

УДК 57.023 581.1

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ ВАКУОЛЯРНИХ КАНАЛІВ РОДИНИ ТРК ІЗ РИСУ ВІДНОВЛЮЄ ПОГЛИНАННЯ КАЛІЮ В МУТАНТНІЙ ЛІНІЇ *E. COLI* LB2003

С.В. ІСАЄНКОВ¹, Ф.Й.М. МААТХАУС²

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Київ

² Йоркський університет, Біологічний факультет, Великобританія

E-mail: stan.isayenkov@gmail.com

*Функціональність вакуолярних двопорових каналів родини ТРК із рису вивчена ще не повністю. Для визначення функціональних характеристик цих каналів дві ізоформи OsTRK з рису та одна детально охарактеризована ізоформа AtTRK1 з арабідопсису клоновані та експресовані в мутантній лінії *E. coli* LB2003. Бактеріальні клітини штаму LB2003 мають дефект у системі транспорту K^+ , тому не здатні поглинати екзогенний K^+ . Експресії генів цих каналів підтверджено за допомогою ПЛР зі зворотною транскрипцією. Проведені дослідження показали, що експресія цих каналів в мутантній лінії *E. coli* LB2003 відновлює ріст на середовищі з низьким вмістом K^+ . Аналіз поглинання калію у трансформантів демонструє підвищення рівня поглинання цього іону в клітинах. Отримані результати свідчать про те, що калієві канали родини ТРК із рису можуть утворювати функціональні системи транспорту іонів калію в мутантних бактеріальних клітинах штаму LB2003.*

Ключові слова: *Orisa sativa*, *Escherichia coli*, калій, двопорові калієві канали (Two Pore K channels, ТРК), вакоуля.

Вступ. Рослинні вакуолі є унікальними та важливими органелами клітини. В рослинній клітині вони можуть займати до 90 % об'єму. Роль цих органел у клітинних процесах є різноманітною. Вакуолі рослинних клітини – головне джерело тургорного тиску та головний резервуар для зберігання та накопичення поживних речовин, продуктів деградації метаболізму та мінеральних сполук. Вакуоля рослин є головним місцем зберігання іонів Ca^{2+} , тому ця структура відіграє важливу роль у внутрішньо-

клітинній комунікації. Слід зазначити, що рослинні клітини, окрім «класичних» літичних вакуоль, також мають білкові вакуолі, які значно відрізняються за своїми ознаками [1, 2]. Вони невеликі за розміром та мають нейтральне значення рН у порівнянні з кислим середовищем літичних вакуоль. Цей тип вакуоль відповідає за зберігання запасних білків та інших важливих речовин [1–3]. Клітини тканин насіння та репродуктивних органів є збагаченими на протеїнові вакуолі [1, 3]. Попри все, цей тип вакуоль зустрічається у клітинах майже всіх типів рослинних тканин. Функції вакуоль цього типу залишаються ще не з'ясованими у клітинах тканин вегетативних органів.

Тонoplast вакуолі рослинної клітини містить різні типи транспортних протеїнів. Калієві канали вакуолі були ідентифіковані завдяки електрофізіологічним дослідженням в клітинах продохів та отримали назву двопорових калієвих каналів (ТРК, Two-pore potassium channels). Нещодавні дослідження функцій ТРК-каналів свідчать про те, що вони розповсюджені і в продохових клітинах, і в інших типах клітин [4–7]. «Класичні» канали родини ТРК мають вакуолярну локалізацію, дві пори із характерною комбінацією амінокислот – GYG D, що відповідає за селективність цих пор для іонів K^+ . Завдяки присутності EF-мотивів у С-кінцевому домені більшості двопорових каналів вони регулюються іонами кальцію. Також багато каналів родин ТРК мають 14-3-3 мотив у N-кінці. Роботи останніх років свідчать про те, що для формування ефективною системи транспорту ка-

© С.В. ІСАЄНКОВ, Ф.Й.М. МААТХАУС, 2015

лію двопорові канали утворюють димери [7, 8]. Субодиниці AtTRK1 з арабідопсису та NtTRK1 можуть формувати функціональні гомодимери при експресії останніх у гетерологічних та гомологічних системах [9]. Геном арабідопсису кодує п'ять різних ізоформ TRK-каналів – AtTRK1, 2, 3, 4, 5. AtTRK1 є одним із найбільш вивчених каналів цієї родини, що бере участь у процесах закриття продохів, проростання насіння та відповіді на осмотичний стрес. Вважається, що інші ізоформи – AtTRK2 та AtTRK5 – також мають вакуолярну локалізацію [3, 6]. Результати деяких робіт з дослідження функцій TRK-каналів вказують на те, що окрім «класичного» розташування у тонопласті центральної вакуолі, деякі представники цієї родини мають інші сайти локалізації. Зокрема встановлено, що AtTRK4 арабідопсису локалізується на плазматичній мембрані [10], а AtTRK3 – у тилакоїдах хлоропластів [11]. Слід зауважити, що TRK-канали рису також мають різну вакуолярну локалізацію. OsTRKa локалізується у тонопласті літичної вакуолі, а тонопласт протеїнових вакуоль містить OsTRKb [3, 12].

Окрім різниці в органельній локалізації TRK-каналів в клітинах, вони також мають різну тканинну спеціалізацію. Зокрема експресія гена *AtTRK3* спостерігається в кінцівках коренів та пилку, а *AtTRK5* експресується в судинах та статевих органах [6]. Гени білків TRK-каналів рису також мають різні рівні експресії в тканинах, зокрема OsTRKb відіграє велику роль у формуванні насіння. Рівень експресії *OsTRKa* є конститутивним в усіх органах рису [3]. На відміну від AtTRK1 функції багатьох TRK-каналів вивчені недостатньо, а деяких залишаються ще не з'ясованими. Щоб зрозуміти, чи можуть AtTRK2, 3, 4, 5 утворювати функціональні канали, проведена спроба експресії генів цих каналів в мутантній лінії *E. coli* LB2003, де не функціонують системи поглинання K^+ , а саме транспортери Trk та Kdp [13–15]. Разом з експресією *NtTRK1* із тютюну встановлено, що експресія генів *AtTRK 1, 2, 5* може відновлювати ріст LB2003 на поживному середовищі із низьким вмістом калію [9, 15]. Зважаючи на той факт, що рисові калієві канали родини TRK ще недостатньо вивчені та мають відмінності у своїй клітинній локалізації, була зроблена спроба дослідити функціональні особливості цих

каналів у мутанті LB2003. В цій роботі нами запропоновано використати схожу стратегію відновлення фенотипу мутанта LB2003, а саме росту та поглинання іонів калію за допомогою експресії в останньому генів TRK-каналів із рису (*OsTRKa* та *OsTRKb*) [9, 15]. Тому мета цієї роботи – оцінити можливість вакуолярних калієвих каналів родин TRK з рису створювати функціональні системи поглинання калію у мутантному штамі бактерії *E. coli* LB2003 та визначити їх деякі функціональні характеристики, зокрема показники поглинання калію та росту трансформованих клітин в умовах низьких концентрацій цього елемента.

Матеріали та методи. Плазмідну культуру *E. coli*. Штам *E. coli* LB2003 ($\Delta trkA$ *kup1* (*trkD1*) $\Delta kdpABC5$ *rpsL metE thi rha gal*) [13] люб'язно наданий Е. Баккером із Університету Оснабрюка, Німеччина.

Послідовності досліджуваних генів можуть бути знайдені у EMBL/GenBank бібліотека за номерами ГенБанку: *OsTRKa* NM_001057833; *OsTRKb* NM_001065254; кДНК для *AtTRK1* отримана нами раніше [15]. кДНК із *OsTRKa* та *OsTRKb* одержані із Центру геному рису (Rice Genome Resource Center (RGRC, Японія).

ПЛР проводили у 50 мкл реакційної суміші, що містила 1×Phusion HF ПЛР буфер, 200 мкМ дНТП суміші, 3 % ДМСО та 1 мкл Phusion полімерази («Finnzymes», Фінляндія) з використанням 20 нг кДНК. Програма ампліфікації за допомогою ПЛР мала наступні параметри: 95 °C 30 с; 36 циклів: 95 °C 10 с, 72 °C 30 с; 72 °C 10 хв. Ампліфіковані ПЛР *AtTRK/OsTRK*-фрагменти повної довжини були клоновані у вектор для експресії – pQE-32 («Qiagen», Crawley, OK) за допомогою рестрикції ферментами *XhoI* чи *BamHI* та *SmaI* (NEB) та лігування T4-ДНК лігазою (NEB, Hitchin, OK). Для проведення ПЛР ампліфікації фрагментів *AtTRK/OsTRK* використовували наступні пари праймерів:

1) *AtTRK1BamHI_for* GCGGATCCTGATGTC GAGTGATGCAGCTCG;

AtTRK1SmaI_rev GCCCCGGGCCTTTGAAT CTGAGACGTGG;

2) *OsTRKaXhoI_for* GCCTCGAGATGGATGACAACAGCATT,

OsTRKaSmaI_rev GCCCCGGGCTGAGCAG-ATTGTGCTAG;

3) *OsTRKbBamHI_for* GCGGATCCTGATGG
CGGCCCTCGACCAACA,

OsTRKbSmaI_rev GCCCCGGGACGCAGGG-
AAGGCGGCGGGT.

Оцінка росту бактеріальних трансформантів. Штам *E. coli* LB2003 трансформували пустим вектором pQE32 чи створеними конструкціями pQE32-*AtTRK1*, -*OsTRKa*, -*OsTRKb*. Бактерію вирощували 16 год на поживному середовищі KLM з високим K^+ (0,5 % екстракт дріжджів, 1 % триптон, 150 мМ KCl та 100 мг/л ампіциліну). Після інкубації протягом 16 год з бактеріальної культури відбирали 100 мкл та розбавляли у 5 мл свіжого середовища KLM.

Щоб оцінити ріст бактерій у рідкому середовищі, 5 мл стартової культури у середовищі KLM вирощували до досягнення нею оптичної густини 0,5 (OD_{600}). Експресію генів білків TRK-каналів в бактерії індукували додаванням 1 мМ ізопропіл- β -D-1-тіоґалактопіранозиду (ІПТГ) («Sigma», США). Через 2 год після додавання ІПТГ визначали оптичну густину культури (OD_{600}). Усі культури ІПТГ доводили (нормалізували) до оптичної густини 0,5 розбавленням середовищем KLM. Із бактеріальних культур після доведення оптичної густини відбирали 5 мл, центрифугували протягом 2 хв при 10 000 g, відмивали один раз у свіжому середовищі ІПТГ-KLM, центрифугували 2 хв при 10 000 g та видаляли супернатант. Осад використовували як інокулюм для росту бактерій на рідкому поживному середовищі (0,5 % екстракт дріжджів, 1 % триптон, 100 мг/л ампіциліну, 1 мМ ІПТГ) за відсутності K^+ та за його присутності у різних концентраціях – 0,1; 3; 150 мМ KCl. Експерименти із оцінкою швидкості росту рідкої бактеріальної культури *E. coli* LB2003 повторювали три рази.

ПЛР зі зворотною транскрипцією. Загальну РНК бактерій виділяли з осаджених зразків бактеріальних трансформантів, оброблених ІПТГ. РНК виділяли за допомогою NucleoSpin RNA II kit («Macherey-Nagel», Німеччина) відповідно до рекомендованої виробником методики. кДНК із загальної бактеріальної РНК синтезували за допомогою системи SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR («Invitrogen», США) відповідно до методики виробника. Синтезовану кДНК використовували для ПЛР ампліфікації *AtTRK1* та *OsTRKa*,

OsTRKb за допомогою відповідних праймерів, що уже описані раніше.

Визначення поглинання іонів калію бактеріальними трансформантами. Трансформанти бактерій вирощували на рідкому середовищі KLM (0,5 % екстракт дріжджів, 1 % триптон, ампіцилін 100 мг/л, 1 мМ ІПТГ, 10 мМ KCl) до досягнення оптичної густини 0,5 (OD_{600}). Після центрифугування впродовж 5 с при 5000 g видаляли супернатант, а бактеріальний осад ресуспендували у рідкому голодному середовищі без калію (0,5 % екстракт дріжджів, 1 % триптон, 100 мг/л ампіциліну, 1 мМ ІПТГ) та інкубували протягом 3 год. Після інкубації бактеріальні культури розділяли на чотири рівні частини та центрифугували впродовж 5 с при 5000 g. Одну з чотирьох частин бактеріальних культур переносили на льод для подальшого використання як контролю. Інші три фракції бактеріальних культур ресуспендували у 10 мл рідкого середовища KLM (0,5 % екстракт дріжджів, 1 % триптон, ампіцилін 100 мг/л, 1 мМ ІПТГ), що містило 0,1 чи 3 мМ KCl, та залишали інкубуватись впродовж 1 год для оцінки поглинання іонів калію. Після вимірювання оптичної густини для кожної пробірки експериментальні та контрольні зразки центрифугували 5 с при 5000 g, видаляли супернатант та ресуспендували у такому ж об'ємі середовища KLM без калію (0,5 % екстракт дріжджів, 1 % триптон, ампіцилін 100 мг/л, 1 мМ ІПТГ). Для оцінки іонів калію у бактеріальній суспензії зразки центрифугували 5 с при 5000 g, видаляли супернатант, ресуспендували у 2 мл 5 % трихлороцтової кислоти та залишали на інкубацію впродовж 30 хв. Вимірювання вмісту калію у бактеріальних зразках здійснювали за допомогою фотометрії у полум'ї («Sherwood Scientific», ОК). Рівень поглинання калію ($nM/g \cdot год^{-1}$) розраховували після віднімання показників вмісту калію у контрольних зразках.

Результати досліджень та їх обговорення. Відомо, що бактеріальний штам LB2003 не здатний рости на середовищі, що має вміст калію нижче 0,1 мМ, оскільки у нього відсутня система поглинання іонів калію, а саме Trk (TrkG і TrkH), Kup (TrkD) та Kdp [13]. Відповідно до результатів експериментів показано, що бактеріальний ріст LB2003, трансформованого пустим вектором (pQE-32), має значно нижчий рівень

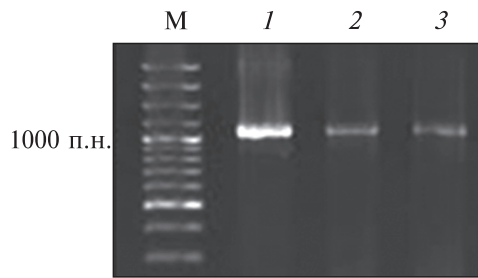


Рис. 1. Результати ПЛР зі зворотною транскрипцією в трансформантах LB2003: М – молекулярний маркер; 1 – клітини, трансформовані *AtTPK1*; 2 – *OsTPKa*; 3 – *OsTPKb*

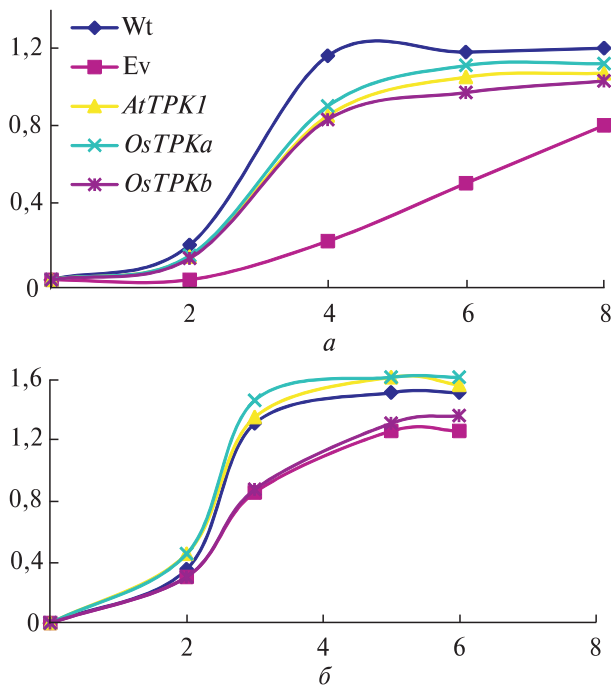


Рис. 2. Ріст клітин *E. coli*. Клітини дикого типу, трансформовані пустим вектором (Wt), мутант LB2003, трансформований пустим вектором (Ev), та мутанти LB2003, трансформовані *AtTPK1*, *OsTPKa* та *OsTPKb*, вирощували на рідкому середовищі, що містило 0,1 (а) чи 3 мМ КСІ (б). Величини оптичної густини, OD_{600} (по вертикалі) визначались для кожного типу трансформантів протягом 8 (0,1 мМ K^+) чи 6 (3 мМ K^+) годин інкубації (по горизонталі)

росту у порівнянні з бактеріями дикого типу на середовищі, що містить 0,1 мМ КСІ (рис. 1). Щоб з'ясувати, чи можливо відновити функції поглинання іонів калію за допомогою функціональної експресії каналів родини ТРК із ри-

су, нами проведена трансформація мутантного бактеріального штаму LB2003 двома генами, що кодують *OsTPKa* та *OsTPKb*. Для порівняльного аналізу як позитивний контроль використали трансформацію LB2003 геном *AtTPK1*, що кодує найбільш вивчений двопоровий калієвий канал з арабідопсису [15]. Зокрема було показано, що ПЛР аналіз зі зворотною транскрипцією бактеріальних трансформантів підтвердив присутність повнорозмірних транскриптів трансгенів в популяції РНК трансформованих бактеріальних культур (рис. 1). Бактеріальні культури *E. coli* штаму LB2003, трансформовані генами, що кодують білки *AtTPK1* та *OsTPKa/b*, росли менш інтенсивно, ніж клітини дикого типу (Wt), але мали значно кращі показники росту у порівнянні із LB2003, трансформованим пустим вектором (Ev) (рис. 2, а). Бактеріальні трансформанти із генами, що кодують канали родини ТРК рису, мали подібний характер росту на середовищі із низьким вмістом іонів калію (рис. 2, а). При збільшенні вмісту калію в середовищі до 3 мМ різниця у швидкості росту бактеріальних культур майже зникла (рис. 2, б). Подібну картину спостерігали при дослідженні росту бактеріальних мутантів, трансформованих генами, що кодують канали *AtTPK1*, *AtTPK2* та *AtTPK5* з арабідопсису [15].

Щоб детальніше охарактеризувати вплив роботи каналів *OsTPKa/b* на ріст штаму LB2003 в залежності від концентрації калію у середовищі, було проведено тест з оцінки часу подвоєння бактеріальної популяції трансформантів (рис. 3). Трансформанти *E. coli* вирощували на рідкому поживному середовищі з різним вмістом калію (0; 0,1; 3; 150 мМ K^+) або за його відсутності. Встановлено, що час подвоєння популяції під час експоненціальної фази росту був значно меншим для трансформантів *OsTPKa/b* та *AtTPK1* у порівнянні із бактеріальною культурою, трансформованою пустим вектором (Ev) в умовах низького вмісту (0,1 мМ K^+) або за відсутності калію у середовищі (рис. 3). За умови підвищення вмісту калію у середовищі до 3 та 150 мМ різниці у часі подвоєння трансформованих бактеріальних популяцій із диким типом (Wt) та трансформантами з пустим вектором (Ev) не спостерігали (рис. 3).

Ці результати свідчать на користь того, що бактеріальні клітини отримали нову функцію-

нальну транспортну систему, котра може забезпечувати транспорт та поглинання калію для подальшого росту та є відмінною від бактеріальних Trk та Kdp.

Припустили, що відновлення росту ТРК трансформантів штаму LB2003 відбувається саме за рахунок поглинання іонів калію завдяки рослинним системам транспорту калію. Для підтвердження провели оцінку «потужності» поглинання іонів калію бактеріями, що були інкубовані на голодному (без додавання K^+) середовищі, а в подальшому інкубували впродовж 1 год на середовищі із різним вмістом калію (рис. 4). Згідно із даними експериментів чистий приток іонів калію для клітин дикого типу (Wt) складав близько $2 \text{ нМ/г} \cdot \text{год}^{-1}$ (із розрахунку на одиницю сирої маси). Встановлено, що клітини LB2003, трансформовані пустим вектором, мають негативні значення ($-0,5 \text{ нМ/г} \cdot \text{год}^{-1}$ із розрахунку на одиницю сирої маси) і таким чином втрачають іони калію протягом проведення аналізу (рис. 4). Клітини, що експресували гени *OsTPKa* та *OsTPKb*, демонстрували значні потужності для поглинання іонів калію у порівнянні із *AtTPK1* трансформантами і мали рівень поглинання калію, схожий із клітинами дикого типу (Wt) (рис. 4). Рівень поглинання калію для трансформантів із генами *OsTPKa* та *OsTPKb* становив приблизно $2,5 \text{ нМ/г} \cdot \text{год}^{-1}$ із розрахунку на одиницю сирої маси, що є значно вищим показником для бактеріальних клітин, трансформованих *AtTPK1*. Подібний рівень поглинання калію зазначений для бактерій цього штаму, трансформованих геном, що кодує білок AtTPK5 [15]. Характер поглинання калію значно змінився для бактеріальних культур, інкубованих у середовищі, що містило $3 \text{ мМ } K^+$ (рис. 4). Для цієї концентрації калію у середовищі приток іонів калію зафіксований і для клітин, трансформованих пустим вектором (Ev). Але у такому випадку рівень поглинання був значно нижчим, ніж у клітин дикого типу чи трансформантів із *AtTPK1*. Цікавим є те, що при таких концентраціях калію найвищий рівень поглинання спостерігався в бактеріальній культурі, трансформованій *AtTPK1*, та сягав приблизно $3 \text{ нМ/г} \cdot \text{год}$ (рис. 4). Слід зазначити, що рівень притоку калію у бактеріальних культурах, трансформованих генами *OsTPKa* та

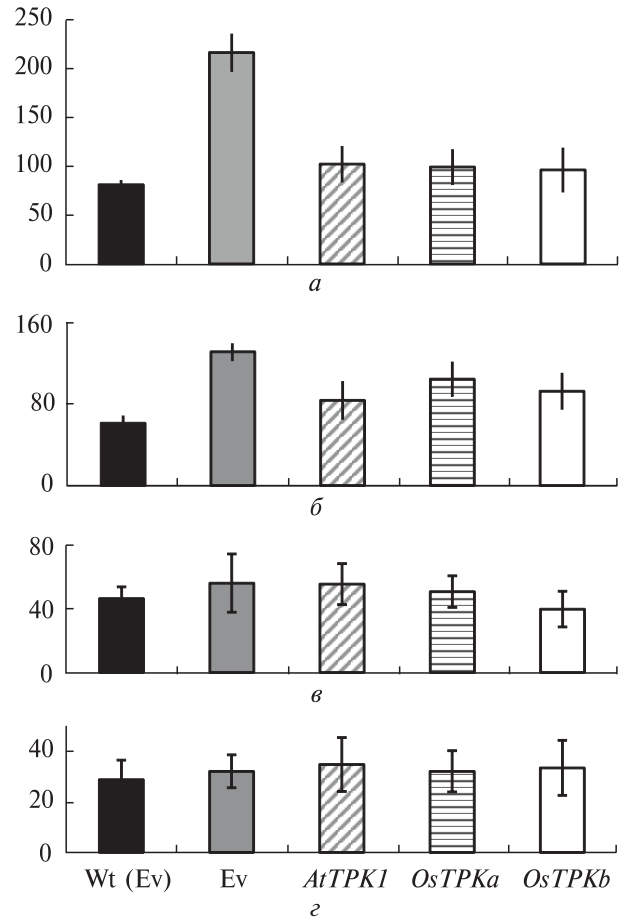


Рис. 3. Час подвоєння популяції *E. coli* (по вертикалі, хв) за умови різних концентрацій калію. Клітини дикого типу (Wt-Ev), мутант LB2003, трансформований пустим вектором (Ev), та мутантні клітини, трансформовані конструкціями, що несуть *AtTPK1*, *OsTPKa*, *OsTPKb*, пророщували на рідкому поживному середовищі, що містило різні концентрації KCl, мМ, а саме: 0 (а), 0,1 (б), 3 (в) чи 150 (г). Час подвоєння популяції вираховували за показниками оптичної густини (OD_{600}) протягом експоненціальної фази росту

OsTPKb, був наполовину меншим, ніж для бактерій дикого типу (рис. 4).

Результати попередніх досліджень свідчать про те, що трансформація LB2003 генами, які кодують вакуолярний канал NtTPK1 із тютюну чи білки ТРК-каналів із арабідопсису, а саме AtTPK1, AtTPK2 та AtTPK5, призводить до часткового чи повного відновлення поглинання іонів K^+ мутантним бактеріальним штамом LB2003 [9, 14, 15]. Подібна стратегія комплементції

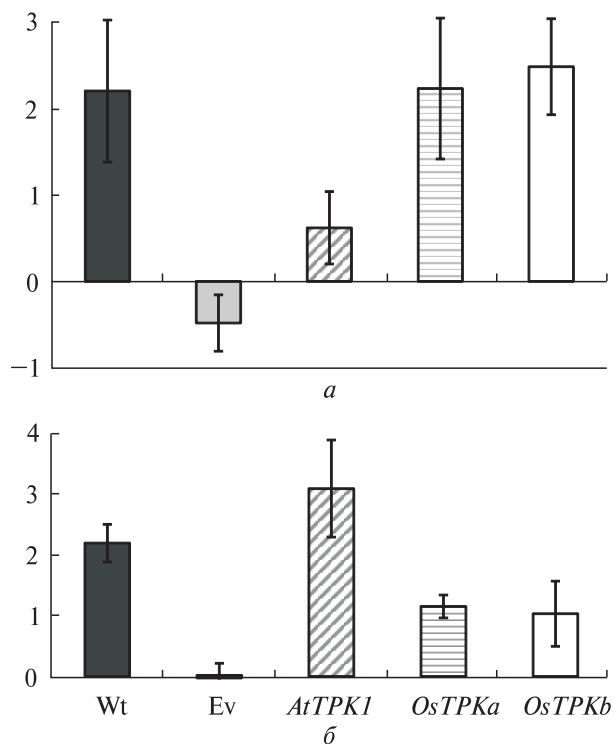


Рис. 4. Поглинання K^+ (по вертикалі, $nM/g \cdot год^{-1}$ із розрахунку на одиницю сирої маси) клітинами *E. coli*, що експресують гени ТРК-каналів із рису та арабідопсису. Клітини *E. coli*, що були попередньо інкубовані на «голодному» середовищі, вільному від K^+ , в подальшому інкубували протягом 1 год у середовищі, що містило 0,1 (а) чи 3 мМ КСl (б). Щоб визначити величину поглинання K^+ , різницю у вмісті K^+ вираховували перед та після інкубації при різних концентраціях K^+ для клітин *E. coli* дикого типу (Wt), мутанта LB2003, трансформованого пустим вектором (Ev), та мутантними клітинами, трансформованими *AtTPK1*, *OsTPKa* та *OsTPKb*. Негативні показники означають втрату K^+ бактеріальними клітинами

мутанту, але за допомогою двох різних ізоформ двопорових каналів із рису була використана нами, і результати свідчать, що канали родини ТРК із рису можуть формувати функціональні транспортні системи калію в штамі *E. coli* LB2003. Аналіз росту трансформантів вказує на те, що *OsTPKa*, *OsTPKb* та *AtTPK1* відновлюють ріст бактеріальної культури на середовищі із низьким вмістом калію до рівнів росту дикого типу (рис. 2 і 3). Експресія *OsTPKa*, *OsTPKb* призводить до значно вищого рівня поглинання іонів калію у порівнянні із бактеріальними культурами, трансформованими пустим

вектором (рис. 4). В той же час дані попередніх робіт свідчать про те, що не всі канали родини ТРК здатні сформувати функціональні системи транспорту калію у бактеріальних клітинах, зокрема встановлено неспроможність трансформантів мутанта *E. coli* відновлювати ріст та поглинання калію у випадку трансформації геном, що кодує *AtTPK3* [15].

Завдяки проведеним експериментам з'ясовано, що *OsTPKa* та *OsTPKb* не тільки відновлюють функції росту LB2003, а й значно підвищують рівень притоку та поглинання іонів калію. Отримані нами результати чітко вказують на те, що окрім калієвого вакуолярного каналу із арабідопсису – *AtTPK1*, ТРК-канали із рису, а саме *OsTPKa* та *OsTPKb*, можуть формувати функціональну та потужну систему транспорту калію в *E. coli*. Відповідно до результатів наших досліджень двопорові калієві канали рису та арабідопсису формують стабільні та селективні системи транспорту калію і в бактеріальних, і в рослинних клітинах [2, 15]. Результати наших експериментів та дані попередніх досліджень [9, 14–17] свідчать про перспективність та ефективність використання такого підходу для дослідження не тільки калієвих каналів родини ТРК, але і інших транспортних білків, що відповідають за транспорт іонів калію.

THE GENE EXPRESSION OF RICE VACUOLAR TPK CHANNELS RESTORE POTASSIUM UPTAKE IN *E. COLI* MUTANT STRAINS LB2003

S. Isayenkov, F.J.M Maathuis

Institute of Food Biotechnology and Genomics NAS of Ukraine, Kyiv

E-mail: stan.isayenkov@gmail.com

University of York, Department of Biology; York, UK

The functionality of some rice TPK channels (*OsTPKa* and *OsTPKb*) is not completely justified. In order to further evaluate the functional features of these channels, two of the three rice isoforms and one *Arabidopsis* isoform (*AtTPK1*) were cloned and expressed in the mutant *E. coli* strain – LB2003. The *E. coli* LB2003 strain lacks K^+ uptake systems and thus is incapable of growing on low external K^+ concentrations. The expression of channels in bacteria was confirmed by RT-PCR. Our results show that expression of these channels in the bacterial mutant restored the LB2003 growth on low K^+ media. The analysis of potassium uptake exhibited elevated levels of K^+ uptake in the three types of TPK transformants. Our data suggest

that these plant vacuolar channels can form functional potassium transport systems in bacterial cells.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ВАКУОЛЯРНЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА ТРК ИЗ РИСА ВОССТАНАВЛИВАЕТ ПОГЛОЩЕНИЕ КАЛИЯ В МУТАНТНОЙ ЛИНИИ *E. COLI* LB2003

С.В. Исаенков, Ф.Й.М. Маатхаус

Функциональность вакуолярных двупоровых каналов из риса изучена еще не полностью. Для того чтобы оценить функциональные характеристики этих каналов, две изоформы OsTPK из риса и одна детально охарактеризованная изоформа AtTPK1 из арабидопсиса клонированы и экспрессированы в мутантной линии *E. coli* LB2003. Бактериальные клетки штамма LB2003 имеют дефектную систему транспорта K^+ , поэтому они не в состоянии поглощать экзогенный K^+ . Экспрессия этих генов в бактериальных клетках подтверждена при помощи ПЦР с обратной транскрипцией. Проведенные исследования свидетельствуют о том, что экспрессия этих каналов в мутантной линии *E. coli* LB2003 восстанавливает рост в питательной среде с низким содержанием K^+ . Анализ поглощения калия у трансформантов демонстрирует повышение уровня этого иона в клетках. Результаты наших экспериментов свидетельствуют о способности этих каналов формировать функциональные системы транспорта ионов калия в мутантных бактериальных клетках штамма LB2003.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Isayenkov S.V.* Plant vacuoles : Physiological roles and mechanisms of vacuolar sorting and vesicular trafficking // *Cytology and Genetics*. – 2014. – **48**, № 2. – P. 127–137.
2. *Исаенков С.В.* Транспортні системи тонопласту рослинних вакуоль та їх потенційне застосування у біотехнології // *Biotechnol. Acta*. – 2013. – **3**. – С. 9–22.
3. *Isayenkov S., Isner J.C., Maathuis F.J.* Membrane localisation diversity of TPK channels and their physiological role // *Plant Signal. Behav.* – 2011. – **6**. – P. 1201–1204.
4. *Dunkel M., Latz A., Schumacher K. et al.* Targeting of vacuolar membrane localized members of the TPK channel family // *Mol. Plant*. – 2008. – **1**. – P. 938–949.
5. *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. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2007. – **104**. – P. 10726–10731.
6. *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.

7. *Bihler H., Eing C., Hebeisen S. et al.* TPK1 is a vacuolar ion channel different from the slow-vacuolar cation channel // *Plant Physiol.* – 2005. – **139**. – P. 417–424.
8. *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.
9. *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. – **283**. – P. 1911–1920.
10. *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. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2004. – **101**. – P. 15621–15626.
11. *Carraretto L., Formentin E., Teardo E. et al.* Thylakoid-located two-pore K^+ channel controls photosynthetic light utilization in plants // *Science*. – 2013. – **342**. – P. 114–118.
12. *Isayenkov S., Isner J.C., Maathuis F.J.M.* Rice two-pore K^+ channels are expressed in different types of vacuoles // *Plant Cell*. – 2011. – **23**. – P. 756–768.
13. *Schlösser A., Meldorf M., Stumpe S. et al.* TrkH and its homolog, TrkG, determine the specificity and kinetics of cation transport by the Trk system of *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* – 1995. – **177**. – P. 1908–1910.
14. *Uozumi N., Nakamura T., Schroeder J.I., Muto S.* Determination of transmembrane topology of an inward-rectifying potassium channel from *Arabidopsis thaliana* based on functional expression in *Escherichia coli* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 1998. – **95**. – P. 9773–9778.
15. *Isayenkov S., Maathuis F.J.M.* Arabidopsis thaliana vacuolar TPK channels form functional K^+ uptake pathways in *Escherichia coli* // *Plant Signal. Behav.* – 2013. – **8**. – e24665.
16. *Kim J.E., Kwak J.M., Uozumi N., Schroeder J.I.* AtKUP1: an Arabidopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity // *Plant Cell*. – 1998. – **10**. – P. 51–62.
17. *Uozumi N., Kim J.E., Rubio F. et al.* The Arabidopsis HKT1 gene homolog mediates inward Na currents in *Xenopus laevis* oocytes and Na⁺ uptake in *Saccharomyces cerevisiae* // *Plant Physiol.* – 2000. – **122**. – P. 1249–1259.

Надійшла 24.03.14