

На правах рукописи



БЕЛУГИН

Борис Владимирович

**Значение латеральной гетерогенности
PIP-аквапоринов для транспорта воды
через плазмалемму растительных клеток**

03.01.05 – Физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2011

Работа выполнена в лаборатории мембран растительных клеток Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва.

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Трофимова Марина Сергеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,

профессор

Балнокин Юрий Владимирович

доктор биологических наук,

профессор

Булычев Александр Александрович

Ведущее учреждение:

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, биологический факультет.

Защита диссертации состоится «15» ноября 2011 г. в «13» часов на заседании диссертационного совета Д 002.210.01 при Учреждении Российской академии наук Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35.

Факс: (499) 977 80-18, e-mail: m-azarkovich@ippras.ru, ifr@ippras.ru .

Автореферат размещен на сайте ИФР РАН по адресу www.ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии наук Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН.

Автореферат разослан «13» октября 2011 г.

Ученый секретарь совета

по защите докторских

и кандидатских диссертаций,

кандидат биологических наук

М.И. Азаркович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Согласно современным представлениям транспорт воды через биологические мембраны осуществляется по двум путям: через липидный бислой и с участием аквапоринов – белков, формирующих водные каналы в мембранах. Однако до настоящего времени нет определенного ответа на вопрос о том, каков вклад того или иного пути транспорта воды через мембрану в ее осмотическую водную проницаемость и какими факторами он контролируется (Carvajal *et al.*, 1998; Verkman and Mitra, 2000; Hill *et al.*, 2004). Эти исследования должны базироваться на фундаментальном свойстве мембран – неравномерном распределении компонентов в латеральной плоскости, т.е. доменной организации. Доменами называют области мембран, отличающиеся по составу от остальной части мембраны вследствие ограничений в диффузионном обмене их компонентов (Геннис, 1997). Сравнительно недавно в плазматических мембранах эукариот обнаружены специфические домены, смысл существования которых интенсивно изучается. Особенностью таких доменов, получивших название «рафты», является уникальный липидный состав, представленный гликофинголипидами, фосфолипидами с преимущественно насыщенными жирными кислотами и стеринами, количество которых значительно выше, чем в других доменах (Simons and Ikonen, 1997; Pike, 2003). Эти типы липидов обладают высоким сродством друг к другу, и бислой в зоне рафтов находится в плотном высокоупорядоченном состоянии (London and Brown, 2000). Кроме липидов рафты включают белковые комплексы, для которых, по данным протеомики, характерна высокая степень обогащения компонентами, необходимыми для передачи и восприятия внешних сигналов, защиты от стрессов и патогенов, везикулярного транспорта, а также белками канального типа и транспортерами (Brown and London, 2000; Foster *et al.*, 2003; Borner *et al.*, 2005). Неординарность свойств рафтов вызывает большой интерес к выяснению их роли в функционировании биологических мембран, однако вопрос по-прежнему остается неясным, несмотря на значительный объем информации, полученной к настоящему времени. Поэтому для выяснения роли, а также структуры и функций рафтов, разрабатываются новые экспериментальные подходы. До сих пор метода, гарантирующего выделение чистой фракции «рафтов» не найдено. Поэтому для исследований используют детергент-резистентные мембраны (ДРМ), т.е. мембраны, устойчивые к солиubilизации неионными детергентами (Lingwood and Simons, 2007). Одним из характерных белков детергент-устойчивых фракций плазмалеммы клеток растений оказываются PIP-аквапорины (Mongrand *et al.*, 2004; Borner *et al.*, 2005; Morel *et al.*, 2006; Lefebvre *et al.*, 2007). Локализация аквапоринов в рафтах может указывать на существенную роль таких доменов в ответных реакциях клетки и растения в целом на изменение водного потенциала среды. Известно, что водная проницаемость липидного бислоя определяется его фазовым состоянием, которое в

значительной степени зависит от присутствия стеринов (Lande *et al.*, 1995; Mathai *et al.*, 2008). Если относительное содержание стеринов в рафтах выше, чем в соседних фосфолипидных доменах, то очевидно, что бислой в области рафтов будет более плотно упакован, и скорость осмотического транспорта воды через эти участки будет снижена, а степень такого снижения будет определяться количеством и площадью рафтов в мембране. Ограничение скорости трансмембранного транспорта воды потенциально может создать для клетки проблему со временем достижения осмотического равновесия (Liu *et al.*, 2006). Однако эта проблема может и не возникнуть, так как «внутрирафтовые» аквапорины в результате их активации скомпенсируют снижение осмотической водной проницаемости. При этом допускается, что их концентрация в рафтах подобно стеринам выше. В рамках изложенной схемы рафтовые домены могли бы детерминировать кинетику трансмембранного транспорта воды. В литературе подобные предположения пока не высказывались, хотя некоторые полученные результаты прямо или косвенно свидетельствуют в пользу этого.

Цель и задачи исследования. Основной целью работы стало исследование возможного механизма регулирования кинетики транспорта воды через плазмалемму, основанного на неравномерном распределении стеринов и РІР-аквапоринов между ее доменами.

Были поставлены следующие задачи:

1. Получить фракции детергент-резистентных мембран из плазмалеммы корней и побегов 5-дневных этиолированных проростков гороха.
2. Сравнить содержание стеринов и РІР-аквапоринов в изолированной плазмалемме, ее детергент-устойчивой и детергент-солубилизируемой фракциях.
3. Разделить плазмалемму на фракции разной плотности, установить степень обогащения этих фракций стеринами и аквапоринами, а также оценить их осмотическую водную проницаемость.
4. Проверить возможность миграции РІР-аквапоринов из фосфолипидных доменов в детергент-резистентные мембраны при обработке плазмалеммы холодным Тритоном Х-100.
5. Исследовать, зависимость осмотической водной проницаемости и фазового состояния плазмалеммы от степени ее обогащения стеринами.

Научная новизна. Впервые показано, что высокоочищенная плазмалемма, полученная методом разделения микросомальных мембран в водной двухфазной полимерной системе, представлена популяциями везикул, мембраны которых различаются по плотности. Установлено, что мембраны «легких» фракций с плотностью меньше 1.146 г/см^3 обогащены стеринами и обладают высокой упорядоченностью липидного матрикса в отличие от «тяжелых», что подтверждает доменную организацию плазмалеммы. В стерин-обогащенных фракциях

плазмалеммы обнаружено высокое по сравнению со стерин-обедненными содержание РР-аквапоринов, но низкая величина осмотической водной проницаемости. При частичном извлечении стеринов из плазмалеммы содержание РР-аквапоринов сохраняется на прежнем уровне, а скорость осмотического транспорта воды заметно возрастает. После солиubilизации мембран холодным Тритоном Х-100, когда отношение детергент/белок возрастает, происходит концентрирование РР-аквапоринов в детергент-резистентной фракции плазмалеммы, отождествляемой с «рафтами». Это указывает на высокую степень сродства РР-аквапоринов и стеринов и предполагает существование механизма, регулирующего транспорт воды с участием этих компонентов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты имеют фундаментальный характер и вносят вклад в понимание молекулярных механизмов эндогенной регуляции трансмембранного транспорта воды. Экспериментальные данные и теоретические обобщения работы могут быть использованы для продолжения исследований, а также в курсах лекций по физиологии и биохимии растений для студентов биологических факультетов.

Апробация работы. Основные результаты работы были представлены на: Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2009), Годичном собрании Общества физиологов растений России «Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера» (Апатиты, 2009), Международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и нанотехнологии, посвященной 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова (Москва-Пушино, 2010), Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2011), VII Съезде Общества физиологов растений России (Нижний Новгород, 2011), институтских семинарах.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 111 страницах, включает 20 рисунков. Список литературы содержит 197 источников, из которых 192 на иностранном языке.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования – плазмалемма, изолированная из корней и побегов 5-дневных этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.). Проростки выращивали в термостатируемой камере при 25°C на отфильтрованной водопроводной воде.

Для получения **микросомальных мембран** растительный материал гомогенизировали в среде, содержащей 300 мМ сахарозу, 100 мМ Трис-НСl (рН 8.0),

10 мМ ЭДТА, 5 мМ метабисульфит калия, 5 мМ дитиотреитол, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 0.6% поливинилпирролидон. Микросомальные мембраны осаждали центрифугированием гомогената 30 мин при 100000 г. **Плазматические мембраны** получали путем разделения микросомальных мембран в водной двухфазной полимерной системе 6.2% ПЭГ3500 – 6.2% Декстран T500 (Larsson *et al.*, 1994). Плазмалемму собирали из верхней фазы, осаждали центрифугированием (30 мин при 100000 г) и переводили в среду суспендирования, содержащую 0.3 М сахарозу, 5 мМ дитиотреитол, 0.5 мМ ЭДТА и 5 мМ бис трис пропан-MES (рН 7.2), замораживали и хранили до использования при -70°C . Чистоту мембранных препаратов оценивали по активности маркерных ферментов (Briskin *et al.*, 1987).

Фракции плазмалеммы разной плотности и детергент-устойчивые мембраны получали флотацией исходной плазмалеммы или солубилизированной 1% Тритоном X-100 в течение 30 мин при 4°C после центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности OptiPrep («Sigma», США). 50% OptiPrep, приготовленный на среде суспендирования, смешивали с мембранным материалом до конечной концентрации 30% и помещали на дно центрифужной пробирки. Сверху последовательно наслаивали 20 и 10% растворы OptiPrep в той же среде. После центрифугирования 2 ч при 100000 г фракции отбирали в направлении сверху вниз.

Содержание белка определяли при помощи бицинхониновой кислоты или по Bradford (1976) с использованием 0.05% (в/о) Тритона X-100 для солубилизации мембранных белков и БСА в качестве стандарта.

Содержание стерина оценивали при помощи набора ферментов Amplex Red Cholesterol Assay Kit («Invitrogen», США) по протоколу изготовителя. В качестве стандарта использовали холестерин.

Электрофоретическое разделение мембранных белков проводили в 12.5% ПАА-геле по методу Laemmli (1970). Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Super («GE Healthcare», США) по Towbin (1979). Мембрану блокировали в буфере PBS, содержащем 0.05% (в/о) Tween 20 и 2% (в/о) сухое молоко. Для иммунодетекции аквапоринов использовали первичные кроличьи антитела, полученные против конъюгата БСА с пептидом, соответствующим консервативной аминокислотной последовательности аквапоринов Р1Р-типа (DYKERPPAPLFEFGELSSWS), и вторичные козы антитела, меченные флуоресцеином или конъюгированные с пероксидазой («Медгамал», Россия), используя цветную реакцию на пероксидазу с 4-хлор-1-нафтолом в качестве субстрата. Для визуализации белковых полос гели и блоты сканировали на Epson V700 или Typhoon Trio Plus («GE Healthcare», США).

Осмотическую водную проницаемость плазмалеммы оценивали по величине константы скорости осмотического сжатия везикул. В экспериментах методом остановленного потока регистрировали кинетику изменений светорассеяния

суспензии везикул, вызванных осмотическим сжатием после увеличения концентрации сахарозы в среде с 0.1 до 0.3 М (Трофимова и др., 2001).

Для «обеднения» плазмалеммы по стеринам суспензию везикул (2 мг белка/мл) инкубировали с метил-β-циклодекстрином в течение 30 мин при 4°C и пересаждали (30 мин, 100000 g).

Фазовое состояние липидного бислоя оценивали по величине генерализованной поляризации возбуждения флуоресценции липофильного зонда лаурдана (Fluka), встроенного в мембраны в (50 мкг белка/мл) в конечной концентрации 0.3 мкМ. Значения генерализованной поляризации возбуждения рассчитывали по формуле: $GPEX = (I^{440} - I^{490}) / (I^{440} + I^{490})$, где I^{440} и I^{490} – интенсивность флуоресценции при соответствующих длинах волн и возбуждении 380 нм.

Полученные данные обрабатывали стандартными статистическими методами.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание PIP-аквапоринов в детергент-устойчивых и детергент-солюбилизуемых мембранах

Метод получения липидных «рафтов» для анализа основан на их устойчивости к солюбилизации неионными детергентами и низкой плавучей плотности (Lingwood and Simons, 2007). Для выделения детергент-устойчивой фракции мембраны обрабатывали Тритоном X-100 в соотношении детергент/белок 15:1 на холоду в течение 30 мин и центрифугировали в градиенте плотности OptiPrep. После этого с градиента было собрано шесть фракций.

На рис. 1 показано, что детергент-устойчивая фракция мембран всплывает в среднюю зону градиента, которая имеет плотность $< 1.175 \text{ г/см}^3$. Такая плотность фракций согласуется с литературными данными о плотности детергент-устойчивых мембран плазмалеммы растительных клеток (Mongrand *et al.*, 2004; Morel *et al.*, 2006).

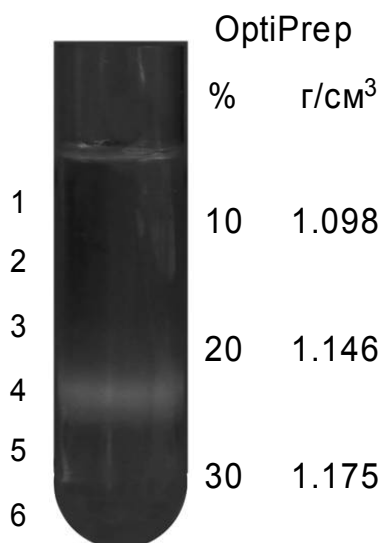


Рис. 1. Характерная картина распределения мембранного материала после центрифугирования в градиенте плотности OptiPrep солюбилизированной 1% Тритоном X-100 плазмалеммы побегов. Цифрами обозначены номера фракций, указаны концентрации и плотности растворов OptiPrep. ДРМ – фракции 3 и 4. Солюбилизованные белки – фракции 5 и 6.

Две верхние фракции градиента (рис. 2а) содержали следовое количество белка, в то время как фракции 3 и 4 – около 20%, а основная его часть была распределена между 5 и 6 фракциями. Детергент-устойчивые мембраны оказались в 3 и 4 фракциях. Тотальное содержание белка в пробирке составляло обычно 250–500 мкг, и это количество принимали за 100%.

Высокое обогащение мембран стеринами считается основным признаком присутствия рафтов в мембране. Нами было проанализировано содержание стерина в фракциях градиента. Как видно из рис. 2б, наибольшая величина отношения стерин/белок приходится на фракции 3 и 4, хотя стерин содержится и в солюбилизированной Тритоном X-100 части плазмалеммы (фракции 5 и 6). Это может означать, что не все стерин входит в состав рафтов. Высокое содержание стерина в фракциях 3 и 4 позволяет оценить их как детергент-устойчивые мембраны.

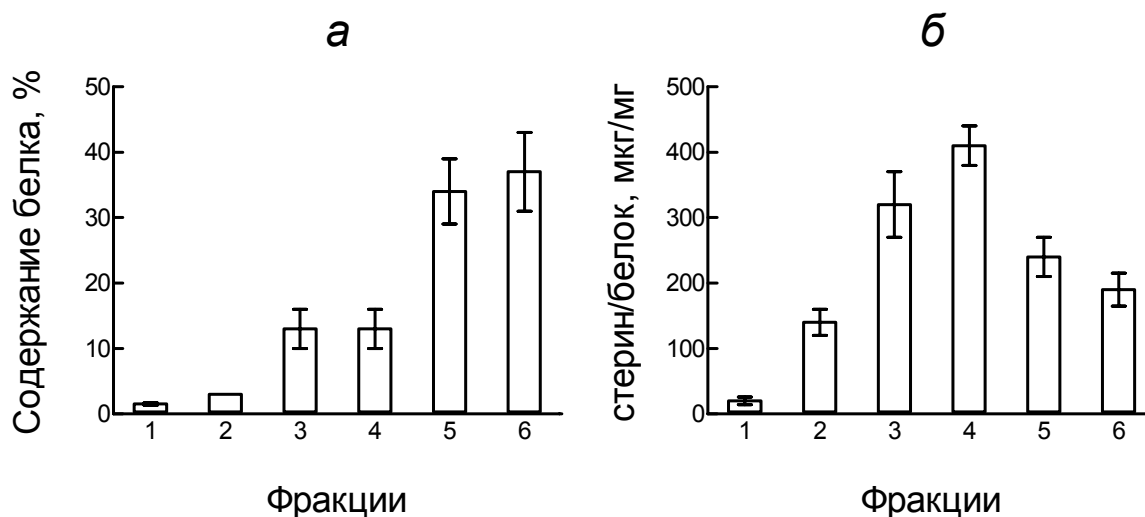


Рис. 2. Распределение мембранного белка (а) и отношение стерин/белок (б) во фракциях, собранных после центрифугирования солюбилизированной 1% Тритоном X-100 плазмалеммы побегов в градиенте плотности OptiPrep. Детергент-устойчивые мембраны – фракции 3 и 4. За 100% принимали содержание белка плазмалеммы, которое обычно составляло от 250 до 500 мкг на центрифужную пробирку.

Далее нами был проанализирован белковый спектр и содержание РІР-аквапоринов детергент-устойчивых и детергент-солюбилизированных фракций плазмалеммы (рис. 3). Видно, что белки фракций 3 и 4, отличаются от состава фракций 5 и 6, содержащих солюбилизированные мембраны, тогда, как и те и другие в сумме сходны с белковым спектром плазмалеммы до солюбилизации ее Тритоном X-100 (рис. 3а). Согласно данным иммунодетекции РІР-аквапоринов эти белки были обнаружены во всех фракциях градиента, причем их содержание в детергент-устойчивых фракциях было существенно выше, чем в детергент-солюбилизированной части плазмалеммы (рис. 3б).

Как известно, солюбилизация мембран Тритоном X-100 нарушает естественное взаимодействие мембранных белков и липидов между собой. Тритон X-100 действует

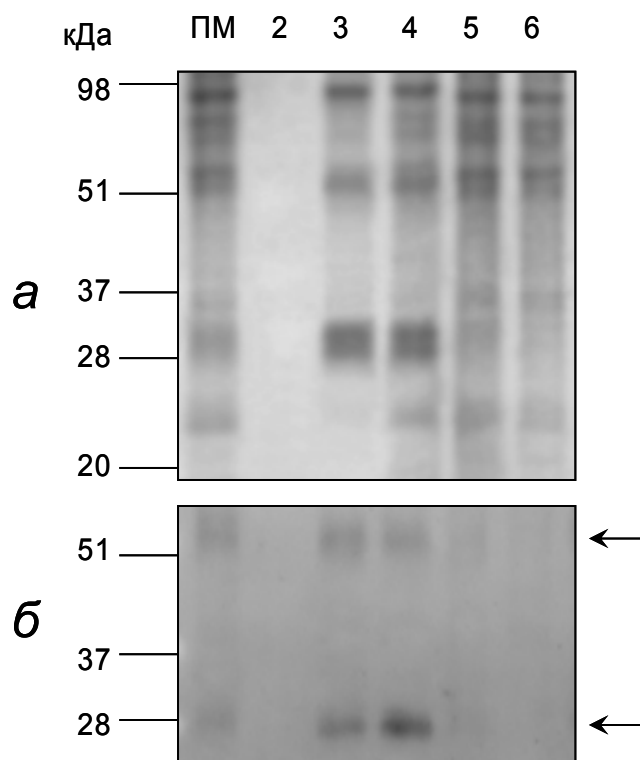


Рис. 3. Электрофоретическое разделение белков (а) и иммунодетекция (б) PIP-аквапоринов в плазмалемме (ПМ) и во фракциях 2-6 градиента плотности OptiPrep, собранных после центрифугирования солюбилизированной 1% Тритоном X-100 плазмалеммы побегов. Отношение детергент/белок – 15:1. На дорожку наносили по 3 мкг белка. Белки в гелях окрашивали SYPRO Ruby. Для визуализации блотов использованы вторичные козы антитела, меченые флуоресцеином. Стрелками указаны димерные и мономерные формы аквапоринов.

избирательно, не подвергая солюбилизации стерин-обогащенные участки мембран (London and Brown, 2000). При этом мембранные белки, имеющие высокую гидрофобность, могут мигрировать в эти участки и, наоборот, белки, локализованные в рафтах, могут перемещаться в другие домены. Поэтому белковый состав ДРМ может не соответствовать белковому составу рафтов. Чтобы доказать возможность перераспределения PIP-аквапоринов между рафтами и иными доменами в результате обработки плазмалеммы Тритоном X-100, плазмалемму солюбилизировали при разных соотношениях детергент/белок и выделяли детергент-устойчивые мембраны. Поскольку фракции градиента, собранные в пределах одной ступени между собой практически не отличались по количеству белка, стерина и аквапоринов, то они были объединены и проанализированы на содержание в них аквапоринов. На рис. 4 приведены данные этого эксперимента. Видно, что с увеличением отношения детергент/белок повышается содержание аквапоринов в детергент-устойчивых мембранах. Исходя из этих данных, можно сказать, что PIP-аквапорины не обязательно являются резидентными белками стерин-обогащенных доменов плазмалеммы, а обработка Тритоном X-100 «затягивает» эти белки в такие структуры.

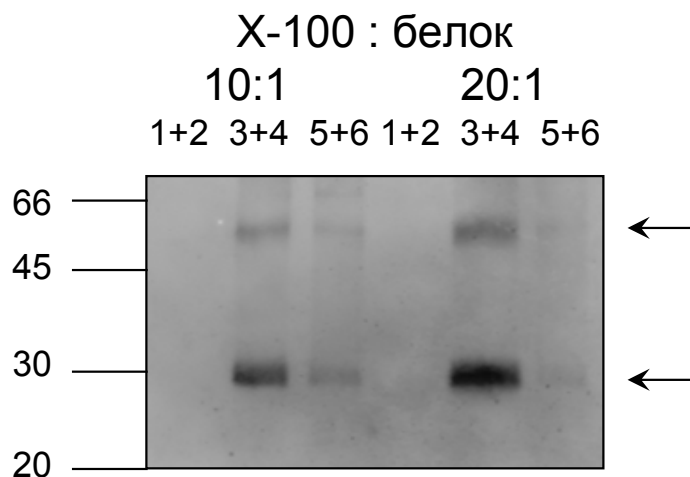


Рис. 4. Иммунодетекция аквапоринов во фракциях 1–6 градиента плотности, собранных после флотации плазмалеммы побегов солюбилизированной Тритоном X-100 при разном соотношении детергент:белок. На дорожки наносили по 3 мкг белка, кроме фракций 1 и 2, которые наносили в максимальном объеме. Блоты визуализировали при помощи вторичных козьих антител, меченых флуоресцеином. Стрелками указаны димерные и мономерные формы аквапоринов.

Характеристика фракций плазмалеммы разной плотности

С учетом того, что обработка детергентами может вызывать изменение взаимодействий между компонентами мембраны, был проведен эксперимент по разделению плазмалеммы на фракции различной плотности без предварительной обработки детергентами. Такой метод был разработан Macdonald и Pike (2005) для быстрого и эффективного выделения липидных рафтов без использования детергентов, основой которого является разделение мембран по плотности. В качестве критерия обогащения рафтами фракций плазмалеммы использовали величину отношения стерин/белок и плотность упаковки липидного бислоя.

На рис. 5 приведена характерная картина распределения мембранного материала плазмалеммы после центрифугирования в трехступенчатом градиенте плотности OptiPrep. В этом случае три фракции плазмалеммы разной плотности распределились на интерфазах ступеней градиента. Они были собраны и

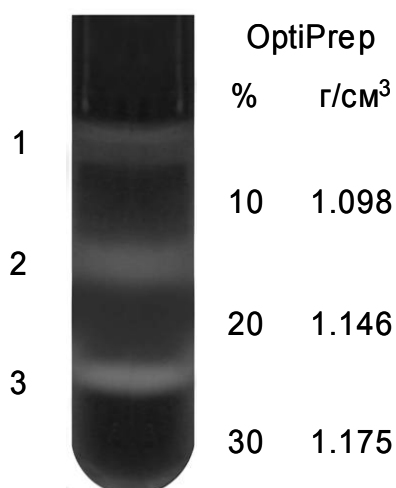


Рис. 5. Фракционирование плазмалеммы побегов флотацией в градиенте плотности OptiPrep. Фракции плазмалеммы разной плотности собирали на границах ступеней градиента. Цифрами указаны номера фракций, концентрация и плотность OptiPrep.

проанализированы на содержание белка, стерина и аквапоринов. Как оказалось две верхние ступени градиента содержали по 40–50% от общего количества белка, загруженного в градиент, при этом количество белка в самой нижней фракции было минимальным (рис. 6а). Это было характерно для плазмалеммы и корней, и побегов. Если судить по величине отношения стерин/белок (рис. 6б), то только во фракциях 3 корней и побегов наблюдалось низкое содержание стерина. При этом отношение стерин/белок в исходной плазмалемме из корней было выше, чем в плазмалемме из побегов. Следует отметить, что в детергент-устойчивых мембранах из плазмалеммы побегов отношение стерин/белок (рис. 2б) достигало 400 мкг/мг, т.е. заметно превышало этот показатель для плазмалеммы, фракционированной по плотности в градиенте OptiPrep (рис. 6б).

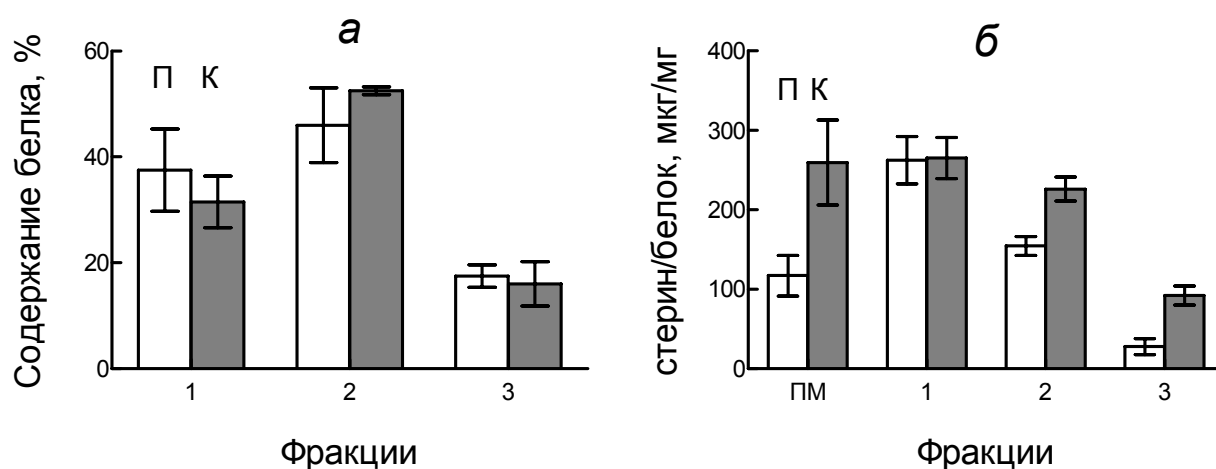


Рис. 6. Распределение мембранного белка (а), и отношение стерин/белок (б) в плазмалемме (ПМ) побегов (П) и корней (К) и во фракциях (1–3) разной плавучей плотности, собранных после разделения мембран флотацией в градиенте плотности OptiPrep. За 100% принимали содержание мембранного белка (500–750 мкг), вносимого в каждую пробирку перед центрифугированием.

По результатам иммунодетекции РІР-аквапоринов во фракциях разной плотности (рис. 7) можно заключить, что доля этих белков в «легких» мембранах выше, по сравнению с «тяжелыми» фракциями и с исходной плазмалеммой, что справедливо для плазмалеммы и побегов, и корней. В распределении аквапоринов по фракциям наблюдалась корреляция с содержанием в них стерина.

Совокупность приведенных результатов можно интерпретировать как свидетельство в пользу того, что РІР-аквапорины обладают высоким сродством к стерин-богатым доменам, но не обязательно являются их резидентами.

Фазовое состояние липидного бислоя и осмотическая водная проницаемость фракций плазмалеммы разной плотности

Поскольку во фракциях плазмалеммы была обнаружена неодинаковая степень обогащения стеринами, мы предположили, что бислой в этих фракциях обладает разной степенью упорядоченности, что, как известно из работ на модельных

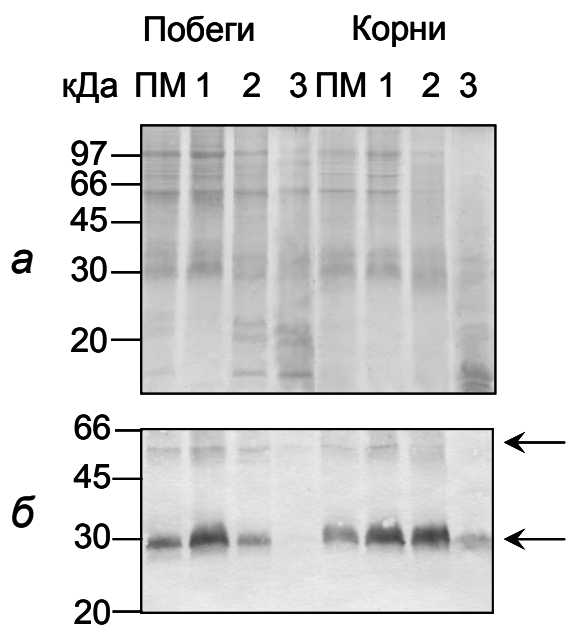


Рис. 7. Электрофоретическое разделение белков (а) и иммунодетекция (б) RIP-аквапоринов в плазмалемме (ПМ) и во фракциях разной плотности (1, 2, 3) из побегов и корней. На дорожку наносили по 10 мкг белка. Для визуализации использовали вторичные козьи антитела, меченные пероксидазой, и 4-хлор-1-нафтол в качестве хромогенного субстрата. Стрелками указаны мономерные и димерные формы аквапоринов.

мембранах, влияет на осмотическую водную проницаемость липидного бислоя (Lande *et al.*, 1995; Schuler *et al.*, 1991).

Для проверки такого предположения оценили фазовое состояние мембранных липидов этих фракций с использованием флуоресцентного зонда лаурдана, который также хорошо подходит и для исследования степени оводненности липидного матрикса мембран (Parasassi *et al.*, 1995). О фазовом состоянии бислоя мембран судили по величине генерализованной поляризации возбуждения флуоресценции (GPEX) лаурдана, значения которой могут принимать значения от -1 до $+1$, при этом величины ниже $+0.25$ соответствуют неупорядоченным жидкофазным доменам с высоким содержанием воды, а выше $+0.5$ – упорядоченным твердофазным.

На рис. 8 представлена температурная зависимость спектров генерализованной поляризации возбуждения флуоресценции лаурдана, встроенного в мембраны фракций разной плотности плазмалеммы побегов. Как видно, при увеличении температуры значения GPEX лаурдана изменяются от значений, превышающих 0.5 при 10°C , до величин меньше 0.25 при 40°C . Это подтверждает, что в физиологическом диапазоне температур в плазмалемме сосуществуют твердо- и жидкофазные домены. На этом же рис. можно видеть, что спектры GPEX лаурдана в плазмалемме с низкой плотностью, располагаются по оси ординат выше по сравнению с фракциями высокой плотности. Это указывает на преобладание доли твердофазных доменов в липидном бислое мембран с высоким содержанием стерина. На основании этих результатов можно ожидать, что осмотическая водная проницаемость бислоя таких мембран будет снижена, и для проверки этого была оценена осмотическая водная проницаемость мембран фракций разной плотности, показателем которой служила константа скорости сжатия везикул, полученная аппроксимацией экспериментальных данных изменения кинетики светорассеяния при генерации осмотического градиента.

Поскольку фракции с низкой плотностью мало отличались друг от друга по содержанию белка, стерина и аквапоринов (рис. 6 и 7), а также по фазовому состоянию липидного бислоя (рис. 8), то было решено объединить их. Результаты эксперимента по оценке водной проницаемости плазмалеммы и везикул «легких» (1+2) и «тяжелых» (3) мембран приведены на рис. 9. Видно, что в мембранах с высоким отношением стерин/белок осмотическая водная проницаемость ниже и, наоборот, – при низкой величине отношения проницаемость выше. Таким образом, фракция «тяжелых» мембран, получаемая с градиента OptiPrep, может соответствовать *in situ* участкам плазмалеммы со слабо упорядоченным бислоем, высокой осмотической водной проницаемостью и низким содержанием РР-аквапоринов. Основная же часть пула этих белков локализуется в стерин-богатых доменах, причем именно этими участками мембраны определяется интенсивность транспорта воды через плазмалемму.

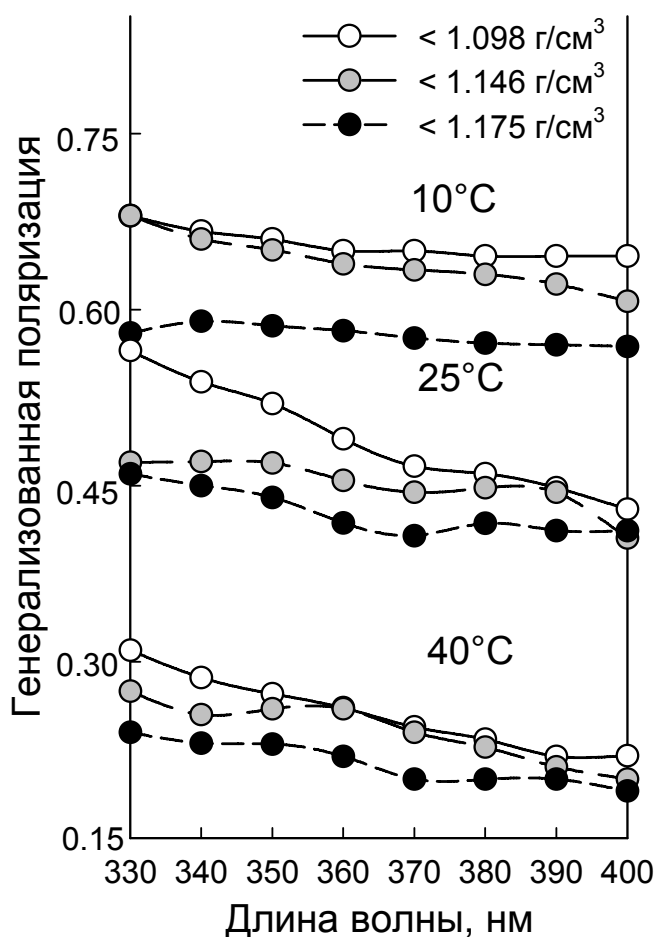


Рис. 8. Температурная зависимость спектров генерализованной поляризации возбуждения флуоресценции лаурдана, встроенного во фракции плазмалеммы разной плавучей плотности. Спектры возбуждения флуоресценции регистрировали при $\lambda_{em} = 440$ и $\lambda_{em} = 490$ нм, далее рассчитывали значения по формуле: $GPEX = (I^{440} - I^{490}) / (I^{440} + I^{490})$.

Влияние стерина на скорость транспорта воды через плазмалемму растительных клеток

Плазмалемма растительных клеток характеризуется не только высоким содержанием стерина, но и большим разнообразием этих липидов в мембранах (Hartmann, 2004). Существует точка зрения, основанная на результатах исследований с модельными мембранами, что внедрение в бислой стерина позволяет расширить

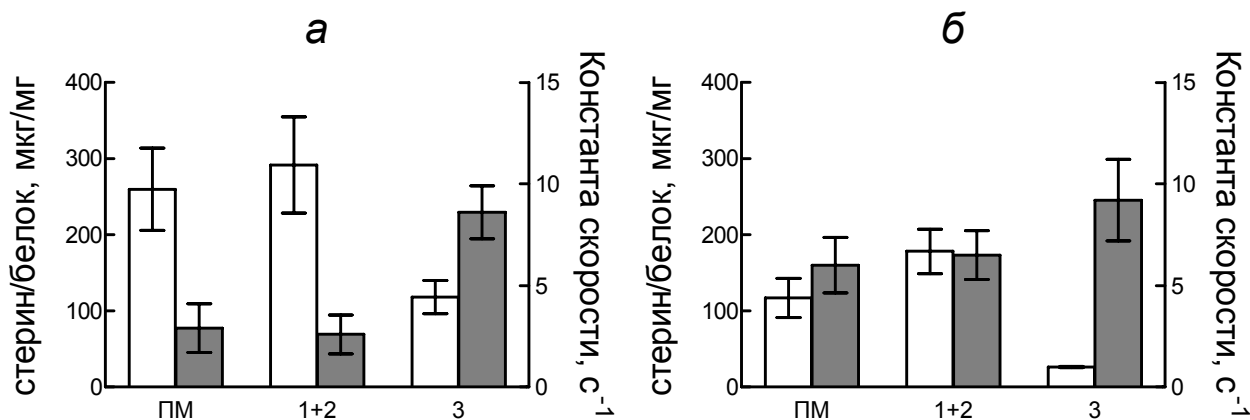


Рис. 9. Соотношение стерин/белок и значения константы скорости осмотической водной проницаемости в плазмалемме (ПМ) из корней (*a*) и побегов (*б*) гороха и ее фракциях с плотностью <math><1.14 \text{ г/см}^3</math> (1+2) и $>1.14 \text{ г/см}^3$ (3).

температурный оптимум для протекания мембраносвязанных процессов. Считается, что само присутствие стерин/белок в мембране служит одним из механизмов адаптации растений к резким перепадам температур (Beck et al., 2007).

На рис. 10 представлены результаты экспериментов по экстракции стерин/белок из плазмалеммы корней и побегов при обработке мембран метил-β-циклодекстрином в различных концентрациях. Видно, что при 30 мМ концентрации этого агента в среде достигается извлечение более 50% стерин/белок из мембраны.

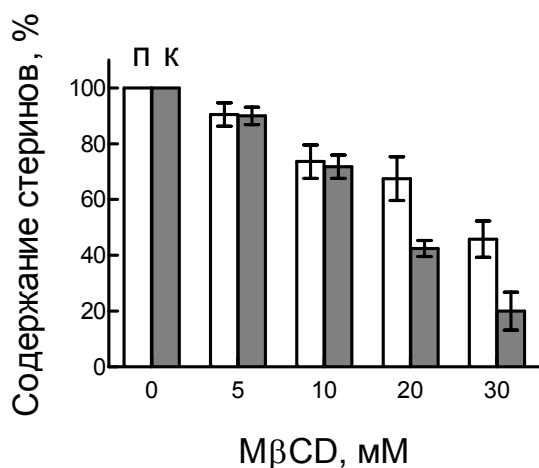


Рис. 10. Содержание стерин/белок в плазмалемме корней (К) и побегов (П) гороха в зависимости от используемой концентрации метил-β-циклодекстрина (MβCD) для экстракции стерин/белок. Суспензию плазмалеммы инкубировали с циклодекстрином 30 минут, переосаждали полчаса при 100000 g, осадки ресуспендировали и определяли в них содержание стерин/белок.

На контрольных и модифицированных метил-β-циклодекстрином мембранах были получены температурные зависимости генерализованной поляризации возбуждения флуоресценции лаурдана (рис. 11).

По характеру изменений величины GPEX, можно сказать, что изменение фазового состояния липидов в мембране побегов и корней в контрольных вариантах не имеет сколько-нибудь заметных различий. На обработанной метил-β-циклодекстрином плазмалемме корней и побегов у кривых температурной зависимости GPEX лаурдана увеличился наклон, но средняя температура фазового

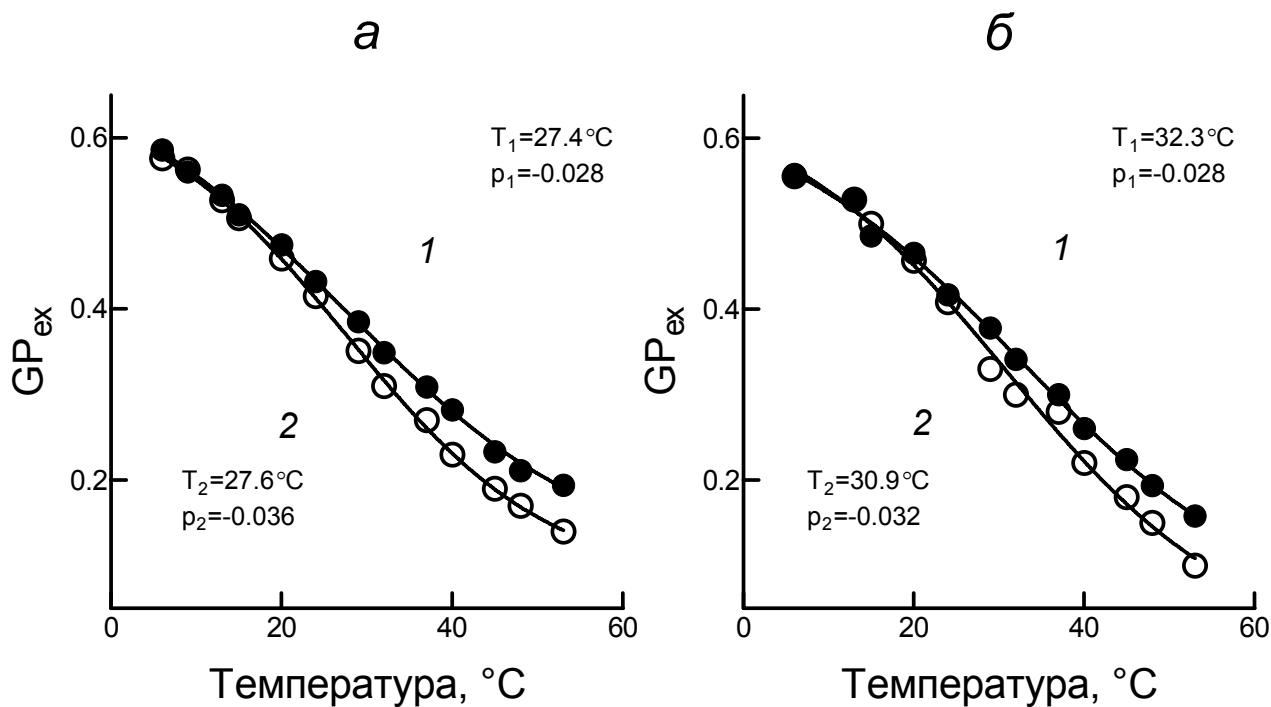


Рис. 11. Температурная зависимость генерализованной поляризации возбуждения флуоресценции лаурдана, встроенного в контрольные (1) и обработанные (2) метил- β -циклодекстрином везикулы плазмалеммы корней (а) и побегов (б) гороха. Значения генерализованной поляризации рассчитывали по интенсивности возбуждения флуоресценции при длине волны 380 нм. Приведены: T_1 и T_2 – средние температуры фазового перехода, соответствующие точке изгиба кривой, и p_1 и p_2 – коэффициенты наклона кривых, характеризующие кооперативность фазового перехода.

перехода понизилась только в плазмалемме побегов. Различия в температуре и коэффициентах наклона свидетельствуют о различной чувствительности плазмалеммы корней и побегов к перепадам температуры.

В последующих экспериментах предполагалось выяснить, изменяется ли осмотическая водная проницаемость при изменении количества стеринов в плазмалемме. Для этого плазмалемма из корней и побегов была обработана метил- β -циклодекстрином в концентрации 10 мМ.

На везикулах плазмалеммы после создания осмотического градиента были получены кривые осмотического сжатия и на их основе рассчитывали константы скорости, характеризующие совокупный трансмембранный поток воды через водные каналы и липидный бислой (рис. 12). Их значения составили 2.9 ± 1.2 и $6.0 \pm 1.4 \text{ с}^{-1}$ для корней и побегов соответственно. Обнаруженные различия в гидравлической проводимости можно объяснить, например, более высоким по сравнению с побегами содержанием стеринов в плазмалемме корней (рис. 6б), а с другой стороны, тем, что доли активных аквапоринов в мембранах этих органов различны, хотя само содержание белков примерно одинаково (рис. 7).

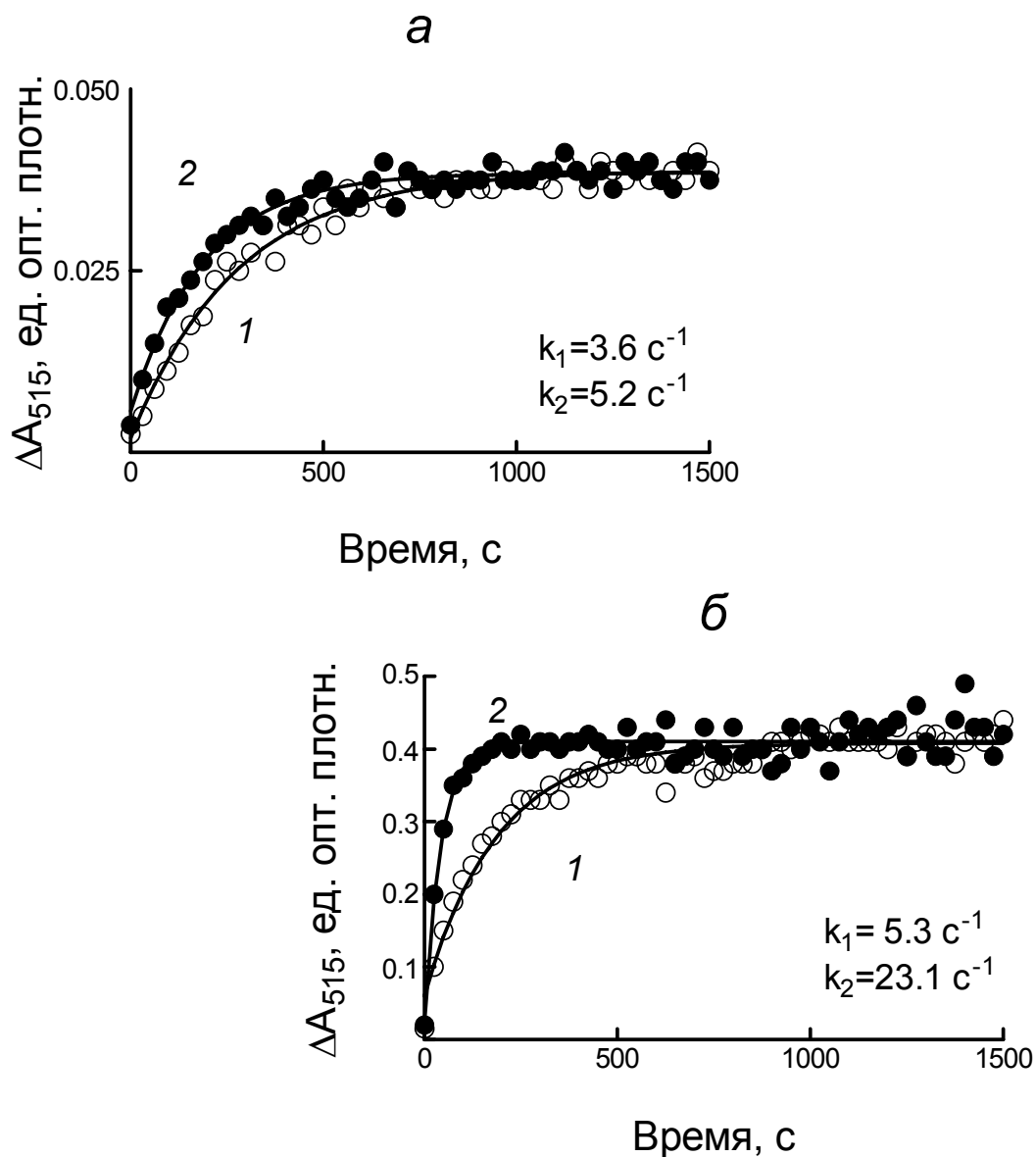


Рис. 12. Кинетика изменения интенсивности светорассеяния суспензий везикул контрольной (1) и обработанной 10 мМ метил- β -циклодекстрином (2) плазмалеммы корней (а) и побегов (б) гороха в ответ на генерацию осмотического градиента ($\Delta C = 0.3 \text{ М}$ сахарозы). Представлены характерные экспериментальные данные (точки) и их аппроксимация экспоненциальной зависимостью (линия), k_1 и k_2 – соответствующие константы скорости. Перед осмотическим сжатием суспензию везикул плазмалеммы (150 мкг белка/мл) в среде с 0.1 М сахарозой предынкубировали в течение 30 мин в присутствии 10 мМ метил- β -циклодекстрина. Представлены данные типичного эксперимента.

После обработки метил- β -циклодекстрином константа скорости осмотического сжатия везикул возросла в 1.5 раза для плазмалеммы корней и в 3–4 раза для побегов (рис. 12). Эти данные подтверждают ранее высказанную точку зрения (Mathai *et al.*, 2008), а также наше предположение о том, что стеринны являются одним из факторов, лимитирующих осмотическую водную проницаемость липидного бислоя мембран.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лимитирующее действие стеринов может быть обусловлено свойствами молекулы стеринов, которые имеют сродство к липидам с насыщенными жирными кислотами и, взаимодействуя с ними, могут инициировать формирование в мембране участков с высокой степенью упорядоченности бислоя. При этом в таких участках стерин вытесняет молекулы воды из полярной области липидного матрикса. Наши эксперименты по исследованию свойств упаковки и оводненности липидного бислоя двух популяций везикул при помощи лаурдана выявили преобладание доли твердофазных доменов в липидном бислое во фракции мембран с высоким содержанием стеринов (рис. 8). Кроме того, в этих же фракциях зарегистрирована низкая осмотическая проницаемость (рис. 9).

В силу отсутствия методических подходов для определения активности аквапоринов в различных доменах плазмалеммы вопрос об их способности компенсировать снижение скорости трансмембранного водного потока в пунктах локализации стеринов остался не ясным. Косвенным подтверждением такой способности аквапоринов контролировать водную проницаемость является тот факт, что основная часть пула этих белков сосредоточена в стерин-обогащенных доменах, которые и определяют интенсивность транспорта воды через плазмалемму.

Вместе с тем просматривается элемент специфичности участия стеринов в транспорте воды, суть которого пока сложно сформулировать. Одно из предположений о такой специфичности может состоять в следующем: локализация аквапоринов в окружении стеринов может обеспечивать поддержание олигомерной структуры аквапоринов в плазмалемме, а также увеличивать время жизни этих белков в мембране за счет ограниченной рециркуляции стерин-обогащенных доменов в везикулярном трафике.

ВЫВОДЫ

1. Плазмалемма, изолированная из корней и побегов 5-дневных этиолированных проростков гороха с применением водной полимерной двухфазной системы, при центрифугировании в градиенте плотности Optiprep разделяется на фракции мембран, различающихся по плавучей плотности.
2. Фракции плазмалеммы с низкой плавучей плотностью обогащены стеринами и обладают более упорядоченной структурой липидного матрикса по сравнению с мембранами высокой плотности.
3. Содержание PIP-аквапоринов выше в стерин-обогащенных фракциях плазмалеммы, как корней, так и побегов.
4. При солубилизации плазмалеммы корней и побегов холодным Тритоном X-100 PIP-аквапорины концентрируются в детергент-резистентных мембранах.

5. После извлечения стеринов из плазмалеммы корней и побегов скорость трансмембранного транспорта воды возрастает, тем самым, свидетельствуя о том, что стерины являются одним из факторов, определяющих кинетику этого процесса.
6. Фазовое состояние липидного матрикса мембран с низким содержанием стеринов резко изменяется в ответ на изменения температуры.
7. Скорость трансмембранного транспорта воды через домены, содержащие стерины, ниже по сравнению с участками мембраны, образованными фосфолипидами. Не исключено, что относительно низкая водная проводимость стерин-обогащенных доменов плазмалеммы компенсируется высоким содержанием и/или активностью РІР-аквапоринов в этих доменах.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Белугин Б.В.** (2009) Анализ содержания аквапоринов РІР-типа в стерин-обогащенных фракциях плазмалеммы корней и побегов этиолированных проростков гороха. В сб.: *Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»*. Москва, с.224-225.
2. **Шевырева Т.А., Белугин Б.В., Жесткова И.М., Трофимова М.С.** (2009) Исследование аквапорин-содержащих доменов плазмалеммы с помощью неионных детергентов. В сб.: *Физико-химические механизмы адаптации растений к антропогенному загрязнению в условиях Крайнего Севера*. Годичное собрание ОФРР, Апатиты, с.361-363.
3. **Белугин Б.В.** (2009) Локализация РІР-аквапоринов в стерин-обогащенных доменах плазмалеммы. В сб.: *Международная научная конференции по биоорганической химии, биотехнологии и нанотехнологии, посвященная 75-летию со дня рождения академика Юрия Анатольевича Овчинникова*. Москва-Пушино, том 2, с. 23-26.
4. **Белугин Б.В., Жесткова И.М., Трофимова М.С.** (2010) Сродство РІР-аквапоринов к стерин-обогащенным доменам плазмалеммы клеток этиолированных проростков гороха. *Биологические мембраны*, том 27, № 5, с. 394–403.
5. **Шевырева Т.А., Белугин Б.В., Трофимова М.С.** (2010) Мультибелковые комплексы плазмалеммы, содержащие РІР-аквапорины. В сб.: *Всероссийский симпозиум Растение и стресс (Plants under Environmental Stress)*. Москва, с. 391-392.
6. **Белугин Б.В., Жесткова И.М., Трофимова М.С.** (2011) Изменение соотношения стеринов и аквапоринов в плазмалемме растительных клеток как способ регуляции трансмембранного транспорта воды. В сб.: *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*. Пушино, том 2, с. 758-763.

7. **Белугин Б.В.**, Жесткова И.М., Трофимова М.С. (2011) Латеральная гетерогенность РР-аквапоринов и водная проницаемость плазмалеммы растительных клеток. В сб.: *Физиология растений – фундаментальная основа экологии и инновационных биотехнологий*. Годичное собрание ОФРР, Нижний Новгород, том 2, с. 91-92.