

STRUKTURA I REGULACJA AKTYWNOŚCI ROŚLINNYCH WAKUOLARNYCH H⁺-ATPaz

STRUCTURE AND REGULATION OF PLANT VACUOLAR H⁺-ATPases

Katarzyna KABAŁA

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie: Roślinne wakuolarnie H⁺-ATPazy (V-ATPazy) stanowią klasę białek błonowych, których podstawową fizjologiczną funkcją jest pompowanie protonów do wnętrza wakuoli przy udziale energii pochodzącej z rozkładu ATP, a w konsekwencji generowanie siły protonomotorycznej i napędzanie procesów transportu wtórnego przez tonoplast. V-ATPazy należą do filogenetycznie najstarszych i najbardziej skomplikowanych pod względem struktury pomp protonowych. Zbudowane są z podjednostek zgrupowanych w dwa sektory: peryferyjny V₁, składający się z 8 podjednostek A-H, odpowiedzialny za hydrolizę ATP oraz błonowy V₀, w obrębie którego wyróżnia się podjednostki a, c, c'', d i e, uczestniczące w transporcie protonów. Analiza genomu *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnika) wykazała, że 13 podjednostek V-ATPazy kodowane jest przez 28 genów *VHA*, co sugeruje, że poszczególne izoformy podjednostek i różne kompleksy V-ATPazy mogą funkcjonować w określonych organach, tkankach, w różnych warunkach fizjologicznych czy stanach rozwojowych. Aktywność roślinnych V-ATPaz podlega regulacji zarówno na poziomie genetycznym, jak i potranslacyjnym, w wyniku odwracalnej fosforylacji, modyfikacji oksydoredukcyjnych lub modyfikacji indukowanych zmianami w składzie lipidowym błony. W odpowiedzi na czynniki stresowe aktywność enzymu może być modulowana zarówno na poziomie ekspresji poszczególnych podjednostek, jak i zmian w strukturze, dlatego V-ATPazę określa się często mianem „eko-enzymu”. Liczne badania potwierdzają, że V-ATPaza uczestniczy w adaptacji roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych, takich jak: zasolenie, obecność metali ciężkich czy niska temperatura.

Słowa kluczowe: V-ATPaza, pompa protonowa, podjednostki VHA.

Summary: Plant vacuolar H⁺-transporting ATPases (V-ATPases) are ATP-driven proton pumps, located mainly in the vacuolar membrane, that generate proton motive force used to energize secondary active transports operating at the tonoplast. V-ATPases are the oldest and most complicated proton pumps found in plant cells. Enzyme subunits are divided into two major domains, the catalytic peripheral V₁ domain responsible for ATP hydrolysis and the membrane-integral V₀ domain responsible for H⁺ translocation. V₁ sector consists of eight subunits named A-H whereas V₀ complex is composed of a, c, c'', d, and e subunits. In *Arabidopsis thaliana*, the 13 V-ATPase subunits are encoded by a total of 28 *VHA* genes suggesting the presence of individual subunit isoforms and different V-ATPase complexes specific to plant organs, tissues or physiological and developmental stages. The activity of plant V-ATPases is

subjected to regulation at both the transcriptional and posttranslational levels. Potential mechanisms of biochemical regulation include reversible phosphorylation, redox regulation and modification induced by changes in the lipid composition of membrane. It has been postulated that under environmental stress the V-ATPase functions as a stress response enzyme, undergoing moderate changes in expression of subunits and modulation of enzyme activity. Since it was involved in ecophysiological adaptations at the molecular level, the V-ATPase was denominated an „eco-enzyme”. Numerous studies have confirmed an essential role of the V-ATPase in plant tolerance to environmental stresses including salinity, heavy metals and low temperature.

Key words: V-ATPase, proton pump, VHA subunits.

WPROWADZENIE

Pompy protonowe to wyspecjalizowana grupa enzymatycznych białek błonowych, które przy użyciu energii pochodzącej z wiązań chemicznych katalizują wektorowy transport protonów, przyczyniając się do wytworzenia gradientu potencjału elektrochemicznego H^+ przez błony. Gradient ten (siła protonomotoryczna, $\Delta\mu_{H^+}$) wykorzystany jest następnie jako źródło energii dla procesów transportu wtórnego. Do roślinnych pomp protonowych zaliczane są plazmolemowe H^+ -ATPazy oraz wakuolarne H^+ -ATPazy (V-ATPazy) i H^+ -pirofosfatazy (V-PPazy). Spośród wymienionych, V-ATPazy należą do filogenetycznie najstarszych i najbardziej skomplikowanych pod względem struktury [1].

V-ATPazy odkryto w błonie wakuolarnej (stąd ich nazwa), później zidentyfikowane zostały w różnych endomembranach, we wszystkich organizmach eukariotycznych. W komórkach zwierzęcych V-ATPazy funkcjonują w błonach wielu organelli, m.in. w endosomach, lizosomach, aparacie Golgiego i pęcherzykach klatrynowych, pełniąc istotną rolę w procesach endocytozy, sekrecji czy fuzji pęcherzyków. Poza tym V-ATPazy mogą występować w błonie komórkowej niektórych wyspecjalizowanych komórek, np. w śródbłonku naczyń krwionośnych, nerkowych kanalikach zbiorczych, osteoklastach, makrofagach czy neutrofilach [2, 3].

Badania roślinnych V-ATPaz rozpoczęły się około 30 lat temu, kiedy po raz pierwszy wykazano aktywność pompowania protonów w wyizolowanych pęcherzykach mikrosomalnych. Pomimo że od tego czasu obecność V-ATPaz stwierdzona została w systemie endomembranowym różnych kompartmentów komórek roślinnych, enzym ten wciąż postrzegany jest jako białko charakterystyczne dla błony wakuolarnej. Podejście takie wynika z faktu, że brak jak dotąd dowodów potwierdzających funkcjonowanie V-ATPaz jako pomp protonowych w innych kompartmentach oprócz wakuoli. Obecność enzymu w innych endomembranach, np. w retikulum endoplazmatycznym czy sieci trans aparatu Golgiego, wydaje się być związana raczej z procesem łączenia podjednostek obu sektorów i transportu złożonej struktury enzymu do ostatecznego miejsca przeznaczenia, czyli błony wakuolarnej (tonoplastu). Nadal jednak pozostaje otwartą kwestia, czy kompleks V-ATPazy w tych kompartmentach jest funkcjonalnie aktywny i generuje gradient protonów przez błonę, czy też utrzymywany jest w stanie nieaktywnym poprzez nieznaną dotąd mechanizm [4].

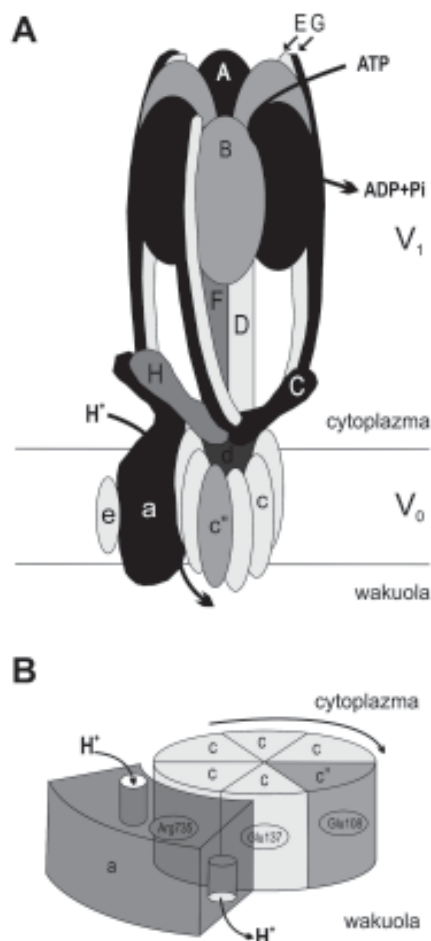
Pod względem budowy i mechanizmu działania V-ATPazy wykazują wiele cech wspólnych z F-ATPazami występującymi w mitochondriach i chloroplastach oraz A-ATPazami archebakteryjnymi, co sugeruje, że białka te mają wspólne pochodzenie, mimo iż różnią się funkcją. ATPazy typu F i A związane są z błonami zaangażowanymi w przemiany energetyczne i w przeciwieństwie do V-ATPaz działają jako syntazy ATP, które wykorzystują energię zgromadzoną w wygenerowanym wcześniej gradiencie jonowym przez błonę do syntezy ATP [5].

STRUKTURA V-ATPazy

Roślinna V-ATPaza jest kompleksem złożonym z kilkunastu podjednostek (ryc. 1A), zgrupowanych w dwa sektory: peryferyjny, katalityczny V_1 , odpowiedzialny za hydrolizę ATP i integralnie związany z błoną V_0 , bezpośrednio uczestniczący w transporcie protonów. Sektor V_1 zbudowany jest z 8 podjednostek (A, B, C, D, E, F, G, H) o masach molekularnych 70–12 kDa. Natomiast w budowie sektora V_0 wyróżnia się 5 podjednostek (a, c, c', d, e), o masach molekularnych 100–8 kDa. W komórkach zwierzęcych sektor błonowy V-ATPazy zawiera dodatkowo podjednostkę c' [2, 6, 7].

Pierwsze badania strukturalne enzymu przeprowadzone z użyciem mikroskopu elektronowego wykazały, że podjednostki sektora V_1 tworzą strukturę *head and stalk* [6]. Część katalityczną stanowi heksamer składający się z ułożonych naprzemian trzech podjednostek A (~70 kDa) i trzech podjednostek B (~55 kDa), które tworzą 6 miejsc wiążących nukleotydy. Miejsca te zlokalizowane są na powierzchniach zetknięcia obu typów podjednostek. Trzy z nich, w których tworzeniu w większym stopniu uczestniczą reszty aminokwasowe podjednostek A, są miejscami katalitycznymi, w których zachodzi hydroliza ATP. Pozostałe trzy, zlokalizowane w głównie na podjednostkach B, pełnią prawdopodobnie funkcję regulatorową [2]. Region odpowiedzialny za połączenie domen katalitycznych z sektorem błonowym ma ogromne znaczenie dla sprzężenia transportu protonów z hydrolizą ATP i regulacji aktywności enzymu. Najnowsze trójwymiarowe analizy V-ATPazy potwierdziły, że pozostałe elementy sektora V_1 zaangażowane są w łączenie miejsc katalitycznych z sektorem V_0 . Oprócz podjednostek D (~29 kDa) i F (~14 kDa), które formują centralne połączenie, istnieją trzy dodatkowe połączenia peryferyjne między podjednostkami B a domeną błonową. Tworzą je głównie podjednostki E (~26 kDa) i G (~12 kDa), z których każda obecna jest w trzech kopiach w jednej cząsteczce enzymu. Obok tych dwóch polipeptydów w tworzeniu peryferyjnych połączeń uczestniczy podjednostka C (~42 kDa) łącząca się z podjednostkami E dwóch peryferyjnych połączeń oraz podjednostka H (~50 kDa), która współtworzy trzecie z połączeń peryferyjnych. Można zatem przyjąć, że struktura sektora V_1 zgodna jest ze stechiometrią $A_3B_3CDE_3FG_3H$ [8, 9, 10].

Centralnym elementem sektora błonowego V_0 są podjednostki c i c', wysoce hydrofobowe, homologiczne względem siebie. Podjednostki c (~16 kDa) mają 4



RYCINA 1. **Budowa i mechanizm działania V-ATPazy.** **A. Model strukturalny V-ATPazy:** V-ATPaza jest kompleksem kilkunastu podjednostek zgrupowanych w dwa sektory: peryferyjny V_1 , odpowiedzialny za hydrolizę ATP, oraz błonowy V_0 , zaangażowany w transport protonów. W budowie sektora V_1 wyróżnia się 8 podjednostek, A–H. W skład sektora V_0 wchodzi pierścień proteolipidowy, zbudowany z podjednostek c i c' , oraz podjednostki a , d i e (wg Muench i in. [10], zmodyfikowane); **B. Mechanizm transportu protonów przez podjednostki sektora V_0 :** Transbłonowa domena podjednostki a tworzy dwa kanały. Pierwszy z nich służy do przenoszenia protonów z cytoplazmy do podjednostek proteolipidowych c i c' . Po rotacji pierścienia proteolipidowego protony uwalniane są przez drugi kanał do wnętrza wakuoli (wg Cipriano i in. [2], zmodyfikowane)

FIGURE 1. **Structure and mechanism of the V-ATPase.** **A. Schematic model of the V-ATPase:** Enzyme subunits are divided into two major domains, the catalytic peripheral V_1 domain responsible for ATP hydrolysis and the membrane-integral V_0 domain responsible for H^+ translocation. V_1 sector consists of eight subunits named A–H. V_0 complex is composed of the proteolipid ring (subunits c and c') and a , d , and e subunits (according to Muench et al. [10], modified). **B. The mechanism of proton transport through V_0 :** Transmembrane domain of subunit a forms two hemi-channels, cytoplasmic and luminal, which allow protons to reach and to leave, respectively, the proteolipid subunits c and c' (according to Cipriano et al. [2], modified)

transbłonowe domeny, natomiast nieco większy polipeptyd c' (~18 kDa) zawiera 5 transbłonowych helis. Podjednostki te tworzą w błonie pierścień proteolipidowy, w skład którego wchodzi zazwyczaj jedna kopia c' oraz 5 kopii podjednostki c (w zwierzęcych V-ATPazach występuje dodatkowo jedna kopia podjednostki c'). Podjednostka d (~40 kDa), o naturze hydrofilowej, wiąże się silnie z cytoplazmatyczną powierzchnią pierścienia proteolipidowego i służy jako miejsce łączenia podjednostek D i F z sektorem V_0 . Podjednostka a (~100 kDa) jest transbłonowym białkiem zbudowanym z 50 kDa cytoplazmatycznej domeny N-końcowej oraz 50 kDa hydrofobowej domeny C-końcowej, tworzącej 8–9 transbłonowych helis. Razem z podjednostkami proteolipidowymi uczestniczy ona w transporcie protonów. Poza tym domena cytoplazmatyczna podjednostki a , razem z podjednostką H , bierze udział w formowaniu jednego z peryferyjnych połączeń V_1 z V_0 . Podjednostka e (~8 kDa), tworząca dwie transbłonowe helisy, jest najmniejszym spośród elementów strukturalnych V-ATPazy o niesprecyzowanej jak dotąd funkcji [2, 7, 11].

Wyniki badań proteomicznych błony wakuolarniej, przeprowadzone w ostatnich latach, były ogromnym zaskoczeniem, bowiem w tonoplaście komórek roślinnych nie stwierdzono obecności podjednostek c'' i e. Oba polipeptydy zidentyfikowano natomiast w retikulum endoplazmatycznym i/lub w aparacie Golgiego. Sugeruje to, że podjednostki c'' i e nie są elementami strukturalnymi funkcjonalnego kompleksu V-ATPazy, a ich funkcja związana jest raczej z procesem łączenia poszczególnych podjednostek w ostateczny kompleks enzymatyczny i/lub kierowania go do miejsca docelowego [4, 12].

MECHANIZM DZIAŁANIA ENZYMU – MODEL ROTOR-STATOR

V-ATPaza funkcjonuje w błonie jako molekularny motor, w którym podjednostki D i F razem z podjednostką d oraz pierścieniem proteolipidowym (c, c'') tworzą rotor, obracający się wokół własnej osi. Natomiast podjednostki katalityczne (A i B) oraz podjednostki C, E, G, H i a, tworzące peryferyjne połączenia, należą do elementów nieruchomych, stanowiących stator stabilizujący strukturę. Energia chemiczna uwalniana w wyniku hydrolizy ATP w miejscach katalitycznych w sektorze V_1 ulega transformacji w energię mechaniczną (sprężenie chemomechaniczne), czyli indukuje rotację podjednostek D, F i d, a następnie pierścienia proteolipidowego. Ruch rotacyjny pierścienia względem nieruchomej części sektora błonowego (podjednostka a) prowadzi, w konsekwencji, do pompowania protonów z cytoplazmy do wnętrza wakuoli [2, 13].

W przenoszeniu protonów przez błonę uczestniczą bezpośrednio podjednostki proteolipidowe. Każda z nich zawiera pojedynczą resztę kwasu glutaminowego (Glu w pozycji 137 w podjednostce c i 108 w podjednostce c'') z grupą karboksylową, która ulega protonacji i przytrzymuje proton podczas rotacji pierścienia. Podjednostka a sektora V_0 tworzy w błonie dwa kanały, z których jeden odpowiedzialny jest za doprowadzenie protonów z cytoplazmy do grup karboksylowych na podjednostkach c i c'', a drugi umożliwia ich uwalnianie do lumenu wakuolarnego po obrocie pierścienia proteolipidowego (ryc. 1B). Wykazano, że reszta argininy w transbłonowej helisie 7 podjednostki a (Arg w pozycji 735) jest istotna dla aktywności transportu protonów przez błonę. Reszta ta wchodzi w interakcję z uprotonowaną grupą karboksylową podjednostek proteolipidowych, co stabilizuje grupę karboksylową w formie ujemnie naładowanej i powoduje uwolnienie protonu [2, 13].

Odkrycie na przełomie lat 80. i 90. ubiegłego stulecia specyficznych inhibitorów V-ATPazy miało kluczowe znaczenie dla badań nad tym enzymem, gdyż umożliwiło jego funkcjonalną identyfikację w wielu wyspecjalizowanych komórkach i tkankach. Opisano wówczas dwa podobne strukturalnie związki, bafilomycynę i konkanamycynę, należące do antybiotyków z grupy makrolidowych, których inhibitorowy wpływ polega na hamowaniu rotacji pierścienia proteolipidowego, zatem miejscem działania tych związków jest sektor błonowy V_0 . Wyniki najnowszych badań wskazują, że inhibitor przyłącza się do powierzchni pierścienia proteolipidowego pomiędzy 1 i

2 transbłonową helisą jednej podjednostki c a 4 transbłonową helisą sąsiadującej podjednostki c. Wiązanie antybiotyku do podjednostek c zachodzi prawdopodobnie wówczas, gdy kontaktują się one z podjednostką a. Badacze sugerują, że podjednostka a uczestniczy również w tworzeniu miejsca wiązania. Do nowo zidentyfikowanych inhibitorów V-ATPazy należą archazolidy z grupy makrolaktonów wytwarzanych przez miksobakterie oraz pochodne indolu. Podobnie jak w przypadku bafilomycyny i konkanamycyny, miejscem interakcji tych inhibitorów są transbłonowe fragmenty podjednostek c sektora V_0 , co wskazuje na podobny mechanizm ich działania [14, 15].

W blokowaniu rotacji pierścienia proteolipidowego i tym samym hamowaniu transportu protonów efektywne są także niespecyficzne inhibitory, wśród nich DCCD (N,N'-dicykloheksylokarbodiimid) i jego pochodne. DCCD kowalencyjnie modyfikuje grupy karboksylowe reszt kwasu glutaminowego zaangażowane w przenoszenie protonów w podjednostkach proteolipidowych c. Już interakcja między pojedynczą podjednostką c w kompleksie V-ATPazy a cząsteczką DCCD jest wystarczająca, by całkowicie zablokować aktywność enzymu. Taki mechanizm działania potwierdza, że enzym sekwencyjnie wykorzystuje każdą z podjednostek proteolipidowych w trakcie cyklu katalitycznego [6, 13].

GENETYCZNA REGULACJA V-ATPazy – IZOFORMY PODJEDNOSTEK VHA

W celu ujednolicenia nomenklatury genów kodujących poszczególne podjednostki roślinnych V-ATPaz w 2002 roku zaproponowano, by identyfikowane geny nazywać *VHA-x*, gdzie x oznacza literowy symbol podjednostki. Analiza genomu *A. thaliana* wykazała, że 13 podjednostek, tworzących strukturę wakuolarną ATPazy, kodowane jest przez 28 genów. Większość podjednostek sektora V_1 kodują pojedyncze geny, wyjątek stanowią podjednostki B, E i G, każda mająca 3 izoformy. Natomiast wszystkie podjednostki sektora V_0 kodowane są przez co najmniej 2 geny. Zidentyfikowano 3 izogeny dla podjednostki a, 5 dla podjednostki c oraz po 2 dla podjednostek c', d i e. Całkowita liczba zidentyfikowanych dotąd genów kodujących V-ATPazę waha się od 14 u *Chlamydomonas reinhardtii* (zawłotni) do 54 u *Glycine max* (soi) [4, 7].

Kompleksowa analiza wzoru ekspresji czterech podjednostek enzymu, VHA-B, VHA-E, VHA-G i VHA-a, z których każda reprezentowana jest przez trzy izogeny w genomie *A. thaliana*, potwierdziła, że poziomy ekspresji poszczególnych izoform w obrębie podjednostek znacznie się różnią, sugerując specyficzną regulację w obrębie tkanek i organów rośliny już w warunkach kontrolnych. Spośród izoform podjednostki E, VHA-E1 jest dominującą w pędach, VHA-E3 w korzeniach, a VHA-E2 w ziarnach pyłku oraz kwiatach. Podobnie w obrębie izoform podjednostki G, VHA-G1 i VHA-G2 występują w korzeniach i pędach w podobnej ilości, podczas gdy ekspresja VHA-G3 jest skrajnie niska w większości organów (wyjątek stanowią kwiaty oraz ziarna pyłku). VHA-B3 i VHA-a3 są najobficiej występującymi izoformami podjednostek B i a, zarówno w pędach jak i korzeniach, jednak wzór

ekspresji izoform podjednostki a nie wykazuje specyficzności organowej. Dwie immunologicznie wyodrębnione izoformy podjednostki E u *Pisum sativum* (grochu) także wykazują odmienną specyficzność tkankową, a kompleksy V-ATPazy, zawierające w swej strukturze izoformę VHA-E1 bądź VHA-E2, charakteryzują się odmiennymi właściwościami katalitycznymi. Analizy histochemiczne izoform podjednostki c u *A. thaliana* pokazały, że VHA-c1 i VHA-c2 podlegają ekspresji we wszystkich organach, natomiast poziom ekspresji VHA-c3 jest bardzo niski lub niewykrywalny w większości organów u tej rośliny, poza silną ekspresją w wierzchołkach wzrostu pędu i korzeni oraz w ziarnach pyłku [1, 16, 17].

Wyniki analiz immunocytochemicznych sugerują obecność izoform podjednostek V-ATPazy specyficznych dla organelli komórkowych. Rozmieszczenie podjednostek VHA-a u *A. thaliana* jest bardzo podobne jak w komórkach *Saccharomyces cerevisiae* (drożdży): VHA-a2 i VHA-a3 zlokalizowano w tonoplazmie, a VHA-a1 w strukturach Golgiego [1, 16].

Powszechnie uważa się, że izoformy VHA mogą spełniać odrębne funkcje w roślinach i różne kompleksy V-ATPazy, tzw. izotypy, mogą funkcjonować w różnych warunkach fizjologicznych. Ekspresja izoform podjednostek V-ATPazy u *A. thaliana* podlega regulacji pod wpływem stresów abiotycznych. Wysoka temperatura i susza powodują wyraźne zmiany w poziomie transkryptów izoform podjednostek E, G i a zarówno w liściach jak i w korzeniach. Natomiast stres solny i stres osmotyczny nie wpływają istotnie na ekspresję podjednostek V-ATPazy, z wyjątkiem VHA-B2, której poziom dwukrotnie wzrasta. Stres solny w odmienny sposób modyfikuje ekspresję dwóch izoform podjednostki A zidentyfikowanych u *Lycopersicon esculentum* (pomidora). VHA-A1 jest obecna we wszystkich organach, włączając korzenie, liście, łodygi, kwiaty i owoce, a jej ilość w liściach zwiększa się dwukrotnie w odpowiedzi na zasolenie. VHA-A2 występuje wyłącznie w korzeniach i w mniejszych ilościach w dojrzałych owocach, jednak jej ekspresja nie zmienia się pod wpływem zasolenia [1, 16, 17].

Regulacja na poziomie transkrypcji genów jest ważnym mechanizmem, który umożliwia dostosowanie aktywności V-ATPazy zarówno do panujących warunków środowiskowych, jak i aktualnych potrzeb rozwojowych roślin. Wyniki badań sugerują, że podjednostki kodowane przez kilka izogenów mają większą skłonność do zmian na poziomie transkrypcji pod wpływem działających czynników niż polipeptydy kodowane przez pojedyncze geny. Można w związku z tym wysunąć hipotezę, że poszczególne izogeny danej podjednostki kodują izoformy, które charakteryzują się odrębnymi cechami lub ulegają ekspresji tylko w określonych warunkach, bądź też izogeny te pozostają pod kontrolą specyficznych promotorów, co w efekcie prowadzi do określonych reakcji w odpowiedzi na określone warunki [18].

MECHANIZMY BIOCHEMICZNEJ REGULACJI AKTYWNOŚCI V-ATPazy

Aktywność V-ATPazy może podlegać regulacji nie tylko na poziomie genów, ale także na etapie syntezy białka, łączenia podjednostek w kompleksy, kierowania ich

do kompartmentów czy potranslacyjnych modyfikacji. Ponieważ enzym jest kompleksem kilkunastu podjednostek, z których przynajmniej część kodowana jest przez więcej niż jeden gen, jego regulacja wydaje się być bardzo skomplikowana i trudna do analizy. W związku z tym też niewiele jak dotąd wiadomo na temat biochemicznej regulacji V-ATPazy u roślin.

Odwracalna regulacja oksydoredukcyjna – tworzenie mostków dwusiarczkowych

V-ATPazy wykazują wrażliwość na związki sulfhydrylowe, co potwierdza istotną rolę reszt cysteiny w utrzymaniu funkcjonalnej konformacji enzymu. Jednym z pierwszych zidentyfikowanych mechanizmów regulacji aktywności V-ATPazy była możliwość tworzenia mostków dwusiarczkowych między konserwatywnymi resztami cysteiny w miejscach katalitycznych. Powstanie wiązania -S-S- między Cys254 a Cys532 podjednostki A powoduje odwracalną inaktywację enzymu, a przez to zahamowanie transportu protonów. ATP wiąże się do miejsca katalitycznego i zachodzi jego hydroliza, jednak produkty hydrolizy, czyli ADP i Pi, nie mogą zostać uwolnione. Mostek dwusiarczkowy uniemożliwia zmianę konformacji miejsca katalitycznego z tzw. „zamkniętej” na „otwartą”. Redukcja wiązania -S-S- między Cys254 a Cys532 wymaga udziału dodatkowej reszty cysteiny w podjednostce A [2].

Na przykładzie liści *Hordeum vulgare* (jęczmienia) wykazano, że roślinna V-ATPaza jest inaktywowana przez H_2O_2 (hamowanie hydrolizy ATP i transportu protonów), a reaktywacja enzymu zachodzi w obecności zredukowanego glutationu lub cysteiny. Udowodniono, że obserwowana modyfikacja aktywności V-ATPazy wynika z tworzenia mostka dwusiarczkowego nie tylko w podjednostce A, ale także w podjednostce E. Zidentyfikowano dwie reszty cysteiny w podjednostce E, Cys134 i Cys186, które są wysoce konserwatywne w roślinnych V-ATPazach, i brak ich u innych organizmów eukariotycznych. Tworzenie mostka dwusiarczkowego między tymi resztami wydaje się być mechanizmem regulatorowym specyficznym dla roślin [18].

Odwracalna fosforylacja

Procesy fosforylacji i defosforylacji, zachodzące przy udziale białkowych kinaz i fosfataz, stanowią powszechny mechanizm potranslacyjnej modyfikacji aktywności białek roślinnych. Do białek takich należy plazmolemowa H^+ -ATPaza, która aktywowana jest w wyniku fosforylacji pojedynczej reszty treoniny i wiązania do niej regulatorowego białka 14-3-3 [1].

Nieliczne dotąd badania sugerują, że fosforylacja podjednostek wakuolarniej ATPazy powoduje stymulację aktywności enzymu. Przykładem jest aktywacja V-ATPazy skorelowana z fosforylacją podjednostki B obserwowana u *Cucurbita pepo* convar. *giromontiina* (cukinii) i fosforylacją podjednostki A u *Zea mays* (kukurydzy). W podjednostce A zidentyfikowano konserwatywną resztę seryny (Ser525) jako potencjalne miejsce fosforylacji. Wykazano także, że kinazy WNK (z ang. *with no lysine*) wchodzi w specyficzną interakcję z podjednostkami C V-ATPazy [18, 19, 20].

W sekwencji aminokwasowej podjednostki A u *H. vulgare* zidentyfikowano niedawno konserwatywną domenę, która jest prawdopodobnie odpowiedzialna za wiązanie białka z rodziny 14-3-3 w sposób zależny od fosforylacji. W fosforylacji podjednostki A uczestniczą specyficzne kinazy, których poziom wzrasta po traktowaniu roślin światłem niebieskim. Krótkie traktowanie tym światłem powoduje również 2-3-krotny wzrost aktywności hydrolitycznej V-ATPazy [20].

Modyfikacja przez lipidy

Oczyszczona V-ATPaza, pozbawiona otoczenia lipidowego, traci większość swojej aktywności. Dodanie fosfolipidów, np. fosfatydylocholiny, przywraca aktywność enzymu (obserwuje się jej około 50-krotny wzrost). Podobnego efektu nie stwierdzono w obecności glikolipidów, które hamują indukowaną przez fosfolipidy aktywację V-ATPazy. Glikolipidy odpowiedzialne są za hamowanie transportu protonów przez tonoplast w warunkach niskiej temperatury, prawdopodobnie poprzez indukowanie zmian konformacyjnych w kompleksie V-ATPazy [18, 21]. Wyniki tych badań sugerują, że zmiana składu lipidowego tonoplastu może modulować (stymulować bądź hamować) aktywność wakuolarniej ATPazy.

Odwracalna dysocjacja sektorów V_1 i V_0

W komórkach *S. cerevisiae* i *Insecta* (owadów) wykazano, że kompleks V-ATPazy może dysocjować wskutek zmieniających się warunków zewnętrznych, uwalniając sektor V_1 od V_0 , przy czym podjednostka C odłącza się niezależnie od pozostałych elementów V_1 . Wolny sektor cytoplazmatyczny nie jest w stanie hydrolizować ATP, sektor błonowy natomiast nie przewodzi biernie protonów [2]. Proces ten jest odwracalny, sektory ponownie mogą się ze sobą łączyć, co prowadzi do aktywacji enzymu.

W komórkach *S. cerevisiae* odwracalna dysocjacja kompleksu V-ATPazy związana jest z dostępnością glukozy (źródło węgla). Kiedy środowisko jest bogate w glukozę, 60–70% sektorów V_0 połączonych jest z V_1 . Po jej wyczerpaniu tylko 15–20% V_0 tworzy aktywne kompleksy z V_1 . Nasuwa się pytanie, w jakim celu na terenie komórki utrzymywana jest pula wolnych nieaktywnych sektorów V_1 i V_0 . Postulowano kilka wyjaśnień takiej regulacji: i) jest to szybszy sposób na łączenie podjednostek V-ATPazy i wzrost aktywności niż synteza nowego kompleksu, ii) cytoplazmatyczny kompleks V_1 może spełniać dodatkowe funkcje w komórce niezależne od V-ATPazy, iii) uwalnianie V_1 z błony daje możliwość wymiany sektorów i tworzenia kompleksów V-ATPazy o nowych właściwościach, np. w zależności od warunków środowiskowych [22].

Równie ciekawą i ważną kwestią dotyczącą odwracalnej dysocjacji enzymu jest pytanie, w jaki sposób dochodzi do wyciszenia aktywności ATPazowej w sektorze V_1 i transportu protonów w sektorze V_0 , po ich rozłączeniu. Wykazano, że w uwolnionym z błony sektorze V_1 podjednostka H zmieniając swoje położenie jest w bliskim sąsiedztwie podjednostki F. W ten sposób elementy rotora łączą się z podjednostkami statora, uniemożliwiając rotację i hamując aktywność. W mechanizmie tym uczestniczy także podjednostka C, której odłączenie od V_1 podczas dysocjacji

kompleksu V-ATPazy stwarza możliwość zmiany pozycji podjednostki H. Obecność podjednostki C w kompleksie zapobiega kontaktowaniu się podjednostki H z rotorem [23, 24]. Podobna sytuacja ma miejsce w sektorze błonowym V_0 , który przewodzi protony tylko wówczas, kiedy wchodzi w interakcję z peryferyjnymi połączeniami tworzonymi przez podjednostki V_1 [10].

Dysocjacja i ponowne łączenie sektorów w kompleks V-ATPazy wydają się być procesami kontrolowanymi niezależnie od siebie. Hipotezę tę potwierdzają badania, w których stwierdzono, że pierwszy z procesów wymaga obecności sieci mikrotubul, drugi natomiast zależy od kompleksu RAVE (regulator kwasowości wakuoli i endosomów). Sugeruje się ponadto istotną rolę podjednostki A w kontrolowaniu procesu dysocjacji. W jej obrębie zidentyfikowano 90-aminokwasową domenę o wysoce konserwatywnej sekwencji, która jest unikalna dla V-ATPaz i nie występuje w homologicznych podjednostkach beta F-ATPaz. Mutacje w tym regionie prowadzą do całkowitego hamowania procesu dysocjacji. Zmiany w opisanej domenie podjednostki A mogą zatem uczestniczyć w aktywacji zależnej od glukozy dysocjacji enzymu [2]. Nie potwierdzono jak dotąd funkcjonowania podobnego mechanizmu regulacji V-ATPaz w komórkach roślinnych.

Modyfikacja współczynnika sprzężenia

Na podstawie symetrii części katalitycznej enzymu, zawierającej po trzy oddziałujące ze sobą podjednostki A i B, oraz symetrii pierścienia proteolipidowego, zbudowanego z 6 podjednostek, z których każda zawiera jedno miejsce wiązania H^+ , ustalono, że współczynnik sprzężenia transportu protonów z hydrolizą ATP dla V-ATPazy wynosi 2 (2 transportowane H^+ /1 hydrolizowane ATP). Stechiometria taka pozwala na generowanie gradientu pH przez błonę wielkości 4,6 jednostki. Późniejsze badania przy użyciu techniki *patch clamp* wykazały, że współczynnik sprzężenia równy jest 3,28 dla V-ATPazy funkcjonującej w błonach wakuolarnych *Beta vulgaris* (buraka czerwonego). Stwierdzono ponadto, że wartość współczynnika nie jest stała i może zmieniać się, dostosowując się do aktualnej różnicy pH po obu stronach tonoplastu. Kiedy gradient pH między wakuolą a cytoplazmą rośnie z 2,8 do 4,7, współczynnik sprzężenia maleje z 3,28 do 1,75. U niektórych gatunków roślin pH soku wakuolarnego może osiągać wartości skrajnie niskie, np. poniżej 1 u *Begonia* (begonii) czy około 2,2 u *Citrus limon* (cytryny). W tych przypadkach stosunek ilości transportowanego H^+ do hydrolizowanego ATP wynosi około 1. Podstawy mechanizmu nie są znane, sugeruje się jednak, że jest on związany z odwracalną dysocjacją sektora katalitycznego V_1 od błonowego V_0 [18, 25].

ROLA V-ATPazy W ADAPTACJI ROŚLIN DO STRESÓW ABIOTYCZNYCH

Wakuola stanowi unikalny kompartment komórek roślinnych, ponieważ w otaczającej ją błonie funkcjonują dwie pompy protonowe, korzystające z innych źródeł energii chemicznej i znacznie różniące się strukturą. Oprócz V-ATPazy, w tonoplaście

występuje wakuolarna pirofosfataza (V-PPaza), zbudowana z pojedynczego polipeptydu, która przenosi protony do wnętrza wakuoli dzięki hydrolizie wiązań wysoko-energetycznych obecnych w pirofosforanie. Generalnie uważa się, że współdziałanie obu enzymów umożliwia roślinom utrzymanie procesów transportu przez tonoplast nie tylko w warunkach optymalnych dla rozwoju, ale także w warunkach stresowych, jednak powiązania funkcjonalne między nimi nie zostały dotąd poznane [4, 25].

Wiele czynników środowiskowych wpływa na funkcjonowanie V-ATPazy w komórkach roślinnych. W odpowiedzi na działanie tych czynników enzym może modyfikować aktywność zarówno na poziomie ekspresji podjednostek, jak i zmian w strukturze. Z tego powodu V-ATPazę roślin wyższych określa się często mianem „eko-enzymu” [6, 18].

Stres solny

Najlepiej poznanym przykładem, potwierdzającym udział V-ATPazy w adaptacji roślin do warunków stresowych, jest modyfikacja enzymu pod wpływem zasolenia.

Rośliny poddane działaniu stresu solnego akumulują szkodliwy nadmiar jonów sodu w wakuoli, w wyniku aktywacji napędzanego przez gradient protonów antyportera Na^+/H^+ . W przypadku halofitów, tj. roślin tolerujących zasolone środowisko, stwierdzono wyraźny wzrost aktywności wakuolarnej ATPazy skorelowany ze zwiększeniem liczby transkryptów genów kodujących poszczególne podjednostki enzymu zarówno w liściach, jak i korzeniach. Modelową rośliną w tych badaniach jest *Mesembryanthemum crystallinum* (przypołudnik). Na jej przykładzie wykazano, że krótkotrwały (8–24 godz.) stres solny powoduje wzrost poziomu mRNA dla podjednostki c odpowiedzialnej za transport protonów przez błonę. Taka regulacja może stanowić wczesną odpowiedź roślin na zasolenie. Natomiast po kilku tygodniach ekspozycji roślin na NaCl, kiedy uruchamiane są mechanizmy adaptacyjne, dochodzi do skoordynowanej aktywacji transkrypcji podjednostek A, B, E, F, G i c, a w konsekwencji do zwiększenia liczby cząsteczek enzymu i jego aktywności. W przeciwieństwie do halofitów, większość glikofitów nie wykazuje podobnej regulacji aktywności V-ATPazy pod wpływem zasolenia. Zatem zdolność do reagowania na stres solny poprzez modyfikację ekspresji genów kodujących podjednostki V-ATPazy wydaje się być podstawowym elementem warunkującym tolerancję roślin na obecność soli w środowisku [21].

W warunkach stresu solnego roślinne V-ATPazy podlegają regulacji nie tylko na poziomie transkrypcji, ale ekspresja podjednostek może być kontrolowana także na poziomie potranskrypcyjnym. U mchu *Tortula ruralis* (pędziczek wiejski), wykorzystywanego jako modelowy system do badań mechanizmów tolerancji roślin na wysychanie, zaobserwowano wzrost poziomu transkryptu podjednostki c w odpowiedzi na zasolenie. Wykazano jednocześnie, że mRNA podjednostki c związane było głównie z frakcją poliribosomalną. Wyniki te sugerują, że w komórkach *T. ruralis* funkcjonuje mechanizm potranskrypcyjnej kontroli genów V-ATPazy uruchamiany pod wpływem zasolenia, który stanowi element konstytucyjnego systemu ochronnego [18]. W korzeniach *Cucumis sativus* (ogórka) wykazano, że w

aktywacji V-ATPazy, wywołanej obecnością NaCl w środowisku, uczestniczy kinaza zależna od wapnia i kalmoduliny, wrażliwa na staurosporynę. Enzym ten prawdopodobnie jest stale obecny w komórkach, wykazując niski poziom aktywności. W warunkach stresu solnego dochodzi do jego aktywacji, a następnie fosforylacji V-ATPazy i w konsekwencji stymulacji aktywności transportu protonów przez tonoplast [26].

Nowo poznany aspekt regulacji aktywności V-ATPazy, potwierdzającym jej udział w reakcjach roślin na stres solny, jest bezpośrednia interakcja między regulatorowymi podjednostkami B enzymu a kinazą serynowo-treoninową SOS2, której efektem jest stymulacja transportu protonów przez tonoplast. Główną funkcją tej kinazy jest fosforylacja i w konsekwencji aktywacja plazmolemowego antyportera Na^+/H^+ (SOS1), odpowiedzialnego za usuwanie nadmiaru jonów sodu z cytoplazmy do apoplastu. Wykazano także, że kinaza SOS2 uczestniczy w aktywacji antyporterów Na^+/H^+ zlokalizowanych w tonoplaście, przenoszących Na^+ do wnętrza wakuoli [27, 28].

W obliczu przedstawionych danych zaskakujące okazały się wyniki badań prowadzonych na mutancie *A. thaliana vha-a2 vha-a3*, charakteryzującym się brakiem obu izoform podjednostki a V-ATPazy obecnych w tonoplaście oraz zahamowaną aktywnością enzymu. Mutant ten nie wykazywał żadnych zaburzeń w akumulacji jonów sodu i dobrze tolerował obecność soli w środowisku, co wskazuje, że w przypadku *A. thaliana* aktywność tonoplastowej V-ATPazy nie jest wymagana w tolerancji na zasolenie. Jednocześnie wykazano, że wrażliwość na sól u tego gatunku związana jest z redukcją aktywności V-ATPazy zlokalizowanej w sieci trans aparatu Golgiego [29].

Stres wywołany obecnością metali ciężkich

Porównanie gatunków roślin wrażliwych z tolerującymi obecność metali ciężkich wskazuje, że odporność na metale związana jest zazwyczaj z aktywnością dodatkowych białek transportowych w błonach. W sekwestracji metali ciężkich w wakuoli uczestniczą zarówno pierwotne, jak i wtórne aktywne systemy transportowe. Do tonoplastowych transporterów pierwotnych, wykorzystujących ATP jako źródło energii, należą białka typu ABC (z ang. *ATP-binding cassette transporters*), transportujące kompleksy metali z glutationem, np. AtMRP3 [30], oraz ATPazy typu $\text{P}_{1\text{B}}$, reprezentowane przez AtHMA3 [31]. Natomiast wśród tonoplastowych transporterów wtórnych, wykorzystujących gradient elektrochemiczny H^+ , wyróżnia się białka CDF (z ang. *Cation Diffusion Facilitators*), wśród nich MTP1, i transportery CAX (z ang. *Cation Exchangers*), przenoszące jony metali do wakuoli na zasadzie antyportu z protonami. Aktywność tych białek zależy pośrednio od aktywności wakuolarnych pomp protonowych, czyli V-ATPazy i V-PPazy [32, 33, 34]. Można w związku z tym założyć, że ekspozycja roślin na metale ciężkie wpływać będzie, podobnie jak zasolenie, na funkcjonowanie V-ATPazy. Mimo to niewiele informacji pojawiło się dotąd w literaturze na temat regulacji aktywności tonoplastowych pomp protonowych pod wpływem metali ciężkich.

Jednym z nielicznych dowodów potwierdzających rolę V-ATPazy w transporcie jonów metali do wakuoli były wyniki badań z użyciem bafilomycyny wskazujące, że u wrażliwej na metale ciężkie *Silene vulgaris* (lepnicy) transport cynku przez tonoplast był wyraźnie hamowany w obecności inhibitora. Otrzymane dane jasno wskazywały, że transport Zn do wakuoli u tego gatunku zależy od gradientu protonów generowanego przez wakuolarną ATPazę [21].

Przeprowadzona w ostatnich latach analiza aktywności V-ATPazy w korzeniach *C. sativus* poddanych działaniu metali ciężkich wykazała, że poszczególne metale w odmienny sposób modyfikują aktywność enzymu. Dla przykładu obecność miedzi w środowisku korzeni istotnie stymulowała aktywność hydrolityczną V-ATPazy oraz katalizowany przez nią transport H^+ , podczas gdy kadm, cynk i nikiel wyraźnie hamowały obie aktywności enzymu. Obserwowane modyfikacje aktywności V-ATPazy nie były wynikiem zmian w ekspresji genów kodujących podjednostkę A i c, ani w poziomie białka podjednostek enzymu. Wydaje się zatem, że w warunkach stresu indukowanego przez metale ciężkie funkcjonują inne mechanizmy odpowiedzialne za regulację aktywności enzymu, a jednym z nich może być zmiana składu lipidowego tonoplastu. Wyniki badań sugerują, że w korzeniach poddanych działaniu miedzi wakuolarna ATPaza odpowiada za generowanie wysokiego gradientu protonów przez tonoplast, który może być wykorzystywany przez wtórne transportery usuwające nadmiar jonów Cu^{2+} do wakuoli. Natomiast w warunkach stresu wywołanego przez Cd, Ni i Zn ograniczone funkcjonowanie V-ATPazy kompensowane jest przez aktywność V-PPazy, co ma istotne znaczenie dla zachowania funkcji pełnionych przez wakuolę, w tym dla procesów transportu wtórnego przez błonę wakuolarną [35, 36].

Stres niskiej temperatury

Już ponad 20 lat temu w granulach chromafinowych zaobserwowano, że pod wpływem niskiej temperatury kompleks V-ATPazy ulega nieodwracalnej dysocjacji na sektory V_1 i V_0 . Indukowany niską temperaturą mechanizm inaktywacji enzymu został szybko potwierdzony w komórkach roślinnych. Wykazano, że konsekwencją dysocjacji peryferyjnych podjednostek z błony jest częściowa degradacja kompleksu V-ATPazy, a inhibicji enzymu towarzyszy zakwaszanie cytoplazmy. Porównanie V-ATPaz roślin wrażliwych na niską temperaturę, np. *Vigna radiata* (fasola mung) i gatunków odpornych, np. *P. sativum*, pozwoliło wyróżnić dwa typy wakuolarniej ATPazy: *mung-bean-type*, podlegający inaktywacji pod wpływem chłodu i *pea-type*, niewrażliwy na niską temperaturę, nie ulegający dysocjacji [21].

Badania przeprowadzone na przykładzie *Pennisetum glaucum* (rosplenicy) wykazały, że w warunkach stresu niskiej temperatury wakuolarna ATPaza może podlegać regulacji na poziomie transkrypcji genów. Ekspresja genu VHA-c1, kodującego błonową podjednostkę proteolipidową, była znacząco stymulowana zarówno pod wpływem zasolenia, jak i niskiej temperatury [37].

Generowanie gradientu protonów przez tonoplast odgrywa istotną rolę w adaptacji roślin do niskiej temperatury. Wytworzona przez V-ATPazę siła protonomotoryczna

służy do napędzania wtórnych aktywnych antyporterów, odpowiedzialnych na przenoszenie do wakuoli cukrów: sacharozy, rafinozy i stachiozy. Związki te chronią błony i białka przed uszkodzeniami oraz zabezpieczają komórki roślinne przed zamarzaniem. Indukowany przez niską temperaturę spadek aktywności V-ATPazy i związane z nim ograniczenie w tworzeniu gradientu protonów mogą negatywnie wpływać na akumulację cukrów w wakuoli i odporność roślin. U niektórych gatunków jednak inaktywacja V-ATPazy kompensowana jest przez stymulację aktywności V-PPazy [21].

PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Przez długi czas wiedza dotycząca funkcjonowania V-ATPaz w komórkach roślinnych koncentrowała się na ich roli w generowaniu gradientu protonów i napędzaniu procesów wtórnego transportu przez tonoplast. Badania ostatnich lat pokazują, że białka te stanowią istotny element transportu pęcherzykowego w systemie sekrecyjnym i w endocytozie. Potwierdzono, że aktywność V-ATPaz ma istotne znaczenie dla utrzymania struktury i funkcji aparatu Golgiego. W komórkach *S. cerevisiae* i pęcherzykach synaptycznych *Drosophila melanogaster* (muszki owocowej) podjednostki sektora V_0 uczestniczą w procesach fuzji błon. Podjednostka a_4 V-ATPazy ssaków natomiast może działać jako sensor pH, biorący udział w komunikacji między wnętrzem endosomów a białkami cytosolowymi [1, 4]. Wykorzystanie metod proteomiki ilościowej pozwoliło wykazać asocjację tonoplastowej V-ATPazy z enzymami glikolitycznymi aldolazą i enolazą, które prawdopodobnie dostarczają ATP do enzymu i bezpośrednio stymulują pompowanie protonów [38]. Powyższe dane jednoznacznie wskazują na związek V-ATPazy nie tylko z różnymi procesami komórkowymi, ale także ze szlakami metabolicznymi.

Poznanie nowych, dodatkowych funkcji podjednostek V-ATPazy, niezależnych od pompowania protonów, podkreśla jeszcze bardziej kompleksowe działanie enzymu. Niezwykle interesującym odkryciem ostatnich lat była identyfikacja podjednostki B (izoformy VHA-B1) w kompleksie jądrowym heksokinazy u *A. thaliana*, co sugeruje rolę tego polipeptydu w przekazywaniu sygnału cukrowego [1, 39]. Pozostaje zatem ciekawą kwestią do rozstrzygnięcia w przyszłości, czy inne podjednostki wakuolarniej ATPazy pełnią w komórkach roślinnych równie zaskakujące, a dotąd nieodkryte funkcje jak VHA-B1.

LITERATURA

- [1] GAXIOLA RA, PALMGREN MG, SCHUMACHER K. Plant proton pumps. *FEBS Lett* 2007; **581**: 2204–2214.
- [2] CIPRIANO DJ, WANG Y, BOND S, HINTON A, JEFFERIES KC, QI J. Structure and regulation of the vacuolar ATPases. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1777**: 599–604.
- [3] SAROUSSI S, NELSON N. The little we know on the structure and machinery of V-ATPase. *J Exp Biol* 2009; **212**: 1604–1610.

- [4] SCHUMACHER K, KREBS M. The V-ATPase: small cargo, large effects. *Curr Opin Plant Biol* 2010; **13**: 1–7.
- [5] GRÜBER G, WIECZOREK H, HARVEY WR, MÜLLER V. Structure-function relationships of A-, F- and V-ATPases. *J Exp Biol* 2001; **204**: 2597–2605.
- [6] RATAJCZAK R. Structure, function and regulation of the plant vacuolar H⁺-translocating ATPases. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1465**: 17–36.
- [7] SZE H, SCHUMACHER K, MÜLLER ML, PADMANABAN S, TAI Z L. A simple nomenclature for a complex proton pump: VHA genes encode the vacuolar H⁺-ATPase. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 157–161.
- [8] DIEPHOLZ M, BÖRSCH M, BÖTTCHER B. Structural organization of the V-ATPase and its implications for regulatory assembly and disassembly. *Biochem Soc Trans* 2008; **36**: 1027–1031.
- [9] ZHANG Z, ZHENG Y, MAZON H, MILGROM E, KITAGAWA N, KISH-TRIER E, HECK AJR, KANE PM, WILKENS S. Structure of the yeast vacuolar ATPase. *J Biol Chem* 2008; **283**: 35983–35995.
- [10] MUENCH SP, HUSS M, SONG CF, PHILLIPS C, WIECZOREK H, TRINICK J, HARRISON MA. Cryo-electron microscopy of the vacuolar ATPase motor reveals its mechanical and regulatory complexity. *J Mol Biol* 2009; **386**: 989–999.
- [11] NISHI T, FORGAC M. The vacuolar H⁺-ATPases – nature's most versatile proton pumps. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; **3**: 94–103.
- [12] SEIDEL T, SCHNITZER D, GOLLDACK D, SAUER M, DIETZ K-J. Organelle-specific isoenzymes of plant V-ATPase as revealed by *in vivo*-FRET analysis. *BMC Cell Biol* 2008; **9**: 28.
- [13] KAWASAKI-NISHI S, NISHI T, FORGAC M. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases. *FEBS Lett* 2003; **545**: 76–85.
- [14] BOWMAN BJ, MCCALL ME, BAERTSCH R, BOWMAN EJ. A model for the proteolipid ring and bafilomycin/concanamycin-binding site in the vacuolar ATPase of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 2006; **281**: 31885–31893.
- [15] HUSS M, WIECZOREK H. Inhibitors of V-ATPases: old and new players. *J Exp Biol* 2009; **212**: 341–346.
- [16] SCHUMACHER K. Endomembrane proton pumps: connecting membrane and vesicle transport. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 595–600.
- [17] HANITZSCH M, SCHNITZER D, SEIDEL T, GOLLDACK D, DIETZ K-J. Transcript level regulation of the vacuolar H⁺-ATPase subunit isoforms VHA-a, VHA-E and VHA-G in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Membr Biol* 2007; **24**: 507–518.
- [18] KLUGE C, LAHR J, HANITZSCH M, BOLTE S, GOLLDACK D, DIETZ K-J. New insight into the structure and regulation of plant vacuolar H⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 2003; **35**: 377–388.
- [19] HONG-HERMESDORF A, BRÜXA, GRÜBERA, GRÜBER G, SCHUMACHER K. A WNK kinase binds and phosphorylates V-ATPase subunit C. *FEBS Lett* 2006; **580**: 932–939.
- [20] KLYCHNIKOV OI, LI KW, LILL H, DE BOER AH. The V-ATPase from etiolated barley (*Hordeum vulgare* L.) shoots is activated by blue light and interacts with 14-3-3 proteins. *J Exp Bot* 2007; **58**: 1013–1023.
- [21] DIETZ K-J, TAVAKOLI N, KLUGE C, MIMURAT, SHARMA SS, HARRIS GC, CHARDONNENS AN, GOLLDACK D. Significance of the V-type ATPase for the adaptation to stressful growth conditions and its regulation on the molecular and biochemical level. *J Exp Bot* 2001; **52**: 1969–1980.
- [22] KANE PM. Regulation of V-ATPases by reversible disassembly. *FEBS Lett* 2000; **469**: 137–141.
- [23] KANE PM. Close-up and genomic views of the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 2005; **37**: 399–403.
- [24] JEFFERIES KC, FORGAC M. Subunit H of the vacuolar (H⁺)ATPase inhibits ATP hydrolysis by the free V₁ domain by interaction with the rotary subunit F. *J Biol Chem* 2008; **283**: 4512–4519.
- [25] LOPEZ-MARQUÉS RL, SCHIØTT M, JAKOBSEN MK, PALMGREN MG. Structure, function and regulation of primary H⁺ and Ca²⁺ pumps. W: Blatt MR [red.] Membrane transport in plants. *Annu Plant Rev* 2004; **72**: 104.
- [26] KLOBUS G, JANICKA-RUSSAK M. Modulation by cytosolic components of proton pump activities in plasma membrane and tonoplast from *Cucumis sativus* L. roots during salt stress. *Physiol Plant* 2004; **121**: 84–92.
- [27] BATELLI G, VERSLUES PE, AGIUS F, QIU Q, FUJII H, PAN S, SCHUMAKER KS, GRILLO S, ZHU J-K. SOS2 promotes salt tolerance in part by interacting with the vacuolar H⁺-ATPase and upregulating its transport activity. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 7781–7790.
- [28] MAHAJAN S, PANDEY GK, TUTEJAN. Calcium- and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. *Arch Biochem Biophys* 2008; **471**: 146–158.

- [29] KREBS M, BEYHL D, GÖRLICH E, AL-RASHEID KAS, MARTEN I, STIERHOF Y-D, HEDRICH R, SCHUMACHER K. *Arabidopsis* V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *PNAS* 2010; **107**: 3251–3256.
- [30] JASINSKI M, FIGLEROWICZ M. Roślinne ABC transportery – rodzina z tradycjami. *Post Biochem* 2006; **52**: 296–302.
- [31] MIGOCKA M. Rola pierwotnych pomp metalowych (P1B-ATPaz) w utrzymywaniu homeostazy metali ciężkich w komórkach roślinnych. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 657–666.
- [32] KRÄER U, TALKE IN, HANIKENNE M. Transition metal transport. *FEBS Lett* 2007; **581**: 2263–2272.
- [33] MARTINOIA E, MAESHIMA M, NEUHAUS HE. Vacuolar transporters and their essential role in plant metabolism. *J Exp Bot* 2007; **58**: 83–102.
- [34] MIGOCKA M, NOWOJSKA E, KŁOBUS G. Wtórne transportery metali ciężkich u roślin. *Post Biochem* 2007; **53**: 272–279.
- [35] KABAŁA K, JANICKA-RUSSAK M, KŁOBUS G. Different responses of tonoplast proton pumps in cucumber roots to cadmium and copper. *J Plant Physiol* 2010; **167**: 1328–1335.
- [36] KABAŁA K, JANICKA-RUSSAK M. Differential regulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-PPase in *Cucumis sativus* roots by zinc and nickel. *Plant Sci* 2011; **180**: 531–539.
- [37] TYAGI W, RAJAGOPAL D, SINGLA-PAREEK SL, REDDY MK, SOPORY SK. Cloning and regulation of a stress-regulated *Pennisetum glaucum* vacuolar ATPase c gene and characterization of its promoter that is expressed in shoot hairs and floral organs. *Plant Cell Physiol* 2005; **46**: 1411–1422.
- [38] BARKLA BJ, VERA-ESTRELLAR, HERNANDEZ-CORONADO M, PANTOJAO. Quantitative proteomics of the tonoplast reveals a role for glycolytic enzymes in salt tolerance. *Plant Cell* 2009; **21**: 4044–4058.
- [39] CIERESZKO I. Odbiór i przekazywanie sygnału wywołanego zmianami poziomu cukrów w komórkach roślin. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 695–713.

Redaktor prowadzący – Janusz Maszewski

Otrzymano: 25.03. 2011 r.

Przyjęto: 18.07. 2011 r.

Katarzyna Kabala

Zakład Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin, Uniwersytet Wrocławski

ul. Kanonia 6/8, 50-328 Wrocław

e-mail: kkabala@biol.uni.wroc.pl