

Шув

**Шувалов Алексей Витальевич**

**Функциональная идентификация и транспортные свойства  $Cl^-/H^+$ -  
антипортера мембран аппарата Гольджи клеток корня галофита  
*Suaeda altissima* (L.) Pall.**

03.01.05 – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

**Научные руководители:**

доктор биологических наук,  
профессор

**Балнокин Юрий Владимирович**

кандидат биологических наук

**Беляев Денис Вадимович**

**Официальные оппоненты:**

**Трофимова Марина Сергеевна,**

доктор биологических наук, лаборатория мембран растительных клеток,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, заведующий лабораторией

**Булывчев Александр Александрович,**

доктор биологических наук, доцент, кафедра биофизики, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, профессор

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет, Биолого-почвенный факультет

Защита состоится 24 декабря 2013 г. в 11 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 002.210.01 по специальности 03.01.05 – “Физиология и биохимия растений” (Биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, ул. Ботаническая, 35. Факс: (495) 977 8018, электронная почта: m-azarkovich@ippras.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва

**Автореферат разослан «23» ноября 2013 г.**

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
кандидат биологических наук

Азаркович Марина Ивановна

**Актуальность темы.** Одной из ключевых проблем современной биологии растений является поиск и исследование механизмов, лежащих в основе устойчивости растений к высоким концентрациям солей в почве. Среди этих механизмов важнейшую роль играет способность клеток поддерживать ионный гомеостаз. Эта способность реализуется за счет функционирования мембранного комплекса растительной клетки. Ионный гомеостаз поддерживается функцией локализованных в мембранах транспортеров и каналов. Исследование этих белков раскрывает пути адаптации растений к почвенному засолению. При высоких концентрациях NaCl в среде растения должны поддерживать низкие концентрации  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в цитоплазме, чтобы избежать токсических эффектов. Поддерживая низкие концентрации ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  в цитоплазме, клетки транспортируют их в вакуоль и/или внеклеточное пространство с затратой метаболической энергии.

Несмотря на то, что трансмембранный электрический потенциал на плазматической мембране (ПМ) препятствует транспорту  $\text{Cl}^-$  в цитоплазму, в условиях засоления  $\text{Cl}^-$  может поступать в клетку по градиенту электрохимического потенциала (Teakle, Tuerman, 2010). Механизмы транспорта  $\text{Cl}^-$  в клетке, в отличие от механизмов транспорта  $\text{Na}^+$ , слабо изучены. Известно, что в трансмембранный перенос анионов вовлечены мембранные белки семейства CLC (chloride channel), которое включает анионные каналы и анион/протонные антипортеры. Гены семейства CLC и их продукты обнаружены у бактерий, животных и растений (Marmagne et al., 2007; Jentsch, 2008). К представителям этого семейства относятся  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортеры, которые осуществляют вторично активный транспорт  $\text{Cl}^-$  в обмен на  $\text{H}^+$ , используя энергию градиента электрохимического потенциала протонов.

Функционирование  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера продемонстрировано в ПМ прокариот (Accardi, Miller, 2004; Jayaram et al., 2008) и внутренних мембранах клеток животных (Graves et al., 2008; Pusch, Zifarelli, 2009). Как на функциональном, так и молекулярно-генетическом уровне CLC-белки у растений исследованы хуже, чем у животных и бактерий. CLC-гены клонированы из растений *Arabidopsis thaliana*, риса, табака, и сои (De Angeli et al., 2007). В геноме *A. thaliana* идентифицировано семь генов (*AtCLCa-g*), кодирующих CLC-белки (Hechenberger et al., 1996; Lv et al., 2009). Продукты этих генов локализованы в разных мембранах, в частности, в тонопласте – *AtCLCa*, *b*, *c* и *g* (Geelen et al., 2000; Harada et al., 2004; De Angeli et al., 2006; 2010; Monachello et al., 2009; von der Fecht-Bartenbach et al., 2010), везикулах аппарата Гольджи (АГ) – *AtCLCd* и *AtCLCf* и тилакоидах – *AtCLCe* (von der Fecht-Bartenbach et al., 2007; Marmagne et al., 2007).

Длительное время исследования функций растительных CLC белков отставали от идентификации кодирующих их генов, хотя в нескольких ранних работах были обнаружены  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$  и  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  обменные транспортные активности через тонопласт клеток корней красной свеклы и овса (Blumwald, Poole, 1985; Shumaker, Sze, 1987). В последнее время наблюдается повышенный интерес к исследованию функций и физиологической

роли растительных CLC. В ряде работ показано, что локализованные в тонопласте AtCLCa и AtCLCb являются  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ -антипортерами и вовлечены в транспорт нитрата из цитоплазмы в вакуоль (Geelen et al., 2000; Harada et al., 2004; De Angeli et al., 2006; Monachello et al., 2009). Крайне мало исследований посвящено функциям  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортеров в растениях. Показано, что AtCLCc, локализованный в тонопласте замыкающих клеток устьиц *Arabidopsis thaliana*, является  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортером и вовлечен в накопление  $\text{Cl}^-$  вакуолями, тем самым регулируя работу устьичного аппарата (Jossier et al., 2010). Было установлено, что *GmCLC1*, кодирующий локализованный в тонопласте клеток сои  $\text{Cl}^-$  транспортер, вовлечен в накопление  $\text{Cl}^-$  в вакуолях. Экспрессия этого гена в клетках табака BY-2 повышала их устойчивость к NaCl (Li et al., 2006; Wang et al., 2012).

Мы предположили, что  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортер играет важную роль у галофитов, где он участвует в регуляции концентраций  $\text{Cl}^-$  в цитоплазме в условиях засоления. Предполагаемая роль этого антипортера состоит в экспорте ионов  $\text{Cl}^-$  из цитоплазмы в вакуоль и/или апопласт. Основанием для этого предположения послужили данные, полученные ранее в лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости ИФР РАН, о распределении ионов  $\text{Cl}^-$  в клетках и тканях соленакапливающего галофита *Suaeda altissima* (Балнокин с соавт., 2007; Халилова, 2008).

**Цель и задачи исследования.** Цель работы заключалась в функциональной идентификации, определении локализации и исследовании свойств  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера в клетках корня галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall..

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. С помощью оптического  $\Delta$  рН-индикатора акридинового оранжевого (АО) и флуоресцентного рН-индикатора пиранина в мембранах, выделенных из клеток корня *S. altissima*, продемонстрировать трансмембранный  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен.
2. Определить мембранную локализацию  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмена путем разделения выделенных мембран в непрерывном градиенте плотности йодиксанола.
3. Исследовать свойства  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмена (электрогенная активность, зависимость от трансмембранного электрического потенциала, рН-зависимость, чувствительность к ингибиторам анионного транспорта, ионная специфичность, сродство к  $\text{Cl}^-$ )

**Научная новизна.** Впервые было продемонстрировано функционирование  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера в мембранах АГ, выделенных из растительного организма и изучены свойства этого  $\text{Cl}^-$ -транспортера.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Функциональная идентификация  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера в мембранах АГ и исследование его свойств позволили высказать гипотезу об участии клеточных систем везикулярного транспорта в переносе  $\text{Cl}^-$  из цитоплазмы в вакуоль и/или апопласт и, таким образом, в регуляции концентрации ионов в клетках галофитов. Полученные результаты вносят существенный вклад в

понимание механизмов, лежащих в основе солеустойчивости растений, и могут быть использованы в учебных курсах биологических факультетов университетов.

**Апробация работы.** Основные результаты работы были представлены в устных докладах на следующих конференциях: 53-ей научной конференции МФТИ «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук» (Долгопрудный, 2010), XVIII международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011 (Москва, 2011), 15-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2011), IV Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2011» (Воронеж, 2011), межинститутском научном молодежном семинаре «Актуальные проблемы физиологии, молекулярной биологии и биотехнологии растений» (Москва, 2012), XIX международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2012» (Москва, 2012), 16-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2012), Международной научно-практической конференции «Адаптационные стратегии живых систем» (Новый Свет, Украина, 2012), IV съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012), II (X) Международной Ботанической Конференции молодых ученых в Санкт-Петербурге (Санкт-Петербург, 2012), V Всероссийском с международным участием медико-биологическом Конгрессе молодых ученых "Симбиоз-Россия 2012" (Тверь, 2012), XX международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013» (Москва, 2013), 17-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, 2013), Международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013) и других. Кроме того были сделаны стендовые сообщения на следующих конференциях: Всероссийском симпозиуме «Растение и стресс» (Москва, 2010), VII съезде Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий» (Нижний Новгород, 2011), Всероссийском симпозиуме «Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии (Москва, 2011).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 20 работ, из которых 1 – в рецензируемом журнале, рекомендованном ВАК.

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Объектом исследования** были 50-60-дневные растения *Suaeda altissima* (L.) Pall., выращенные в водной культуре на среде Робинсона и Даунтона (Robinson, Downton, 1985), содержащей дополнительно 100 мМ NaCl.

**Получение мембранных препаратов** из корней *S. altissima*. Исследования проводили на фракции частично очищенных мембран и фракции, обогащенной

мембранами АГ. Фракцию частично очищенных мембран (ЧОМ) получали центрифугированием микросом в ступенчатом градиенте плотности сахарозы (0/30 %), отбирая мембраны с границы этих двух слоев.

Фракцию, обогащенную мембранами аппарата Гольджи (МАГ), получали разделением частично очищенной мембранной фракции в линейном градиенте плотности йодиксанола (0-30 %).

**Определение состава мембранных фракций** проводили путем определения активностей соответствующих ферментов-маркеров. Содержание ПМ оценивали по активности ортованадатчувствительной АТФазы (АТФазы Р-типа), **тонопласта** – нитратчувствительной АТФазы (АТФазы V-типа), **АГ** – латентной ИДФазы, **эндоплазматического ретикулума (ЭПР)** – антимицин А-нечувствительной НАД(Ф)Н-цитохром с редуктазы, **мембран митохондрий** – цитохром с оксидазы (Hodges, Leonard, 1974). **Концентрацию белка** определяли методом Симпсона и Зонне (Simpson, Sonne, 1982). Неорганический фосфат определяли методом Сахеки (Saheki et al., 1985). **Плавающую плотность мембран** определяли по калибровочной зависимости коэффициента преломления раствора йодиксанола от его плотности.

**Концентрации  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в люмене** полученных мембранных везикул оценивали по концентрациям этих ионов в надосадочной жидкости, оставшейся после центрифугирования гомогената разрушенных клеток, т.е. в среде, где происходило формирование везикул. Концентрации  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в надосадочной жидкости определяли с помощью пламенного фотометра Leki FP 640 (Финляндия).

**Загрузку мембранных везикул** средами заданного состава проводили гипосмотическим шоком, с последующей отмывкой везикул от наружного пиранина на колонке с сефадексом G-50. Загрузку пиранином контролировали по интенсивности флуоресценции этого зонда (при  $\lambda_{\text{ex}}=458$  нм  $\lambda_{\text{em}}=510$  нм) в разбавленной суспензии везикул.

**pH в везикулярном люмене** определяли по отношению интенсивностей флуоресценции ( $\lambda_{\text{em}}=510$  нм) непроникающего через мембраны pH-индикатора пиранина (8-hydroxy-1,3,6-pyrene trisulfonate), находящегося внутри везикул, при двух возбуждающих длинах волн  $\lambda_{\text{ex}}=405$  нм и  $\lambda_{\text{ex}}=458$  нм). Для этой цели был использован построенный нами калибровочный график зависимости этого отношения от pH внутри везикул.

**$\Delta\text{pH}$  на мембране** регистрировали по изменению разности поглощения ( $A_{492} - A_{540}$ ) проникающего в везикулю  $\Delta\text{pH}$ -индикатора акридинового оранжевого (АО) (Palmgren, 1991).

**Изменения  $\Delta\psi$**  на везикулярной мембране регистрировали с помощью потенциалчувствительных индикаторов, сафранина О (Akerman, Wikstrom, 1976) или оксонола VI (Bashford et al., 1979). Генерацию  $\Delta\psi$  со знаком «минус» внутри везикул регистрировали

как уменьшение разности поглощения сафранина O ( $A_{554} - A_{524}$ ), а генерацию  $\Delta\psi$  со знаком «плюс» – как уменьшение разности поглощения оксонола VI ( $A_{621} - A_{582}$ ).

Для записи дифференциального поглощения оптических зондов АО, сафранина O и оксонола VI использовали спектрофотометр Hitachi 557, работающий в двухволновом режиме.

**Ингибиторный анализ**  $Cl^-/H^+$ -обмена проводили с использованием ингибиторов анионного транспорта DIDS (4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene-disulfonic acid) и NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid).

**Диффузионные потенциалы**  $Na^+$  или  $K^+$  создавали, задавая концентрационные градиенты этих ионов на мембране в присутствии ионофоров ETH157 (15 мкМ) или валиномицина (300 нМ), соответственно. В ряде экспериментов на везикулярной мембране создавали нулевой диффузионный потенциал  $K^+$ , для чего выравнивали концентрации  $K^+$  по обе стороны мембраны в присутствии валиномицина в среде.

**Статистика.** Эксперименты проводили в 3-5 кратных биологических повторностях. На графиках представлены результаты типичных экспериментов или даны среднеарифметические значения измерявшихся параметров и их стандартные отклонения.

**Структура и объем диссертации.** Работа изложена на 112 страницах машинописного текста и содержит 21 рисунок. Список литературы включает 159 источников.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Регистрация $Cl^-/H^+$ -обмена на везикулах фракции ЧОМ.

Основной подход в функциональной идентификации хлоридно-протонного антипортера в клетках корня галофита *S. altissima* состоял в демонстрации  $pCl^-$ -зависимого транспорта протонов через мембрану, который регистрировали на выделенных из корней мембранных везикулах. Предварительные эксперименты были проведены на фракции частично очищенных мембран (ЧОМ). Фракция ЧОМ, как показало определение активностей ферментов-маркеров, содержала мембраны различных клеточных органелл: ПМ, тонопласта, АГ и ЭПР, но в ней практически отсутствовали мембраны митохондрий (таблица 1). Транспорт  $H^+$  через мембраны ЧОМ регистрировали с помощью оптического  $\Delta pH$ -индикатора акридинового оранжевого, флуоресцентного  $pH$ -индикатора пиранина и индикатора электрического потенциала ( $\Delta\psi$ ) сафранина O. Создание на мембране  $pCl^-$ , направленного из наружной среды внутрь везикул, приводило к защелачиванию везикулярного люмена, которое сопровождалось генерацией на мембране  $\psi$ , отрицательного внутри везикул. Полученные результаты указывали на  $Cl^-/H^+$ -обмен в везикулах фракции ЧОМ и возможное вовлечение в этот обмен  $Cl^-/H^+$ -антипортера.

Необходимо было выяснить мембранную локализацию предполагаемого  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера.

### Разделение мембран центрифугированием в градиенте плотности йодиксанола

Для того чтобы выяснить, в мембранах какого типа осуществляется  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен, фракция ЧОМ была разделена в линейном градиенте плотности йодиксанола (рис. 1 а). Йодиксанол, как вещество, используемое для создания градиентов плотности, имеет ряд преимуществ по сравнению с сахарозой. Йодиксанол обладает низкой вязкостью и за счет относительно высокого молекулярного веса растворы йодиксанола при одинаковых с растворами сахарозы плотностях обладают гораздо более низкой тоничностью. Фракции, отобранные с линейного градиента йодиксанола, а также исходная микросомальная фракция и фракция ЧОМ, были исследованы на активность ферментов-маркеров мембран (таблица 1).

Типичное распределение белка, активностей ферментов-маркеров и  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмена в градиенте показано на рисунке 1 б, в. Два небольших белковых пика соответствовали мембранам с плавучей плотностью 1,08-1,10 и 1,13-1,14 г/см<sup>3</sup>. Нижнему белковому пику соответствовали максимумы активностей нитрат- и ванадат-чувствительной АТФазы (маркеры тонопласта и ПМ соответственно), а верхнему пику – активность латентной ИДФазы (маркер мембран АГ).

Все мембранные фракции, собранные с градиента йодиксанола, были тестированы на активность  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмена.  $\Delta\text{pCl}$ -зависимое защелачивание везикулярного люмена определяли с помощью флуоресцентного рН-зонда пиранина, загруженного внутрь везикул на первом этапе выделения мембран во время гомогенизации корней.  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен регистрировали при нулевом значении  $\text{K}^+$  диффузионного потенциала. Для этого концентрации  $\text{K}^+$  снаружи и внутри везикул выравнивали, а в среду вносили валиномицин. Создание  $\Delta\text{pCl}$  осуществляли внесением в среду  $\text{Cl}^-$ -ВТР в конечной концентрации 70 мМ. Изменение рН внутри везикул в ответ на добавление  $\text{Cl}^-$  рассчитывали, как разность между значением рН внутри везикул до и после добавления  $\text{Cl}^-$ -ВТР.

Наибольшая активность  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмена наблюдалась во фракциях мембран, отобранных из верхней части градиента йодиксанола. Профиль этой активности по существу совпадал с профилем активности латентной ИДФазы. Этот результат указывает на то, что активность  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмена, в основном, ассоциирована с мембранами АГ. В последующих экспериментах мы объединяли верхние 6 фракций, собранные с градиента йодиксанола, которые характеризовались наибольшими активностями латентной ИДФазы и  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмена, в одну, которую назвали фракцией, обогащенной мембранами аппарата Гольджи (МАГ). О степени загрязнения этой фракции другими мембранами можно судить по данным, представленным в таблице 1. Содержание мембранного белка во фракции МАГ составило лишь 19% и 5,4% от его количеств во фракциях ЧОМ и микросомальной



**Таблица 1. Активности ферментов-маркеров в мембранных фракциях, выделенных из корней галофита *Suaeda altissima***

Общие активности ванадат-чувствительной АТФазы, нитрат-чувствительной АТФазы и лагетной ИДФазы выражены в (нмоль Рi)·фракция<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>; удельные активности этих ферментов выражены в (нмоль Рi)·(мкг белка)<sup>-1</sup>·ч<sup>-1</sup>. Общие активности антимисин А нечувствительной НАД(Ф)Н цитохром с редуктазы и цитохром с оксидазы выражены в (нмоль цитохрома с)·фракция<sup>-1</sup>·с<sup>-1</sup>; удельные активности этих ферментов выражены в (нмоль цитохрома с)·(мкг белка)<sup>-1</sup>·ч<sup>-1</sup>.

	Исходные микросомы		ЧОМ		МАГ	
	Общая	Удельная	Общая	Удельная	Общая	Удельная
<b>Белок (мг·фракция<sup>-1</sup>)</b>	<b>35,1 ± 3,9</b>		<b>10,1 ± 1,7</b>		<b>1,9 ± 0,5</b>	
<b>Ванадат-чувствительная АТФаза</b>	<b>49,4 ± 7,8</b>	<b>5,4 ± 0,5</b>	<b>40,5 ± 4,6</b>	<b>12,8 ± 1,5</b>	<b>2,9 ± 0,8</b>	<b>5,4 ± 0,8</b>
<b>Нитрат-чувствительная АТФаза</b>	<b>50,3 ± 6,2</b>	<b>6,1 ± 0,4</b>	<b>36,5 ± 4,6</b>	<b>11,5 ± 1,4</b>	<b>1,3 ± 0,5</b>	<b>2,5 ± 0,6</b>
<b>Ладетная ИДФаза</b>	<b>9,6 ± 1,3</b>	<b>1,1 ± 0,2</b>	<b>9,6 ± 1,5</b>	<b>2,9 ± 0,3</b>	<b>1,4 ± 0,2</b>	<b>2,7 ± 0,6</b>
<b>Антимисин А нечувствительная НАД(Ф)Н-цитохром с редуктаза</b>	<b>1131 ± 161</b>	<b>124 ± 9</b>	<b>383 ± 34</b>	<b>121 ± 11</b>	<b>41,9 ± 6,1</b>	<b>79,7 ± 9,2</b>
<b>Цитохром с оксидаза</b>	<b>6105 ± 495</b>	<b>686 ± 35</b>	<b>492 ± 46</b>	<b>156 ± 15</b>	<b>7,2 ± 1,6</b>	<b>13,7 ± 2,1</b>

фракции, соответственно. Общие и удельные активности нитрат-чувствительной АТФазы, ванадат-чувствительной АТФазы и антимицин А нечувствительной НАД(Ф)Н цитохром с редуктазы были существенно ниже во фракции МАГ, чем во фракции ЧОМ. Лишь 1,5 и 8,9% общей и удельной активностей цитохром с оксидазы сохранилось от соответствующих активностей во фракции ЧОМ. Хотя общая активность латентной ИДФазы во фракции МАГ после центрифугирования в градиенте йодиксанола снижалась, ее удельная активность сохранялась на уровне активности фракции ЧОМ и была в 2,5 раза выше, чем в микросомальной фракции. Таким образом, фракция МАГ обогащена мембранами АГ и содержит относительно небольшие количества других мембран.

Эксперименты по определению активности латентной ИДФазы позволяют предположить наличие, преимущественно, правильной ориентации мембран АГ. Об этом свидетельствует тот факт, что активность этого фермента проявлялась преимущественно в присутствии в среде тритона X100, делающего мембрану проницаемой для субстрата (ИДФ) и была относительно небольшой в отсутствие детергента (не более 25%). Это указывает на то, что активный центр фермента находился внутри везикул и, лишь когда детергент открывал доступ субстрата к активному центру, происходил гидролиз ИДФ. Такая локализация активного центра латентной ИДФазы характерна для нормально ориентированных везикул АГ (Klohs, Goff, 1980). Следует отметить, что при нормальной ориентации полученных везикул мембран АГ, в ходе выделения они подвергались перезамыканию. Об этом свидетельствует загрузка везикул непроницающим через мембрану рН-индикатором пиранином. Везикулы перезамыкались и в ходе гипосмотического шока, о чем говорит наличие в них пиранина. Везикулы, подвергавшиеся шоку, также сохраняли преимущественно нативную ориентацию.

В дальнейшем все эксперименты проводили на фракции МАГ.

### **Регистрация электрогенного $Cl^-/H^+$ -обмена во фракции МАГ**

Защелачивание везикулярного люмена, вызванное  $Cl^-/H^+$ -обменом во фракции МАГ, обнаруживали с помощью  $\Delta pH$ -индикатора АО. В экспериментах с АО требовалось предварительное закисление везикулярного люмена, так как этот краситель позволяет регистрировать  $\Delta pH$  только с более кислым рН внутри везикул, чем в среде (Palmgren, 1991). Для создания градиента рН такого направления было использовано наличие внутри везикул ионов  $Na^+$ . Выделенные везикулы содержали ионы  $Na^+$ , которые попадали в везикулярный люмен на начальной стадии процедуры выделения везикул при гомогенизации корней. Внесение в суспензию везикул  $Na^+/H^+$ -антипортера, моненсина, (Овчинников, Иванов, Шкроб, 1974), приводило к закислению люмена, (рис. 2 а). Встраивающийся в мембрану экзогенный  $Na^+/H^+$ -антипортер вызывал обмен находящихся внутри ионов  $Na^+$  на наружные протоны и, соответственно, приводил к генерации  $\Delta pH$  с более кислым рН внутри везикул, чем в среде, что регистрировалось как снижение

разности поглощения АО. Cl-ВТР, добавленный к суспензии везикул после генерации  $\Delta pH$ , не приводил к диссипации последнего. Другими словами, создание на мембране  $\Delta pCl$  не приводило к защелачиванию везикулярного люмена и выходу протонов из везикул (рис. 2 а). Диссипация  $\Delta pH$  наблюдалась только после добавления к реакционной среде липофильного катиона тетрафенилфосфония ( $TFF^+$ ). Эффект  $TFF^+$  усиливался с увеличением его концентрации. Мы предположили, что генерация трансмембранного электрического потенциала, отрицательного внутри везикул, происходящая при работе электрогенного  $Cl^-/H^+$ -антипортера ингибировала дальнейший  $Cl^-/H^+$ -обмен. Хорошо проникающий через мембрану  $TFF^+$ , нейтрализовал отрицательные заряды внутри везикул и тем самым поддерживал функционирование  $Cl^-/H^+$ -антипортера.

Предположение об ингибировании  $Cl^-/H^+$ -антипортера отрицательными зарядами, накапливающимися внутри везикул, согласуется с результатами наших экспериментов, в которых при создании на мембране  $\Delta pCl$  наблюдали генерацию трансмембранного электрического потенциала, отрицательного внутри везикул. В этом эксперименте (рис 2 б), условия которого соответствуют условиям эксперимента с  $\Delta pH$  зондом АО (рис 2 а), использовали  $\Delta\psi$ -чувствительный индикатор сафранин О, позволяющий регистрировать  $\Delta\psi$ , отрицательные внутри везикул (Akerman and Wikstrom, 1976). После генерации такого  $\Delta\psi$  (снижение дифференциальной абсорбции сафранина О) в ответ на добавление Cl-ВТР, внесенный в суспензию  $TFF^+$  приводил к быстрому сдвигу  $\Delta\psi$  в положительную сторону с последующим его медленным возвращением к более отрицательным значениям до достижения определенного уровня (рис 2 б).

Двухфазная кинетика изменений  $\Delta\psi$ , которые происходили в ответ на добавление  $TFF^+$ , находит объяснение в рамках предположения о функционировании  $Cl^-/H^+$ -антипортера. Быстрое смещение  $\Delta\psi$  к менее отрицательным значениям, вызванное добавлением  $TFF^+$ , по-видимому, включало антипортер, заблокированный накопившимися внутри везикул отрицательными зарядами. Смещение потенциала к менее отрицательным значениям (при добавлении  $TFF^+$ ) активировало антипортер, который снова смещал потенциал в отрицательную область, что опять тормозило его работу. В присутствии  $Cl^-$  и  $TFF^+$   $\Delta\psi$  на везикулярной мембране, по-видимому, определялся балансом двух процессов, а именно электрогенным  $Cl^-/H^+$ -обменом, смещающим  $\Delta\psi$  к более отрицательным значениям, и генерацией положительного диффузионного тетрафенилфосфониевого потенциала. По мере повышения концентрации  $TFF^+$  в среде вклад второго процесса в формирование потенциала становился всё больше и равновесное значение  $\Delta\psi$  становилось все менее отрицательным (рис. 2 б).

Чтобы проверить, что наблюдаемые резкие сдвиги дифференциального поглощения сафранина О в ответ на внесение  $TFF^+$  действительно отражают изменения в  $\Delta\psi$ , мы сравнили изменения в дифференциальном поглощении сафранина О при добавлении Cl-ВТР с таковым при внесении Cl-ВТР совместно с  $TFF^+$  (рис 3 б). Снижение

$\Delta A_{524-554}$  было меньше, в ответ на (Cl-ВТР + ТФФ<sup>+</sup>), чем в ответ на Cl-ВТР, что указывает на сдвиг  $\Delta\psi$  к более отрицательным значениям в ответ на Cl-ВТР, чем на (Cl-ВТР + ТФФ<sup>+</sup>). Внутривезикулярные изменения рН в ответ на Cl-ВТР или (Cl-ВТР + ТФФ<sup>+</sup>) соответствовали различиям в сдвигах  $\Delta\psi$  (рис. 3 а). Защелачивание везикулярного люмена наблюдалось при внесении Cl<sup>-</sup> совместно с ТФФ<sup>+</sup>, но не наблюдалось защелачивания при добавлении ионов Cl<sup>-</sup> без проникающего катиона (рис. 3 б).

Полученные результаты свидетельствуют в пользу функционирования в мембранах АГ Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-антипортера.

### Электрогенные свойства Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-антипортера

Очевидно, что обмен аниона на катион, сопровождается разделением зарядов на мембране и генерацией трансмембранной разности электрических потенциалов. В наших экспериментах Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-обмен на мембране сопровождался генерацией  $\Delta\psi$ , отрицательного внутри везикул. Этот результат не согласуется с транспортом Cl<sup>-</sup> через анионные каналы или переносом посредством Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-симпортера, поскольку в этих случаях в ответ на внесение Cl<sup>-</sup> должно наблюдаться закисление внутривезикулярного люмена. В соответствии с моделью функционирования в мембране Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-антипортера  $\Delta pCl^-$ -зависимое защелачивание люмена тем интенсивнее, чем эффективнее нейтрализуются отрицательные заряды внутри везикул. Нейтрализация зарядов может осуществляться за счет проникновения внутрь везикул катионов, вносимых в среду вместе с Cl<sup>-</sup>.

Это предположение было подтверждено нами в экспериментах, где наблюдали  $\Delta pCl^-$ -зависимое защелачивание везикулярного люмена при внесении Cl<sup>-</sup> с катионами, различающимися по способности проникать через биологические мембраны. В этих экспериментах изменения рН в везикулярном люмене регистрировали с помощью АО и пиранина.

В экспериментах с АО, после генерации на мембране  $\Delta pH$  (с более кислым значением внутри везикул, чем в среде) с помощью моненсина, в ответ на последующее внесение в суспензию Cl<sup>-</sup> в форме различных солей наблюдали диссипацию предварительно созданного  $\Delta pH$ , т.е. происходил отток H<sup>+</sup> из везикул наружу. Скорость диссипации  $\Delta pH$  была разной при внесении Cl<sup>-</sup> в среду в форме Cl-ВТР, холинхлорида или Cl-Tris. Наибольшая скорость диссипации наблюдалась, если Cl<sup>-</sup> добавляли в форме Tris-соли. В присутствии слабо проникающего ВТР<sup>+</sup> скорость диссипации была едва заметной. С холином<sup>+</sup> скорость разрядки была промежуточной (рис. 4 а). Такой же результат был получен в экспериментах с пиранином (рис 4 б.).

Исследовали также действие ионов Cl<sup>-</sup>, вносимых в среду с разными катионами (Tris, холин, ВТР), на трансмембранный электрический потенциал (рис. 4 в). Добавление Cl<sup>-</sup> к среде в форме разных солей приводило к изменениям  $\Delta\psi$  на везикулярной мембране.

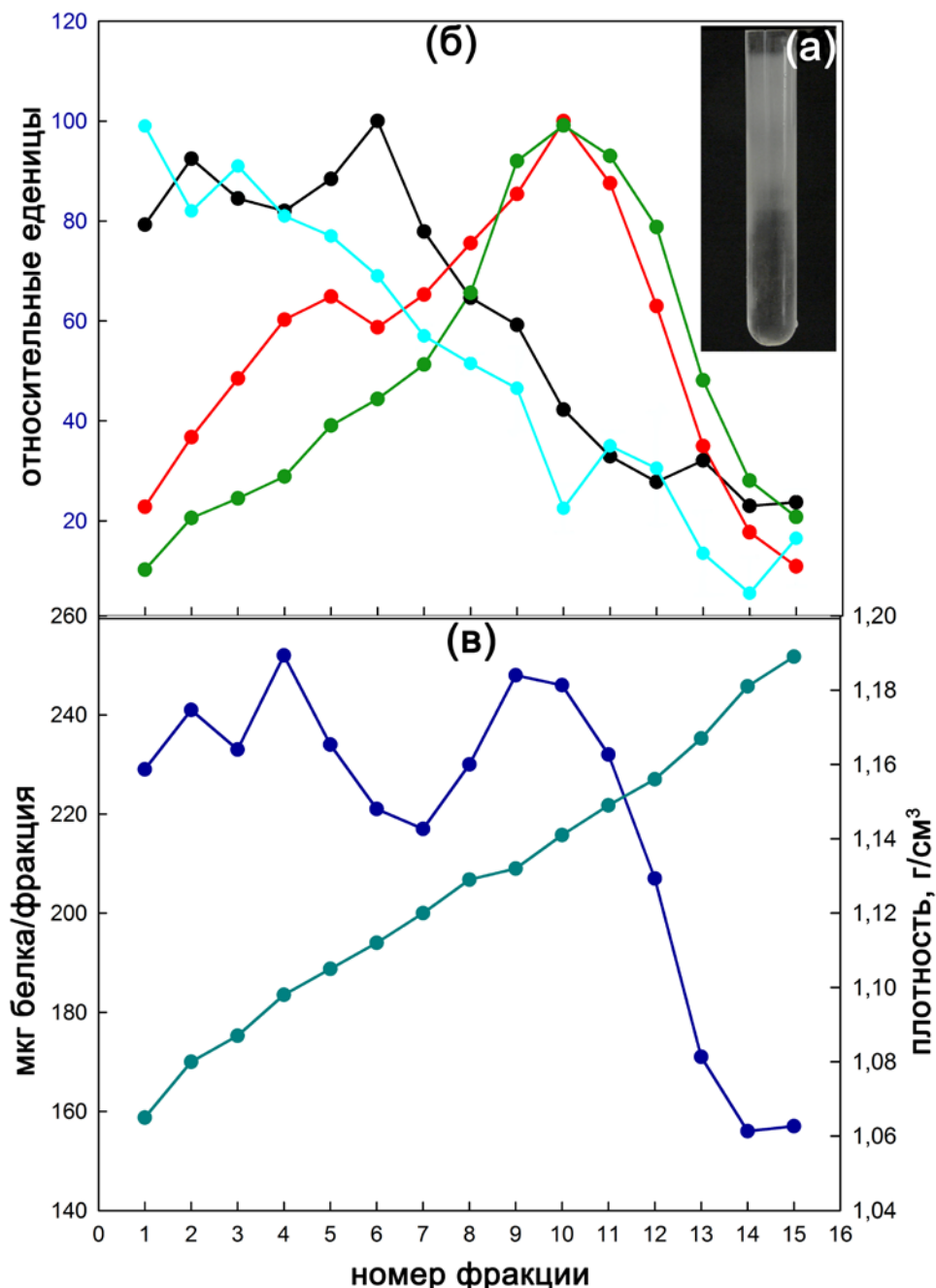


Рис. 1. Результаты центрифугирования в непрерывном градиенте плотности йодиксанола мембран клеток корня *S. altissima*, отобранных с одноступенчатого сахарозного градиента. (а) Вид градиента плотности йодиксанола после центрифугирования мембран. Часть градиента, визуально содержащая мембраны, была разобрана на фракции. (б) Распределение активностей ферментов-маркеров мембран и активности  $CI/H^+$ -обмена в градиенте плотности йодиксанола: латентная ИДФаза (черный), **ванадат-чувствительная АТФаза (красный)**, **нитрат-чувствительная АТФаза (зеленый)**,  **$CI/H^+$ -обмен (циан)**. Для всех ферментов наибольшая активность во фракциях принята за 100, что соответствует  $18,2 \text{ нмоль } P_i \text{ мин}^{-1} \text{ фр}^{-1}$  для латентной ИДФазы,  $38,9 \text{ нмоль } P_i \text{ мин}^{-1} \text{ фр}^{-1}$  для ванадат-чувствительной АТФазы,  $63,2 \text{ нмоль } P_i \text{ мин}^{-1} \text{ фр}^{-1}$  для нитрат-чувствительной АТФазы.  $CI/H^+$ -обмен регистрировали в стандартной реакционной среде (см. рис. 2) с помощью флуоресцентного рН-индикатора пиранина (200 мкМ), загруженного в везикулы на начальной стадии процедуры выделения мембран при гомогенизации корней. (в) Распределение белка (синий цвет) и плотность фракций (темный циан).



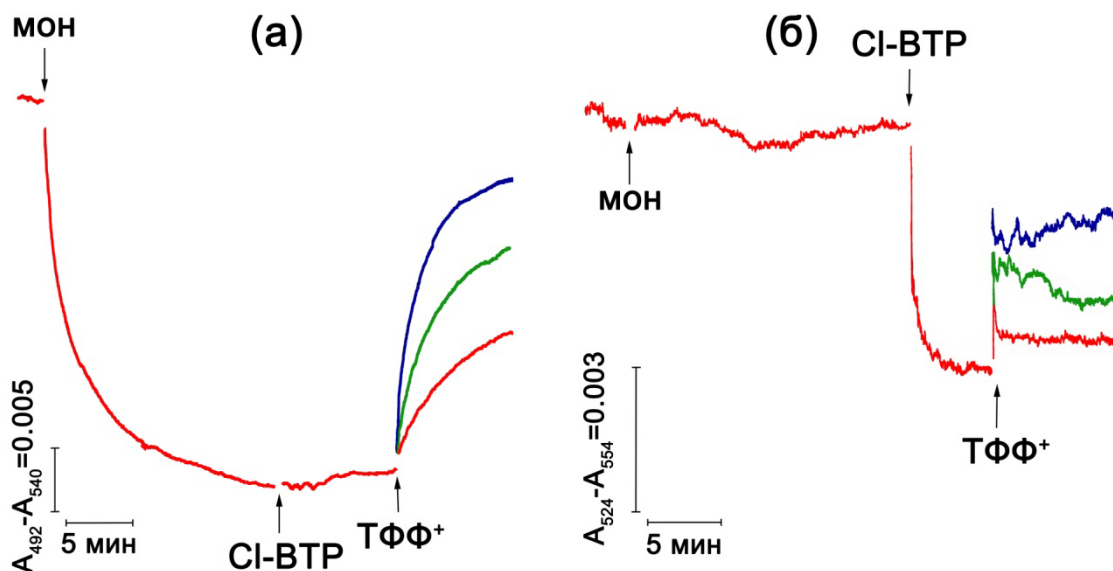


Рис. 2. Индукция  $\Delta pCl$ -зависимого защелачивания везикулярного люмена внесением в суспензию мембран хорошо проникающего катиона  $TFF^+$  после Cl-BTP. Изменения (а)  $\Delta pH$  и (б)  $\Delta \psi$  при последовательном внесении в среду моненсина (300 нМ), Cl-BTP (70 мМ, pH 7,5) и  $TFF^+$  (0,5 мМ (красный цвет), 1 мМ (зеленый) или 2 мМ (синий)) наблюдались с помощью  $\Delta pH$ -индикатора АО (10 мкМ АО) и  $\Delta \psi$ -индикатора сафранина О (8 мкМ), соответственно. Реакцию проводили в стандартной реакционной среде: 0,5 М сахароза, 20 мМ ВТР-MES (pH 7,5), 3 мМ EGTA, 2 мМ  $MgSO_4$ , везикулы (40-100 мкг мембранного белка).

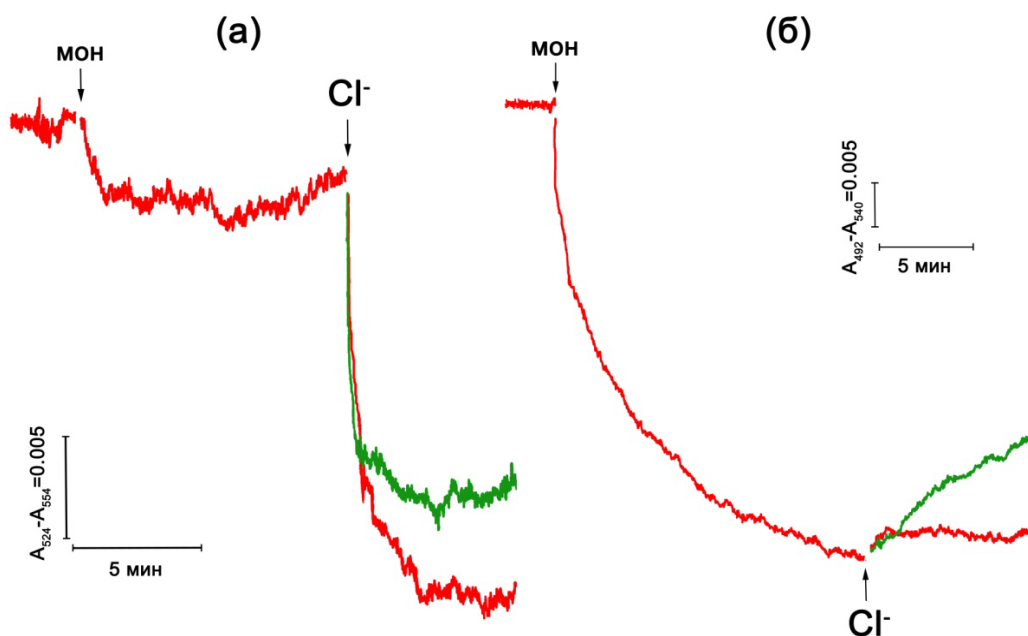


Рис. 3. Индукция  $\Delta pCl$ -зависимого защелачивания везикулярного люмена путем внесения в суспензию мембран хорошо проникающего катиона  $TFF^+$  одновременно с Cl-BTP. Изменения (а)  $\Delta \psi$  и (б)  $\Delta pH$  в ответ на добавление Cl-BTP или (Cl-BTP +  $TFF^+$ ) наблюдали с  $\Delta pH$ -индикатором АО (10 мкМ) и  $\Delta \psi$ -индикатором сафранином О (8 мкМ), соответственно. Cl-BTP (красный) и (Cl-BTP +  $TFF^+$ ) (зеленый) вносили в суспензию везикул после закисления люмена моненсином (300 нМ). Cl-BTP (pH 7,5) и  $TFF^+$  были добавлены в концентрациях 70 мМ и 1 мМ соответственно. Реакцию проводили в стандартной реакционной среде.

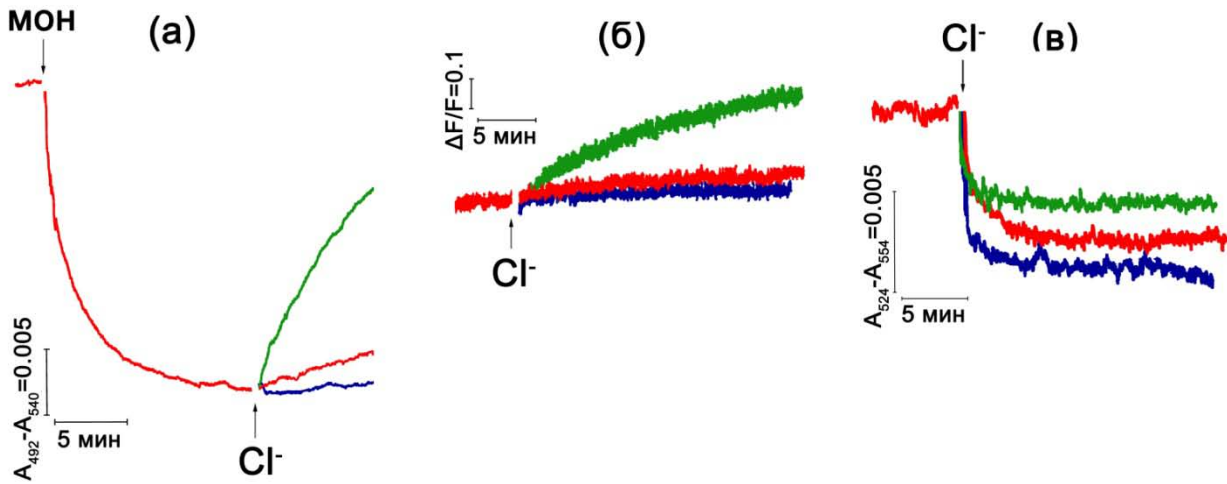


Рис. 4.  $\Delta pCl$ -зависимое защелачивание везикулярного люмена и  $\Delta pCl$ -зависимая генерация трансмембранного электрического потенциала в ответ на добавление 70 мМ  $Cl^-$  вместе с катионами, обладающими разной проникающей способностью через мембрану ( $Tris^+$  – зеленый цвет,  $холин^+$  – красный,  $ВТР^+$  – синий). (а) Защелачивание везикулярного люмена регистрировали с помощью АО (10 мкМ). Предварительную генерацию  $\Delta pH$  с более кислым значением pH внутри везикул, чем в среде осуществляли путем добавления моненсина (300 нМ). (б) Защелачивание везикулярного люмена регистрировали с помощью флуоресцентного pH-индикатора пиранина (200 мкМ), загруженного в везикулы на начальной стадии процедуры выделения мембран при гомогенизации корней. (в) Генерацию электрического потенциала, отрицательного внутри везикул регистрировали с помощью оптического  $\Delta\psi$ -индикатора сафранина О (8 мкМ). Реакцию проводили в стандартной реакционной среде.

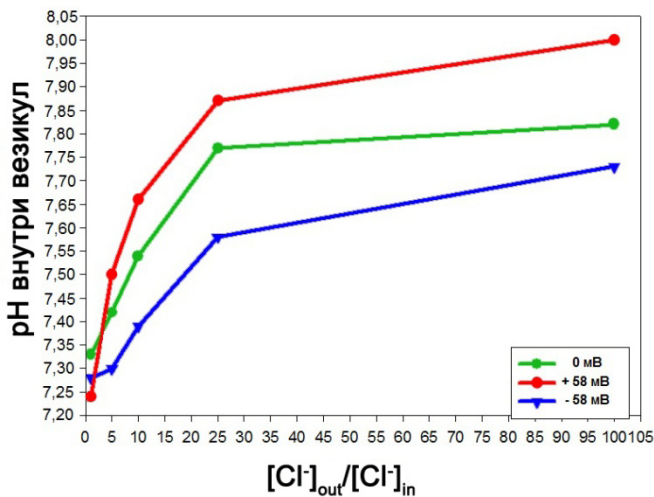
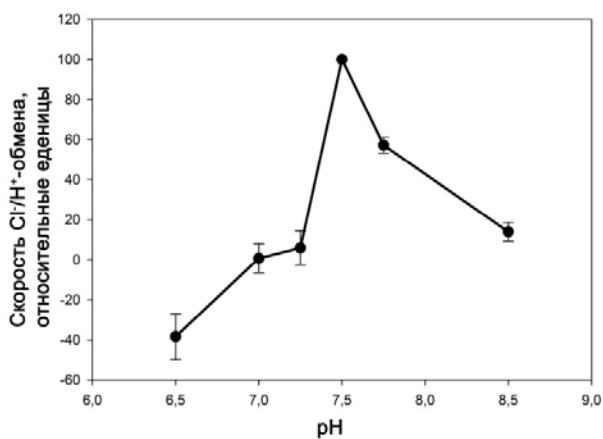


Рис. 5. Защелачивание везикулярного люмена в ответ на создание на мембране  $\Delta pCl$  разной величины при разных значениях диффузионного потенциала  $K^+$ . Защелачивание регистрировали с помощью пиранина, загруженного в везикулы. Загрузку осуществляли с помощью гипотонического шока в средах: 200 мкМ пиранин, 70 (среда I) или 165 (среда II) мМ сахараза, 25 (среда I) или 2,5 (среда II) мМ  $K_2SO_4$ , 2 мМ  $Mg_2SO_4$ , 2,5 мМ EGTA, 3 мМ ВТР-MES, 1 мМ  $Cl^-$ -ВТР, pH 7,5. Реакционные среды были идентичны загрузочным средам, за исключением того что они не содержали

пиранин и концентрации  $K_2SO_4$  и  $Cl^-$ -ВТР в них варьировали в соответствии с задаваемыми значениями  $\Delta pCl$  и диффузионного потенциала  $K^+$ . Реакционные среды содержали также валиномицин (300 нМ). В трех вариантах эксперимента наружные и внутренние концентрации  $K^+$ , выраженные в мМ, были следующими: 50/5, 50/50 или 5/50, что согласно уравнению Нернста соответствовало значениям диффузионного калиевого потенциала +58, 0 и -58 мВ.



кривых, отражавших защелачивание. Максимальная скорость Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-обмена, наблюдавшаяся при pH 7,5, была принята за 100

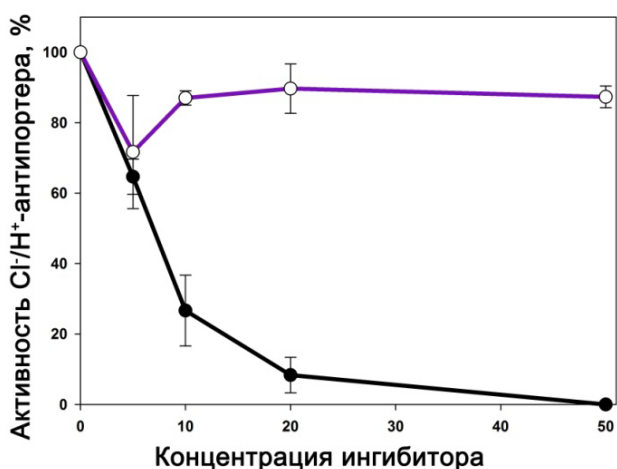


Рис. 7. Влияние ингибиторов анионного транспорта DIDS (черный цвет) и NPPB (фиолетовый) на активность Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-антипортера. Скорость Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-обмена регистрировали при нулевом значении диффузионного потенциала K<sup>+</sup> с помощью флуоресцентного pH-индикатора пиранина, загруженного в везикулы гипотоническим шоком в составе среды I (см. рис. 5). Реакционная среда была идентична загрузочной среде I, за исключением того, что в ней отсутствовал пиранин и дополнительно был внесен валиномицин (300 нм). защелачивание везикул инициировали внесением в реакционную среду 25 мМ Cl<sup>-</sup>-BTP (pH 7,5). В качестве отрицательного контроля вносили MES-BTP.

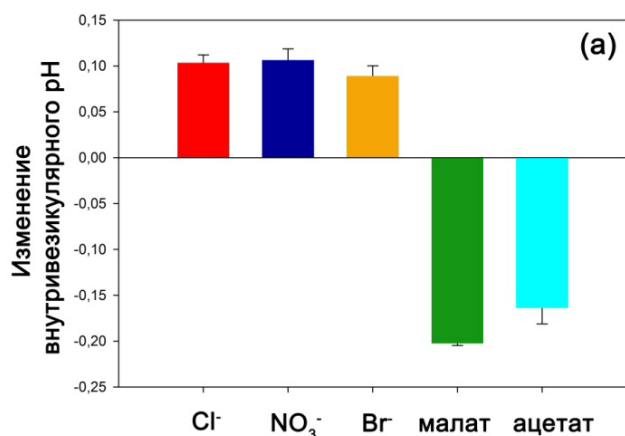
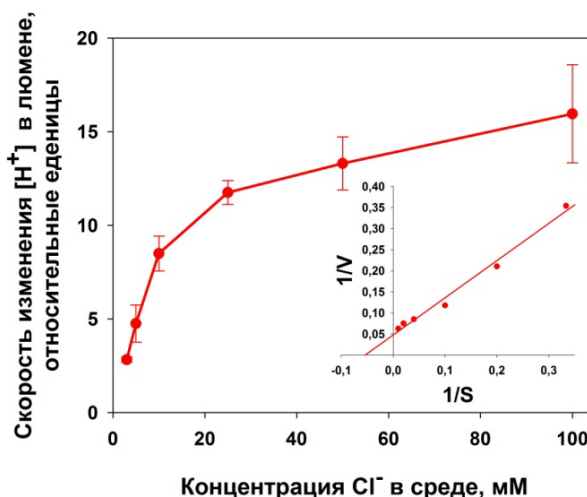


Рис. 8. Изменение pH внутри везикул в ответ на внесение в реакционную среду 25 мМ анион-ВТР (pH 7,5): хлорида (красный), нитрата (синий), бромида (оранжевый), малата (зеленый) и ацетата (циан). Изменения pH наблюдали при нулевом значении диффузионного потенциала K<sup>+</sup> с помощью флуоресцентного pH-индикатора пиранина, загруженного в везикулы гипотоническим шоком в составе среды I (см. рис. 5).

Рис. 9. Зависимость скорости изменения концентрации H<sup>+</sup> от концентрации Cl<sup>-</sup> в реакционной среде. Изменение [H<sup>+</sup>] регистрировали при нулевом значении диффузионного потенциала K<sup>+</sup> с помощью флуоресцентного pH-индикатора пиранина, загруженного в везикулы гипотоническим шоком в составе среды I (см. рис. 5). Реакционная среда была идентична загрузочной среде I.





Наибольшее смещение  $\Delta\psi$  в отрицательную область наблюдалась в присутствии ионов  $\text{Cl}^-$ , добавленных в комбинации с плохо проникающим через мембрану ВТР, тогда как  $\text{Cl}^-$  в комбинации с проникающим катионом  $\text{Tris}^+$  сдвигал  $\Delta\psi$  в отрицательную область заметно слабее. Ионы  $\text{Cl}^-$ , внесенные в среду вместе с холином, приводили к генерации промежуточного  $\Delta\psi$ .

### **$\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортер характеризуется односторонней проводимостью**

Так как  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортер является электрогенным, то трансмембранный электрический потенциал должен оказывать влияние на его работу. Следующий эксперимент показал, что  $\Delta\text{pCl}^-$ -зависимый транспорт  $\text{H}^+$  действительно находится под контролем  $\Delta\psi$ . Электрический потенциал той или иной величины задавали, поддерживая на мембране соответствующий диффузионный калиевый потенциал. Для этого внутри (с помощью гипоосмотического шока) и снаружи везикул задавали различные концентрации (мМ)  $\text{K}^+$ : 5/50, 50/50 или 50/5. При этом в наружную среду был также внесен валиномицин. Согласно уравнению Нернста при указанных отношениях концентраций  $\text{K}^+$  внутри везикул и снаружи на мембране поддерживались следующие диффузионные калиевые потенциалы: +58, 0, и -58 мВ, соответственно. При трех заданных значениях диффузионного  $\text{K}^+$  потенциала и разных отношениях концентраций  $\text{Cl}^-$  снаружи и внутри везикул с помощью пиранина и калибровочного графика определяли внутривезикулярный pH (рис. 5).

Этот эксперимент показал, что защелачивание люмена тем больше, чем больше концентрационный градиент  $\text{Cl}^-$ , направленный из наружной среды в везикулы. Скорость защелачивания характеризовалась насыщением при 25-кратном градиенте  $\text{Cl}^-$  на мембране.

Защелачивание везикулярного люмена зависело не только от  $\Delta\text{pCl}^-$  на везикулярной мембране, но и от  $\Delta\psi$  (рис. 5). Отрицательные значения диффузионного калиевого потенциала («минус» внутри везикул) подавляли защелачивание, а положительные значения, напротив, его усиливали.

При отрицательных значениях  $\Delta\psi$  и небольших концентрационных градиентах  $\text{Cl}^-$  на мембране должно происходить обращение направления транспорта  $\text{H}^+$  и  $\text{Cl}^-$ . В этой ситуации защелачивание везикулярного люмена должно сменяться закислением. Однако закисления не наблюдалось ни при каких условиях данного эксперимента (рис. 5). Одна из наиболее вероятных причин этого состоит в том, что  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортер *S. altissima* обладает выпрямляющими свойствами, т.е. работает только в одном направлении. Анионно-протонные антипортеры, обладающие односторонней проводимостью, были показаны в тонопласте *A. thaliana* (De Angeli et al. 2006, von der Fecht-Bartenbach et al., 2010).

Следует отметить, что наблюдение односторонней проводимости  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера возможно только, если вся популяция везикул, или подавляющая ее часть имеет

одинаковую ориентацию. В связи с этим, полученный в этом эксперименте результат может быть еще одним доводом в пользу того, что преобладающая часть везикул мембран АГ, перезамыкаясь, принимает правильную ориентацию.

### **pH-зависимость $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера**

Концентрация  $\text{H}^+$  является важным фактором, регулирующим активность белков. В связи с этим pH-зависимость является важной характеристикой  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера. С помощью  $\Delta$  pH-зонда АО исследовали pH-зависимость скорости  $\Delta$ pCl-зависимого защелачивания везикулярного люмена.

Чтобы избежать возникновения исходных pH-градиентов на мембране, везикулы с помощью гипоосмотического шока загружали растворами с теми же значениями pH, что и в наружной среде. После генерации  $\Delta$ pH на мембране с помощью моненсина и последующего внесения в реакционную среду Cl-Tris, регистрировали скорость диссипации  $\Delta$ pH. О скорости реакции судили по первичному наклону части кривой, отражающей  $\Delta$ pCl-зависимое защелачивание везикулярного люмена.

Обмен наблюдается в диапазоне значений pH от 7 до 8,5 с оптимумом при pH 7,5 (рис. 6). Следует отметить, что pH оптимум  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмена соответствует цитоплазматическому значению pH растительных клеток.

### **Ингибиторный анализ $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера**

Исследования действия ингибиторов транспорта анионов на  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен во фракции МАГ проводили с помощью pH-индикатора пиранина, создавая на мембране нулевой диффузионный  $\text{K}^+$  потенциал. В этих условиях отрицательные заряды, накапливающиеся при  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмене внутри везикул, нейтрализуются и не происходит ингибирования этого обмена.

Результаты экспериментов, в которых исследовали эффект ингибиторов, согласуются с представлениями о  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмене, осуществляемом антипортером. DIDS (4,4'-diisothiocyanatostylbene-2,2'-disulfonic acid) - известный ингибитор хлоридных транспортеров и анионных каналов в клетках млекопитающих и растений (Matulef, 2005; Tavares et al., 2011; Garcia-Celma et al., 2013) подавлял  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен с  $\text{IC}_{50}=7$  мкМ. В концентрации 50 мкМ этот ингибитор полностью подавлял  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен (рис. 7). NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid) - ингибитор анионных каналов (Barbier-Brygoo et al., 2000) не оказывал ингибирующего действия на  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен в мембранной фракции МАГ в диапазоне концентраций от 0 до 50 мкМ (рис. 7). Более высокие концентрации NPPB также не оказывали ингибирующего действия.

## Анионная специфичность антипортера

Важное значение для выяснения природы ионных транспортеров имеет изучение их ионной специфичности.

Изучали анионную специфичность защелачивания люмена везикул фракции МАГ с заданным составом люмена. На везикулярной мембране задавали направленный внутрь концентрационный градиент анионов:  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ , малата или ацетата (25 мМ снаружи и 1 мМ внутри). Направленные внутрь 25-кратные градиенты  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ , или  $\text{Br}^-$  вызывали защелачивание везикулярного люмена, в то время как градиенты малата и ацетата приводили к закислению везикул (рис 8 а).

Закисление люмена при создании на мембране градиентов малата и ацетата указывает на вовлечение в наблюдавшийся протонный транспорт, не анион-протонных антипортеров, а каких-то других белков. В частности, были продемонстрированы анион-селективные каналы, активирующиеся при отрицательных значениях потенциала на цитоплазматической стороне вакуолярной мембраны растительных клеток, участвующие в накоплении малата в вакуоли (Hafke et al., 2003; Hurtu et al., 2005).

Зависимость скорости защелачивания везикулярного люмена от концентрации  $\text{Cl}^-$  в наружной среде продемонстрировала насыщающую кинетику с наблюдаемой  $K_M$  равной  $18.5 \pm 1.7$  мМ ( $n = 4$ ) (рис 8 б). Это значение  $K_M$  лежит в диапазоне цитоплазматических концентраций  $\text{Cl}^-$  у близкого объекту исследования вида *Suaeda maritima* (Hajibagheri, Flowers, 1989).

## Заключение

Результаты работы показывают, что активность  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмена в мембранах, выделенных из корней *S. altissima*, преимущественно локализована в мембранах АГ.

В настоящее время локализация CLC белков показана в тонопласте, мембранах АГ и тилакоидах, но не в других мембранах растительных клеток (von der Fecht-Bartenbach et al., 2007; Marmagne et al., 2007; Barbier-Brygoo et al., 2011). Принимая это во внимание и предполагая такую же локализацию CLC белков в клетках *S. altissima*, можем заключить, что  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен, наблюдавшийся в МАГ, осуществляется  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортером мембран АГ.

Способность МАГ обменивать на  $\text{H}^+$  также  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{Br}^-$  свидетельствует о низкой селективности  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера. Низкая избирательность CLC транспортеров по отношению к анионам показана для *Arabidopsis thaliana* (De Angeli et al. 2006, Bergsdorf et al., 2009, von der Fecht-Bartenbach et al., 2010).

Встает вопрос, какова физиологическая роль  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера мембран аппарата АГ в клетках *S. altissima*. Кроме часто упоминаемых в литературе функций нейтрализации отрицательных зарядов, накапливающихся в цитоплазме при работе протонных насосов, и регулирования рН внутри органелл (Kornak et al., 2001; Kasper et al., 2005; Miller, 2006;

Graves et al., 2008, Barbier-Brygoo et al., 2011; Pittman, 2012), Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-антипортер может вносить вклад в солеустойчивость растений. При высоких концентрациях соли в среде равновесный потенциал  $\bar{\psi}_{\text{Cl}}$  ПМ может быть более отрицательным, чем трансмембранный электрический потенциал, то есть возможны ситуации, когда ионы Cl<sup>-</sup> поступают из внеклеточной среды в цитоплазму по градиенту электрохимического потенциала (Teakle, Tyerman, 2010). В этих случаях Cl<sup>-</sup>-антипортер может транспортировать Cl<sup>-</sup> из цитоплазмы в апопласт или внутриклеточные компартменты, в частности, в вакуоли, используя энергию протонного градиента. Зависимость скорости защелачивания везикулярного люмена от концентрации Cl<sup>-</sup> (рис 8б) обнаруживает K<sub>M</sub>, лежащую в миллимолярном диапазоне, что соответствует концентрациям Cl<sup>-</sup> в цитоплазме близкого вида *Suaeda maritima* (Hajibagheri, Flowers, 1989). Наши результаты не исключают, что Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-антипортер функционирует и в тонопласте. Относительно высокая активность Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-обмена наблюдалась во фракциях 8-11 градиента йодиксанола, где активность нитрат-чувствительной АТФазы была максимальной.

Теоретически, транспорт Cl<sup>-</sup> из цитоплазмы в вакуоль может осуществляться непосредственно Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-антипортером тонопласта или с участием везикулярного транспорта. В последнем случае накопление Cl<sup>-</sup> в везикулярном люмене также предполагается с участием Cl<sup>-</sup>/H<sup>+</sup>-антипортера. Внутриклеточный перенос Cl<sup>-</sup> в вакуоль согласуется с данными литературных источников о внутриклеточном везикулярном транспорте ионов Na<sup>+</sup>. Вовлечение везикулярного транспорта в компартментализацию Na<sup>+</sup> в вакуолях было показано в клетках корня *A. thaliana* (Hamaji et al., 2009; Krebs et al., 2010). Было показано также, что изоформы Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-антипортера NHX5 и NHX6 ассоциированы с транс-Гольджи сетью и ранними эндосомами. Двойной нокаут-мутант по *nhx5* и *nhx6* *A. thaliana* характеризовался замедленным ростом и повышенной чувствительностью к NaCl (Bassil et al., 2011). В пользу везикулярного транспорта Cl<sup>-</sup> свидетельствуют электронно-микроскопические исследования *S. altissima*, проведенные ранее в лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости ИФР РАН (Балнокин с соавт., 2007; Халилова, 2008). Эти исследования показали стимуляцию хлористым натрием, присутствующим в питательном растворе, образования везикул и мультивезикулярных тел в клетках листьев и корней *S. altissima*. Такие структуры были обнаружены преимущественно на границах цитоплазмы и центральной вакуоли, а также цитоплазмы и ПМ. Локальное накопление Cl<sup>-</sup> в этих зонах было продемонстрировано методом электронно-микроскопической цитохимии, основанном на формировании электронно-плотных гранул AgCl в местах локализации Cl<sup>-</sup> после обработки растительных тканей ионами Ag<sup>+</sup>. Встает вопрос о том, является ли везикулярный транспорт ионов в вакуоль более предпочтительным по сравнению с прямой закачкой этих ионов с помощью ионных транспортеров тонопласта. Выдвинуто с соавторами выдвинуто предположение, что везикулярный транспорт Na<sup>+</sup> в вакуоль выгоднее прямого транспорта, так как мембраны мелких везикул энергизуются более

эффективно, поскольку у них больше отношение площади поверхности к объему (Martinoia et al., 2012).

## ВЫВОДЫ

1. Из клеток корней галофита *Suaeda altissima* выделена мембранная фракция, обогащенная везикулами аппарата Гольджи, которые имеют, преимущественно, нативную ориентацию, то есть обращены цитоплазматической стороной наружу.
2. В мембранах аппарата Гольджи из клеток корней галофита *Suaeda altissima* функционирует  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортер, чувствительный к ингибитору  $\text{Cl}^-$  транспортеров и  $\text{Cl}^-$  каналов DIDS (4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene-disulfonic acid) и не чувствительный к ингибитору  $\text{Cl}^-$  каналов NPPB (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid).
3.  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен, осуществляемый  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортером мембран аппарата Гольджи, сопровождается генерацией трансмембранного электрического потенциала, отрицательного внутри везикул.
4.  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортер обладает выпрямляющими свойствами, то есть характеризуется односторонней проводимостью:  $\text{Cl}^-$  транспортируется внутрь везикул, а  $\text{H}^+$  – из везикул в наружную среду.
5. Активность  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера регулируется трансмембранным электрическим потенциалом.  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -обмен, осуществляемый антипортером, усиливается при более положительных значениях потенциала и подавляется при более отрицательных.
6. Активность  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера обнаруживает рН-зависимость с максимумом при рН 7,5, что соответствует значению цитоплазматического рН растительной клетки.
7.  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортер мембран аппарата Гольджи *S. altissima* обменивает  $\text{H}^+$  на другие неорганические анионы ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{Br}^-$ ), то есть характеризуется низкой анионной селективностью, подобно  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортерам внутриклеточных мембран млекопитающих, цитоплазматической мембраны прокариот и внутриклеточных мембран *A. thaliana*.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Мясоедов Н.А., Беляев Д. В., Халилова Л.А., Андреев И.М., Балнокин Ю.В. Функциональная идентификация  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера в мембранной фракции клеток корня галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. // Труды МФТИ, Долгопрудный, 2012. - Т.4, №3 – С.285-289.
2. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Андреев И.М., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В. Функциональная идентификация  $\text{Cl}^-/\text{H}^+$ -антипортера в мембранной фракции, обогащенной

плазмалеммой, из клеток корней галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. // Материалы Всероссийского симпозиума «Растение и стресс». Москва, 2010. – С.397.

3. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Беляев Д.В., Андреев И.М., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В.  $Cl^-/H^+$ -антипортер в плазмалемме клеток корня галофита *Suaeda altissima* // Труды 53-й научной конференции МФТИ «Современные проблемы фундаментальных и прикладных наук». Часть IV «Молекулярная и биологическая физика. Москва-Долгопрудный, 2010. – С.33.

4. Шувалов А.В., Орлова Ю.В.  $Cl^-/H^+$ -обмен в мембранах клеток корня *Suaeda altissima* // Материалы XVIII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2011». Секция «Биология». Москва, 2011. – С. 227.

5. Шувалов А.В., Орлова Ю.В.  $Cl^-/H^+$ -зависимый перенос протонов через мембраны клеток корня галофита *Suaeda altissima* // Материалы 15 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Секция «Биология». Пущино, 2011. – С. 117.

6. Шувалов А.В. Функциональная идентификация  $Cl^-$ -транспортера в мембранах клеток корня галофита // Материалы IV Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов-биологов «Симбиоз Россия 2011» Воронеж, 2011, – том 1., С. 126.

7. Балнокин Ю.В., Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Мясоедов Н.А., Андреев И.М.  $Cl^-/H^+$ -антипортеры у бактерий, животных и растений: функциональная характеристика и физиологическая роль // VII Съезд Общества физиологов растений России «Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий». Материалы докладов. Часть I. – Нижний Новгород, 2011. – С. 68.

8. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Андреев И.М., Мясоедов Н.А., Беляев Д.В., Балнокин Ю.В.  $Cl^-/H^+$ -антипортер как механизм устойчивости растений к засолению. // Всероссийский симпозиум «Экология мегаполисов: фундаментальные основы и инновационные технологии». Материалы докладов. — Москва, 2011. – С. 164.

9. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Халилова Л.А. Функциональная и генетическая идентификация семейства *CLC* растения галофита *Suaeda altissima* // Материалы XIX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2012». Секция «Биология». Москва, 2012. – С.241-242.

10. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Халилова Л.А.  $Cl^-/H^+$ -антипортер в мембранах клеток корня галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. и его функциональная характеристика // Материалы 16 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Секция «Биология». Пущино, 2012. – С.484-485.

11. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Беляев Д. В., Балнокин Ю.В. Молекулярная идентификация экспрессирующихся в условиях засоления генов семейства *CLC* у галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. // Тезисы докладов научно-

практической конференции «Адаптационные стратегии живых систем». Новый Свет, Украина, 2012. – С.123.

12. Балнокин Ю.В., Шувалов А.В., Халилова Л.А., Орлова Ю.В., Мясоедов Н.А., Беляев Д. В., Андреев И.М. Транспорт  $Cl^-$  у галофитов на клеточном уровне и уровне целого растения // Тезисы докладов научно-практической конференции «Адаптационные стратегии живых систем». Новый Свет, Украина, 2012. – С.363.

13. Орлова Ю.В., Халилова Л.А., Козгунова Е.К., Андреев И.М., Шувалов А.В., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В. Функциональная идентификация  $Cl^-/H^+$ -антипортеров в мембранах клеток корней различающихся по солеустойчивости растений // Материалы II Международной научно-практической конференции «Ботанические чтения», Ишим 2012. – С. 59-60.

14. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В. Идентификация и характеристика  $Cl^-/H^+$ -антипортера в мембранах клеток корня галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. // IV съезд биофизиков России. Симпозиум I «Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток». Материалы докладов. — Нижний Новгород, 2012. – С.324.

15. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В. Идентификация и исследование свойств  $Cl^-/H^+$ -антипортера в мембранах аппарата Гольджи галофита *Suaeda altissima* (L.)Pall. // V Всероссийский с международным участием медико-биологический Конгресс молодых ученых "Симбиоз-Россия 2012". Материалы докладов. — Тверь, 2012. – С.445-448.

16. Шувалов А.В.  $Cl^-/H^+$ -антипортер галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. // Материалы XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2013». Секция «Биология». Москва, 2013. – С 312.

17. Шувалов А.В. Орлова Ю.В., Халилова Л.А.  $Cl^-/H^+$ -обмен на мембранах аппарата Гольджи галофита *Suaeda altissima* // Материалы 16 Международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Секция «Биология». Пущино, 2013. – С. 505

18. Шувалов А.В., Орлова Ю.В., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Балнокин Ю.В. Хлоридный транспортер галофита *Suaeda altissima* (L.)Pall. //Материалы докладов Международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы». Воронеж, 2013. – С 94-98.

19. Балнокин Ю.В., Орлова Ю.В., Шувалов А.В., Халилова Л.Ф., Куркова Е.Б., Мясоедов Н.А., Беляев Д.В., Андреев И.М. Возможная роль аппарата Гольджи во внутриклеточном транспорте  $Cl^-$  у галофита *Suaeda altissima* (L.) Pall. // Годичное собрание общества физиологов растений России. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений», 2013. – С 137

20. Балнокин Ю.В., Орлова Ю.В., Халилова Л.Ф., Мясоедов Н.А., Беляев Д.В. Идентификация генов *CLC Suaeda altissima* (L.) Pall. // Годичное собрание общества физиологов растений России. Тезисы докладов Всероссийской научной конференции с международным участием «Инновационные направления современной физиологии растений», 2013. – С 357-358