

УДК 57.023 581.1

ТРАНСПОРТНІ СИСТЕМИ ТОНОПЛАСТА РОСЛИННИХ ВАКУОЛЬ ТА ЇХ ПОТЕНЦІЙНЕ ЗАСТОСУВАННЯ У БІОТЕХНОЛОГІЇ

С. В. ІСАЄНКОВ

ДУ «Інститут харчової біотехнології та геноміки» НАН України, Київ

E-mail: stan.isayenkov@gmail.com

Отримано 25.01.2013

В огляді аналізується роль рослинних вакуоль у життєдіяльності рослин, зокрема в підтриманні клітинного тургорного тиску, зберіганні мінералів та поживних речовин. Описано головні механізми транспорту через мембрану вакуолі. Наведено основні типи транспорту поживних речовин, важких металів, вітамінів та органічних сполук через тонопласт вакуоль. Розглянуто головні системи мембранного транспорту рослинних вакуоль, їхні фізіологічні функції та охарактеризовано найвідоміші транспортні протеїни вакуоль.

Обговорюються значення та роль транспорту сполук різної природи у вакуолі для життєдіяльності рослини. Описано головні типи рослинних вакуоль та їхню роль у функціонуванні рослини. Розглянуто сучасний стан досліджень транспорту рослинних вакуоль. Подано приклади використання принципів та механізмів вакуолярного транспорту в різних галузях біотехнології рослин. Окреслено перспективи нових напрямів і підходів у розвитку біотехнології рослин із застосуванням різних типів вакуоль та систем мембранного вакуолярного транспорту.

Ключові слова: вакуоля, тонопласт, мембранний транспорт, канали, транспортери, біотехнологія.

Більшість рослинних клітин містять одну чи навіть декілька вакуоль, що можуть займати до 90% об'єму клітини [1]. Вакуолі рослинних клітин є важливими клітинними органелами для перебігу багатьох фізіологічних процесів у рослині. Вакуолі рослин відіграють істотну роль у зберіганні важливих мінералів, поживних речовин та протеїнів. Функціонування цих клітинних органел є вкрай необхідним для зміни об'єму клітини у процесі росту та розвитку рослини, відкриття і закриття продихових клітин та підтримання тургорного тиску, що зміцнює механічну жорсткість зелених тканин рослин. Вакуолі рослинних клітин є одним із головних депо іонів Ca^{2+} . Тому окрім «класичних» функцій зберігання, генерації тургору та гідролізу вакуолі рослинних клітин беруть активну участь у клітинному сигналінгу [2]. Вони відокремлені від цитозолу за допомогою вакуолярної мембрани, що отримала назву тонопласт. Головними елементами вакуолярного соку рослинних клітин є солі неорганічних сполук і вода. Завдяки

пластичності та мультифункціональності вакуоль рослинні клітини здатні значно збільшувати свій об'єм і розміри, накопичувати в собі багато різноманітних солей та води із навколишнього середовища [1]. Такий широкий спектр функцій і пластичність цих клітинних органел роблять їх привабливими для використання в різноманітних напрямках біотехнології. Хоча більшість рослинних клітин містить велику центральну літичну вакуоль (ЛВ), деякі типи клітин дуже часто мають інший тип вакуоль, набагато менший за розмірами, ніж ЛВ (рис. 1, 2). Ці вакуолі отримали назву протеїнових вакуоль (ПВ) (PSV, Protein storage vacuoles). Якщо ЛВ є еквівалентами лізосом тваринних клітин та вакуоль дріжджів, то походження ПВ ще не з'ясовано [2]. Транспорт через тонопласт вакуоль є одним із найважливіших процесів, що забезпечує виконання цими клітинними органелами своїх фізіологічних функцій. Окрім того, слід зазначити, що вивчення транспортних систем тонопласта вакуоль відкриває нові перспективи

для використання цих органел як клітинних «біореакторів» для зберігання й накопичення важливих біологічно активних сполук, що включають токсини, фармпрепарати, вітаміни та мінерали.

Протонні помпи рослинних вакуоль. Рух через тонопласт забезпечується роботою протонних помп, що створюють електрохімічний градієнт. Рослинні вакуолі мають два типи протонних насосів — V-АТФази та V-пірофосфатази [1–4]. V-АТФази — мультимерні комплекси, що є характерними для тонопласта клітин вищих рослин та грибів, а також для мембрани лізосом клітин ссавців [5]. V-АТФази — головні компоненти закиснення вакуолярного соку ЛВ [2] (рис. 1, А). Вакуолі рослинних клітин мають пірофосфатази, що також забезпечують закиснення вакуолярного соку. Н⁺-пірофосфатази було знайдено у багатьох представників рослинного царства — водоростей, мохів, папоротей [6, 7]. Гомологічні до Н⁺-пірофосфатаз

протеїни ідентифіковано у деяких бактерій, однак цей тип протонних помп відсутній у клітинах тварин і грибів. Н⁺-пірофосфатази тонопласта рослинних вакуоль є невеликим мономером, активність якого залежить від присутності іонів Mg²⁺. Цікавим фактом є те, що існують дві ізоформи цього протеїну, один із них активується іонами K⁺, тимчасом як інша ізоформа не потребує наявності цього іона [8]. Хоча загальний рН ПВ є нейтральним, Н⁺-пірофосфатазу було виявлено у мембрані глобоїдів, що мають кисле значення рН порівняно з вакуолярним соком ПВ [9] (рис. 2). Відповідно до хімічно-осмотичної моделі енергозалежного транспорту розчинних сполук створення протонного електрохімічного градієнта тонопласта вакуоль забезпечується роботою V-АТФаз чи Н⁺-пірофосфатаз. Створення такого електрохімічного градієнта є головною рушійною силою транспорту через мембрану тонопласта багатьох сполук, зокрема цукрів, аміно-

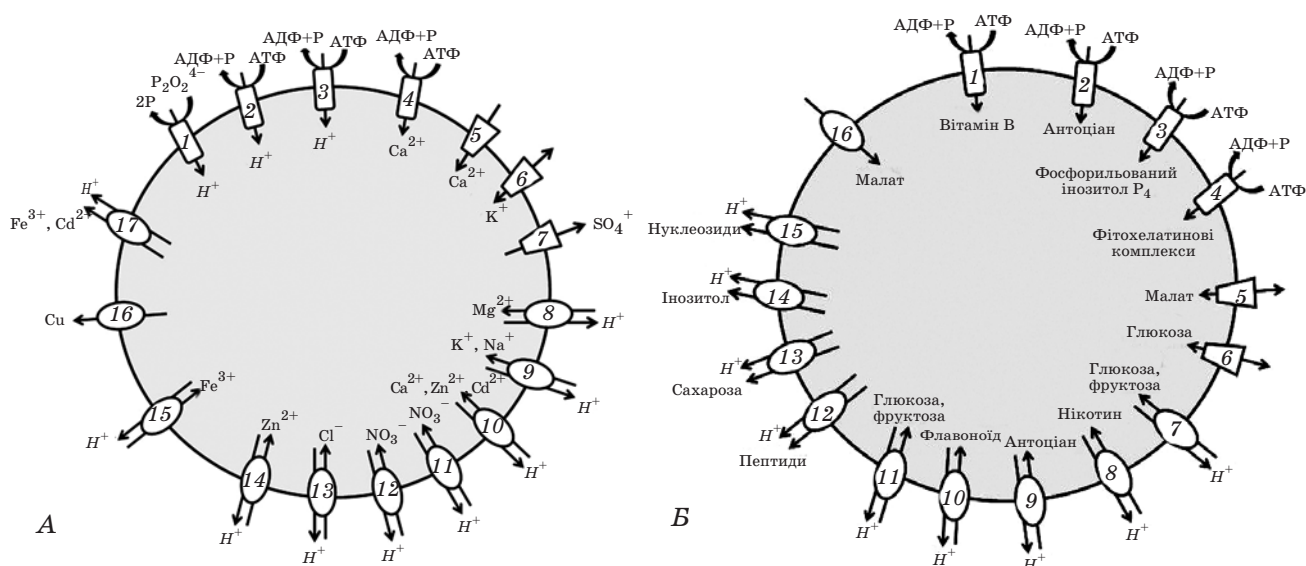


Рис. 1. Система транспорту через тонопласт літичних вакуоль:

А — транспорт неорганічних сполук: 1 — пірофосфатаза; 2 — протонна АТФаза V-типу; 3 — АНА10 — протонна АТФаза Р-типу; 4 — АСА4 та АСА11 — Ca²⁺-залежні АТФази Р-типу; 5 — ТРК1 — канал для Ca²⁺; 6 — ТРК1, -2, -3 та -5 — канали для K⁺; 7 — AtSUTR4-1 та -2 — експортери сульфатів; 8 — MGT — імпортер Mg²⁺; 9 — NHX — обмінники K⁺ та Na⁺; 10 — CAX1, -3, -4, та -9 — імпортери Zn²⁺, Cd²⁺ та Ca²⁺; 11 — CLCa — протонний обмінник NO₃⁻; 12 — NRT2.7 — протонний обмінник NO₃⁻; 13 — CLCс — протонний обмінник Cl⁻; 14 — MTP1 і -3 — протонні обмінники Zn²⁺; 15 — COPT5 — експортер Cu; 16 — NRAMP4 і -5 — протонні симпортери Cd²⁺ або Fe³⁺; 17 — VIT1 — протонний обмінник Fe³⁺.

Б — транспорт органічних сполук: 1 — АВСС — транспортер антоціанів; 2 — АВСС1 і -4 — транспортери вітамінів групи В; 3 — АВСС-1 і -2 — транспортери хелатинів і желатинових комплексів; 4 — АВСС5 — транспортер фосфоінозитолів P₆; 5 — АЛМТ4, -5, -6 і -9 — канали для малатів та фумаратів; 6 — ELS1 — пермеаза глюкози; 7 — VGT1 — протонний обмінник глюкози та фруктози; 8 — JAT1 — протонний обмінник нікотину МАТЕ-типу; 9 — TT12 — протонний обмінник антоціанів МАТЕ-типу; 10 — DTX35 — протонний обмінник флавоноїдів МАТЕ-типу; 11 — TMT1 — протонний обмінник глюкози, фруктози та сахарози; 12 — PTR2 — протонний симпортер пептидів; 13 — SUC4 — протонний симпортер сахарози; 14 — INT1 — протонний симпортер інозитолу; 15 — ENT1 — протонний симпортер нуклеозидів; 16 — TDT — транспортер малату та фумарату

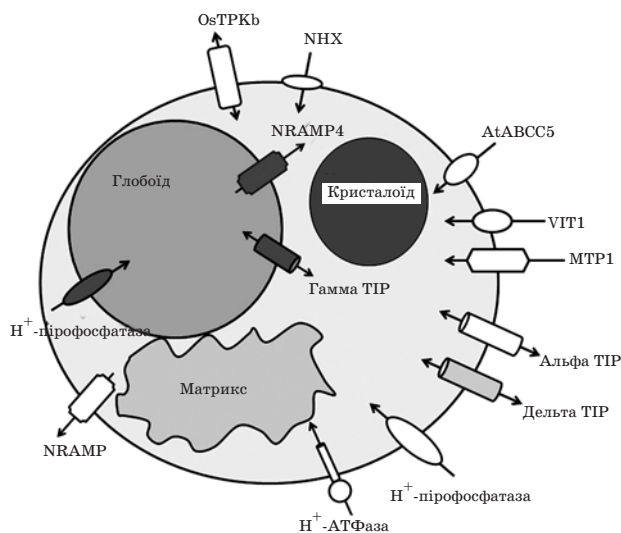


Рис. 2. Система мембранного транспорту протеїнових вакуоль

Наведено ідентифіковані мембранні транспортери

кислот, катіонів та аніонів мінеральних сполук [2]. Підсилення експресії генів, що кодують вищезазначені протонні помпи, та роботи цих pomp у тонопласті може призводити до збільшення протонного електрохімічного градієнта, активізуючи тим самим пасивний транспорт мінеральних сполук у вакуолі (рис. 1, 2).

Системи транспорту аніонів. Іонні канали відіграють важливу роль у транспорті мінеральних сполук через тонопласт відповідно до створеного електрохімічного градієнта. Представники іонних каналів тонопласта стали одними з перших протеїнів вакуоль, що їх було детально охарактеризовано [10–12]. Багато досліджень здійснено для характеристики функцій неселективних та K^+/Ca^{2+} -селективних катіонних каналів [2]. Проте зовсім мало робіт, що описують функції та роботу аніонних каналів. Відомо всього декілька досліджень з вивчення функціонування транспортних каналів малату, Cl^- та NO_3^- [13, 14]. Механізми транспорту через тонопласт можуть відрізнятися і для клітин з різних типів рослинних тканин, і різних типів вакуоль. Великого прогресу в дослідженні вакуолярних транспортних протеїнів було досягнуто за останні роки завдяки декільком дослідженням протеому вакуоль та аналізу мутантів рослин [15, 16] (рис. 1).

Роль аніонних каналів вакуолярної мембрани у підтриманні мінерального гомеостазу, відповіді на абіотичні та біотичні стреси ще залишається майже невідомою. Існує

декілька ранніх робіт, що свідчать про суттєве накопичення Cl^- та малату у вакуолях за умов сольового стресу [13]. Відомо, що похідні малату беруть участь у багатьох важливих процесах у цитоплазмі, гліоксісомах та хлоропластах [14]. Рослини із САМ-метаболизмом використовують малат для зберігання CO_2 , що вивільняється протягом прохолодної ночі і таким чином допомагає запобігати істотним втратам води рослиною [2]. Дослідження електрофізіологічних показників вакуоль мезофілу САМ-рослин *Kalanchoe daigremontiana* показали значне надходження малату всередину вакуолі [17]. Малат та цитрат є головними похідними органічних кислот, що накопичуються у великих кількостях у вакуолярному соку [1]. Біохімічні експерименти вказують на те, що один і той самий транспортний протеїн відповідає за транспорт більшості карбогідратів [1]. Після відкриття транспортеру малату було показано, що цей транспортний протеїн є близьким гомологом транспортера дикарбоксилату натрію AtTDT (*A. thaliana* tonoplast dicarboxylate transporter) (рис. 1, B) [1]. Завдяки подальшим дослідженням вакуолярного транспорту було ідентифіковано вакуолярний канал малату, що належить до родини транспортерів металу ALMT (Aluminium tolerance metal transporters) [18, 19]. Геном арабідопсису містить 15 генів, що кодують ALMT-транспортери [19]. Хоча функції більшості ізоформ AtALMT транспортерів із арабідопсису ще не з'ясовано, було встановлено, що саме AtALMT9 локалізується в тонопласті й відповідає за транспорт малату у вакуолях клітин мезофілу [19]. Мутантні лінії рослин за геном AtALMT9 демонструють незначне зменшення вмісту малату у вакуолях. Такі несуттєві зміни у фенотипі мутантних рослин можна пояснити функціонуванням у вакуолях цих клітин ще AtTDT-подібного транспортеру малату AtTDT [2, 19] (рис. 1).

Інша велика група аніонних каналів вакуоль належить до родини CLC (Chloride channels). Роль цих каналів і досі є майже невідомою. Проте відомо, що нітрати можуть зберігатись у вакуолях у досить високих концентраціях [1]. Для того аби забезпечити таке накопичення у вакуолях, рослинна клітина залучає до роботи транспортні протеїни родини CLC. Нещодавно було показано, що один із протеїнів родини CLC бере участь у транспорті нітратів [20]. Після детального аналізу CLC-мутантів арабідопсису було виявлено, що саме CLCc відповідає за регуляцію рівня нітратів у тканинах

рослин [20]. Мутації за цим геном призводили до зниження накопичення нітратів у тканинах рослин [20]. Цікавим фактом є те, що вміст інших аніонів, зокрема малату, цитрату та хлориду, був нижчий у мутантів лінії *clsc*. Слід зазначити, що мембранну локалізацію CLCс ще не повністю з'ясовано. Залишається невідомим, де локалізується CLCс — у тонопласті чи в плазматичній мембрані [2]. Було показано, що *AtCLCa* впливає на обмін та гомеостаз нітратів у рослин [21]. Мутантні лінії арабідопсису за цим геном чутливі до дії нітратів у високих концентраціях. Було встановлено, що *Atclca* мають більшу чутливість до дії гербіцидів. Вважають, що більшість CLC-протеїнів є аніонними каналами, проте було показано, що *AtCLCa* є $\text{NO}_3^-:\text{H}^+$ антипортером (рис. 1) [21]. Достатньо лише незначних змін в амінокислотній послідовності CLC-каналу (E148 та E202), щоб перетворити цей CLCa на транспортер [21]. Цікавим фактом є те, що канал *AtCLCs* має високу ступінь гомології з тваринним CLC-5, який є протонно-хлоридним обмінником ($2\text{Cl}^-:\text{H}^+$), що функціонує в клітинах нирок [2]. Було продемонстровано, що тільки заміна однієї амінокислоти на іншу в CLC-5 є достатньою, аби змінити спеціалізацію цього обмінника і перетворити його на протонно-нітратний обмінник ($\text{NO}_3^-:\text{H}^+$) [22]. Дослідження CLC-каналів у рослинах рису показали, що *OsCLC-1* та *OsCLC-2* відповідають за обмін і гомеостаз аніонів Cl^- у рослинах [23, 24].

Окрім нітратів та хлоридів вакуолі рослин накопичують аніони сульфату. Тільки два транспортери сульфату, а саме *SULTR4-1* та *SULTR4-2*, відомі на сьогодні. Ці сульфатні транспортери відповідають за експорт сульфатів із вакуоль у цитоплазму в клітинах кореня та гіпокотилію [25]. Таким чином, подальше вивчення транспорту аніонів через мембрану вакуоль може допомогти у багатьох напрямках рослинної біотехнології, зокрема детоксифікації ґрунтів від нітратів, підвищення солестійкості рослин шляхом посилення транспорту іонів Cl^- у вакуолі та ін. (рис. 1, А).

Системи транспорту катіонів. Топопласт рослинних вакуоль містить різноманітні за своїми характеристиками та функціями катіонні канали і транспортери. Клітини рослин мають дві родини каналів, що регулюються лігандами (LGC, Ligand gated channels). Першою родиною є канали, подібні до рецепторів глутамату (GLR, Glutamate receptor like), другою — канали, що регулюються циклічними нуклеотидами (CNGC,

Cyclic nucleotide gated channels) [2]. Функції деяких із цих каналів було добре вивчено. Зокрема показано, що CNGC-канал з бере участь у транспорті катіонів [26]. Проте остаточно мембранну локалізацію цього CNGC-каналу ще не з'ясовано. Існує декілька повідомлень, що свідчать про участь LGC-каналів рослин у сигнальних процесах клітин, зокрема у вивільненні іонів Ca^{2+} із вакуоль та інших мембранних резервуарів клітини [27]. Було показано, що продукт фосфатінозитольного сигнального шляху — інозитол 1,4,5-трифосфат (IP_3 , inositol 1,4,5-triphosphate) може вивільняти Ca^{2+} з ізольованих вакуоль [28]. Разом із вищезазначеним дослідженням існує ще декілька робіт, що свідчать про існування IP_3 -каналу у вакуолях рослин [29, 30]. Окрім експериментальних доказів існування вакуольного IP_3 -каналу, деякі дослідження вказують на існування іншого типу LGC-каналів у тонопласті вакуоль. Було показано, що циклічна АДФ-рибоза (цАДФР) також може стимулювати вивільнення іонів Ca^{2+} із вакуоль червоного буряку [29]. Фармакологічні дослідження цього каналу свідчать про подібність останнього до ріанодинового рецептора тваринних клітин [29]. Проте нещодавно проведена робота показала відсутність будь-якої стимуляції вивільнення Ca^{2+} із вакуоль за допомогою цАДФР [31]. Слід також зазначити, що окрім функції вивільнення іонів Ca^{2+} LGC-канали, а саме родина CNGC, бере участь у транспорті іонів Na^+ [32] (рис. 1, А).

Транспорт іонів Ca^{2+} через мембрану вакуоль можуть забезпечувати також інші транспортні протеїни. Зокрема, нещодавно було відкрито канал транспорту іонів Ca^{2+} , що отримав назву TPC (Two pore channel) [33]. Цей канал складається із 12 трансмембранних доменів, двох EF-доменів зв'язування із Ca^{2+} та потенційного 14-3-3 сайту зв'язування із 14-3-3 протеїнами [2, 33]. Завдяки аналізу *Attpc1* мутантів арабідопсису було з'ясовано участь *AtTPC1* у закритті продихів, що залежить від концентрації іонів Ca^{2+} у цитозолі та в пов'язаному з дією абсцизину процесі проростання насіння [33]. Мутації гена *TPC* у рослинах рису призводили до зниження чи гальмування відповіді на дію еліситорів (ксиланази) та індукції процесів гіперчутливої відповіді [34]. Подібний до рослин рису фенотип спостерігався і для суспензійної культури тютюну BY-2 [35]. Таким чином, TPC-1 може брати участь у сигнальних процесах, що пов'язані із захистом рослин від патогенів, проростання насіння та закритті клітин продихів (вод-

ному стресі). Після відкриття каналів цього типу в науковій спільноті виникла велика полеміка з приводу Ca^{2+} -специфічності та вакуолярної локалізації ТРС-каналів. Однак низка останніх досліджень із застосуванням підходів вакуолярної протеоміки, мічення антитілами та ТРС:GFP-злиттям свідчать про те, що ТРС-канали є специфічними для іонів Ca^{2+} і розташовані в тонопласті рослинних вакуоль [36–42]. Слід зазначити, що ТРС-канали належать до SV-типу (slow vacuolar channel) [2] (рис. 1, А).

Калієві канали вакуоль було ідентифіковано завдяки електрофізіологічним дослідженням калієвих струмів клітин продохів [43]. Нещодавно було показано, що вакуолярні калієві канали родини ТРК (Two pore K^+ channel) належать до VK-типу (vacuolar K^+ selective) та локалізовані і в клітинах продохів, і в інших типах клітин рослин [44]. Окрім AtTRK1, геном арабідопсису містить ще 4 гени, що кодують інші ізоформи ТРК-каналів (AtTRK2, 3, 4, 5) [44, 45]. Усі форми AtTRK з арабідопсису, за винятком AtTRK4, локалізовані у тонопласті вакуоль [2, 44, 45, 46]. На відміну від своїх родичів, AtTRK4 розташований у плазматичній мембрані [47]. Подібні за своїми характеристиками ТРК-канали було знайдено в геномах інших видів рослин, зокрема рису, ячменю, тютюну, *Physcomitrella* та ін. [2, 47, 48]. Канали ТРК є невеликою родиною транспортних протеїнів з переважно вакуолярною локалізацією та селективністю до K^+ . Типовий ТРК-канал має 4 трансмембранних домени, дві пори з характерною комбінацією амінокислот — GYGD, що відповідає за селективність цих пор для іонів K^+ [2, 46]. Окрім того, більшість ТРК-каналів мають EF-мотиви у С-термінальному кінці та 14-3-3 мотив у N-термінальному кінці. Тому ці канали можуть регулюватись як іонами Ca^{2+} , так і 14-3-3 протеїнами [2, 46, 47, 49]. Цікавим фактом є те, що одна з ізоформ тютюну NtTRK1 може мати варіації в амінокислотній послідовності у другій порі — замість канонічної GYGD-послідовності друга пара містить VHGD чи GHGD [50]. Найбільш дослідженим ТРК-каналом є AtTRK1 [44]. Було встановлено, що функція AtTRK1 є важливою для закриття продохів, проростання насіння та індукції осмотичного стресу [44]. Інші ізоформи з арабідопсису AtTRK2, AtTRK3, AtTRK5 мають вакуолярну локалізацію, але функціональність цих каналів ще до кінця не з'ясовано [2, 46]. Цікавим відкриттям була відмінність у вакуолярній локалізації двох ізоформ

ТРК-каналів із рису [46, 51]. Встановлено, що OsTRKa міститься в тонопласті ЛВ, проте OsTRKb локалізується на мембрані ПВ [51]. Така різниця у вакуолярній локалізації ТРК-каналів свідчить про різноманіття фізіологічних функцій вакуоль рослин. OsTRKb є спеціалізованим каналом ПВ і відіграє важливу роль у процесах формування та проростання насіння. Окрім того, дані свідчать про те, що експресія OsTRKb зростає в умовах сольового стресу [46]. Імовірно, OsTRKb не тільки є важливим детермінантом гомеостазу K^+ в насінні та репродуктивних органах рослин, але й відповідає за формування відповіді на дію сольового стресу [32, 46] (рис. 1, А; 2).

Інтерес становить група вакуолярних транспортних протеїнів Na^+/H^+ -антипортерів, що транспортують Na^+ та, можливо, калій у вакуолі [32, 52]. Транспортери родини NHX було знайдено й охарактеризовано для багатьох видів рослин [53–57] (рис. 1, А; 2).

Найбільш детально описано AtNHX1 з арабідопсису, що є одним із головних детермінантів стійкості рослин до сольового стресу [55, 58]. Наприклад, експресія AtNHX1 у томатах значно підвищує солестійкість рослин, такі помідори здатні формувати ягоди за концентрації солей, що є летальною для рослин дикого типу [55]. Подібні ефекти підвищення солестійкості показано також для OsNHX1 із рису [59, 60]. Геном арабідопсису містить шість генів цієї родини — AtNHX1-6 [61]. Кожен представник родини NHX з арабідопсису по-різному реагує на дію абсцизину та високих концентрацій NaCl [61]. NHX-транспортери поділяють на два класи — I та II. NHX-обмінники класу I мають ЛВ-специфічну локалізацію, а транспортери класу II містяться або у превакуолярних компартментах, або в інших ендосомальних компартментах клітин [62, 63]. Дослідження NHX-обмінників показали, що антипортери класу I є насправді K^+/H^+ -обмінниками [63].

Таким чином, експериментальні дані свідчать на користь того, що NHX-транспортери класу I в нормальних умовах беруть участь у поглинанні іонів калію у вакуолях для генерації тургору, регуляції рН та зберігання K^+ [32]. Вони також мінімізують токсичні ефекти сольового стресу й осмотичного шоку, транспортуючи іони K^+ та в деяких випадках Na^+ у вакуолі, і таким чином підтримують відповідний баланс іонів калію стосовно іонів натрію в цитозолі [63].

Тонопласт вакуоль рослинних клітин також містить Ca^{2+} -транспортери, що отримали назву CAХ (cation/ H^+ exchangers). Перші

кДНК САХ-транспортерів було клоновано із рослин арабідопсису. Функцію САХ як $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ -обмінників продемонстровано за допомогою комплементачії мутантів дріжджів кДНК цих транспортерів [64]. Два гени, що їх уперше знайдено в арабідопсисі, дістали назви — САХ1 та САХ2 [64]. Було показано активацію САХ1 на дію холодового стресу. САХ1 бере участь у регуляції експресії генів, що відповідають за холодостійкість рослин [1].

САХ1 та САХ2 є Ca^{2+} -транспортерами, однак згодом було встановлено, що деякі інші представники родини САХ можуть транспортувати не тільки іони Ca^{2+} , але й іони інших металів. Потенційними субстратами для різних представників САХ-транспортерів є іони кадмію, марганцю, ртуті, цинку, нікелю і навіть срібла [1, 64–66] (рис. 1, А; 3).

Окрім САХ-транспортерів, транспортування металів через тонопласт вакуолю можуть забезпечувати транспортери родини NRAMP (Natural resistance-associated macrophage proteins). Цю родину транспортерів металів добре охарактеризовано для клітин ссавців. Здебільшого NRAMP-транспортери відповідають за транспорт бівалентних іонів

[67, 68]. Гени NRAMP-транспортерів ідентифіковано для великої кількості видів рослин [68–71]. Дослідження функцій AtNRAMP3 з арабідопсису показали, що він локалізований у вакуолярній мембрані й відповідає за експорт іонів заліза із вакуолю. Мутантні лінії арабідопсису з порушеною функцією AtNRAMP3 виявляють стійкість до впливу кадмію і збільшують накопичення марганцю та цинку в умовах дефіциту заліза [72, 73]. Підсилення експресії AtNRAMP3 призводить до пригнічення накопичення марганцю [72, 73]. Транспортери родини САХ та NRAMP можуть набути широкого застосування у технологіях фіторемедіації та біофортificaції (рис. 3).

Попередні дослідження транспорту металів у клітинах рослин виявили транспортну активність для іонів металів у вакуолярній мембрані [74]. Було ідентифіковано протонно-магнієвий обмінник родини AtMNX та вакуолярний імпортер іонів цинку ZAT1 (Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana*) родини CDF (Cation diffusion facilitator) [75, 76]. В останні роки знайдено декілька вакуолярних імпортерів важких металів родини MTP (metal tolerance protein) та HMA3

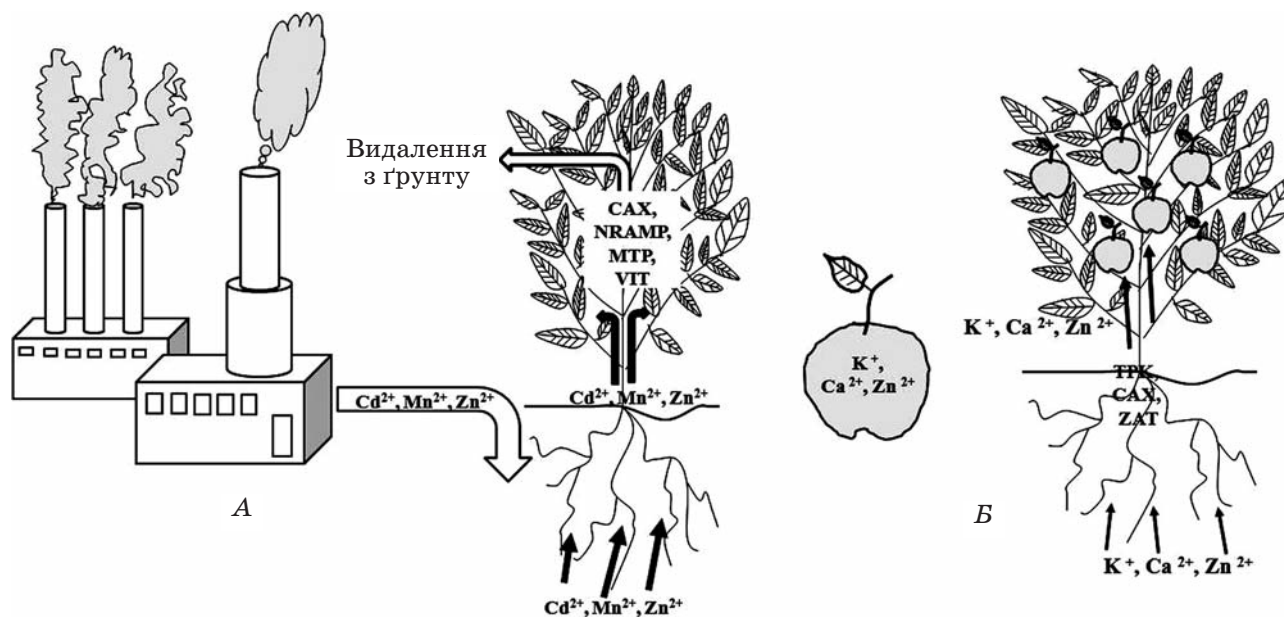


Рис. 3. Використання транспортних протеїнів рослинних вакуолей у біотехнології рослин:

А — варіанти фіторемедіації ґрунтів за допомогою генетично модифікованих рослин, що експресують/оверекспресують гени родин САХ, NRAMP, MTP, VIT. Рослини із розгалуженою кореневою системою трансформують одним чи декількома із вищезазначених генів. Трансформовані рослини здатні транспортувати важкі метали (Cd^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+}). Стебло та листя накопичують у своїх тканинах ці важкі метали. Стебло та листя рослин може бути зібрано для подальшої утилізації.

Б — варіанти біофортificaції рослин за допомогою транспортних протеїнів тонопласта. Цінні харчові культури рослин можуть бути трансформовані генами TPK, САХ, ZAT під контролем специфічного для фруктів промотору. Транспортні протеїни TPK, САХ, ZAT сприятимуть накопиченню цінних мінеральних елементів (K^{+} , Ca^{2+} , Zn^{2+}) у вакуолях фруктів та поліпшенню харчової цінності рослин

(Heavy metal ATPase 3) [77, 78]. Функціонування транспортеру MTP1 забезпечує, зокрема, виживання рослин в умовах забруднення ґрунтів цинком [77]. Нещодавно було показано, що AtHMA3 з арабідопсису є Р-типом АТФази і сприяє функціонуванню вакуолярного імпортера кадмію, цинку, кобальту та свинцю [78]. Існує припущення, що експорт цинку, інших металів та мінералів із ПВ забезпечується роботою HMA-помп та NRAMP-транспортерів [79]. Більш того, транспорт іонів металів у ПВ відбувається за рахунок функціонування MTP-імпортерів та VIT-транспортерів (vacuole iron uptake transporter) [79]. Було також встановлено, що і мембрана глобоїду ПВ, і тонопласт ЛВ містять транспортер металу NRAMP4 (рис. 1, А; 2; 3) [52, 80].

Тільки один із представників транспортерів міді родини СОРТ (copper transport protein) — СОРТ5 виявлено в тонопласті вакуоль [81, 82]. Мутанти арабідопсису із втраченою функцією СОРТ5 накопичують більше міді в коренях. Спостерігається також менший вміст міді у стеблі. Вміст міді у вакуолях, виділених із клітин мутантних рослин, був значно вищий. Ці результати свідчать на користь того, що СОРТ5 є експортером міді з вакуоль [81].

Системи транспорту цукрів. Вакуолярна мембрана бере участь у транспорті різноманітних типів цукрів. Молекули сахарози транспортуються у вакуолі й накопичуються у великих кількостях у клітинах цукрового буряка за допомогою механізму протонного антипорту [1]. Дифузія сахарози у вакуолі спостерігається також для клітин тканин ячменю, томатів та цукрової тростини [1]. У багатьох рослин сахароза вакуолярного соку дуже швидко перетворюється на фруктани чи інші складні полімери, що надалі залишаються у цьому клітинному резервуарі [1]. У такому разі енергія, що потрібна для транспорту та накопичення карбогідратів, надходить завдяки розщепленню хімічного зв'язку між глюкозою та фруктозою [1]. Завдяки інтенсивним дослідженням протеома й транскриптома, регуляції та транспорту вакуоль було ідентифіковано 4 різних транспортери глюкози, що забезпечують імпорт глюкози у вакуоль [15, 16, 83]. На сьогодні ідентифіковано лише один експортер сахарози, тому вивчення вакуолярного транспорту цукрів є важливим і перспективним напрямом досліджень [1, 15, 16, 83]. Дослідження транспорту сахарози через мембрану вакуолі дали змогу

виявити декілька типів транспортних протеїнів, що беруть участь у цьому процесі. Було показано, що протонно-сахарозний симпортер AtSUC4 відповідає за експорт сахарози із вакуоль (рис. 1, В) [84, 85]. Зворотний рух молекул сахарози із вакуоль до цитоплазми забезпечується транспортними системами протонного антипорту, зокрема TMT1 і TMT2 [84, 85]. Серед усіх членів родини SUC/SUT (Sucrose carriers/transporters) і TMT (tonoplast monosaccharide transporter) тільки AtSUC4 та TMT1/2 мають вакуолярну локалізацію [84, 85]. Більш того, дослідження протеома вакуолярних мембран ячменю вказують на те, що гомолог AtSUC4 з ячменю — HvSUT2 також має вакуолярну локалізацію [86, 87]. Припускають, що експорт молекул глюкози та інших моносахаридів із вакуолі в цитоплазму забезпечується протонними симпортерами родини VGT (Vacuolar glucose transporter) [88, 89]. На сьогодні відомо тільки два представники цієї родини — VGT1 та VGT2, однак функціональні характеристики цих транспортерів ще невідомі (рис. 1, В).

Транспорт органічних сполук та метаболітів за допомогою АВС-транспортерів. Дослідження фізіології транспорту рослинних вакуоль уможливили ідентифікацію групи транспортних протеїнів суперродини АВС-транспортерів, що забезпечують транспорт органічних сполук і метаболітів. Транспорт сполук через систему вакуолярних АВС-транспортерів потребує енергії гідролізу MgАТФ [90]. Загалом АВС-транспортери вакуоль забезпечують транспорт кон'югатів із глутатионом та метаболітів [3].

Такі енергозалежні «насоси» можуть «закачувати» у вакуолі сполуки різноманітної природи. Вони відповідають за транспорт цукрів, пептидів, деяких неорганічних іонів, важких металів [3]. АВС-транспорт допомагає рослинам накопичувати у вакуолях токсичні сполуки, зокрема феноли та алкалоїди, які мають репелентні властивості й використовуються рослиною як «біологічна зброя» у боротьбі з атаками комах та мікроорганізмів. Окрім того багато токсичних сполук ксенобіотичної природи (пестициди та інші) можуть бути модифіковані й утилізовані рослиною у центральних ЛВ [1–3]. Нещодавно було продемонстровано, що АВС-транспортери родини МАТЕ (Multidrug and toxic compound extrusion) відповідають за вакуолярний експорт антоціанів та нікотину. МАТЕ-транспортер — TT12 є флавоноїд-протонним антипортером і виявляє активність у клітинах оболонки насіння

арабідопсису [91]. Цікавим фактом є те, що геном арабідопсису містить 56 генів, які кодують МАТЕ-транспортери, а геном людини — тільки два гени [88]. Одне з перших спостережень того, що вакуолярний транспорт флавоноїдів та антоціанів забезпечується роботою ABC-транспортерів, було стосовно жита (*Secale cereale*) та рослин арабідопсису [92, 93]. Зокрема, встановлено, що AtMRP2/AtABCC2 діє як транспортер кон'югатів глюкоронату [93]. Було з'ясовано також, що транспорт глікозилізованих антоціанів у вакуолі забезпечується роботою ABC-транспортера MRP-типу (Multidrug resistance protein) у рослинах кукурудзи [94]. Глікозилювання ксенобіотичних сполук чи створення кон'югатів із глутатионом є одним із механізмів детоксифікації клітини. Видалення і транспорт у вакуолі глутатионових кон'югатів відбувається виключно за рахунок гідролізу АТФ. Було виявлено декілька генів, що кодують протеїни транспорту глутатионових кон'югатів у рослин. Усі ці транспортні протеїни належать до ABC-родини і мають відповідні гомологи в клітинах ссавців та дріжджів [95, 96]. Цікавим фактом є те, що, на відміну від клітин ссавців чи грибів, де глутатионові кон'югати транспортуються до плазматичної мембрани та екскретуються у міжклітинний простір, клітини рослин транспортують кон'югати цього типу у вакуолі [1]. Багато продуктів деградації метаболізму клітин можуть також продукувати високореактивні типи вільних радикалів. Існування таких радикалів у метаболічно-активній частині клітини — цитозолі — є вкрай небезпечним. Тому утилізація таких продуктів розпаду та деградації у вакуоль за допомогою MRP-транспортерів є дуже важливою. Детоксифікація деяких сполук ABC-транспортерами у рослин було показано для транспортерів MRP-типу [90]. Відомо, що сполуки важких металів можуть бути детоксифіковані за допомогою фітохелатинів і утилізовані у вакуолях. Нещодавно виявлено два нових представники MRP-транспортерів, що забезпечують транспорт фітохелатинових комплексів, зокрема із миш'яком до вакуоль [96]. ABC-транспортери також відіграють важливу роль у функціонуванні ПВ. Зокрема, для рослин кукурудзи та сорго було показано, що накопичення фітату у глобоїдах ПВ відбувається завдяки ABC-транспортерам MRP-типу (рис. 2) [97]. Нещодавно з'ясовано, що накопичення фітату в насінні арабідопсису відбувається за допомогою спеціалізованого ABC-транспортеру AtABCC5

(рис. 2) [98]. ABC-транспортери також забезпечують транспорт вітамінів групи B9 у вакуолі клітин рослин. Відомі два ABC-транспортери з арабідопсису — AtABCC1, що транспортує фолати, та AtABCC4, який транспортує антифолати до вакуоль (рис. 1, B) [99, 100]. ABC-транспортери мають великий потенціал для використання у технологіях вакуолярної утилізації токсичних органічних сполук. Більш того, ABC-транспортери є головними транспортними протеїнами вакуоль, що відповідають за транспорт великих органічних сполук. Така властивість цих транспортних протеїнів уможливає використання їх у накопиченні та зберіганні у вакуолях різноманітних ксенобіотиків (рис 1, B).

Транспорт води за допомогою аквапоринів. Центральна вакуоль рослинної клітини може займати до 90% її об'єму, тому вакуолі рослин мають велике значення для зберігання води і відіграють одну із ключових ролей у водному гомеостазі клітин. Дослідження транспортування води через вакуолярну мембрану показали, що такий тип транспорту забезпечується функціонуванням спеціалізованих транспортних протеїнів-аквапоринів. Багато різних типів аквапоринів було описано для рослинних вакуоль [101]. Аквапорини родини TIR вивчено краще за інші. Відомо, що вакуолі рослин мають три головних типи TIR-аквапоринів — альфа-, дельта- та гамма-TIR. Більшість TIR-аквапоринів має чітку вакуолярну спеціалізацію [102, 103]. Альфа- та дельта-TIR локалізовані в тонопласті ПВ [102–104]. Іноді з ПВ виділяють ще один тип, де тонопласт має виключно дельта-TIR [105]. Гамма-TIR присутній у тонопласті ЛВ, що мають кисле значення рН, та у мембранах глобоїду ПВ [102–106]. Окрім вищезазначеного гамма-TIR-аквапорину тонопласт багатьох літичних вакуоль містить с-TIR-аквапорин [107]. Альфа-TIR із ПВ відповідає за дегідратацію цих вакуоль [1]. Цікавим фактом є те, що, на відміну від гамма-TIR-аквапорину, фосфорилування альфа-TIR-аквапорину значно збільшує його пропускну здатність (рис. 1, 2) [1]. Підвищення експресії ключових генів TIR-аквапоринів може сприяти поліпшенню водного балансу клітин. А різна вакуолярна спеціалізація TIR-аквапоринів робить їх перспективними об'єктами для застосування у спеціалізованому транспорті корисних сполук у різні типи вакуоль.

Перспективи застосування мембранних транспортних систем рослинних вакуоль

у біотехнології рослин. Вивчення фізіології і транспорту рослинних вакуоль має велике значення для розвитку біотехнології. Вакуоля має унікальні властивості — великий розмір, обмежену метаболічну активність, що робить цю клітинну органелу резервуаром, придатним для зберігання та накопичення комерційно важливих сполук. Окрім того, існування різних типів вакуоль у рослині уможливує керування та спрямування процесу накопичення певних сполук у різних органах рослини. Наприклад, коли потрібно поліпшити харчові характеристики насіння, то слід індукувати механізми і системи транспорту ПВ. З другого боку, існування незалежного від апарату Гольджі механізму везикулярного транспорту для ПВ робить ці органели перспективним «біореактором» для зберігання корисних сполук без додаткових модифікацій, зокрема глікозилування. Вакуолі рослин мають великий потенціал у біофортificaції харчових продуктів. Так, збільшення накопичення у вакуолях важливих мікроелементів, зокрема Fe^{2+} чи Zn^{2+} , значно покращить якість харчування людини (рис. 3). Слід також наголосити, що вакуолі рослин мають великі перспективи для фіторемерації. Рослини здатні накопичувати та зберігати токсичні сполуки із навколишнього середовища у вакуолях. Вагоме значення рослинні вакуолі можуть мати у створенні безпечних для людського організму продуктів харчування. Зокрема, вибіркоче накопи-

чення токсичних чи небажаних сполук в окремих органах рослин, що не вживаються у їжу (рис. 3). Дослідження останніх років показують, що модифікація чи зміна транспорту через мембрану вакуоль може збільшувати соле- та посухостійкість рослин. Було встановлено, що підсилення експресії вакуолярної пірофосфатази чи Na^+/H^+ -антипортерів сприяє зростанню толерантності рослин до засолення та посухи [53, 108]. Для поліпшення фіторемерації та біофортificaції продуктів харчування було модифіковано роботу декількох транспортних протеїнів мембрани вакуолі (рис. 3) [109, 110]. Накопичення антоціанів та флавоноїдів у вакуолях є перспективним напрямом поліпшення харчових продуктів, оскільки ці сполуки мають антиоксидантні властивості і є важливими для здоров'я людини. На жаль, на сьогодні механізм транспорту флавоноїдів та антоціанів у вакуолі залишається невідомим. Слід також зазначити, що біосинтез і накопичення важливих вторинних метаболітів у вакуолях є вкрай складним завданням і потребує розуміння механізмів не тільки вакуолярного транспорту, але й метаболічних шляхів цих сполук.

Таким чином, вивчення механізмів вакуолярного транспорту, відкриття нових типів транспортних протеїнів має велике наукове та практичне значення. Багато транспортних протеїнів тонопласта вакуолі ще очікують на своє відкриття.

ЛІТЕРАТУРА

1. Neuhaus J. M., Martinoia E. Plant Vacuoles // eLS. — 2011. — DOI: 10.1002/9780470015902.a0001675.pub2.
2. Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M. Vacuolar ion channels: Roles in plant nutrition and signaling // FEBS Lett. — 2010. — V. 584. — P. 1982–1988.
3. Marty F. Plant vacuoles // Plant Cell. — 1999. — V. 11. — P. 587–600.
4. Maeshima M. Tonoplast transporters: Organization and function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 2001. — V. 52. — P. 469–497.
5. Sze H., Li X., Palmgren M. G. Energization of plant cell membranes by H^+ -pumping ATPases: regulation and biosynthesis // Plant Cell. — 1999. — V. 11. — P. 677–689.
6. Martinoia E., Massonnet A., Frangne N. Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants // Plant Cell Physiol. — 2000. — V. 41. — P. 1175–1186.
7. Hedrich R., Barbier-Brygoo H., Felle H. H. et al. General mechanisms for solute transport across the tonoplast of plant vacuoles: a patch clamp survey of ion channels and proton pumps // Bot. Acta. — 1988. — V. 101. — P. 7–13.
8. Maeshima M. Tonoplast transporters: Organization and function // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 2001. — V. 52. — P. 469–497.
9. Jiang J., Phillips T., Hamm C. et al. The protein storage vacuole: a unique compound organelle // J. Cell Biol. — 2001. — V. 155. — P. 991–1002.
10. Barkla B. J., Pantoja O. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1996. — V. 47. — P. 159–184.
11. Hedrich R., Neher E. Cytoplasmic calcium regulates voltage-dependent ion channels in

- plant vacuoles // *Nature*. — 1987. — V. 329. — P. 833–836.
12. Demidchik V., Maathuis F. J. M. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: from salt stress to signalling and development // *New Phytol.* — 2007. — V. 175. — P. 387–404.
 13. Pantoja O., Dainty J., Blumwald E. Ion channels in vacuoles from halophytes and glyco-phytes // *FEBS Lett.* — 1989. — V. 255. — P. 92–96.
 14. Fernie A. R., Martinoia E. Malate. Jack of all trades or master of a few? // *Phytochemistry*. — 2009. — V. 70. — P. 828–832.
 15. Martinoia E., Maeshima M., Neuhaus H. E. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism // *J. Exp. Bot.* — 2007. — V. 58. — P. 83–102.
 16. Jaquinod M., Villiers F., Kieffer-Jaquinod S. et al. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture // *Mol. Cell. Proteomics*. — 2007. — V. 6. — P. 394–412.
 17. Hafke J. B., Hafke Y., Smith J. A. et al. Vacuolar malate uptake is mediated by an anion-selective inward rectifier // *Plant J.* — 2003. — V. 35. — P. 116–128.
 18. Kovermann P., Meyer S., Hoertensteiner S. et al. The *Arabidopsis* vacuolar malate channel is a member of the ALMT family // *Ibid.* — 2007. — V. 52. — P. 1169–1180.
 19. Liu J., Magalhaes J. V., Shaff J., Kochian L. V. Aluminium-activated citrate and malate transporters from the MATE and ALMT families function independently to confer *Arabidopsis* aluminium tolerance // *Ibid.* — 2009. — V. 57. — P. 389–399.
 20. Harada H., Kuromori T., Hirayama T. et al. Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in *Arabidopsis* leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, *AtCLCc*, to variation in nitrate levels // *J. Exp. Bot.* — 2004. — V. 405. — P. 2005–2014.
 21. De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G. et al. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles // *Nature*. — 2006. — V. 442. — P. 939–942.
 22. Zifarelli G., Pusch M. Conversion of the 2Cl⁻/1H⁺ antiporter CLC-5 in a NO₃⁻/H⁺ antiporter by a single point mutation // *EMBO J.* — 2009. — V. 28. — P. 175–182.
 23. Nakamura A., Fukuda A., Sakai S., Tanaka Y. Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.) // *Plant Cell Physiol.* — 2006. — V. 47. — P. 32–42.
 24. Lypez-Rodriguez A., Trejo A., Coyne L. et al. The product of the gene GEF1 of *Saccharomyces cerevisiae* transports Cl⁻ across the plasma membrane // *FEMS Yeast Res.* — 2007. — V. 8. — P. 1218–1229.
 25. Kataoka T., Watanabe-Takahashi A., Haya-shi N. et al. Vacuolar sulfate transporters are essential determinants controlling internal distribution of sulfate in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* — 2004. — V. 16. — P. 2693–2704.
 26. Gobert A., Park G., Amtmann A. et al. *Arabidopsis thaliana* cyclic nucleotide gated channel 3 forms a non-selective ion transporter involved in germination and cation transport // *J. Exp. Bot.* — 2006. — V. 57. — P. 791–800.
 27. Malho R. Coding information in plant cells: the multiple roles of Ca²⁺ as a second messenger // *Plant Biol.* — 1999. — V. 1. — P. 487–494.
 28. Alexandre J., Lassalles J. P., Kado R. T. Opening of Ca²⁺ channels in isolated red beet root vacuole membrane by inositol 1,4,5-triphosphate // *Nature*. — 1990. — V. 343. — P. 567–570.
 29. Allen G. J., Muir S. R., Sanders D. Release of Ca²⁺ from individual plant vacuoles by both Insp3 and cyclic ADP-ribose // *Science*. — 1995. — V. 268. — P. 735–737.
 30. Allen G. J., Sanders D. Vacuolar ion channels of higher plants // *Adv. Bot. Res.* — 1997. — V. 25. — P. 217–252.
 31. Pottosin I. I., Wherrett T., Shabala S. SV channels dominate the vacuolar Ca²⁺ release during intracellular signalling // *FEBS Lett.* — 2009. — V. 583. — P. 921–926.
 32. Ісаєнков С. В. Фізіологічні та молекулярні аспекти сольового стресу рослин // *Цитология и генетика*. — 2012. — № 46. — С. 50–71.
 33. Peiter E., Maathuis F. J. M., Mills L. N. et al. The vacuolar Ca²⁺-activated channel TPC1 regulates germination and stomatal movement // *Nature*. — 2005. — V. 434. — P. 404–408.
 34. Kurusu T., Yagala T., Miyao A. et al. Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺ channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice // *Plant J.* — 2005. — V. 42. — P. 798–809.
 35. Kadota Y., Furuichi T., Ogasawara Y. et al. Identification of putative voltage-dependent Ca²⁺-permeable channels involved in cryptogein-induced Ca²⁺ transients and defense responses in tobacco BY-2 cells // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* — 2004. — V. 317. — P. 823–830.
 36. Furuichi T., Cunningham K. W., Muto S. A putative two pore channel AtTPC1 mediates Ca²⁺ flux in *Arabidopsis* leaf cells // *Plant Cell Physiol.* — 2001. — V. 42. — P. 900–905.
 37. Allen G. J., Chu S. P., Schumacher K. et al. Alteration of stimulus-specific guard cell calcium oscillations and stomatal closing in *Arabidopsis det3* mutant // *Science*. — 2000. — V. 289. — P. 2338–2342.
 38. Ranf S., Wunnenberg P., Lee J. et al. Loss of the vacuolar cation channel, AtTPC1, does

- not impair Ca^{2+} signals induced by abiotic and biotic stresses // *Plant J.* — 2008. — V. 53. — P. 287–299.
39. *Beyhl D., Hurtensteiner S., Martinoia E. et al.* The *fou2* mutation in the major vacuolar cation channel TPC1 confers tolerance to inhibitory luminal calcium // *Ibid.* — 2009. — V. 58. — P. 715–723.
40. *Demuro A., Parker I.* Imaging single-channel calcium microdomains // *Cell Calcium.* — 2006. — V. 40. — P. 413–422.
41. *Whiteman S.A., Serazetdinova L., Jones A.M. et al.* Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana* // *Proteomics.* — 2008. — V. 8. — P. 3536–3547.
42. *Wang Y.J., Yu J.N., Chen T. et al.* Functional analysis of a putative Ca^{2+} channel gene *TaTPC1* from wheat // *J. Exp. Bot.* — 2005. — V. 56. — P. 3051–3060.
43. *Ward J.M., Schroeder J.I.* Calcium activated K^+ channels and calcium-induced calcium release by slow vacuolar ion channels in guard cell vacuoles implicated in the control of stomatal closure // *Plant Cell.* — 1994. — V. 6. — P. 669–683.
44. *Gobert A., Isayenkov S., Voelker C. et al.* The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K^+ conductance and plays a role in K^+ homeostasis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2007. — V. 104. — P. 10726–10731.
45. *Voelker C., Schmidt D., Mueller-Roeber B., Czempinski K.* Members of the *Arabidopsis* AtTPK/KCO family form homomeric vacuolar channels in planta // *Plant J.* — 2006. — V. 48. — P. 296–306.
46. *Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M.* Membrane localisation diversity of TPK channels and their physiological role // *Plant Cell Signal. Behav.* — 2011. — V. 6. — P. 1201–1204.
47. *Becker D., Geiger D., Dunkel M. et al.* AtTPK4, an *Arabidopsis* tandem-pore K^+ channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca^{2+} -dependent manner // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2004. — V. 101. — P. 15621–15626.
48. *Dunkel M., Latz A., Schumacher K. et al.* Targeting of vacuolar membrane localized members of the TPK channel family // *Mol. Plant.* — 2008. — V. 1. — P. 938–949.
49. *Latz A., Becker D., Hekman M. et al.* TPK1, a Ca^{2+} -regulated *Arabidopsis* vacuole two-pore K^+ channel is activated by 14-3-3 proteins // *Plant J.* — 2007. — V. 52. — P. 449–459.
50. *Hamamoto S., Marui J., Matsuoka K. et al.* Characterization of a tobacco TPK-type K^+ channel as a novel tonoplast K^+ channel using yeast tonoplasts // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283. — P. 1911–1920.
51. *Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M.* Rice Two-Pore K^+ Channels Are Expressed in Different Types of Vacuoles // *Plant Cell.* — 2011. — V. 23. — P. 756–768.
52. *Blumwald E.* Sodium transport and salt tolerance in plants // *Curr. Opin. Cell Biol.* — 2000. — V. 12. — P. 431–434.
53. *Apse M. P., Aharon G. S., Snedden W. A., Blumwald E.* Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis* // *Science.* — 1999. — V. 285. — P. 1656–1658.
54. *Xue Z. Y., Zhi D. Y., Xue G. P. et al.* Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+ // *Plant Sci.* — 2004. — V. 167. — P. 849–859.
55. *Zhang H. X., Blumwald E.* Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit // *Nat. Biotechnol.* — 2001. — V. 19. — P. 765–768.
56. *Li W. Y. F., Wong F. L., Tsai S. N. et al.* Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells // *Plant Cell Environ.* — 2006. — V. 29. — P. 1122–1137.
57. *Fukuda A., Nakamura A., Tanaka Y.* Molecular cloning and expression of the Na^+/H^+ exchanger gene in *Oryza sativa* // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1999. — P. 1446. — P. 149–155.
58. *Yokoi S., Bressan R. A., Hasegawa P. M.* Salt Stress Tolerance of Plants // JIRCAS Working Report. — 2002. — P. 25–33.
59. *Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A. et al.* Function, intracellular localization and the importance of salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice // *Plant Cell Physiol.* — 2004. — V. 45. — P. 146–159.
60. *Chen Z. H., Pottosin I. I., Cuin T. A. et al.* Root plasma membrane transporters controlling K^+/Na^+ homeostasis in salt-stressed barley // *Plant Physiol.* — 2007. — V. 145. — P. 1714–1725.
61. *Yokoi S., Quintero F. J., Cubero B. et al.* Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* NHX Na^+/H^+ antiporters in the salt stress response // *Plant J.* — 2002. — V. 30. — P. 529–539.
62. *Rodriguez-Rosales M. P., Jiang X., Galvez F. J. et al.* Overexpression of the tomato K^+/H^+ antiporter LeNHX2 confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization // *New Phytol.* — 2008. — V. 179. — P. 366–377.

63. Jiang X., Leidi E. O., Pardo J. M. How do vacuolar NHX exchangers function in plant salt tolerance? // *Plant Signal. Behav.* — 2010. — V. 5. — P. 792–795.
64. Hirschi K. D., Zhen R., Cunningham K. W. et al. CAX1, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1996. — V. 93. — P. 8782–8786.
65. Shigaki T., Rees I., Nakhleh N., Hirschi K. D. Identification of three distinct phylogenetic groups of CAX cation/proton antiporters // *J. Mol. Evol.* — 2006. — V. 63. — P. 815–825.
66. Manohar M., Shigaki T., Hirschi K. D. Plant cation/H⁺ exchangers (CAXs): biological functions and genetic manipulations // *Plant Biol.* — 2011. — V. 4. — P. 561–569.
67. Gunshin H., Mackenzie B., Berger U. V. et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter // *Nature.* — 1997. — V. 388. — P. 482–488.
68. Belouchi A., Kwan T., Gros P. Cloning and characterization of the OsNRAMP family from *Oryza sativa*, a new family of membrane proteins possibly implicated in the transport of metal ions // *Plant. Mol. Biol.* — 1997. — V. 33. — P. 1085–1092.
69. Mäser P., Thomine S., Schroeder J. I. et al. Phylogenetic relationships within cation transporter families of *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* — 2001. — V. 126. — P. 1646–1667.
70. Williams L. E., Pittman J. K., Hall J. L. Emerging mechanisms for heavy metal transport in plants // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — V. 1465. — P. 104–126.
71. Thomine S., Wang R., Ward J. M. et al. Cadmium and iron transport by members of a plant transporter gene family in *Arabidopsis* with homology to NRAMP genes // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2000. — V. 97. — P. 4991–4996.
72. Thomine S., Lelièvre F., Debarbieux E. et al. AtNRAMP3, a multispecific vacuolar metal transporter involved in plant responses to iron deficiency // *Plant J.* — 2003. — V. 34. — P. 685–695.
73. Lanquar V., Lelièvre F., Bolte S. et al. Mobilization of vacuolar iron by AtNRAMP3 and AtNRAMP4 is essential for seed germination on low iron // *EMBO J.* — 2005. — V. 24. — P. 4041–4051.
74. Salt D. E., Wagner G. J. Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots — evidence for a Cd²⁺/H⁺ antiport activity // *J. Biol. Chem.* — 1993. — V. 268. — P. 12297–12302.
75. Shaul O., Hilgemann D. W., De Almeida-Engler J. et al. Cloning and characterization of a novel Mg/H exchanger // *EMBO J.* — 1999. — V. 18. — P. 3973–3980.
76. Van Der Zaal B. J., Neuteboom L. W., Pinas J. E. et al. Overexpression of a novel *Arabidopsis* gene related to putative zinc-transporter genes from animals can lead to enhanced zinc resistance and accumulation // *Plant Physiol.* — 1999. — V. 119. — P. 1047–1055.
77. Kobae Y., Uemura T., Sato M. et al. Zinc transporter of *Arabidopsis thaliana* AtMTP1 is localized to vacuolar membranes and implicated in zinc homeostasis // *Plant Cell Physiol.* — 2004. — V. 45. — P. 1749–1758.
78. Morel M., Crouzet J., Gravot A. et al. AtHMA3, a P1b-ATPase allowing Cd/Zn/Co/Pb vacuolar storage in *Arabidopsis* // *Plant Physiol.* — 2008. — V. 149. P. 894–904.
79. Brinch-Pedersen H., Borg S., Tauris B., Holm P. B. Molecular genetic approaches to increasing mineral availability and vitamin content of cereals // *J. Cereal Sci.* — 2007. — V. 46. — P. 308–326.
80. Bolte S., Lanquar V., Soler M. N. et al. Distinct lytic vacuolar compartments are embedded inside the protein storage vacuole of dry and germinating *Arabidopsis thaliana* seeds // *Plant Cell Physiol.* — 2011. — V. 52. — P. 1142–1152.
81. Garcia-Molina A., Andrrés-Coltras N., Perea-García A. et al. The intracellular *Arabidopsis* COPT5 transport protein is required for photosynthetic electron transport under severe copper deficiency // *Plant J.* — 2011. — V. 65. — P. 848–860.
82. Klaumann S., Nickolaus S. D., Furst S. H., Starck S. The tonoplast copper transporter COPT5 acts as an exporter and is required for interorgan allocation of copper in *Arabidopsis thaliana* // *New Phytol.* — 2011. — V. 92. — P. 393–404.
83. Fontes N., Gerys H., Delrot S. Grape Berry Vacuole: A Complex and Heterogeneous Membrane System Specialized in the Accumulation of Solutes // *Am. J. Enol. Vitic.* — 2011. — P. 270–278.
84. Schulz A., Beyhl D., Marten I. et al. Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2 // *Plant J.* — 2011. — V. 68. — P. 129–136.
85. Etxeberria E., Pozueta-Romero J., Gonzalez P. In and out of the plant storage vacuole // *Plant Sci.* — 2012. — V. 190. — P. 52–61.
86. Endler A., Meyer S., Schelbert S. et al. Identification of a vacuolar sucrose transporter in barley and *Arabidopsis* mesophyll cells by a tonoplast proteomic approach // *Plant Physiol.* — 2006. — V. 141. — P. 196–207.
87. Reinders A., Sivitz A. B., Starker C. G. et al. Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar

- sucrose transporter from *Lotus japonicus* // Plant Mol. Biol. — 2008. — V. 68 — P. 289–299.
88. Martinoia E., Meyer S., De Angeli A., Nagy R. Vacuolar Transporters in Their Physiological Context // Annu. Rev. Plant Biol. — 2012. — V. 63. — P. 183–213.
 89. Aluri S., Buettner M. Identification and functional expression of the *Arabidopsis thaliana* vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2007. — V. 104. — P. 2537–2542.
 90. Rea P. A., Li Z.-S., Lu Y.-P. et al. From vacuolar GS-X pumps to multispecific ABC transporters // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. — 1998. — V. 49. — P. 727–760.
 91. Marinova K., Pourcel L., Weder B. et al. The *Arabidopsis* MATE transporter TT12 acts as a vacuolar flavonoid/H⁺- antiporter active in proanthocyanidin-accumulating cells of the seed coat // Plant Cell. — 2007. — V. 19. — P. 2023–2038.
 92. Klein M., Martinoia E., Hoffmann-Thoma G., Weissenböck G. A membrane-potential dependent ABC-like transporter mediates the vacuolar uptake of rye flavone glucuronides: regulation of glucuronide uptake by glutathione and its conjugates // Plant J. — 2000. — V. 21. — P. 289–304.
 93. Liu G., Sanchez-Fernandez R., Li Z. S., Rea P. A. Enhanced multispecificity of *Arabidopsis* vacuolar multidrug resistance-associated protein-type ATP-binding cassette transporter, AtMRP2 // J. Biol. Chem. — 2001. — V. 276. — P. 8648–8656.
 94. Goodman C. D., Casati P., Walbot V. A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays* // Plant Cell. — 2004. — V. 16. — P. 1812–1826.
 95. Yazaki K., Shitan N., Sugiyama A., Takanashi K. Cell and molecular biology of ATP-binding cassette proteins in plants // Int. Rev. Cell Mol. Biol. — 2009. — V. 276. — P. 263–299.
 96. Song W.-Y., Park J., Mendoza-Corzat D. G. et al. Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABCC-type phytochelatin transporters // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2010. — V. 107. — P. 21187–21192.
 97. Shi J., Wang H., Schellin K. et al. Embryo-specific silencing of a transporter reduces phytic acid content of maize and soybean seeds // Nat. Biotechnol. — 2007. — V. 25. — P. 930–937.
 98. Nagy R., Grob H., Weder B. et al. The *Arabidopsis* ATP-binding cassette protein ATMRP5/ATABCC5 is a high-affinity inositol hexakisphosphate transporter involved in guard cell signaling and phytate storage // J. Biol. Chem. — 2009. — V. 284. — P. 33614–33622.
 99. Klein M., Geisler M., Suh S. J. et al. Disruption of AtMRP4, a guard cell plasma membrane ABCC-type ABC transporter, leads to deregulation of stomatal opening and increased drought susceptibility // Plant J. — 2004. — V. 39. — P. 219–236.
 100. Raichaudhuri A., Peng M., Naponelli V. et al. Plant vacuolar ATP-binding cassette transporters that translocate folates and antifolates in vitro and contribute to antifolate tolerance in vivo // J. Biol. Chem. — 2009. — V. 284. — P. 8449–8460.
 101. Maurel C. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties // FEBS Lett. — 2007. — V. 581. — P. 2227–2236.
 102. Paris N., Stanley C. M., Jones R. L., Rogers J. C. Plant cells contain two functionally distinct vacuolar compartments // Cell. — 1996. — V. 85. — P. 563–572.
 103. Gattolin S., Sorieul M., Frigerio L. Tonoplast intrinsic proteins and vacuolar identity // Biochem. Soc. Transact. — 2010. — V. 38. — P. 769–773.
 104. Frigerio L., Hinz G., Robinson D. G. Multiple vacuoles in plant cells: rule or exception? // Traffic. — 2008. — V. 9. — P. 1564–1570.
 105. Park M., Kim S. J., Vitale A., Hwang I. Identification of the Protein Storage Vacuole and Protein Targeting to the Vacuole in Leaf Cells of Three Plant Species // Plant Physiol. — 2004. — V. 134. — P. 625–639.
 106. Jiang J., Phillips T., Hamm C. et al. The protein storage vacuole: a unique compound organelle // J. Cell Biol. — 2001. — V. 155. — P. 991–1002.
 107. Martinez D. E., Costa M. L., Gomez F. M. et al. Senescence-associated vacuoles are involved in the degradation of chloroplast proteins in tobacco leaves // Plant J. — 2008. — V. 56. — P. 196–206.
 108. Gaxiola R. A., Li J., Undurraga S. et al. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2001. — V. 98. — P. 11444–11249.
 109. Palmgren M. G., Clemens S., Williams L. E. et al. Zinc biofortification of cereals: problems and solutions // Trends Plant Sci. — 2010. — V. 13. — P. 464–473.
 110. Singh B. R., Gupta S. K., Azaizeh H. et al. Safety of food crops on land contaminated with trace elements // J. Sci. Food Agric. — 2011. — V. 91. — P. 1349–1366.

**ТРАНСПОРТНЫЕ СИСТЕМЫ
ТОНОПЛАСТА РАСТИТЕЛЬНЫХ
ВАКУОЛЕЙ И ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИИ**

С. В. Исаенков

Институт пищевой биотехнологии
и геномики
НАН Украины,
Киев

E-mail: stan.isayenkov@gmail.com

В обзоре анализируется роль растительных вакуолей в жизнедеятельности растений, в частности в поддержании клеточного тургорного давления, хранении минералов и питательных веществ. Описаны главные механизмы транспорта через вакуолярную мембрану вакуоли. Приведены основные типы транспорта питательных веществ, тяжелых металлов, витаминов и органических соединений через тонопласт растительных вакуолей. Рассмотрены главные системы мембранного транспорта растительных вакуолей, их физиологические функции и даны характеристики наиболее известных транспортных протеинов вакуолей.

Обсуждаются значение и роль транспорта различных химических соединений в вакуоли для жизнедеятельности растения. Описаны главные типы растительных вакуолей и их роль в функционировании клетки. Рассматривается состояние современных исследований мембранного транспорта растительных вакуолей. Приведены примеры использования принципов и механизмов вакуолярного транспорта в различных областях биотехнологии растений. Очерчены перспективы новых направлений и подходов в развитии биотехнологии растений с применением разных типов вакуолей и систем мембранного вакуолярного транспорта.

Ключевые слова: вакуоль, тонопласт, мембранный транспорт, каналы, транспортеры, биотехнология.

**THE TONOPLAST TRANSPORT SYSTEMS
OF PLANT VACUOLES AND THEIR
POTENTIAL APPLICATION
IN BIOTECHNOLOGY**

S. V. Isayenkov

Institute of Food Biotechnology
and Genomics of National Academy
of Sciences of Ukraine,
Kyiv

E-mail: stan.isayenkov@gmail.com

The pivotal role of plant vacuoles in plant survival was discussed in the review. Particularly, the providing of cellular turgor, accumulation of inorganic osmolytes and nutrients are the primary tasks of these cellular organelles. The main mechanisms of tonoplast transport systems were described. The known transport pathways of minerals, heavy metals, vitamins and other organic compounds were classified and outlined. The main systems of membrane vacuolar transport were reviewed. The outline of the physiological functions and features of vacuolar membrane transport proteins were performed.

The physiological role of transport of minerals, nutrients and other compounds into vacuoles were discussed. This article reviews the main types of plant vacuoles and their functional role in plant cell. Current state and progress in vacuolar transport research was outlined. The examples of application for principles and mechanisms of vacuolar membrane transport in plant biotechnology were given. The perspectives and approaches in plant and food biotechnology concerning transport and physiology of vacuoles are discussed.

Key words: vacuole, tonoplast, membrane transport, channels, transporters, biotechnology.