



УДК 57.023 581.1

С. В. Ісаєнков, Ф. Й. М. Маатхаус

Функціональна експресія генів вакуолярних калієвих каналів родини ТРК арабідопсису в мутантній лінії *Escherichia coli* LB2003

(Представлено академіком НАН України Я. Б. Блюмом)

Геном Arabidopsis thaliana кодує п'ять різних ізоформ AtTPK (ТРК, Two-pore potassium channels) – AtTPK1, 2, 3, 4, 5. Детально вивчено функціональні характеристики лише AtTPK1 та AtTPK4. Для того щоб оцінити функціональність інших каналів, чотири ізоформи AtTPK – AtTPK1, 2, 3, 5, були клоновані та експресовані в мутантній лінії E. coli LB2003. Через дефекти в системі транспорту K⁺ лінія LB2003 не здатна поглинати екзогенний K⁺. Характер експресії генів каналів у бактеріальних клітинах проаналізовано за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією. При трансформації цієї мутантної лінії векторами, що експресують AtTPK1, AtTPK2 чи AtTPK5, відбувається відновлення росту LB2003 на поживному середовищі з низьким вмістом K⁺, що свідчить про здатність цих каналів утворювати функціональні системи транспорту K⁺ в бактеріальних клітинах.

Рослинні вакуолі є важливими та мультифункціональними органелами рослинної клітини. Вони можуть займати до 90 % об'єму клітини та беруть активну участь у різноманітних клітинних процесах. Рослинні вакуолі є головним джерелом клітинного тургору та резервуаром для зберігання і накопичення поживних речовин. Вакуолі рослинних клітин відповідають за підтримку гомеостазу різноманітних сполук у цитозолі, а саме мінеральних сполук, цукрів, органічних кислот та вторинних метаболітів. Вакуолі рослин є головним депо іонів Ca²⁺, тому вони є важливими для сигнальних процесів клітини.

Тонопласт рослинних вакуоль містить різноманітні транспортні протеїни, що відповідають за транспорт мінеральних сполук. Калієві канали вакуоль були ідентифіковані завдяки електрофізіологічним дослідженням калієвих токів клітин проростків та отримали назву двопорових калієвих каналів (ТРК, Two-pore potassium channels). Нещодавно було показано, що вакуолярні канали родини ТРК розповсюджені й у клітинах проростків та інших типах клітин рослин [1–4]. “Класичний” ТРК-канал має чотири трансмембранних домени, дві по-

© С. В. Ісаєнков, Ф. Й. М. Маатхаус, 2013

ри із характерною комбінацією амінокислот — GYGD, що відповідає за селективність цих пор для іонів K^+ . Крім того, більшість ТРК-каналів мають EF-мотиви в С-термінальному кінці та 14–3–3 мотив у N-термінальному кінці. Припускається, що для свого успішного функціонування ТРК-канали утворюють функціональні димери [4, 5]. Було показано, що субодиниці AtTPK1 з арабідопсису та NtTPK1 тютюну утворюють функціональні гомодимери за умови експресії останніх у гомологічних та гетерологічних системах [6]. За даними електрофізіології, AtTPK1 та NtTPK1 проводять іони K^+ через тонопласт вакуолю. Крім AtTPK1, геном арабідопсису містить ще чотири гена, що кодують інші ізоформи ТРК-каналів — AtTPK2, 3, 4, 5 [1–3]. На відміну від своїх родичів, AtTPK4 локалізований на плазматичній мембрані. AtTPK4 є спеціалізованим каналом клітин пилоквих трубок і був досить детально охарактеризований. Робота AtTPK1 важлива для закриття продихів, проростання насіння та осмотичного стресу. Ізоформи AtTPK2, AtTPK3, AtTPK5 також мають вакуолярну локалізацію. Рівень експресії генів, що кодують AtTPK2, 3, 4, 5, набагато нижчий порівняно з “класичним” AtTPK1 [3]. Ці AtTPK2, 3, 4, 5-канали також мають тканинну специфічність. Наприклад експресія *AtTPK3* спостерігається в кінцівках коренів та пилку, а *AtTPK5* експресується в клітинах судин та статевих органів [4]. На відміну від AtTPK1, функції цих каналів залишаються майже не з’ясованими.

Експресія *AtTPK1* та його ортологів у клітинах рослин дозволяє чітко встановити події транспорту іонів калію через тонопласт за допомогою цих каналів. На відміну від *AtTPK1*, експресія в клітинах рослин інших ТРК-ізоформ із арабідопсису, а саме *AtTPK2*, *3*, *4*, *5* не призводила до помітного збільшення транспорту іонів калію через тонопласт [4]. Для того щоб зрозуміти, чи можуть AtTPK2, 3, 4, 5 утворювати активні та функціональні канали, ми спробували експресувати гени цих протеїнів у мутантній лінії *Escherichia coli* LBA2003. У LBA2003 не функціонують системи поглинання K^+ , а саме транспортери родини Trk та Kdp [7]. Було показано, що експресія *NtTPK1* із тютюну в LBA2003 може відновлювати поглинання K^+ цим мутантом, тому ми використовували подібну стратегію досліджень для того, щоб з’ясувати, чи можуть AtTPK2, 3, 4, 5 відновлювати поглинання K^+ та ріст даного штаму бактерії на середовищі з низьким вмістом цього іона [8]. Отримані результати свідчать про те, що, крім *AtTPK1*, експресія *AtTPK2* та *AtTPK5* у LBA2003 сприяла відновленню росту мутанта *E. coli* на середовищі з низькою концентрацією іонів K^+ .

Матеріали та методи. Штам *E. coli* LB2003 ($\Delta trkA$ *kup1* (*trkD1*) $\Delta kdpABC5$ *rpsL* *metE* *thi rha gal*) [7] був люб’язно наданий Е. Баккером із Університету Оснабрюка, Німеччина.

Загальну РНК із проростків та пилку арабідопсису виділяли за допомогою TRIzol-реагенту (“Invitrogen”, США.). За допомогою системи SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (“Invitrogen”) відповідно до протоколу було синтезовано кДНК. Для отримання кДНК клонів повної довжини для *AtTPK1*, *AtTPK2*, *AtTPK3* та *AtTPK5* використовували такі пари праймерів:

- 1) AtTPK1BamHI_for GCGGATCCTGATGTTCGAGTGATGCAGCTCG,
AtTPK1SmaI_rev GCCCCGGGCCTTTGAATCTGAGACGTGG;
- 2) AtTPK2BamHI_for GCGGATCCTGATGGCTAACGACGGTAACGG,
AtTPK2SmaI_rev GCCCCGGGAATAGAAGTTGCAGTGGGTA;
- 3) AtTPK3BamHI_for GCGGATCCTGATGGCCAACGAAGGAAGTGA,
AtTPK3KpnI_rev GCGGTACCGCATCGCCACTGCCACCTTC;
- 4) AtTPK5SacI_for GCGAGCTCGCATGGAACCACTCATCAGCCC,
AtTPK5Pst1_rev GCCTGCAGGCCAAAGGATCCCCCAAAGATCAGG.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили, використовуючи 20 нг кДНК, у 50 мкл реакційної суміші, що містила 1x Phusion HF PCR buffer, 200 мкМ dNTP суміші, 3% DMSO та 1 мкл Phusion polymerase (“Finnzymes”, Фінляндія). ПЛР-програма мала такі параметри: 95 °С 30 с; 36 циклів: 95 °С 10 с, 72 °С 30 с; 72 °С 10 хв. Ампліфіковані за допомогою ПЛР *AtTPK*-клони повної довжини були клоновані у вектор для експресії рQE-32 (“Qiagen”, Великобританія) шляхом рестрикції відповідними ферментами кожного окремого клону *AtTPK* та лігування Т4-ДНК лігазою (NEB, Великобританія). кДНК *AtTPK1* та *AtTPK2* були клоновані в рQE-32 вектор за допомогою *BamHI* та *SmaI* (NEB), *AtTPK3* — за допомогою *BamHI* та *KpnI* (NEB), *AtTPK5* — за допомогою *SacI* та *KpnI* (NEB).

Штам *E. coli* LB2003 трансформували вектором рQE32 чи рQE32-*AtTPK1, 2, 3, 4, 5*-конструкціями. Бактерію вирощували 16 год на поживному середовищі з високою концентрацією K^+ (KLM). Середовище KLM мало такий вміст: 0,5% екстракт дріжджів, 1% триптон, 150 мМ KCl та ампіцилін 100 мг/л. Із кожної 16-годинної культури відбирали 100 мкл та розбавляли в 5 мл свіжого KLM середовища. Стартову культуру в 5 мл KLM вирощували до досягнення нею оптичної густини 0,5 (OD600). Експресію генів ТРК-каналів арабідопсису індукували додаванням 1 мМ ізопропіл- β -D-1-тіоґалактопіранозиду (ІПТГ) (“Sigma”). Через 2 год після додавання ІПТГ вимірювали оптичну густину культури (OD600). Усі ІПТГ-культури розбавляли (нормалізували) до досягнення оптичної густини 0,5. Після цього з бактеріальних культур відбирали 10 мкл та робили розбавлення 10^2 , 10^3 . Оригінальний сток (OD600 = 0,5) та його розбавлення 10^2 , 10^3 розкапували по 5 мкл на тверде середовище з низьким вмістом K^+ , а саме 0,1 мМ KCl. Крім KCl тверде середовище містило: 0,5% екстракт дріжджів, 1% триптон, 1% агарозу, ампіцилін 100 мг/л, 1мМ ІПТГ. Експерименти з розкапуванням рідкої культури *E. coli* LB2003 в трьох різних розбавленнях на тверде середовище (Drop assay) повторювали три рази.

Загальну РНК бактерій виділяли з осаджених зразків бактеріальних трансформантів, що були оброблені ІПТГ. РНК виділяли за допомогою NucleoSpin RNA II kit (“Macherey-Nagel”, Німеччина) та відповідно до рекомендованого виробником протоколу. кДНК із загальної бактеріальної РНК синтезували за допомогою системи SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (“Invitrogen”) згідно з протоколом виробника. Синтезовану кДНК використовували для ПЛР ампліфікації *AtTPK1, 2, 3, 5* клонів за допомогою відповідних праймерів, що вже були описані раніше.

Результати та обговорення. Мутантний штам *E. coli* LB2003 не може рости на середовищі з вмістом K^+ меншим ніж 0,1 мМ, тому що цей штам втратив транспортери поглинання K^+ високої та середньої афінності Trk (TrkG та TrkH), Kup (TrkD) та Kdp [7]. При трансформації LB2003 “пустим” рQE-32 вектором (EV) цей мутантний штам бактерії має значно повільніший ріст порівняно із диким типом бактерії (WT), що була трансформована рQE-32 без вставки (WT + EV) (рис. 1). Для того щоб перевірити можливість елімінації чи мінімізації дефекту поглинання K^+ в мутантній лінії *E. coli* за допомогою експресії генів калієвих каналів рослин, LB2003 було трансформовано різними генами родини *TPK* з арабідопсису. Для підтвердження трансформації та експресії генів *AtTPK1, 2, 3, 5* в LB2003 проведено ЗТ-ПЛР (ПЛР зі зворотною транскрипцією). З цією метою з індукованих ІПТГ LB2003 трансформантів було виділено загальну РНК. Синтезовану із цих зразків загальну кДНК використовували для ампліфікації клонів *AtTPK* із повною довжиною (рис. 2). Використання ЗТ-ПЛР дало можливість встановити функціональність отриманих конструкцій. Всі лінії трансформованих клітин LB2003 при індукції ІПТГ показували експресію відповідних генів родини ТРК із арабідопсису. Для перевірки ефективності комплементації LB2003

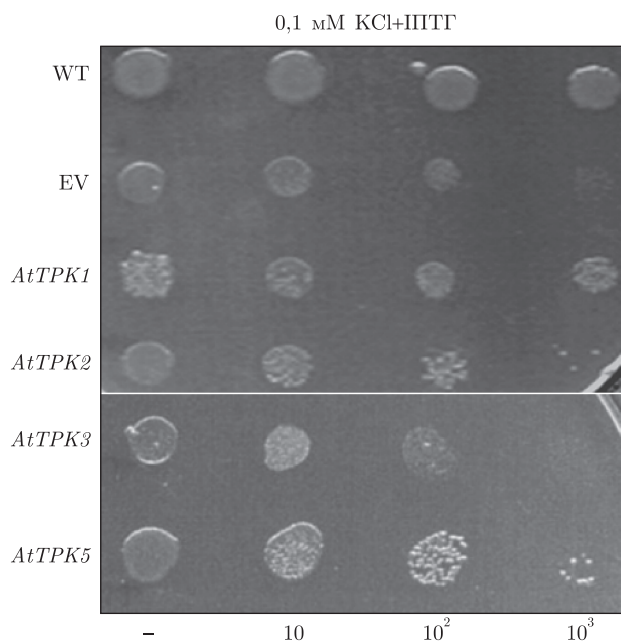


Рис. 1. Комплементация клітин *E. coli* штаму LB2003 за допомогою калієвих каналів родини ТРК із арабідопсису

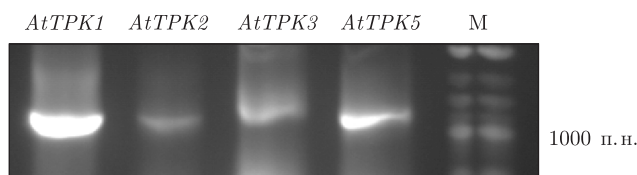


Рис. 2. Результати ЗТ-ПІР експресії *AtTPK1*, *2*, *3*, *5* в трансформантах LB2003

різними калієвими каналами з арабідопсису рідкі культури трансформантів розкапували на тверде середовище з 0,1 mM KCl та ПТГ у декількох розбавленнях (див. рис. 1). Аналіз динаміки росту різних ТРК-трансформантів LB2003 вказує на те, що експресія *TPK* генів із арабідопсису в бактеріальному мутанті може сприяти відновленню параметрів росту культури майже до рівня дикого типу (див. рис. 1). Хоча аналіз ЗТ-ПІР показує експресію *AtTPK3* у LB2003, робота цього каналу в бактеріальному мутанті істотно не впливала на покращення та відновлення характеристик росту бактерії на середовищі з мінімальним вмістом калію. Проте робота інших калієвих каналів, а саме: *AtTPK1*, *2* та *5*, привела до відновлення швидкості росту бактеріальної культури до показників дикого типу.

Таким чином, показано ефективність підходу комплементції бактеріальних мутантів генами рослин для встановлення деяких функціональних характеристик білків, що досліджуються. Одержані результати свідчать про те, що, крім *AtTPK1*, *AtTPK2* та *AtTPK5*, вірогідно, також можуть формувати функціональні системи транспорту калію в бактеріях.

1. 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.
2. Gobert A., Isayenkov S., Voelker C. et al. The two-pore channel TPK1 gene encodes the vacuolar K^+ conductance and plays a role in K^+ homeostasis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – 104. – P. 10726–10731.

3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – **95**. – P. 9773–9778.

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

Надійшло до редакції 15.03.2013

С. В. Исаенков, Ф. Й. М. Маатхаус

Функциональная экспрессия генов вакуолярных калиевых каналов семейства ТРК арабидопсиса в мутантной линии *Escherichia coli* LBA2003

Геном *Arabidopsis thaliana* кодирует пять различных изоформ AtTPK (ТРК, Two-pore potassium channels) — AtTPK1, 2, 3, 4, 5. Детально изучены функциональные характеристики только AtTPK1 и AtTPK4. Для того чтобы оценить функциональность других каналов, четыре изоформы AtTPK — AtTPK1, 2, 3, 5, были клонированы и экспрессированы в мутантной линии *E. coli* LB2003. Из-за дефектов в системе транспорта K⁺ линия LB2003 не может поглощать экзогенный K⁺. Характер экспрессии генов каналов в бактериальных клетках проанализирован с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией. При трансформации этой мутантной линии векторами, экспрессирующими AtTPK1, AtTPK2 или AtTPK5, происходит восстановление скорости роста LB2003 на питательной среде с низким содержанием K⁺, что свидетельствует о способности этих каналов формировать функциональные системы транспорта K⁺ в бактериальных клетках.

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

The functional expression of Arabidopsis two-pore Potassium channels genes in *Escherichia coli* mutant — LBA2003

The *Arabidopsis thaliana* genome encodes 5 different AtTPK isoforms — AtTPK1, 2, 3, 4, 5. The functional properties of only AtTPK1 and AtTPK4 were studied in detail. We have used a complementation of K⁺ uptake deficient *Escherichia coli* mutant LB2003 to analyze the functional properties of Arabidopsis thaliana TPK family members (AtTPK1, 2, 3, 5). The expression of AtTPK-genes in bacteria is analyzed by RT-PCR. Our results show that AtTPK1, AtTPK2, or AtTPK5 are restoring the LB2003 growth on low K⁺ media. Our data suggest that these channels can form functional K⁺ transport systems in *E. coli*.