

STRESZCZENIE

Ścieżki sygnałowe uczestniczące w regulacji wakuolarniej H⁺-ATPazy w warunkach stresu kadmowego

Magdalena Zboińska

Wakuolarna H⁺-ATPaza (V-ATPaza, EC 3.6.3.14) jest starym ewolucyjnie enzymem obecnym w systemie błon wewnętrznych wszystkich komórek eukariotycznych. Jej działanie polega na zależnym od ATP transporcie jonów wodorowych przez dwuwarstwą lipidową. Aktywność V-ATPazy i generowany przez nią gradient protonów w poprzek błony są niezbędne do zachowania podstawowych procesów komórkowych, takich jak wtórny transport substancji, zakwaszanie lizosomów, endocytoza i transport pęcherzykowy, glikozylacja białek czy autofagia. W komórkach roślinnych enzym ten występuje głównie w błonie wakuolarniej i pośredniczy w wielu funkcjach pełnionych przez wakuolę.

Jednym z czynników stresowych, hamujących działanie roślinnej V-ATPazy są jony kadmu, stanowiące dla komórki element toksyczny. Mechanizm inhibicji enzymu pod wpływem kadmu nie został jednak dotąd wyjaśniony. Podobnie niewiele wiadomo na temat czynników endogennych, które są odpowiedzialne za modulacje aktywności pompy w warunkach stresowych. W związku z tym podjęto badania, których celem było określenie roli H₂S, H₂O₂, NO i kwasu jasmonowego w regulacji V-ATPazy w korzeniach ogórka poddanych działaniu kadmu.

W pracy potwierdzono, że w korzeniach siewek ogórka traktowanych 100 μM CdCl₂ przez 24 h dochodzi do zmian w endogennym poziomie H₂S, H₂O₂ i NO, a także OPDA - prekursora syntezy jasmonianów. Poziom H₂S, H₂O₂ i OPDA zwiększa się, a NO obniża. Wykorzystanie związków służących jako donory tych przekaźników sygnału, inhibitory ich syntezy lub zmiatacze pozwoliło wykazać, że wszystkie analizowane cząsteczki modulują aktywność pompy protonowej - kwas jasmonowy i H₂O₂ działają jako inhibitory, podczas gdy NO i H₂S stymulują aktywność. Ponadto udowodniono, że zawartość H₂O₂ i NO w tkankach korzenia zmienia się istotnie już po 2 h działania kadmu, natomiast wzrost poziomu jasmonianów następuje po 8 h, a H₂S dopiero po 24 h ekspozycji na metal ciężki. Można zatem założyć, że hamowanie V-ATPazy w warunkach stresowych związane jest ze zwiększoną akumulacją jasmonianów i H₂O₂ (wytwarzanego najprawdopodobniej przez plazmolemową oksydazę NADPH i/lub w mitochondriach) oraz zmniejszoną syntezą NO

w wyniku hamowania reduktazy azotanowej. W późniejszym etapie odpowiedzi siewek ogórka na stres, zarówno kadm jak i H_2O_2 stymulują aktywność desulfhidraz cysteiny, powodując wzrost poziomu H_2S , który chroni pompę przed inhibicją. Potwierdzono, że wprowadzenie donora tego gazu do pożywki przed ekspozycją roślin na Cd^{2+} zapobiega inhibicji V-ATPazy. Podobny efekt H_2S wykazuje w warunkach *in vitro* chroniąc enzym przed oksydacją.

Analizując mechanizm działania wymienionych cząsteczek sygnałowych stwierdzono, że nie jest on związany z regulacją transkrypcji genów kodujących najważniejsze podjednostki enzymu, ponieważ nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian poziomu mRNA genów kodujących najważniejsze podjednostki enzymu, w tym katalityczną podjednostkę A (VHA-A), regulatorową podjednostkę B (VHA-B) oraz dwie podjednostki sektora błonowego - a (VHA-a) i c (VHA-c). Zmiana poziomu białka wybranych podjednostek V-ATPazy, skorelowana ze zmianą aktywności enzymu, nastąpiła wyłącznie w korzeniach roślin traktowanych kwasem jasmonowym. Wyniki sugerują, że H_2O_2 , H_2S i NO regulują aktywność V-ATPazy poprzez modyfikacje post-translacyjne w obrębie jej podjednostek. Celem działania wszystkich trzech cząsteczek jest grupa tiolowa (-SH) reszt cysteiny. H_2O_2 może indukować jej sulfenylację (-SOH) lub nieodwracalną oksydację do kwasów sulfinowego lub sulfonowego, działanie H_2S może prowadzić do persulfidacji (-SSH), natomiast NO indukuje S-nitrozylację (-SNO).

W związku z istotną rolą H_2S w ochronie V-ATPazy przed szkodliwym działaniem kadmu określono znaczenie persulfidacji w regulacji aktywności V-ATPazy, zawężając analizę do podjednostek A, B i E. Potwierdzono, że wszystkie trzy analizowane podjednostki V-ATPazy ulegają persulfidacji w korzeniach ogórka, zarówno w siewkach uprawianych w warunkach kontrolnych jak i w roślinach traktowanych czynnikami powodującymi hamowanie aktywności enzymu, czyli $CdCl_2$, H_2O_2 i kwasem jasmonowym. Zmiany w poziomie persulfidacji podjednostek zaobserwowano jednak wyłącznie w przypadku działania kwasu jasmonowego, który indukuje obniżenie stopnia persulfidacji VHA-E oraz prawdopodobnie VHA-B, co może być mechanizmem odpowiedzialnym za hamowanie V-ATPazy pod wpływem tego hormonu.

Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano model regulacji aktywności wakuolarniej H^+ -ATPazy w korzeniach ogórka, zarówno w warunkach kontrolnych jak i stresowych indukowanych obecnością kadmu w pożywce.

11.05.2021 r.

Magdalena Zborińska

ABSTRACT

Signaling pathways involved in the regulation of vacuolar H⁺-ATPase under cadmium stress

Magdalena Zboińska

Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase, EC 3.6.3.14) is evolutionary old enzyme found in the endomembrane system of all eukaryotic cells. The function of V-ATPase is ATP-dependent transport of hydrogen ions across lipid bilayer. V-ATPase activity and the proton gradient generated by the enzyme are necessary for the maintenance of fundamental cellular processes such as secondary active transport, lysosomal acidification, endocytosis and vesicular transport, protein glycosylation, as well as autophagy. In plant cells, this enzyme is located mainly in the vacuolar membrane, where it mediates many functions performed by the vacuole.

One of the stress factors inhibiting the action of plant V-ATPase are cadmium ions, which are a toxic element for the cell. However, the mechanism of enzyme inhibition by Cd has not yet been elucidated. Similarly, little is known about endogenous factors that are responsible for modulating proton pump activity under stressful conditions. For this reason, the goal of the study was to determine the role of H₂S, H₂O₂, NO and jasmonic acid in the regulation of V-ATPase in cucumber roots treated with cadmium.

The research confirmed that in the roots of cucumber seedlings exposed to 100 μM CdCl₂ for 24 h, the endogenous contents of H₂S, H₂O₂, NO, and a precursor of jasmonate synthesis - OPDA are changed. The levels of H₂S, H₂O₂ and OPDA increase whereas NO level decreases. Experiments using donors of signaling molecules, inhibitors of their synthesis or scavengers demonstrated that all analyzed substances modulate the activity of the proton pump - jasmonic acid and H₂O₂ act as inhibitors, while NO and H₂S stimulate the enzyme activity. Moreover, in cucumber roots, it was shown that the contents of H₂O₂ and NO change significantly after 2 h of Cd treatment, while the increase in jasmonate level occurs after 8 h, and H₂S after 24 h of exposure to heavy metal. It can therefore be assumed that under stress conditions V-ATPase inhibition is probably associated with increased accumulation of jasmonates and H₂O₂ (most likely produced by NADPH oxidase and/or in mitochondria) as well as with lowered NO synthesis caused by inhibition of nitrate reductase. At a later stage

of stress response in cucumber, both cadmium and H_2O_2 stimulate cysteine desulfhydrase activity to produce H_2S , which protects the pump against inhibition. It was confirmed that the exposure of *Cucumis* seedlings to H_2S donor before cadmium treatment prevents the down-regulation of V-ATPase. H_2S shows a similar effect *in vitro*, protecting the enzyme against oxidation.

By analyzing the mechanism of action of the above-mentioned signaling molecules, it was found that it is not related to the regulation of gene transcription, because no relevant differences in mRNA level of genes encoding the most important enzyme subunits, including catalytic A subunit (VHA-A), regulatory B subunit (VHA-B) and two subunits of the membrane sector - a (VHA-a) and c (VHA-c), were observed. The change in the protein level of selected V-ATPase subunits, correlated with changed enzyme activity, occurred only in the roots of plants treated with jasmonic acid. Results suggest that H_2O_2 , H_2S and NO control V-ATPase activity through post-translational modifications within its subunits. The target of this modification is thiol group of cysteine residues. H_2O_2 can induce its sulfenylation (-SOH) or irreversible oxidation to sulfinic or sulfonic acid, H_2S action can lead to persulfidation (-SSH), while NO can induce S-nitrosilation (-SNO).

Due to the significant role of H_2S in the V-ATPase protection against the harmful effects of cadmium, persulfidation of VHA-A, VHA-B and VHA-E and its importance was determined. It was confirmed in cucumber roots that all three analyzed V-ATPase subunits undergo persulfidation, both in seedlings grown under control conditions and in plants treated with factors inhibiting the enzyme activity, i.e. $CdCl_2$, H_2O_2 and jasmonic acid. However, changes in the level of subunit persulfidation were observed only after treatment with jasmonic acid, which induces a reduction in the persulfidation of VHA-E, and possibly VHA-B. This may be the mechanism responsible for the inhibition of V-ATPase by this hormone.

Based on the obtained results, a model of vacuolar H^+ -ATPase regulation in cucumber roots was proposed including both control conditions as well as cadmium stress conditions.

11.05.2021

Magdalena Zbainiska