



УДК 57.023 581.1

С. В. Ісаєнков, Ф. Й. М. Маатхаус

## Клонування та особливості клітинної локалізації калієвих каналів родини ТРК із тютюну

(Представлено академіком НАН України Я. Б. Блюмом)

*Досліджено особливості клітинної локалізації двох калієвих каналів родини ТРК з рослин тютюну. Послідовності кДНК NtTRK1a та NtTRK1b було клоновано у вектори для створення злитих з EYFP химерних білків. Завдяки транз'єнтній трансформації протопластів рослин NtTRK1a–EYFP та NtTRK1b–EYFP конструкціями було встановлено відмінності у клітинній локалізації NtTRK1a та NtTRK1b. Показано, що NtTRK1b локалізується у везикулярних структурах, що відрізняються від “класичних” літичних вакуоль.*

ТРК канали рослин відіграють важливу роль у широкому спектрі клітинних та фізіологічних процесів рослин. Вони є важливими регуляторами гомеостазу калію, тургорного тиску. ТРК канали беруть участь при формуванні відповіді на дію різноманітних типів абіотичного стресу [1]. Селективні по калію канали родини ТРК були знайдені в геномах багатьох видів рослин, а саме арабідопсису, рису, евкالیпту, тополі, ячменю та ін. [1]. За винятком однопорового AtKCO3, усі інші відомі калієві канали мають два порових домени з характерною для них послідовністю GYGD, що відповідає за селективність по калію та належать до родини ТРК (Two pore potassium channels) [1, 2]. Пізніше було показано, що навіть однопоровий AtKCO3 формує функціональні димери [3]. Усі канали родини ТРК є мембранними протеїнами та мають чотири трансмембранних домени. Завдяки наявності EF-доменив у С-терміналі в більшості представників ТРК каналів, ці білки можуть регулюватись іонами кальцію. Більшість представників каналів родини ТРК мають вакуолярну локалізацію. Наприклад, найбільш вивчений представник AtTRK1 з арабідопсису є чутливим до концентрації кальцію в цитозолі та рН і локалізований у тонопласті великих літичних вакуоль. Крім AtTRK1 подібний характер клітинної локалізації спостерігався і для інших представників родини ТРК, зокрема було показано, що AtTRK2 та AtTRK5 також локалізовані в мембрані літичних вакуоль [4, 5].

На відміну від “класичної” локалізації в тонопласті центральної вакуолі, деякі представники ТРК каналів локалізуються на мембранах інших типів. Зокрема, AtTRK4 з ара-

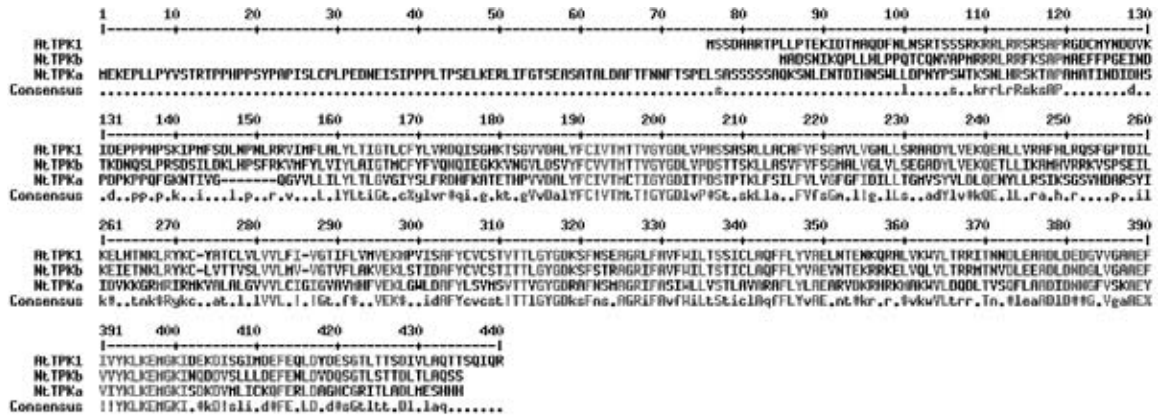


Рис. 1. Порівняльний аналіз амінокислотних послідовностей двох ізоформ ТРК каналів тютюну із AtTPK1 арабідопсису

бідопсису локалізується в плазматичній мембрані [6], а AtTPK3 — у тилакоїдах хлоропластів [3]. ТРК-канали рису (OsTPKa та OsTPKb) мають різну вакуолярну спеціалізацію. OsTPKa локалізується в тонопласті літичної вакуолі, а тонопласт протеїнових вакуоль містить OsTPKb [1, 7].

У рослин тютюну виявлено два представники родини каналів ТРК, і обидва вони отримали назву NtTPK1 [8, 9]. Для полегшення та запобігання непорозумінню в подальшому ми називатимемо ці канали NtTPK1a (GenBank accession № EU161633) та NtTPK1b (GenBank accession № AV353341). Функції, клітинна локалізація та фізіологічна роль цих каналів залишаються майже не вивченими. NtTPK1a було знайдено завдяки пошуку гомологів ТРК каналів із бази даних EST — послідовностей BY-2 клітин та RACE-ПЛР [8]. Шляхом біоінформаційного пошуку встановлено послідовність завдовжки 684 пар нуклеотидів, гомологічну до AtTPK2. Повна послідовність NtTPK1a була з'ясована завдяки застосуванню RACE-ПЛР. За своєю послідовністю NtTPK1a є більш подібним до AtTPK5 та AtTPK3 із арабідопсису (рис. 1). Цікавим фактом є те, що другий поровий мотив NtTPK1a може мати відмінності в канонічній послідовності YGGD, а саме варіації VHGD чи GHGD [8]. Активність NtTPK1a є чутливою до дії спермідину та сперміну. Рівень транскриптів NtTPK1a підвищується при дії солявого стресу чи осмотичного шоку [8]. Існує припущення, що NtTPK1a може брати участь у регуляції відповіді на гіперосмотичний шок [8]. Крім того, було показано, що рекомбінантний NtTPK1a локалізується в тонопласті вакуоль дріжджів. А білок, ген якого експресований під контролем 35S промотору, був ідентифікований у фракції білків тонопласта [8]. Це вказує на тонопластну локалізацію цього протеїну.

Клітинна локалізація іншого представника цієї родини в тютюні — NtTPK1b залишається невідомою. Функції цього каналу, ідентифікованого з рослин тютюну завдяки застосуванню ПЛР з дегенеративними праймерами, також невідомі [9]. Проте було показано, що рівень транскриптів NtTPK1b збільшується протягом клітинного поділу та зменшується за умови дефіциту ауксинів [9].

Метою нашого дослідження було клонування ТРК каналів тютюну, злитих із флуоресцентним білком EYFP, та з'ясування їх клітинної локалізації за допомогою конфокальної мікроскопії.

**Матеріали і методи.** кДНК для NtTPK1a та NtTPK1b були отримані шляхом ПЛР із зворотною транскрипцією із загальної РНК рослин тютюну. Кодуючі послідовності повної

довжини *NtTPK1a* та *NtTPK1b* без стоп-кодону були ампліфіковані за ПЛР із застосуванням специфічних праймерів, що містили відповідні сайти рестрикції. Для ампліфікації повної кодуєчої послідовності *NtTPK1a* використовували таку пару праймерів:

*NtTPK1aEcoRI\_for* gccaatcatgagagaagagcctcttct,  
*NtTPK1aSmaI\_rev* gccccgggatggtggctttccattagatc.

Для ампліфікації кодуєчої послідовності *NtTPK1b* було застосовано іншу пару праймерів:

*NtTPK1bXhoI\_for* gcctcgagatggcagacagcaacataaa,  
*NtTPK1bSmaI\_rev* gccccgggatgattgagcaagtgtca.

ПЛР проводили, використовуючи 20 нг кДНК, в об'ємі 50 мкл, що містила 1xPhusion HF ПЛР буфер, 200 мкМ дНТП суміші, 3% ДМСО та 1 мкл Phusion polymerase ("Finnzymes", Фінляндія). Програма ПЛР ампліфікації мала такі параметри: 98 °С 30 с; 36 циклів: 98 °С 10 с, 72 °С 30 с; 72 °С 10 хв. Ампліфіковані за допомогою ПЛР *NtTPK1*-фрагменти повної довжини були клоновані у вектор pART7-*EYFP* [7] за допомогою рестрикції ферментами *EcoRI* та *SmaI* для *NtTPK1a* і *XhoI* та *SmaI* для *NtTPK1b* (NEB, Великобританія) та лігування Т4-ДНК лігазою (NEB). Клоування *AtTPK1-EYFP* та *OsTPKb-EYFP* описано в наших попередніх роботах [5, 7]. Протопласти з коренів арабідопсису були ізольовані та трансформовані конструкціями pART7-*NtTPK1a/NtTPK1b-EYFP* відповідно до методики, описаної в роботі [7]. Аналіз флуоресценції репортерних *EYFP* протеїнів, злитих із *NtTPK1a* чи *NtTPK1b*, проводили за допомогою конфокальної скануючої мікроскопії (Zeiss LSM510 Meta). Перевірку флуоресценції *EYFP* протеїну виконували за допомогою лямбда-моду мікроскопа. Сигнали спектрально розділяли за допомогою заздалегідь прописаних і збережених спектрів автофлуоресценції та *EYFP*. Флуоресценцію *EYFP* у протопластах арабідопсису перевіряли через 18 год після трансформації. Загалом від 30 до 50 протопластів аналізували щодо флуоресценції та клітинної локалізації. Трансформацію та мікроскопічний аналіз протопластів повторювали тричі.

**Результати та їх обговорення.** У результаті проведення ПЛР були отримані кодуєчі послідовності відповідних *NtTPK1* калієвих каналів (див. рис. 1). Попри невизначеність рослинних тканин, в яких гени, що кодуєть ці канали, мають найвищий рівень експресії, застосування загальної РНК із молодих рослин тютюну для синтезу та ампліфікації кДНК відповідних генів цих каналів було успішним. Цілоком ймовірно, що гени цих каналів є досить активними в клітинах більшості типів тканин тютюну. Незважаючи на такий характер експресії генів вищезазначених каналів, ці білки істотно відрізняються за своєю амінокислотою послідовністю і цілоком ймовірно, що їх клітинні та фізіологічні функції є різними (рис. 2). Функціональні характеристики та особливості клітинної локалізації *NtTPK1a* ще недостатньо вивчені. На відміну від *NtTPK1a*, роль *NtTPK1b* у підтримуванні калієвого гомеостазу рослини, клітинна локалізація, профіль експресії та електрофізіологічні характеристики ніколи не вивчалися і залишаються невідомими. Тому подальші дослідження ролі та функцій цього каналу є вкрай необхідними.

Раніше вже було показано, що більшість представників ТРК каналів із арабідопсису та рису (*AtTPK1*, *AtTPK2*, *AtTPK5* та *OsTPKa*) локалізовані в тонопласті літичних вакуоль [4, 7, 10]. Для того щоб зрозуміти потенційну роль ТРК каналів у клітинах тютюну, було отримано та клоновано дві ізоформи ТРК, функції яких та клітинна локалізація остаточно ще не визначені. Дві повні послідовності, що кодуєть *NtTPK1a* та *NtTPK1b*, були ампліфіковані та вставлені в плазмідну конструкцію для транз'єнтної експресії химерного злитого *EYFP* білка. Створені ДНК конструкції *NtTPK1a-EYFP* та *NtTPK1b-EYFP* ви-

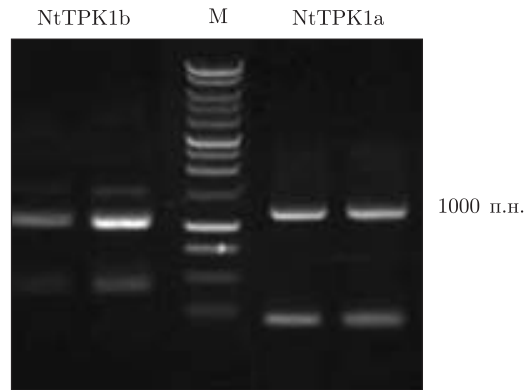


Рис. 2. Результати ампліфікації повних кодуючих послідовностей NtTPK1a/NtTPK1b із кДНК загальної РНК рослин тютюну

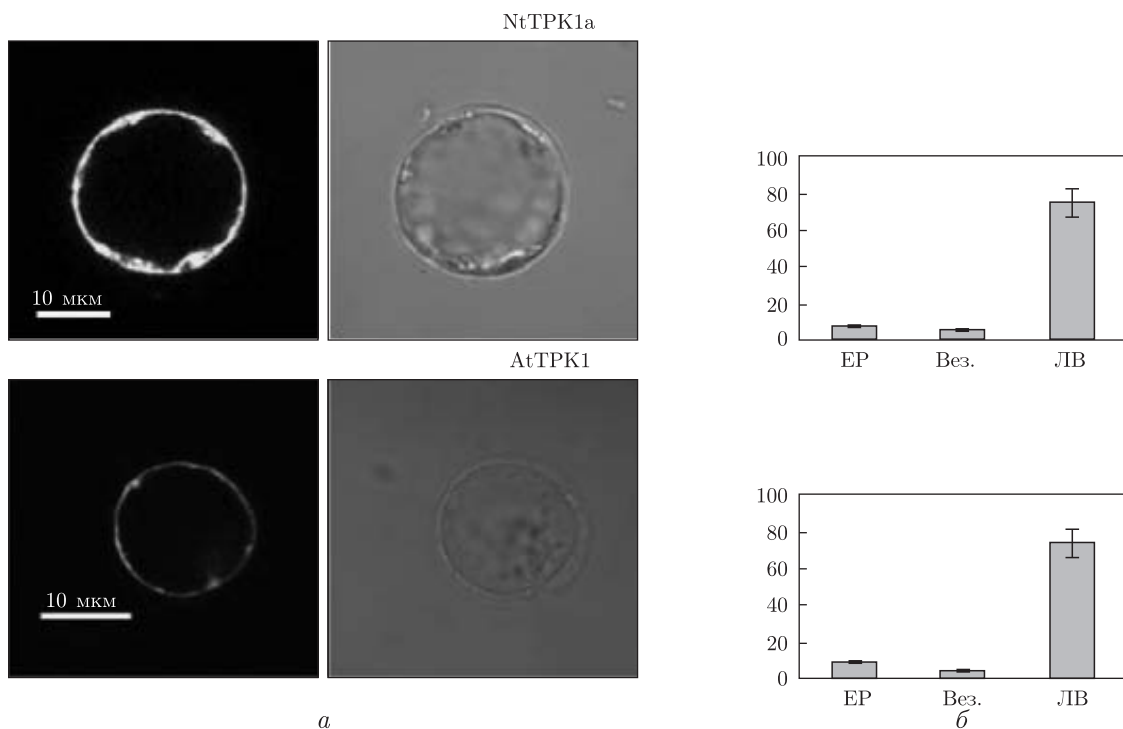


Рис. 3. Клітинна локалізація NtTPK1a порівняно із AtTPK1 у протопластах арабідопсису.

*a* — EYFP-флуоресценція в протопластах арабідопсису, що були трансформовані плазмідними конструкціями *NtTPK1a/AtTPK1-EYFP*, спостерігається в центральних літичних вакуолях (ЛВ). AtTPK1-EYFP є специфічним маркером літичних вакуоль.

*б* — розподіл флуоресценції NtTPK1a та AtTPK1-залежної флуоресценції в різних частинах протопласта, що був трансформований *NtTPK1a/AtTPK1-EYFP* плазмідними конструкціями. Підрахунок розподілу флуоресценції по органелах проводили для трьох незалежних подій трансформації протопластів

користували для трансформації протопластів арабідопсису. У ході аналізу протопластів трансформованих *NtTPK1a-EYFP* було виявлено, що EYFP-флуоресценція спостерігається по периметру великої літичної вакуолі і за характером вона подібна до флуоресценції протопластів трансформованих AtTPK1-EYFP (рис. 3). Залишковий незначний рівень флуоресценції відмічений і в ЕР, але більшість химерного злитого NtTPK1a-EYFP виявлено

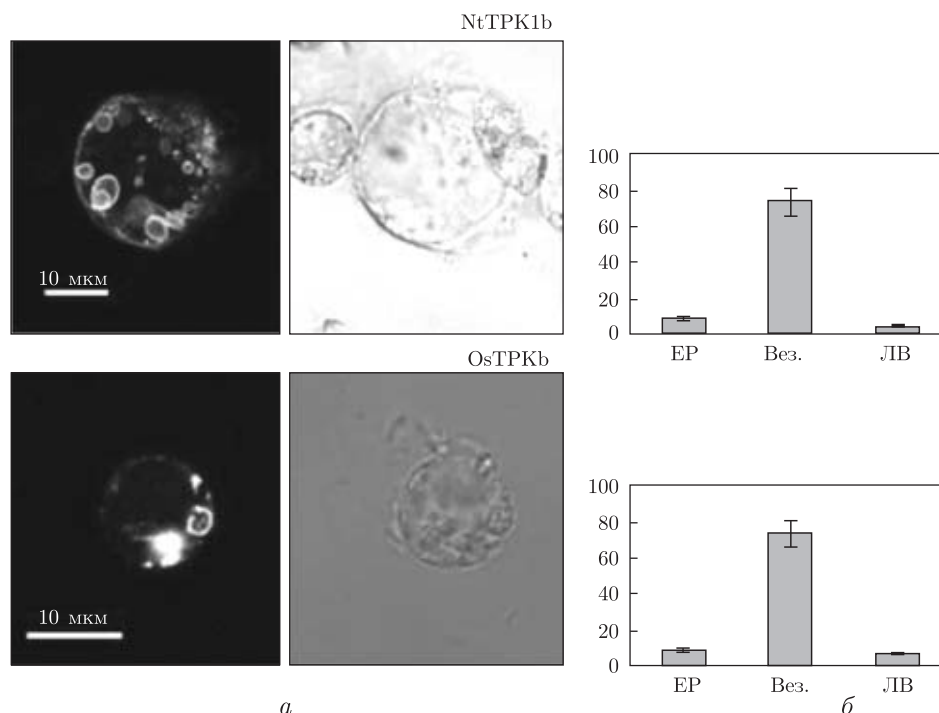


Рис. 4. Клітинна локалізація NtTPK1b порівняно із OsTPKb у протопластах арабідопсису. *а* — ЕУФР-флуоресценція в протопластах арабідопсису, що були трансформовані плазмідними конструкціями *NtTPK1b/OsTPKb-EYFP*, спостерігається в малих везикулярних утвореннях, подібних до протеїнових вакуоль. OsTPKb-EYFP є специфічним маркером протеїнових вакуоль. *б* — розподіл флуоресценції NtTPK1b та OsTPKb-залежної флуоресценції в різних частинах протопласта, що був трансформований *NtTPK1b/OsTPKb-EYFP* плазмідними конструкціями. Підрахунок розподілу флуоресценції по органелах проводили для трьох незалежних подій трансформації протопластів

в тонопласті літичних вакуоль. Слід зауважити, що AtTPK1 із арабідопсису локалізується в тонопласті літичних вакуоль [4, 5]. Подібність до AtTPK1-EYFP в клітинній локалізації химерного білка NtTPK1a-EYFP вказує на те, що NtTPK1a належить до системи тонопласта літичної вакуолі. Більш того, наші дані підтверджують раніше висунуте припущення, що цей іонний канал локалізується на мембрані літичних вакуоль, бо саме він був ізольований із фракції білків тонопласта [8]. Експресія *NtTPK1a* у дріжджових клітинах також підтверджує вакуолярну локалізацію цього каналу [8]. Зазначимо, що вакуоль дріжджових клітин та лізосоми тваринних клітин є аналогами літичної вакуолі в рослині. Всі ці клітинні органели мають кисле рН та відіграють літичну функцію [11].

При трансформації протопластів химерним білком NtTPK1b-EYFP відмічалася зовсім інша картина порівняно з NtTPK1a-EYFP (рис. 4). Флуоресценція химерного NtTPK1b-EYFP спостерігалась у малих везикулярних структурах, що іноді дуже важко виділити при аналізі протопластів при видимому світлі, але при застосуванні флуоресцентного світла ці структури демонструють чітку і сильну флуоресценцію (див. рис. 3). Подібний характер клітинної локалізації був показаний для протопластів рослин, що були трансформовані геном злитого білка OsTPKb-EYFP [7]. Відомо, що OsTPKb є білковим маркером тонопласта білкових вакуоль, які є унікальними структурами рослинних клітин. Цілком ймовірно, що NtTPK1b має локалізацію в тонопласті білкової вакуолі. Можливо, що саме NtTPK1b виконує функції калієвого каналу в білкових вакуолях клітин тютюну.

Таким чином, наші дані свідчать про те, що дві ізоформи ТРК каналів із тютюну, а саме NtТРК1а та NtТРК1b мають різну клітинну локалізацію. Порівнюючи клітинні профілі флуоресценції цих химерних білків, злитих із ЕУФР, з великою часткою вірогідності можна допустити, що ці два калієві канали тютюну мають різну вакуолярну спеціалізацію. Слід зазначити, що отримані дані щодо вакуолярної локалізації NtТРК1а підтверджують припущення про те, що цей канал, як більшість ТРК каналів інших рослин, локалізується в тонопласті літичної вакуолі.

Майже зовсім не вивченими залишаються клітинні та фізіологічні функції NtТРК1b. Згідно з отриманими нами даними, скоріше за все цей канал локалізується в малих везикулярних структурах. Є велика частка вірогідності, що саме цей канал є специфічним для мембрани білкових вакуоль. Зважаючи на вищесказане дослідження клітинної локалізації потрібно продовжувати. Необхідно, по-перше, визначити реакцію рН цих малих везикулярних утворень, по-друге, провести дослідження із колокалізації цього каналу з іншими маркерними білками для окремих клітинних структур, по-третє, з'ясувати його фізіологічну роль та електрофізіологічні характеристики. Відомо, що цей калієвий канал задіяний у клітинному поділі, але, на наш погляд, його роль у клітині та рослині в цілому може бути набагато ширшою.

Наші дані свідчать про те, що попри велику спорідненість цих каналів до AtТРК1 [1], NtТРК1а та NtТРК1b мають різну субклітинну локалізацію, NtТРК1b накопичується у везикулярних структурах, відмінних від “класичних” літичних вакуоль.

1. *Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M.* Membrane localisation diversity of TPK channels and their physiological role // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – **6**. – P. 1201–1205.
2. *Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M.* Plant vacuolar ion channels // *FEBS Lett.* – 2010. – **584**. – P. 1982. – 1988.
3. *Carraretto L., Formentin E., Teardo E. et al.* Thylakoid-located Two-Pore K<sup>+</sup> Channel Controls Photosynthetic Light Utilization in Plants // *Science.* – 2013. – **342**. – P. 114–118.
4. *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. – **48**. – P. 296–306.
5. *Gobert A., Isayenkov S., Voelker C., Czempinski K., Maathuis F. J. M.* The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K<sup>+</sup> conductance and plays a role in K<sup>+</sup> homeostasis // *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – **104**. – P. 10726–10731.
6. *Becker D., Geiger D., Dunkel M. et al.* AtTPK4, an Arabidopsis tandem-pore K<sup>+</sup> channel, poised to control the pollen membrane voltage in a pH- and Ca<sup>2+</sup>-dependent manner // *Ibid.* – 2004. – **101**. – P. 15621–15626.
7. *Isayenkov S., Isner J. C., Maathuis F. J. M.* Rice two-pore K<sup>+</sup> channels are expressed in different types of vacuoles // *Plant Cell.* – 2011. – **23**. – P. 756–768.
8. *Hamamoto S., Marui J., Matsuoka K. et al.* Characterization of a tobacco TPK-type K<sup>+</sup> channel as a novel tonoplast K<sup>+</sup> channel using yeast tonoplasts // *J. Biol. Chem.* – 2008. – **283**. – P. 1911. – 1920.
9. *Sano T., Kutsuna N., Becker D. et al.* Outward-rectifying K<sup>+</sup> channel activities regulate cell elongation and cell division of tobacco BY-2 cells // *Plant J.* – 2009. – **57**. – P. 55–64.
10. *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. – **52**. – P. 449–459.
11. *Ісаєнков С. В.* Особливості органельного розпізнавання, везикулярного транспорту та фізіологічна роль рослинних вакуоль // *Цитология и генетика.* – 2014. – **48**. – P. 71–82.

ДУ “Інститут харчової біотехнології та геноміки” НАН України, Київ  
Університет м. Йорк, Великобританія

Надійшло до редакції 11.06.2014

С. В. Исаенков, Ф. Й. М. Маатхаус

### Клонирование и особенности клеточной локализации калиевых каналов семейства ТРК из табака

*Исследованы особенности клеточной локализации двух калиевых каналов семейства ТРК из растений табака. Последовательности κДНК NtTPK1a и NtTPK1b были клонированы в векторы для создания слитых с EYFP химерных белков. Благодаря транзientной трансформации протопластов растений NtTPK1a-EYFP и NtTPK1b-EYFP конструкциями были установлены отличия в клеточной локализации NtTPK1a и NtTPK1b. Показано, что NtTPK1b локализуется в везикулярных структурах, которые отличаются от “классических” литических вакуолей.*

S. V. Isayenkov, F. J. M. Maathuis

### The cloning and peculiarities of the cellular localization of tobacco TPK potassium channels

*The characters of the subcellular localization of two TPK potassium channels from Tobacco were investigated. In order to create EYFP fusions, the cDNAs of NtTPK1a and NtTPK1b were cloned into specific vectors. The transient transformation of plant protoplast by created constructs revealed the differences in the subcellular localization for two TPK channels from tobacco. The localization of NtTPK1b in vesicular structures that are different from “typical” lytic vacuoles was detected.*