCCP, 0.5 мМ ИТФ и 5 мМ $(NH_4)_2SO_4$.

транслокации Ca^{2+} в ходе функционирования на СМ Ca^{2+} -АТФазы, является одним из эффектов, отражающих транспортную активность этого фермента как Ca^{2+}/nH^+ антипортера, связанную с выходом ионов H^+ из симбиосом в обмен на поступление в них ионов Ca^{2+} . В описанных здесь экспериментах для исследования кинетики развития такого эффекта следили за ИТФ- или Са-зависимой диссипацией градиента pH на симбиосомной мембране, создаваемого на ней в результате FCCP-ускоряемого трансмембранного K^+/H^+ обмена, имеющего место при инкубации симбиосом в бескальциевой среде, либо за счет активности на этой мембране протонного насоса, H^+ -АТФазы соответственно.

Первый из этих экспериментальных подходов был использован нами для выяснения эффекта pH среды инкубации симбиосом на транспортную активность Ca^{2+} -АТФазы. Принимая во вни-

мание то обстоятельство, что при использовании АО как ΔpH -индикатора pH внутри симбиосом должен быть всегда ниже, чем pH наружной среды, выбранные значения pH последней (6.5, 7.0 и 8.0), судя по наблюдаемым эффектам, находились еще в области, приемлемой для его применения как индикатора. На рис. 1 показана кинетика FCCP-индуцированного кислотного сдвига pH внутри симбиосом и его последующая ИТФ-индуцируемая диссипация при их инкубации в среде с pH 7.0. Наблюдаемый в данной работе эффект соответствовал тому эффекту, который был выявлен нами ранее [9]. При умеренно низком (6.5) и при высоком (8.0) значениях pH инкубационной среды кинетика процесса диссипации явно замедлялась, по меньшей мере, качественно отражая соответствующую pH-зависимость как скорости гидролиза ИТФ Ca^{2+} -АТФазой, так и Са-зависимой диссипации ΔpH на СМ, обусловленной активностью фермента. Эти данные подтверждают еще один сделанный ранее вывод о тесной сопряженности каталитической и транспортной активностей исследуемой Ca^{2+} -АТФазы [9]. Хорошо известная выраженная pH-зависимость такого типа кальциевых транспортеров как АТФ-энергизуемых Ca^{2+}/H^+ -обменников во многом объясняется наличием ряда протолитических групп в их Ca^{2+} -координирующих сайтах и, как следствие, модуляцией pH их Ca^{2+} -связывающей способности [16].

При использовании другого экспериментального подхода для выявления транспортной активности Ca^{2+} -АТФазы следили за Са-зависимой диссипацией градиента pH, создаваемого на симбиосомной мембране в результате функционирования на ней H^+ -АТФазы. За кинетикой развития такого эффекта следили при различных концентрациях экзогенного кальция в среде инкубации симбиосом с целью оценки аффинности Ca^{2+} -связывающего сайта фермента для этого катиона (рис. 2). Концентрационная зависимость кинетики рассматриваемого процесса, отражаемой в на-

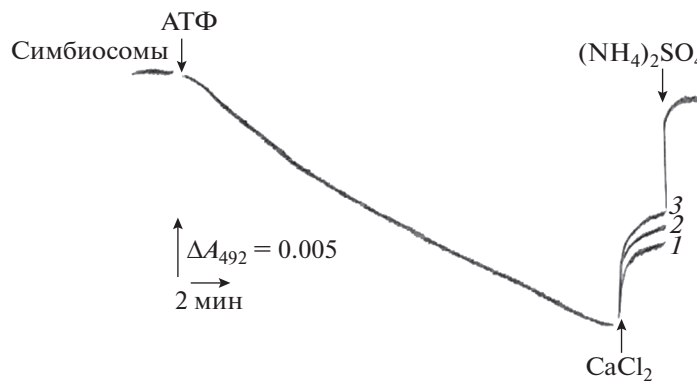


Рис. 2. Генерация на СМ трансмембранного градиента pH H^+ -АТФазой и его диссипация в присутствии ионов Ca^{2+} . Где указано, добавлено 1 мМ Na_2ATP , 0.1 (1), 0.2 (2), 0.3 (3) мкМ $CaCl_2$, и 5 мМ $(NH_4)_2SO_4$.

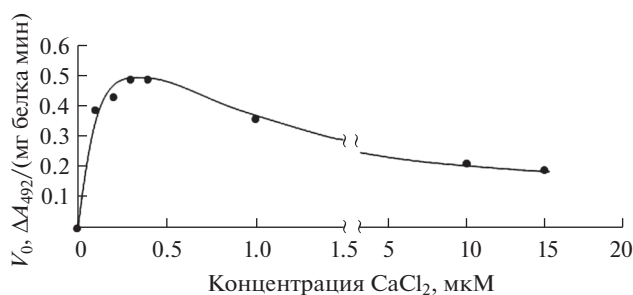


Рис. 3. Зависимость начальной скорости (V_0) Ca²⁺-зависимой диссипации трансмембранного градиента pH на СМ, образованного H⁺-АТФазой, от концентрации CaCl₂ в среде инкубации симбиосом.

чальной скорости Ca-зависимой диссипации ΔpH на СМ, представлена на рис. 3. Можно видеть, что эта зависимость достигает насыщения, то есть стационарного уровня, уже при очень низких, а именно субмикромольных, концентрациях кальция в среде и качественно сходна с соответствующей концентрационной зависимостью ИТФ-гидролазной активности фермента [7], тем самым снова указывая на высокое сродство его Ca²⁺-связывающего сайта к этому катиону. Поскольку рассматриваемая зависимость, построенная как функция концентрации свободного кальция, обнаруживает признаки насыщения даже при более низких концентрациях этого катиона, отсутствие в экспериментах данного типа кальциевого буфера в среде инкубации симбиосом не дает оснований считать сделанное здесь заключение неправомерным. Иначе говоря, в этом случае мы имели бы только более сильный аргумент в пользу нашего вывода. На рис. 3 можно также видеть, что активность Ca²⁺-АТФазы заметно снижается при относительно высоких концентрациях кальция в среде, что вероятно обусловлено снижением скорости диссоциации Ca²⁺ с Ca²⁺-связывающих сайтов фермента, когда концентрация аккумулированного катиона внутри симбио-

сом приближается к их K_d для Ca²⁺ или становится выше этой величины.

Довольно низкая величина кажущейся K_M Ca²⁺-АТФазы для Ca²⁺, следующая из анализа концентрационной зависимости кинетики Ca-индуцируемой диссипации трансмембранного градиента pH на СМ, образованного H⁺-АТФазой, подтверждает высокую аффинность исследуемого фермента для этого катиона, ранее установленную в результате определения его ИТФ-гидролазной активности [9]. В свою очередь это означает, что низкоаффинный Ca²⁺/nH⁺ антипортер, энергизуемый трансмембранным протонным градиентом, отсутствует на СМ, что согласуется с результатами, полученными нами ранее [5]. В этой связи интересно отметить, что в отношении механизма аккумуляции кальция симбиосома как уникальный мембранный компартмент обнаруживает сходство с саркоплазматическим ретикулумом, мембрана которого снабжена Ca²⁺-АТФазой, также функционирующей как Ca²⁺/nH⁺-обменник и обеспечивающей эффективную загрузку этой органеллы ионами Ca²⁺ [17]. Однако, как и в случае симбиосом, потенциальная физиологическая роль трансмембранной транслокации иона H⁺ рассматриваемым ферментом остается пока неясной.

Принимая во внимание тот факт, что вопрос о возможной способности Ca²⁺-связывающего сайта Ca²⁺-АТФазы связывать другие катионы двухвалентных металлов и далее переносить их через СМ в ходе работы данного фермента в настоящее время остается открытым, в дальнейших экспериментах мы попытались выяснить, функционирует ли Ca²⁺-АТФаза в присутствии ионов Cd²⁺ и Mn²⁺. Как показано на рис. 4, добавление к симбиосомам субмиллимолярных концентраций этих катионов после достижения относительно стационарной величины ΔpH на СМ в ходе функционирования на ней протонного насоса, оставляет ее фактически неизменной, причем кажущийся очень слабый диссипативный эффект, вызываемый кати-

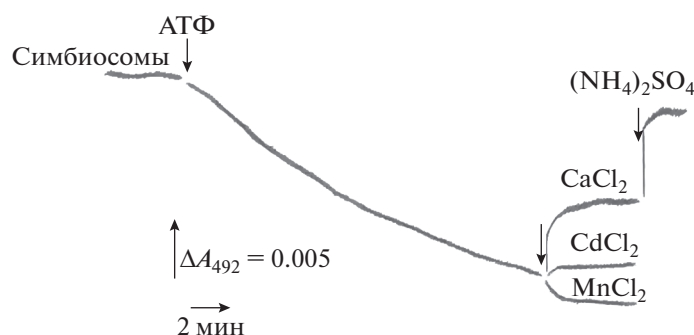


Рис. 4. Эффекты Ca²⁺, Cd²⁺ и Mn²⁺ на кинетику кислотного сдвига pH внутри симбиосом, запускаемого активностью H⁺-АТФазы на СМ. Где указано, добавлено 1 мМ Na₂АТФ, 100 мкМ CaCl₂, CdCl₂, MnCl₂ и 5 мМ (NH₄)₂SO₄.

онами Cd^{2+} , скорее всего является результатом ингибирования H^+ -АТФазы, как вполне ожидаемого их сильного токсического действия. Хотя эти данные могут указывать на относительно высокую избирательность Ca^{2+} -связывающего сайта Ca^{2+} -АТФазы для ионов Ca^{2+} , такое заключение нельзя считать окончательным из-за явной ограниченности полученных экспериментальных данных. В частности, в случае Mn^{2+} сродство Ca^{2+} -связывающего сайта Ca^{2+} -АТФазы к этому катиону может быть гораздо меньше, чем к Ca^{2+} [12], и тем самым обуславливать очень слабый эффект.

Среди представленных в настоящей работе результатов обращает на себя внимание тот факт, что выявленная величина кажущейся K_M Ca^{2+} -АТФазы для Ca^{2+} оказывается сравнимой с той, что была найдена в клетках эукариотов для кальциевых АТФаз, активированных кальмодулином (CaM) или другими факторами за счет снятия ими эффекта автоингибирования, свойственного этим ферментам [18]. Это обстоятельство предположительно указывает на то, что в выделенных симбиосомах Ca^{2+} -АТФаза СМ либо остается связанной с эндогенным CaM или CaM-подобным белком, либо претерпевает определенную модификацию в ходе их выделения и очистки симбиосомной мембраны, например, в результате активности эндогенных протеаз, приводящей также к диссоциации автоингибиторного домена от активного центра фермента и тем самым к увеличению доступности последнего для ионов Ca^{2+} . Однако вопрос о справедливости этой гипотезы остается пока открытым и является одним из важных аспектов наших будущих исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Udvardi M.K.* Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1997. V. 48. P. 493–523.
2. *Udvardi M.K., Pool P.S.* Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses // *Ann. Rev. Plant Biol.* 2013. V. 64. P. 781–805.
3. *Carafoli E.* Calcium – a universal carrier of biological signals // *FEBS J.* 2005. V. 272. P. 1073–1089.
4. *Plieth C.* Calcium: just another regulator in the machinery of life? // *Ann. Bot.* 2005. V. 96. P. 108.
5. *Andreev I.M., Dubrovo P.N., Krylova V.V., Andreeva I.N., Koren'kov V.D., Sorokin E.M., Izmailov S.F.* Characterization of ATP-hydrolyzing and ATP-driven proton-translocating activities associated with the peribacteroid membrane from root nodules *Lupinus luteus* L. // *J. Plant Physiol.* 1997. V. 151. P. 563–569.
6. *Andreev I.M., Dubrovo P.N., Krylova V.V., Izmailov S.F.* Functional identification of ATP-driven Ca^{2+} pump in the peribacteroid membrane of broad bean root nodules // *FEBS Lett.* 1999. V. 447. P. 49–52.
7. *Krylova V., Andreev I.M., Zartdinova R., Izmailov S.F.* Biochemical characteristics of the Ca^{2+} pumping ATPase in the peribacteroid membrane from broad bean root nodules // *Protoplasma.* 2013. V. 250. P. 531–538.
8. *Krylova V.V., Zartdinova R.F., Andreev I.M., Izmailov S.F.* $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ antiport as a possible mechanism of the Ca^{2+} -translocating ATPase functioning in vesicles of bean nodule's symbiosome membrane // *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A. Membr. Cell Biol.* 2016. V. 10. P. 218–222.
9. *Krylova V.V., Andreev I.M., Zartdinova R., Izmailov S.F.* Ca^{2+} -ATPase in the symbiosome membrane from broad bean root nodules: further evidence for its functioning as ATP-driven $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchanger // *Acta Physiol. Plant.* 2017. V. 39. P. 247–254. doi 10.1007/s11738-017-2546-y
10. *Inesi G., Tadini-Buoninsegni F.* $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ exchange, luminal Ca^{2+} release and $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ coupling ratios in the sarcoplasmic reticulum ATPase // *J. Cell Commun. Signal.* 2014. V. 8. P. 5–11.
11. *Ferreira-Gomes M.S., Mangialavori I.C., Ontiveros M.Q., Rinaldi D.E., Martiarena J., Verstraeten S.V., Rossi J.P.* Selectivity of plasma membrane calcium ATPase (PMCA)-mediated extrusion of toxic divalent cations in vitro and in cultured cells // *Arch. Toxicol.* 2018. V. 92. P. 273–288.
12. *Ynekura S., Toyshima C.* Mn^{2+} transport by Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum // *FEBS Lett.* 2016. V. 590. P. 2086–2095.
13. *Palmgren M.G.* Acridine orange as a probe for measuring pH gradients across membranes: mechanism and limitations // *Anal. Biochem.* 1991. V. 192. P. 316–321.
14. *Andreev I., Krylova V., Dubrovo P. and Izmailov S.* Passive potassium transport by symbiosomes from broad bean root nodules // *Plant Science.* 2005. V. 168. P. 1005–1010.
15. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
16. *Obara K., Miyashita N., Xu C., Toyashima I., Sugita Y., Inesi G., Toyashima C.* Structural role of countertransport revealed in Ca^{2+} pump crystal structure in the absence of Ca^{2+} // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 14489–14496.
17. *Moller J.V., Nissen P., Sorensen T.L.-M., le Maire M.* Transport mechanism of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase pump // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005. V. 15. P. 387–393.
18. *Dalghi M.G., Ferreira-Gomes M., Rossi J.P.* Regulation of the plasma membrane calcium ATPase by the actin cytoskeleton // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2018. V. 506. P. 347–354.