На правах рукописи

Шевырева Таисия Александровна

Везикулярный транспорт PIP-аквапоринов в растительной клетке при осмотическом стрессе

03.00.12 – Физиология и биохимия растений

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2008

Работа выполнена в Лаборатории мембран растительных клеток Института физиологии растений им. К.А.Тимирязева РАН, г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук — Трофимова Марина Сергеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор — Бабаков Алексей Владимирович

доктор биологических наук — Носов Александр Владимирович

Ведущее учреждение:

Санкт-Петербургский Государственный Университет, биолого-почвенный факультет

Защита диссертации состоится «23» декабря в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д.35. Факс (495) 977 80 18, электронная почта: ifr@ippras.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «21» ноября 2008 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
кандидат биологических наук — М.И. Азаркович

1. Общая характеристика работы

1.1. Актуальность проблемы. В настоящее время все интенсивнее исследуются механизмы клеточной адаптации живых организмов к различным типам стресса. В ответе клетки на действие стрессового фактора существенную роль играет регуляция проницаемости мембран для различных соединений, в том числе для воды. Водная проницаемость клеточных мембран в значительной степени определяется функционированием специальных белков – аквапоринов, формирующих каналы для транспорта воды (Maurel, 1997; Tyerman et al., 1999; Chaumont et al., 2005). Аквапорин-опосредованный трансмембранный ток воды может регулироваться за счет изменения, как активности этих белков, так и их содержания в мембране. Молекулярная организация аквапоринов допускает много способов их посттрансляционной модификации через фосфорилирование (Maurel et al., 1995; Johansson et al., 1998; Prak et al., 2008), метилирование (Santoni et al., 2006), гликозилирование (Vera-Estrella et al., 2004) протонирование (Tournaire-Roux et al., 2003) и формирование гетероолигомеров (Temei et al., 2005; Zelazny et al., 2007). Известно, что при действии неблагоприятных абиотических факторов наблюдается активация или торможение экспрессии генов аквапоринов, что предполагает изменение и в количестве аквапоринов в мембране, способное уменьшить или увеличить водную проницаемость мембран. Вместе с тем способы регуляции содержания аквапоринов в мембранах изучены недостаточно. В исследованиях на клетках животных была показана решающая роль везикулярного транспорта в подержании водной проницаемости апикальных мембран клеток почечных канальцев за счет встраивания в них AQP2 (Noda & Sasaki, 2005). Однако, насколько значительна роль везикулярного транспорта в регуляции аквапорин-опосредованной водной проницаемости мембран у растений фактически неизвестно. В значительной степени дефицит информации об этой проблеме обусловлен трудностями исследования процессов белкового трафика у высших растений из-за наличия клеточной стенки, вакуолей различных типов, особенностей функционирования ЭПР, аппарата Гольджи и цитоскелета. Вплоть до 90-годов 20-го века ставилась под

сомнение сама возможность функционирования эндоцитоза в растительных организмах (Aniento & Robinson, 2005; Šamaj et al., 2005). Основанием для таких сомнений было наличие в растительной клетке высокого тургорного давления, которое, на первый взгляд, делает эндоцитоз энергетически невыгодным процессом (Gradman & Robinson, 1989). Однако, как показали исследования последних лет, везикулярный транспорт не только существует, но и задействован во многих жизненно-важных для растений процессах, в том числе в трафике белков-транспортеров (Murgia et al., 1999; Hurst et al., 2004; Takano et al., 2005). Не исключено, что эндо- и экзоцитоз как компоненты клеточного трафика играют весьма существенную роль в поддержании ионного гомеостаза растительной клетки при постоянно меняющихся условиях окружающей среды. Важной составляющей этой проблемы является исследование возможностей изменения активности процессов трафика при колебаниях осмотического потенциала среды и их роли в регуляции содержания аквапоринов в мембранах, в том числе плазмалемме.

1.2. Цели и задачи исследования. Основной целью являлось исследование возможности перераспределения аквапоринов PIP-типа между плазмалеммой и эндомембранами при осмотическом стрессе путем активации везикулярного транспорта.

В рамках этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить временные и количественные параметры осмотически-индуцируемых изменений объема и площади поверхности протопластов.
2. Исследовать закономерности перераспределения мембранного материала плазмалеммы в изо-, гипо- и гиперосмотических условиях с использованием флуоресцентных маркеров фосфолипидов FM 1-43 и стеринов – филипина.
3. Изучить влияние брефелдина А как ингибитора клеточной секреции на конститутивный и осмотически-индуцируемый везикулярный транспорт в протопластах.
4. Проверить возможность перераспределения мембранного материала плазмалеммы, содержащего аквапорины PIP-типа, между плазмалеммой и

эндомембранами в гипер- и гипотонических условиях на основе данных об иммунолокализации исследуемых белков.

5. Сравнить распределение PIP-аквапоринов в мембранных фракциях разной плотности, изолированных их клеток суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы, находившихся в изо- или гиперосмотических условиях.
6. Определить обогащенность аквапоринами PIP-типа мембранных доменов плазмалеммы, различающихся по устойчивости к действию неионных детергентов Тритона X-100 и додецил мальтозида, с помощью денатурирующего и голубого нативного электрофореза с последующим вестерн-блот анализом.

1.3. Научная новизна. Впервые показано, что резкое изменение осмотического потенциала среды вызывает активацию экзо- или эндоцитоза в протопластах, и, как следствие, увеличение или уменьшение их площади поверхности. При этом мигрирующие участки плазмалеммы обеднены аквапоринами PIP-типа. В основе такого поведения PIP-аквапоринов при осмотическом стрессе может лежать гетерогенность их латеральной локализации в плазмалемме.

1.4. Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты носят фундаментальный характер и вносят вклад в понимание молекулярных механизмов эндогенной регуляции трансмембранного транспорта воды и водного обмена в растениях; нахождение PIP-аквапоринов в надмолекулярных комплексах плазмалеммы следует учитывать при проведении работ по молекулярной биоинженерии растений. Теоретические обобщения и экспериментальные данные работы могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических факультетов вузов.

1.5. Апробация работы. Основные результаты были представлены на Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия» (Вологда, 2005), I(IX) Международной конференции молодых ботаников (Санкт-Петербург, 2006), Конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии» (Ростов-на-Дону, 2006),

Международной конференции "Современная физиология растений: от молекул до экосистем" (Сыктывкар, 2007) и Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва,2008).

1.6. Публикации. По материалам диссертации опубликовано 6 работ.

1.7. Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, изложения полученных результатов, их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 159 страницах, проиллюстрирована 32 рисунками; библиография включает 277 источников.

2. Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили клетки суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы (*Beta vulgaris L.)* из коллекции «Культуры клеток высших растений» Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева (г. Москва), изолированные из них протопласты, а также плазматические мембраны побегов 5-дневных этиолированных проростков кукурузы (*Zea mays* L.).

Изменения объема протопластов в осмотических процессах регистрировали по изменению светорассеяния в двулучевом режиме (ΔA_{600}), а также по данным анализа микрофотографий.

Об интенсивности везикулярного транспорта в протопластах судили по кинетике изменения интенсивности флуоресценции маркера экзо- и эндоцитоза FM 1-43 и визуальному наблюдению за локализацией окрашенного им мембранного материала во флуоресцентном микроскопе (Bolte et al., 2004). Параллельно наблюдали за трафиком стерин-обогащенных участков плазмалеммы, используя филипин.

Локализацию аквапоринов PIP-типа в клетках и протопластах выявляли методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием первичных антител к PIP-аквапоринам (Ампилогова и др. 2006) и вторичных Alexa-Fluor 488 флуоресцентно меченых антител.

Плазматические мембраны получали путем разделения микросомальной фракции в двухфазной полимерной системе (Larsson et al., 1994), *фракции клеточных мембран различной плотности* – разделением микросомальных мембран в ступенчатом сахарозном градиенте путем флотации (Sazuka et al., 1998).

Степень обогащения мембранных фракций плазмалеммой и тонопластом устанавливали по активности специфичных маркерных ферментов в сопряженной системе (Palmgren, 1990)

Детергент-устойчивые фракции плазмалеммы выделяли центрифугированием (100000 g, 2 ч) после солюбилизации мембран 1%-ными Тритоном X-100 или додецилмальтозидом 30 мин на льду.

Прецепитацию белков проводили 10%-ной ТХУ с последующим растворением осадков в 2%-ном ДДСNa.

Содержание белка в мембранных препаратах определяли методом Bradford (1976) или с помощью бицинхониновой кислоты (Smith et al., 1985), в качестве стандарта используя БСА.

Денатурирующий электрофорез мембранных белков проводили в 12.5%-ном ПАА-геле по методу Laemmli (1970). *Голубой нативный электрофорез* − в 5–20%-ном ПАА-геле согласно Wittig et al (2006).

Вестерн-блот анализ вели по Towbin et al. (1979) и анализировали содержание аквапоринов с первичными антителами к PIP-аквапоринам и вторичными, коньюгированными с пероксидазой, визуализацию полос проводили с 1-хлор-4-нафтолом в качестве хромогена. Полученные окрашенные гели и блоты сканировали и подвергали компьютерной обработке.

3. Результаты и обсуждение

3.1. Изменение объема протопластов при осмотическом стрессе

В ходе эксперимента изменения объема протопластов регистрировали двумя путями: измеряя размер протопластов на микрофотографиях с последующим вычислением их объемов и используя спектрально-абсорбционный метод.

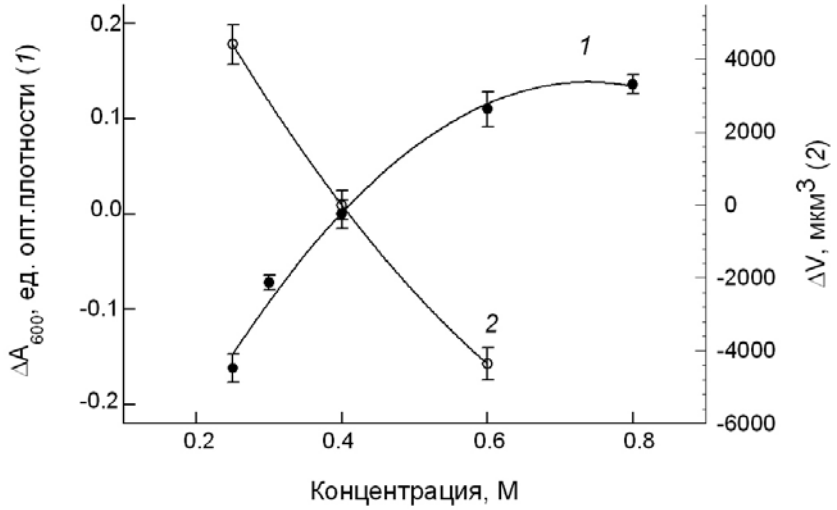


Рис. 1. Амплитуда изменений светорассеяния (ΔA_{600}) и объема (ΔV) протопластов в зависимости от концентрации сорбита в среде.
Регистрацию светорассеяния проводили в двухлучевом режиме при λ=600 нм и оценивали максимальные изменения сигнала. Диаметр протопластов измеряли по микрофотографиям и рассчитывали средний объем, принимая форму протопласта как сферическую.

Подавляющее большинство протопластов в изоосмотических условиях имело диаметр от 16 до 24 мкм. Измерения размеров протопластов и оценка их усредненного объема в изо-, гипер- и гипотонических условиях показали, что их объем менялся линейно и обратно пропорционально осмолярности среды (рис. 1). Резкая смена концентрации осмотика в среде суспендирования приводила к изменениям светорассеяния суспензии протопластов. Как видно на рис. 1, при замене изоосмотической среды (0.4 М сорбит) на гипертоническую (0.6 М сорбит) интенсивность светорассеяния суспензии протопластов возрастала. В гипотонической среде интенсивность светорассеяния менялась противоположным образом. В изотонических условиях ΔA_{600} имела нулевое значение. Колебания амплитуды интенсивности светорассеяния при возникновении трансмембранного осмотического градиента были пропорциональны его величине. При этом наблюдалась корреляция между величинами светорассеяния и изменениями в размере протопластов, индуцированными осмотическим градиентом. Исходя из этого, мы считаем, что интенсивность светорассеяния суспензии протопластов может служить показателем их объема, а кинетика светорассеяния непосредственно отражает скорость его

изменения. При оценке кинетики осмотически индуцированных изменений объема протопластов было обнаружено, что скорость их сжатия выше по сравнению со скоростью набухания. Минимального объема протопласты достигали за 1–2 мин, в то время как максимального (при набухании) – за 3 мин. Это дает возможность предположить, что в основе осмотических изменений объема протопластов лежат различные механизмы: изменение объема в гиперосмотических условиях является результатом инвагинации плазмалеммы, а в гипоосмотических – встраивания дополнительного мембранного материала в эту мембрану. Для подтверждения этой гипотезы нами были проведены следующие эксперименты.

3.2. Активность везикулярного транспорта в условиях осмотического стресса

Теоретически изменения объема протопластов можно объяснить: сокращением/растяжением плазматической мембраны; образованием инвагинаций в плазмалемме и их выпрямлением; изъятием мембранного материала, либо его встраиванием. Биологические мембраны обладают низким модулем упругости: при механической нагрузке разрыв мембраны происходит при 3–5%-ном растяжении относительно исходного состояния (Wolfe & Steponkus, 1983; Morris & Homann, 2001). В наших экспериментах было установлено снижение объема протопластов на 40% в гиперосмотических условиях и его увеличение на 60% – в гипоосмотических, следовательно, изменения размеров нельзя объяснить только упругими свойствами плазматической мембраны. Сжатие/набухание протопластов также может происходить либо за счет изменения морфологии их поверхности с сохранением постоянной площади поверхности, либо за счет активации мембранного трафика. В исследованиях, проведенных на клетках животных, было показано, что подобные значительные изменения в объеме клеток сопровождаются изъятием/интеркаляцией мембранного материала в плазмалемму, в то время как менее существенные изменения размеров происходят за счет изменения формы поверхности клеток (Groulx et al., 2006).

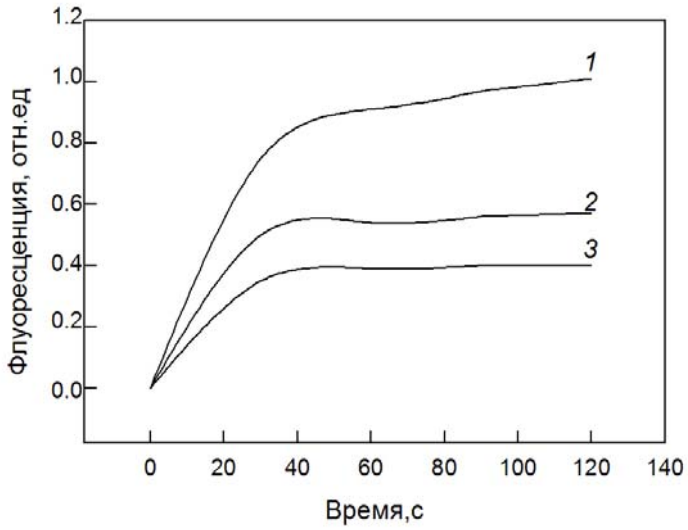


Рис. 2. Кинетика связывания FM 1-43 с мембранами протопластов, находящихся в гипо- (*1*), изо- (*2*) или гиперосмотических (*3*) условиях.
К суспензии протопластов в среде с 0.25 (*1*), 0.4 (*2*) или 0.6 (*3*) М сорбитом добавляли FM 1-43 до конечной концентрации 5 мкМ и регистрировали изменения интенсивности флуоресценции при 600 нм, возбуждая ее при 480 нм.

Для исследования возможности перераспределения мембранного материала между плазмалеммой и внутриклеточными компартментами при изменениях осмолярности среды был использован флуоресцентный краситель FM 1-43 как маркер экзо- и эндоцитоза. Благодаря наличию липофильного «хвоста» в составе своей молекулы FM 1-43 легко проникает в липидный бислой мембран, и это взаимодействие индуцирует его флуоресценцию, возрастание интенсивности которой отражает увеличение доступного для маркера мембранного материала. Положительно заряженная «голова» молекулы FM 1-43 фиксирует его во внешнем липидном слое, препятствуя проникновению внутрь клетки через мембрану. Поэтому единственным путем поступления этого красителя вглубь клетки является эндоцитоз (Bolte et al., 2004). Рис. 2 демонстрирует кинетику связывания FM 1-43 с протопластами в средах с разным осмотическим потенциалом. Можно видеть, что связывание красителя происходит относительно быстро и занимает 1–3 мин. При этом в изотонических и гипертонических условиях насыщение интенсивности флуоресценции достигается уже через 1 мин (кривые *2* и *3*), в то время как на протопластах, подвергнутых гипоосмотическому стрессу, это время возрастает до 2 мин (кривая *1*).

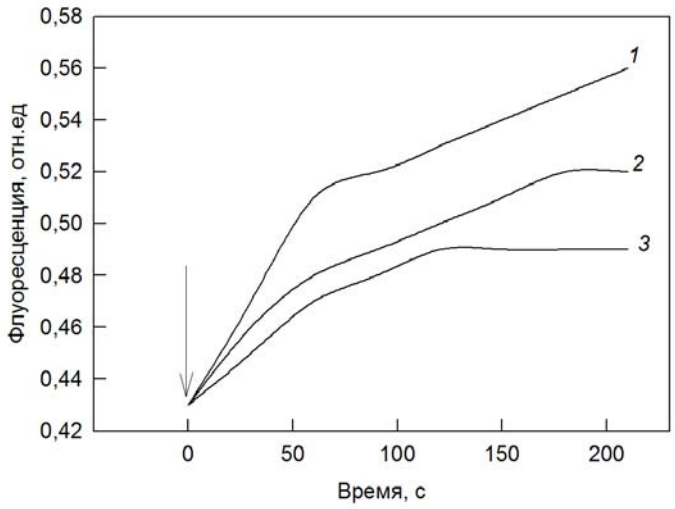


Рис. 3. Влияние брефелдина А на кинетику связывания FM 1-43 с мембранами протопластов при гипоосмотическом стрессе.
В суспензию протопластов в 0.4М сорбите вносили брефелдин А в конечной концентрации 200 нМ и инкубировали в течение 15 (*2*) или 30 (*3*) мин. После этого вносили FM 1-43 в концентрации 5 мкМ и после выхода флуоресценции на стационарный уровень одновременно подвергали протопласты гипоосмотическому воздействию (0.25 М сорбит) и регистрировали кинетику изменений флуоресценции. Контрольными служили протопласты, подвергнутые гипоосмотическому стрессу, но не обработанные предварительно брефелдином А (*1*).

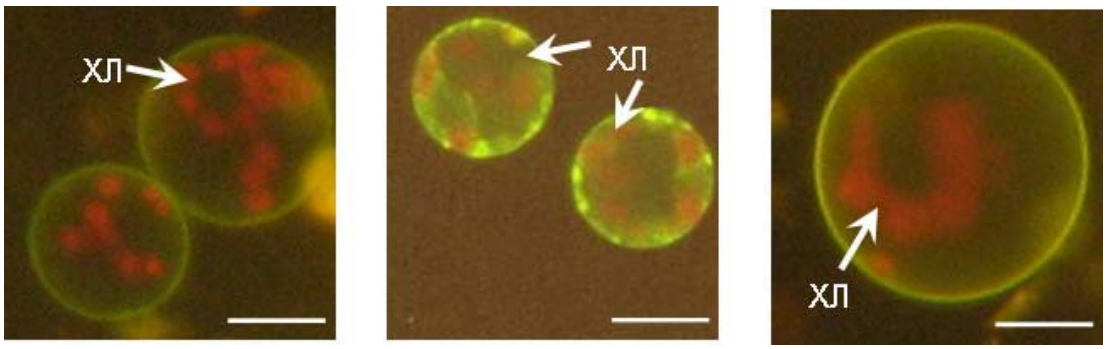
Необходимость более продолжительного времени для насыщения связывания красителя протопластами может свидетельствовать о том, что количество красителя, связываемого плазматической мембраной в условиях гипотонии возрастало, что можно рассматривать как результат увеличения площади поверхности этой мембраны. Также было выявлено, что амплитуда изменений интенсивности флуоресценции зависела от концентрации сорбита в среде: максимальные ее значения соответствовали гипоосмотическим условиям, а минимальные – гиперосмотическим. Различия в амплитуде интенсивности флуоресценции FM 1-43 также говорят о том, что количество доступного для красителя мембранного материала в среде разной осмолярности было различным (рис. 2).

В другой серии экспериментов концентрацию осмотика в среде изменяли после добавления FM 1-43 и насыщения его связывания с протопластами. С уменьшением тоничности среды интенсивность флуоресценции FM 1-43 увеличивалась более чем на 25% по сравнению с ее величиной в изоосмотических условиях. Таким образом, независимо от того, связывался ли краситель с протопластами, еще не подвергнутыми гипоосмотическому стрессу, или после его воздействия, интенсивность

флуоресценции свидетельствует об увеличении площади поверхности плазмалеммы при его индуцировании.

После инкубации протопластов с ингибитором экзоцитоза брефелдином А, скорость связывания FM 1-43 с набухающими протопластами снижалась и зависела от времени инкубации с этим ингибитором: более длительная экспозиция (30 мин) приводила к более выраженному снижению скорости связывания красителя с мембранами протопластов (рис. 3). В работах, посвященных регулируемому экзоцитозу у растений, показано ингибирование секреции и роста растяжением в клетках, обработанных брефелдином А (Parton et al., 2001; Baluška et al., 2002; Ritzenthaler et al. 2002;), т.е. этот ингибитор нарушает транспорт везикул по направлению к плазмалемме. Основываясь на этом, мы можем предположить, что увеличение площади поверхности протопластов при гипоосмотическом стрессе происходит за счет активации экзоцитоза.

Для дополнительного подтверждения этого вывода был проведен анализ микрофотографий протопластов, окрашенных FM 1-43 после действия кратковременного осмотического стресса. Во всех вариантах ярко и контрастно выделялась зеленая флуоресценция красителя, связанного с плазматической мембраной (рис. 4). Как в изо-, так и в гипоосмотических условиях окрашивалась только плазмалемма, но не внутренние мембраны. Таким образом, при переходе протопласта в гипотонические условия интенсивность флуоресценции FM 1-43 увеличивалась только за счет плазмалеммы, т.е. гипотония действительно оказалась активатором экзоцитоза, обеспечившего увеличение площади поверхности протопласта. В то же время, после гипертонического стресса отчетливо заметно накопление окрашенного FM 1-43 материала, локализованного в примембранной области протопласта, сравнимого по интенсивности окрашивания с плазмалеммой. Как уже указывалось выше, единственный способ, которым FM 1-43 может попасть внутрь клетки, является эндоцитоз, поэтому можно утверждать, что этот мембранный материал был изъят из плазмалеммы при гипертоническом действии сорбита.



(а) **(б)** **(в)**

Рис. 4. Изменения локализации окрашенного FM 1-43 мембранного материала в протопластах в изо- (а), гипер-(б) и гипоосмотических (в) условиях.
Протопласты, окрашенные FM 1-43, непосредственно перед микроскопированием на предметном стекле подвергали гипер- (0.6 М сорбит) или гипоосмотическому (0.25 М сорбит) воздействию. Контролем служили протопласты, находившиеся в изоосмотических условиях (0.4 М сорбит).
хл – хлоропласты, красная флуоресценция. Масштабная линейка – 12 мкм.

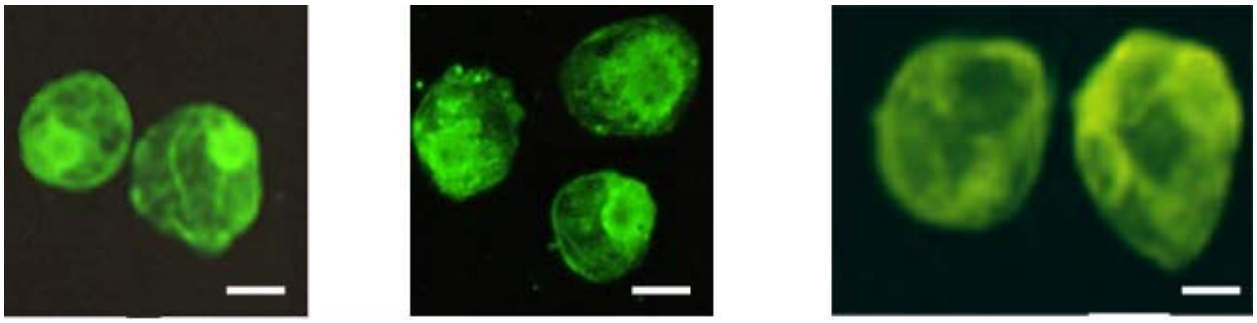
Результатом такого «изъятия» могло стать сокращение площади поверхности протопласта.

Основываясь на выше изложенных результатах, мы приходим к выводу, что в основе осмотически индуцированных изменений объема протопластов лежит трафик мембранного материала между плазмалеммой и внутриклеточным содержимым.

Осмотический стресс напрямую влияет на водный баланс клетки, который в значительной степени зависит от активности и содержания аквапоринов, регулирующих водную проницаемость мембран, и, в конечном счете адаптацию клетки к новым условиям.

3.3. Распределение аквапоринов PIP-типа в клетках суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы и изолированных из них протопластах при осмотическом стрессе

Изложенные выше результаты показали, что при осмотическом стрессе в протопластах происходит миграция материала плазмалеммы в обоих направлениях: как внутрь, так и наружу. Для того чтобы выяснить, содержатся ли аквапорины PIP-типа в транспортируемом мембранном материале, была проведена иммунолокализация этих белков в протопластах.



(а) **(б)** **(в)**

Рис. 5. Иммунолокализация PIP-аквапоринов в протопластах в изоосмотических условиях (а) и при их осмотическом сжатии (б) и набухании (в).
Протопласты инкубировали в течение 10 мин в среде содержащей 0.4 (а), 0.6 (б) и 0.25 (в) М сорбит, затем фиксировали. Распределение PIP-аквапоринов выявляли методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии.
Масштабная линейка – 10 мкм.

Протопласты, выдерживали в течение 15 мин в изо-, гипер-, или гипотонических условиях, а затем подвергали фиксации и иммуномечению. При быстрой смене осмотического потенциала среды мы надеялись исключить активацию экспрессии генов аквапоринов, поскольку для этого, согласно литературным данным, необходимо воздействие стрессового фактора, длящееся не менее 30 мин (Vera-Estrella et al., 2004) или даже 2–4 часов (Boursiac et al., 2005).

При анализе фиксированных протопластов наблюдали зеленое окрашивание не только плазмалеммы, но и эндомембран (рис. 5а). Наличие аквапоринов PIP-типа не только в плазмалемме, но и в других мембранных структурах, было показано и в других работах с помощью электронной (Robinson et al., 1996), флуоресцентной (Kirsh et al. 2000) и конфокальной (Boursiac et al., 2005; Prak et al., 2008) микроскопии. В протопластах, фиксированных после гипертонического стресса, окрашивание плазмалеммы было значительно более интенсивным по сравнению с изотоническими условиями (рис. 5б). Это можно объяснить тем, что сжатие протопластов сопровождается высвобождением участков, не содержащих аквапорины, в результате чего аквапорин-содержащие участки плазмалеммы сближаются, а это приводит к увеличению интенсивности флуоресценции. В протопластах, набухших в результате гипотонического воздействия, наблюдалась противоположная картина, а именно: снижалась плотность окрашенных участков, а интенсивность Alexa Fluor 488-

зависимой флуоресценции уменьшалась (рис. 5в). Это может означать, что при увеличении площади поверхности плазмалеммы, встраиваемые участки обеднены PIP-аквапоринами. Таким же образом изменялось и окрашивание эндомембран, а именно: при гиперосмотическом воздействии оно усиливалось, а при гипоосмотическом – снижалось. Если бы изменения осмотического потенциала среды вызывали перераспределение PIP-аквапоринов между разными компартментами клетки, то характер окрашивания эндомембран и плазмалеммы в условиях разной тоничности также бы различался.

Таким образом, мы полагаем, что кратковременное снижение тоничности среды, активируя экзоцитоз, не приводит к увеличению содержания аквапоринов PIP-типа в плазмалемме. Однако гиперосмотическое воздействие оказывает на положение аквапоринов в мембране концентрирующий эффект за счет изъятия участков мембран, лишенных аквапоринов. Однако изменения Alexa Fluor 488-зависимой флуоресценции в приведенных выше опытах были качественными и для их дополнительного подтверждения нами были получены доказательства изменения концентрации аквапоринов в мембранах с помощью биохимических подходов.

3.4. Распределение PIP-аквапоринов в мембранных фракциях различной плотности

Наличие аквапоринов PIP-типа не только в плазмалемме, но и во внутриклеточных мембран предоставляет возможность для их перераспределения между разными компартментами клетки. Активируется ли такой механизм регуляции содержания аквапоринов PIP-типа в плазмалемме за короткий промежуток осмотических изменений объема, или нет? Для того чтобы ответить на этот вопрос, из клеток культуры мезофилла сахарной свеклы, подвергнутых гиперосмотическому стрессу, или находившимся в изотонических условиях, были выделены фракции клеточных мембран различной плотности путем флотации в ступенчатом градиенте сахарозы.

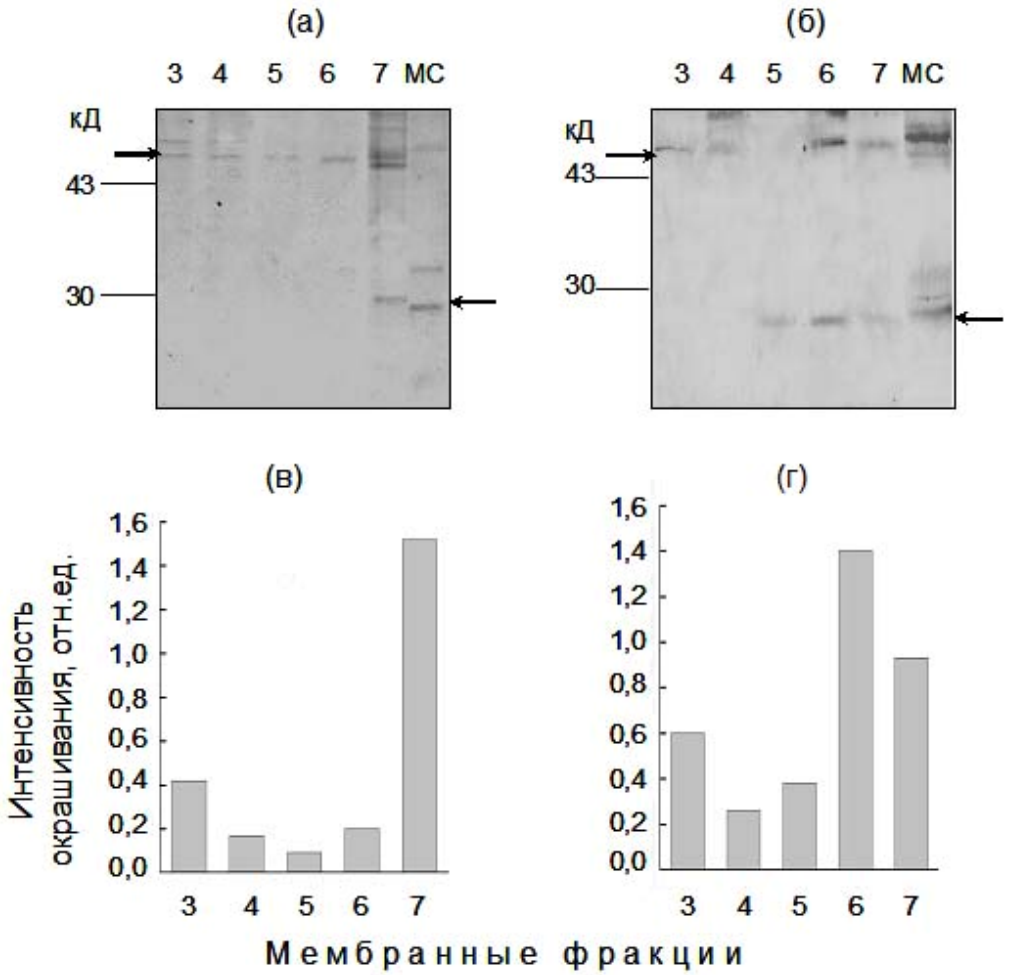


Рис. 6. Иммунодетекция аквапоринов PIP-типа (а и б) и распределение их содержания (в и г) в мембранных фракциях (3–7) различной плотности и микросомальных мембранах (МС) из клеток суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы, находившихся в изо- (а и в) или гиперосмотических (б и г) условиях.
Клетки отмывали от среды культивирования и подвергали гиперосмотическому стрессу в среде, содержавшей 0.6 М сорбит в течение 1 ч. Стрелками указано местоположение полос, соответствующих мономерным (~ 30 кД) и димерным (~ 50 кД) формам аквапоринов.

После ультрацентрифугирования были последовательно отобраны сверху вниз 8 фракций, различающихся по содержанию в них сахарозы и мембранного белка. Фракции № 1 и 2 были исключены из дальнейшего исследования из-за низкого содержания в них мембран, фракция № 8 – из-за того, что ее белковый спектр представлял микросомальные мембраны. Наиболее обогащенной плазмалеммой оказалась фракция № 5, где активнось маркера Р-АТФазы была максимальной, во фракции № 4 преобладали везикулы тонопласта. Мембранные фракции были подвергнуты денатурирующему электрофорезу и вестерн-блот анализу.

Иммунодетекция аквапоринов PIP-типа подтвердила наличие этих белков во всех клеточных мембранах (рис. 6). Были обнаружены как мономерные (~ 30 кДа), так и димерные (~50 кДа) формы аквапоринов, причем их соотношение было характерным для разных фракций. Так в гиперосмотических условиях в № 4 были идентифицированы только димеры, в № 5 – только мономеры, а в № 6 – мономеры и димеры аквапоринов (рис. 6б). Возможно, что в разных фракциях превалируют различные изоформы PIP-аквапоринов, степень и характер солюбилизации которых несколько различаются. О разнообразии изоформ детектируемых белков также свидетельствует тот факт, что на иммуноблоте положение полос, соответствующих аквапоринам, несколько варьирует. Это может отражать и различные посттрансляционные модификации аквапоринов.

Цифровая обработка изображений полученных иммуноблотов позволила оценить интенсивность окрашивания полос белкового спектра. Как видно из рис. 6г, во всех мембранных фракциях, выделенных из клеток подвергнутых гиперосмотическому стрессу, происходило увеличение интенсивности окрашивания полос, соответствующих аквапоринам. Наиболее ярко этот эффект наблюдался во фракциях № 5 и № 6, которые характеризовались повышенной активностью P-АТФазы, т.е. были наиболее обогащены плазмалеммой. Интенсификация окрашивания полос аквапоринов при гиперосмотическом стрессе отражает увеличение содержания аквапоринов на мкг мембранного белка, что можно объяснить концентрированием данных белков в мембранах при повышенном осмотическом потенциале среды, что уже было показано с помощью непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии ранее (рис 5).

3.5. Устойчивость мембранных структур плазмалеммы, содержащих аквапорины PIP-типа, по отношению к различным детергентам

Согласно современным представлениям структура биологических мембран включает домены, отличающиеся по своему составу и физико-химическим свойствам. Примерами таких доменов могут служить так называемые «рафты». Из-за высокого

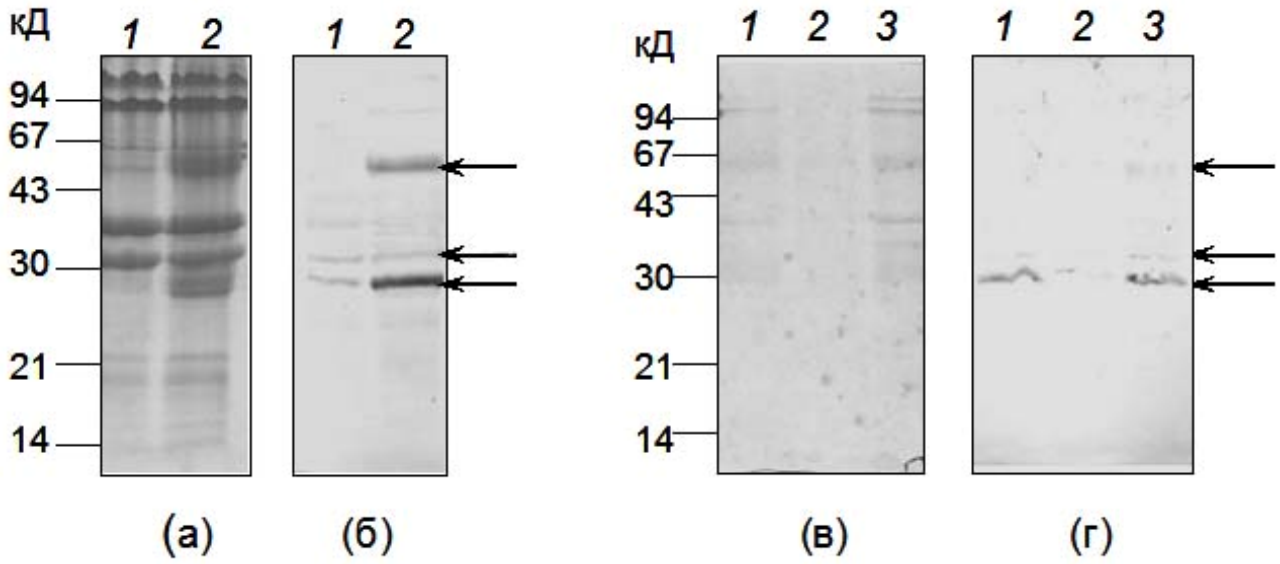


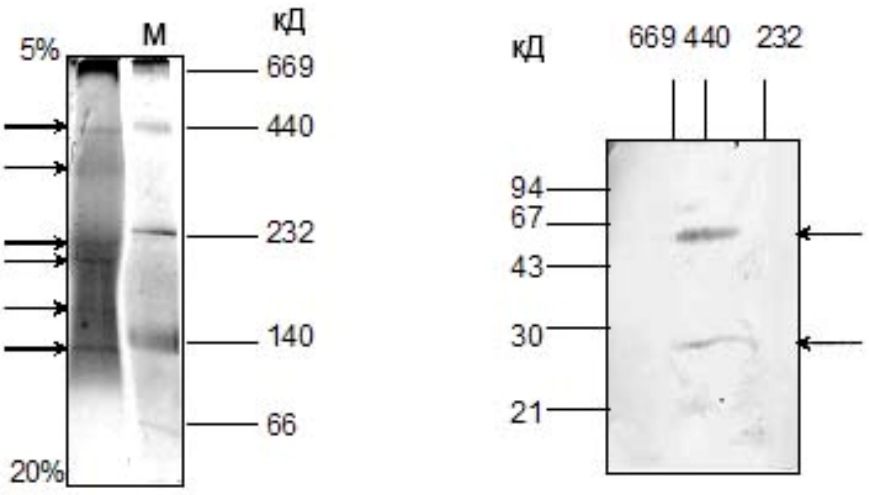
Рис. 7. Электрофоретическое разделение (а и в) белков мембранных фракций плазмалеммы из этиолированных проростков кукурузы, различающихся по своему отношению к действию 1 %-ного додецилмальтозида (*1*) и Тритона X-100 (*2*), и иммунодетекция (б и г) в них аквапоринов PIP-типа.
Солюбилизированные мембранные препараты переосаждали центрифугированием. Полученные осадки и супернатант переводили в буфер Laemmli. При проведении денатурирующего электрофореза на дорожки, соответствующие осадкам (а и б), вносили весь объем полученного раствора (15 мкл), а при разделении супернатантов (в и г) – по 6.5 мкг белка. В качестве контроля использовали плазмалемму (*3*). Стрелками обозначены полосы, соответствующие аквапоринам.

содержания в них стеринов, гликосфинголипидов и липидов с насыщенными жирными кислотами, «рафты» характеризуются более плотной упаковкой липидных молекул по сравнению с окружающими их участками мембран. Кроме специфического липидного состава эти мембранные домены характеризуются и определенным белковым профилем . (Nichols, 2003).

Как установлено в настоящей работе, кратковременный осмотический стресс активирует как экзо-, так и эндоцитоз в протопластах. Кроме того обнаружено, что траспортируемые везикулы слабо обогащены аквапоринами PIP-типа. Совокупность этих фактов позволила предположить, что PIP-аквапорины локализованы в малоподвижных доменах плазмалеммы, которые могут представлять собой «рафты». Для экспериментального обоснования этого предположения было использовано два методических подхода. Первый состоял в анализе распределения PIP-аквапоринов в мембранных препаратах плазмалеммы после их солюбилизации разными типами

неионных детергентов. Второй – в наблюдении за локализацией маркера стеринов – филипина – в протопластах.

Плазмалемму солюбилизировали в присутствии неионных детергентов: β-D-додецилмальтозида или Тритона X-100. Первый разрушает структуру липидных «рафтов», а второй – ее сохраняет. Исходя из этого, было проанализировано распределение аквапоринов PIP-типа в солюблизированной части препаратов плазмалеммы (супернатант) и во фракциях, устойчивых к действию этих детергентов (осадок). В качестве контроля использовали препараты плазмалеммы, солюбилизированные стандартным для денатурирующего электрофореза буфером по Laemmli (1970), содержащим ионный детергент ДДСNa. Как видно на рис. 7г, степень солюбилизации белков плазмалеммы как Тритоном X-100, так и додецилмальтозидом, гораздо ниже, чем при использовании ДДСNa-буфера (дорожки *1, 2, 3*). Белковый спектр несолюбилизируемых этими детергентами фракций плазмалеммы также различался (рис. 7а, дорожки *1* и *2*). Поскольку Тритон X-100 нарушает липид-липидные взаимодействия в мембране, эти отличия могут отражать локализацию детектируемых белков в мембранных доменах, характеризующихся повышенным содержанием липидов, устойчивых к действию данного детергента, а именно стеринов. С помощью вестерн-блот анализа было показано, что в составе этих белков оказываются аквапорины PIP-типа (рис. 7б, дорожка *2*). Можно утверждать достаточно уверенно, что эти домены представляют собой липидные «рафты». Другой неионный детергент – додецилмальтозид был способен солюбилизировать аквапорины PIP-типа, при этом белки были идентифицированы как в супернатанте, так и в осадке (рис. 7б и 7г, дорожки *1*). Интенсивность окрашивания полос иммуноблота, соответствующих PIP-аквапоринам, в случае солюбилизации додецилмальтозидом и ДДСNa-содержащим буфером были сопоставимы (рис. 7г, дорожки *1* и *3*). Это говорит о том, что хотя солюбилизация белков плазмалеммы более эффективна при использовании буфера по Laemmli (1970), тем не менее, для обнаружения аквапоринов PIP-типа достаточно обработки препаратов плазматической мембраны средой, содержащей 1%-ный додецилмальтозид.

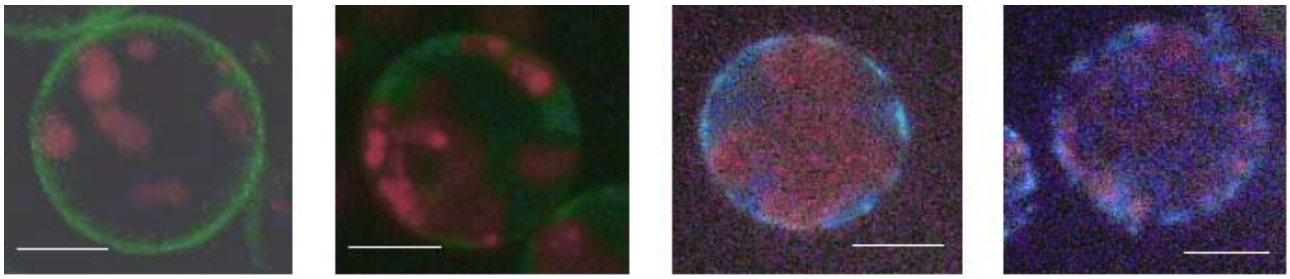


(а) **(б)**

Рис. 8. Выявление высокомолекулярных белковых комплексов в плазмалемме побегов этиолированных проростков кукурузы (а) и иммунодетекция в них аквапоринов PIP-типа (б). Плазмалемму солюбилизировали по Wittig et al (2006)и подвергали голубому нативному электрофорезу в градиентном 5–20% ПААГ. На дорожку вносили 25.5 мкг белка. Стрелками обозначены выявленные белковые комплексы (а) и полосы, соответствующие аквапоринам (б). М – маркерные белки.

Особенностью додецилмальтозида является его действие на липид-белковые, но не на белок-белковые взаимодействия в мембране, за счет чего сохраняется структура надмолекулярных белковых образований (Schägger & Pfeiffer, 2000), в состав которых теоретически могут входить и PIP-аквпорины. Поэтому далее был проведен нативный голубой электрофорез фракции плазматической мембраны, солюбилизируемой додецилмальтозидом, который позволяет выявлять многокомпонентные белковые комплексы.

В проведенных экспериментах с плазмалеммой проростков кукурузы нами было выявлено шесть высокомолекулярных комплексов с массой 440, 341, 222, 202, 164 и 133 кД (рис. 8а). Вестерн-блот анализ последующего разделения белковых комплексов в денатурирующих условиях показал, что аквапорины PIP-типа выявляются в областях, соответствующих расположению молекулярных комплексов с молекулярной массой от 669 до 232 кД (рис. 8б). Это согласуется с данными, полученными на плазмалемме из клеток листьев шпината Kjell с соавторами (2004),



(а) **(б)** **(в)** **(г)**

Рис. 9. Конститутивный эндоцитоз мембранного материала плазмалеммы, обогащенного фосфолипидами (а и б) и стеринами (в и г).
В суспензию протопластов вносили FM 1-43 (а и б) или филипин (в и г) и инкубировали в течение 5 (а и в) или 120 (б и г) мин. Масштабная линейка – 12 мкм.

согласно которым PIP-аквапорины локализованы в молекулярных комплексах с массой ~ 230 кД.

Таким образом, по крайней мере, часть аквапоринов PIP-типа входит в состав надмолекулярных комплексов плазмалеммы, которые локализуются в мембранных доменах, устойчивых к действию Тритона X-100. Не исключено, что локализация в тех или иных мембранных доменах может определять активность аквапоринов. В этом случае латеральная гетерогенность в распределении аквапоринов могла бы рассматриваться как еще один механизм регуляции водной проницаемости мембран. Однако экспериментальных данных, позволяющих допускать подобную взаимосвязь, к настоящему моменту нет.

Устойчивость мембранных структур к действию Тритона X-100 связана с повышенным содержанием в них стеринов. Поскольку аквапорины оказываются в несолюбилизируемых Тритоном X-100 фракциях, можно утверждать, что значительная доля аквапоринов локализуется в стерин-обогощенных доменах («рафтах»). Если это так, то поведение стерин-содержащих участков плазмалеммы при гиперосмотическом стрессе должно повторять таковое у материала плазматической мембраны с повышенным содержанием аквапоринов.

3.6. Локализация стерин-обогащенных доменов плазмалеммы

Инкубация протопластов с FM 1-43 в течение 5 мин приводила к окрашиванию плазмалеммы в виде тонкой сплошной линии зеленого цвета (рис. 9а). Филипином за

это же время маркировалась также только плазматическая мембрана, но при этом она приобретала вид пунктирной линии голубого цвета, что может свидетельствовать о неравномерном распределении в ней стеринов (рис. 9в). Через 120 мин FM 1-43 в составе мембранных везикул проникал вглубь протопластов, что приводило к интенсивному окрашиванию внутриклеточных мембран (рис. 9б). Это свидетельствует об активном везикулярном транспорте в исследуемых протопластах в изотонических условиях. Вместе с тем, внутренние мембраны не приобретали голубого филипин-зависимого окрашивания. При этом происходило изменение в размере и локализации окрашенных филипином областей: они становились толще, но располагались реже (рис. 9г). Таким образом, интенсивность конститутивного эндоцитоза стерин-содержащих участков плазмалеммы ниже по сравнению с фосфолипид-содержащими.

В первой части нашей работы, посвященной механизмам осмотически индуцируемых изменений объема протопластов, было показано, что мембранный трафик может активироваться осмотическим стрессом. Но насколько это утверждение справедливо для стерин-содержащих доменов плазмалеммы? Чтобы получить ответ на этот вопрос, изолированные протопласты были окрашены филипином, а затем подвергнуты осмотическому стрессу путем внесения в среду буфера соответствующей осмолярности непосредственно перед микроскопированием. Независимо от осмотического потенциала среды плазмалемма протопластов приобретала неравномерное окрашивание в виде тонкой пунктирной линии (рис. 10). Это свидетельствует о том, что при кратковременном осмотическом стрессе структура «рафт»-подобных образований плазмалеммы сохраняется. В гиперосмотических условиях наблюдалось сближение окрашенных филипином участков мембран и, как следствие, интенсификация флуоресцентного свечения плазмалеммы (рис. 10б). При снижении осмолярности среды происходило разрежение меченых филипином участков, а также уменьшение интенсивности флуоресценции филипина (рис. 10в). Т.е. при изъятии мембранного материала плазмалеммы при гиперосмотическом стрессе происходит увеличение содержания стерин-обогащенных

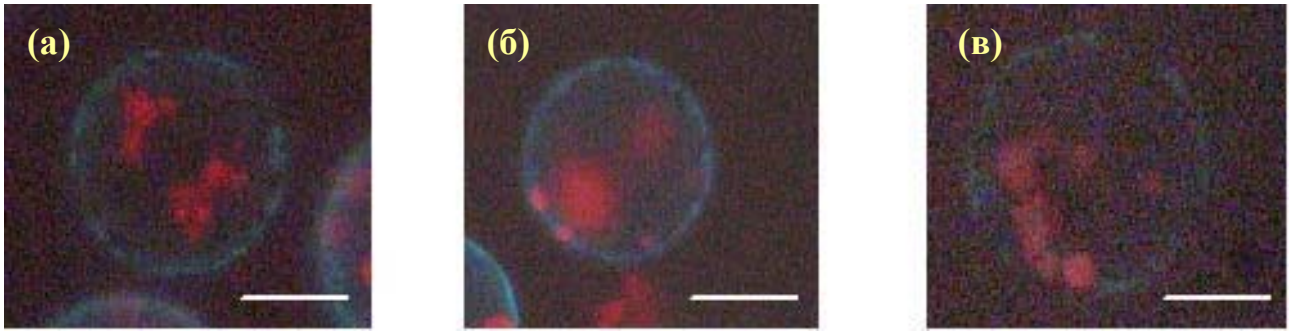


Рис. 10. Локализации мембранного материала, обогащенного стеринами, в протопластах в изотонических условиях (а) и при гипер- (б) и гипоосмотическом (в) стрессе. Окрашенные филипином (5 мкг/мл) протопласты непосредственно перед микроскопированием на предметном стекле подвергали гипер- (0.6 М сорбит) или гипоосмотическому (0.25 М сорбит) воздействию. Контролем служили протопласты, находившиеся в изоосмотических условиях (0.4 М) условиях. Масштабная линейка – 12 мкм.

мембранных структур на единицу площади, а при его интеркаляции в гипоосмотических условиях – снижение. Следовательно, транспортируемые в ходе осмотически индуцируемых эндо- и экзоцитоза участки плазмалеммы характеризуются пониженным содержанием стеринов. Подобная картина наблюдалась нами и при изучении трафика аквапоринов PIP-типа в условиях осмотического стресса, т.е. аквапорин-содержащие домены плазматической мембраны, также как и стерин-обогащенные, характеризовались низкой подвижностью при осмотическом стрессе. Учитывая локализацию PIP-аквапоринов в Тритон-устойчивых мембранных фракциях, а также одинаковую реакцию на смену осмотического потенциала среды стерин- и аквапорин-содержащих участков плазмалеммы, можно заключить, что эндо- и экзоцитоз, активируемые кратковременным осмотическим стрессом, не включают в себя трафик этих доменов в протопластах.

Заключение

Жидкостно-мозаичная структура биологических мембран определяет их как высоко динамичные образования. Это подразумевает, что белковый и липидный состав, толщина, текучесть и проводимость мембран неодинаковы в разных ее областях и способны изменяться. Формирование структурно различающихся доменов

позволяет координировать и синхронизовать мембранные процессы в пространстве и времени, обеспечивая более эффективные ответы клетки на изменяющиеся условия среды. Известно, что концентрирование некоторых липидов и белков в определенных участках мембраны детерминирует такие этапы везикулярного транспорта как формирование везикул на донорной и слияние с акцепторной мембраной. Но может ли локализация транспортируемых мембранных белков определять интенсивность их трафика неизвестно.

Вместе с тем, везикулярный транспорт может рассматриваться наряду с транскрипцией, трансляцией, посттрансляционными модификациями как важный путь регуляции содержания белков-транспортеров в мембранах-мишенях. Так показана решающая роль везикулярного транспорта аквапорина AQP2 млекопитающих в регуляции водной проницаемости апикальных мембран клеток почечных канальцев. Экспериментальных данных, позволяющих рассматривать везикулярный транспорт как способ регуляции содержания аквапоринов в растительных мембранах, пока весьма не достаточно, хотя известно, что активность трафика в растениях очень высока и установлено его участие во многих физиологически значимых процессах клетки.

В нашей работе показано, что латеральная организация аквапоринов PIP-типа в плазмалемме носит гетерогенный характер. Об этом свидетельствует тот факт, что эти белки детектировались в мембранных фракциях устойчивых к действию Тритона X-100. Подобная устойчивость может объясняться специфическим липидным составом аквапорин-содержащих участков плазмалеммы, а именно повышенным содержанием в них стеринов. Кроме того, было обнаружено, что эти белки могут входить в состав высокомолекулярных белковых комплексов плазматической мембраны. Не исключено, что включение аквапоринов в подобные образования может отражаться на их участии в регуляции водной проницаемости мембран. По крайней мере, на основании полученных результатов, можем предполагать, что локализация аквапоринов PIP-типа в стерин-обогащенных и Тритон-устойчивых мембранных доменах влияет на везикулярный транспорт этих белков. В пользу этого

свидетельствуют наблюдения, показавшие низкую подвижностью аквапорин- и стерин-содержащих доменов как при экзо-, так и при эндоцитозе, вызванных гипо- или гиперосмотическим воздействием соответственно.

Выводы:

1. Изменения осмотического потенциала среды культивирования сопровождаются изменениями объема протопластов из клеток суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы: увеличением или уменьшением этого параметров в гипо- и гиперосмотических условиях, соответственно.
2. Уменьшение или увеличение объема протопластов при кратковременном осмотическом стрессе являются результатом интернализации или интеркаляции материала плазмалеммы.
3. В изотонических условиях под влиянием брефелдина А, блокатора экзоцитоза, нарушается баланс между антероградным и ретроградным везикулярным транспортом, что сопровождается концентрированием мембранного материала плазмалеммы внутри протопластов.
4. PIP-аквапорины обнаруживаются не только в плазмалемме, но и во внутриклеточных мембранах мезофилла сахарной свеклы, что предполагает возможность их перераспределения между различными компартментами.
5. Кратковременный осмотический стресс не инициирует перераспределение PIP-аквапоринов между плазмалеммой и эндомембранами, т.е. транспортируемые везикулы плазмалеммы, обеднены аквапоринами PIP-типа.
6. Стерин-обогащенные домены плазмалеммы, как и аквапорин-содержащие участки, обладают низкой подвижностью при кратковременном осмотическом стрессе, т.е. не подвергаются ни интернализации, ни интеркаляции при изменениях объема протопластов.
7. Аквапорины PIP-типа входят в состав надмолекулярных белковых комплексов, которые локализуются в устойчивых к солюбилизации Тритоном X-100 доменах плазмалеммы.

По материалам диссертрации опубликованы следующие работы:

1. Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. (2005) Участие транспорта мембранных везикул в осмотическом набухании и сжатии протопластов из клеток суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы. *Тез. Годичного собрания ОФР России и Международной конференции «Физиологические и молекулярно-генетические аспекты сохранения биоразнообразия».* Вологда, с. 188.
2. Шевырева Т.А.. (2006) Действие брефелдина А на процесс везикулярного транспорта в протопластах культуры мезофилла сахарной свеклы *Beta vulgaris* L. *Материалы I(IX) Международной конференции молодых ботаников.* Санкт-Петербург, с. 220.
3. Шевырева Т.А.., Жесткова И.М., Трофимова М.С. Иммунолокализация аквапоринов PIP-типа в протопластах из суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы при осмотическом стрессе. (2006) *Тез. Конференции «Физиология растений – фундаментальная основа современной фитобиотехнологии».* Ростов-на-Дону, 2006, с.172.
4. Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. (2007) Иммунолокализация PIP-аквапоринов в протопластах из суспензионной культуры мезофилла сахарной свеклы в изоосмотических условиях и при осмотическом стрессе. *Физиология растений*, **54**, 356-364.
5. Шевырева Т.А., Жесткова И.М., Трофимова М.С. (2007) Латеральная гетерогенность аквапоринов PIP-типа в плазмалемме растительных клеток. *Тез. VI съезда ОФР России и Международной конференции "Современная физиология растений: от молекул до экосистем"*. Сыктывкар, с. 158-159.
6. Шевырева Т.А. (2008) Участие аквапорин-содержащих доменов плазмалеммы растительной клетки в осмотически индуцируемом эндо/экзоцитозе. *Тез. докладов Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»*. Москва, с.198-199.