

Божко Кира Николаевна



**Роль аквапоринов в регуляции
осмотической водной проницаемости
мембран растительных клеток**

03.00.12. - Физиология и биохимия растений

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2005

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

Новикова Галина Викторовна

доктор биологических наук,
профессор

Бабаков Алексей Владимирович

Ведущее учреждение:

Кафедра физиологии растений Биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова

Защита диссертации состоится «26» апреля 2005 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета К 002.210.01 при Институте физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН по адресу: 127276, г. Москва, Ботаническая ул., 35. Факс: 07(095)9778081

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

Автореферат разослан « 25 » марта 2005г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат биологических наук



М.И. Азаркович

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. Открытие аквапоринов у представителей всех царств живой природы стало источником новой информации о механизмах проницаемости клеточных мембран для воды (Verkman and Mirta 2000). Чрезвычайно высокое разнообразие и многочисленность аквапоринов у отдельных видов растений поставило вопрос об их функциональной роли (Maurel 1997; Hill et al. 2004). Имеющиеся в настоящее время данные показывают, что выяснение особенностей функционирования и способов регуляции активности аквапоринов весьма перспективно для понимания механизмов, определяющих динамику транспорта воды в растениях при нормальных и стрессовых условиях окружения. Вместе с тем, несмотря на интенсивно ведущиеся в настоящее время работы по выявлению аквапоринов в растениях, мало известно о функциональной активности этих белков в их нативном окружении в биологических мембранах и способах ее регуляции. Основные доказательства в пользу постулируемой функции аквапоринов как водных каналов получены с использованием модельной системы, представленной ооцитами *Xenopus*. Применение такого подхода далеко не всегда позволяет выявить активность исследуемых белков, причем в особенности это касается аквапоринов плазмалеммы (Chaumont et al. 2000; Fetter et al. 2004).

Цель и задачи исследования. Цель данной работы состояла в исследовании участия аквапоринов в регуляции осмотической водной проницаемости клеточных мембран растений. Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Получить препараты микросомальных, плазматических и вакуолярных мембран из растений с различной эффективностью использования воды.
2. Оценить величину осмотической водной проницаемости этих мембран.
3. Определить содержание аквапоринов PIP-типа в мембранных препаратах с различной водной проницаемостью.

Научная новизна. Исследована осмотическая водная проницаемость клеточных мембран, изолированных из тканей этиолированных проростков кукурузы и растений *Mesembryanthemum crystallinum* на стадиях онтогенеза с различной способностью к индукции САМ. Проведена оценка обогащенности исследованных мембран изоформами аквапоринов PIP-группы. Впервые проведено сопоставление

водной проницаемости плазмалеммы из различных тканей этиолированных проростков кукурузы с их обогащенностью аквапоринами, что позволило установить существование положительной корреляции между этими величинами. Это свидетельствует о том, что функциональная активность аквапоринов является важнейшим фактором, определяющим осмотическую водную проницаемость мембран. Впервые усвоенно, что снижение водной проницаемости плазмалеммы листьев *M. crystallinum* при переходе на САМ, индуцированном процессом онтогенеза или засолением, происходит за счет уменьшения содержания в ней некоторых изоформ аквапоринов. Снижение водной проницаемости тех же мембран из корней под влиянием тех же факторов не сопровождалось заметным изменением количества аквапоринов PIP-группы. Вместе с тем, выявлен достаточно заметный уровень содержания этих белков во фракциях внутриклеточных мембран. Это подтверждает возможность регулирования степени обогащенности мембран аквапоринами за счет функционирования системы везикулярного транспорта. На основе полученных данных сделан вывод об участии аквапоринов в перераспределении интенсивностей водных потоков в растении при переходе на САМ посредством регуляции осмотической водной проницаемости мембран.

Теоретическая и практическая значимость работы. Сопоставление кинетических параметров трансмембранного переноса воды и относительного содержания аквапоринов в мембранных препаратах позволило получить новую информацию об активности аквапоринов и их роли в регуляции осмотической водной проницаемости мембран растительных клеток в оптимальных и стрессовых условиях. Полученные результаты могут быть использованы для развития исследований молекулярных механизмов эндогенной регуляции трансмембранного потока воды и адаптивных свойств растительных клеток, а также при поиске средств водообеспечения у растений. Теоретические обобщения и совокупность экспериментальных данных работы могут использоваться в курсах лекций для студентов биологических факультетов вузов.

Апробация работы. Основные результаты были представлены на международном симпозиуме "Plant under Environmental Stress" (Москва, 2001), на I-ой молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (Москва, 2001), на 5-ом съезде Общества физиологов

растений России (Пенза, 2003), на международной конференции «Проблемы физиологии растений Севера» (Петрозаводск, 2004), на XVII-ой зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2005) и других научных мероприятиях.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, изложения полученных результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 100 страницах машинописного текста, включает таблицу, 25 рисунков; библиография содержит 183 источника.

Объекты и методы исследования

В исследованиях использовали 7-дневные этиолированные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) сорта Нард 150 и растения хрустальной травки (*Mesembryanthemum crystallinum* L.). Кукурузу выращивали в темноте в полукондиционируемой камере при 25°C. Для экспериментов использовали корни, мезокотили и колеоптили.

M. crystallinum выращивали на питательной среде Джонсона, модифицированной по Winter (1973) в камере фитотрона при температуре 23-25°C и относительной влажности воздуха ~55% в дневное время суток. Ночью температуру и влажность воздуха поддерживали на уровне 15-17°C и ~70%, соответственно. В экспериментах были использованы растения *M. crystallinum* трех возрастов: 4-5-недельные с C₃-типом фотосинтеза; 6-7-недельные и 8-9-недельные с САМ-метаболизмом. Часть 4-5-недельных растений подвергали в течение 3 ч. или 2 недель солевому стрессу путем внесения 400 мМ NaCl в питательный раствор.

Об индукции и развитии САМ судили по изменению характерной суточной динамики титруемой кислотности клеточного сока. Для ее определения из первичных листьев брали высечки диаметром 1 см утром, перед началом дневного освещения, и через 12 ч, в конце светового периода. Вытяжку клеточного сока получали экстракцией из высечек листьев 20%-ным водным раствором метанола при 100°C в течение 20 мин. Вытяжку титровали ЮММ раствором NaOH до pH 7.0. Расчет содержания протонов [ИГ] проводили с учетом массы свежей ткани.

Мембраны выделяли из корней и надземных частей проростков кукурузы или корней и листьев растений хрустальной травки. 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 дитиоэритритол, 1 мМ фенолметил-сульфонилфторид и 0.6%-ный (в/о) поливинилпирролидон, и осаждали центрифугированием.

Микросомальные мембраны фракционировали с использованием водной двухфазной полимерной системы: 6.2%-ный декстран Т500 (в/в) - 6.2%-ный полиэтиленгликоль 3500 (в/в) (Larsson et al. 1994). Метод позволяет получать высокоочищенную фракцию плазмалеммы и обогащенную тонопластом фракцию, содержащую также относительно невысокий процент мембран ЭПР и аппарата Гольджи. В серии экспериментов использовали очищенный препарат тонопласта, который получали по методу Maeshima и Yoshida (1989) с разделением микросомальных мембран флотацией на сахарозной подушке. Мембраны замораживали и хранили при -70°C до использования.

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

Чистоту изолированных мембранных фракций оценивали по активности специфических маркерных ферментов: Ca_3VO_4 -чувствительной H^+ -АТФазы для плазмалеммы, KNO_3 -ингибируемой H^+ -АТФазы для тонопласта, цитохром *c* - оксидазы для внутренних мембран митохондрий и цианид-нечувствительной НАД Н-цитохром *c* - редуктазы для мембран ЭПР (Briskin et al. 1987).

Для определения коэффициента осмотической водной проницаемости мембран (P_{oc}) везикулы подвергали осмотическому сжатию и регистрировали кинетику светорассеяния с помощью приставки к спектрофотометру Hitachi-557 («Hitachi», Япония), позволяющей проводить измерения методом остановленного потока. Кинетические кривые, характеризующие временной ход светорассеяния везикулярной суспензии, аппроксимировали экспоненциальной зависимостью. Коэффициент осмотической водной проницаемости мембран (P_{oc}) рассчитывали в соответствии с van Heeswijk и van Os (1986) из уравнения: $P_{oc} = V k / (A V_w C_c)$, где V - объем и A - площадь поверхности везикулы, k - экспоненциальная константа

скорости, V_w - парциальный молярный объем воды (18 моль/см³) и C_c - молярность наружного раствора сахарозы.

Электрофоретическое разделение мембранных белков проводили в 13% ПАА геле по методу Laemmli (1970). Перед электрофорезом препараты мембран смешивали в равных объемах с 2X экстрагирующим буфером, содержащим 125 мМ Трис-НСl (рН 6.8), 4% (в/о) SDS, 20% (в/в) глицерин, 200 мМ ДТТ, 0.02% (в/о) бромфеноловый синий. Денатурацию мембранного белка из тканей кукурузы проводили при 56°C в течение 5 мин., из корней и листьев *M. crystallinum* - при 96°C 5 мин. Далее белки электрофоретически переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Super («Amersham», Великобритания), используя Multiphor II Electrophoresis Unit («LKB», Швеция). После переноса белков нитроцеллюлозную мембрану отмывали в среде PBST, содержащей 10 мМ фосфатный буфер рН 7.4, 2.7 мМ КСl и 137 мМ NaCl и 0.5% (в/о) Tween-20, и блокировали в той же среде с добавлением 2% (в/о) сухого обезжиренного молока в течение 1 ч. при 18°C. Далее мембрану инкубировали с сыворотками, содержащими антитела, полученные против конъюгата БСА с консервативной аминокислотной последовательностью аквапоринов РlР-типа, или антитела против последовательностей белков МlР А, МlР В и МlР С *M. crystallinum*, любезно предоставленные проф. Нl. Bohnert (University of Arizona, США), в течение ночи при 4°C. После инкубации мембрану отмывали от первичных антител в PBST и инкубировали с вторичными козыми антикроличьими антителами, конъюгированными с пероксидазой («Promega», США), в течение 1.5 ч. Аквапорины визуализировали, используя цветную реакцию на пероксидазу в растворе, содержащем 26 мг 2,4-хлорнафтол, 7 мл метанола, 45 мл Н₂О и 40 мкл 20% Н₂О₂, согласно (Каравайко и др. 1995).

Результаты и обсуждение

Осмотическая водная проницаемость мембран, изолированных из этиолированных проростков кукурузы. Оценка осмотической водной проницаемости изолированных мембран требует применения подходов, позволяющих регистрировать очень быстрые осмотические изменения объема мембранных везикул. Один из таких подходов состоит в регистрации кинетики изменения светорассеяния мембранных везикул методом остановленного потока (Verkman 1995), который

позволяет быстро (< 1 мсек) переводить везикулы, нагруженные раствором сахарозы с концентрацией C_n , в среду с другой концентрацией этого осмотика C_c и тем самым создавать трансмембранный осмотический градиент определенной величины и направления. В нашей работе именно этот метод был использован для измерения водной проницаемости микросомальных, внутриклеточных и плазматических мембран, изолированных из корней, мезокотилей и колеоптилей кукурузы, с целью выяснения механизмов трансмембранного транспорта воды.

Для оценки осмотической водной проницаемости изолированных мембран была исследована кинетика изменения светорассеяния суспензии мембранных везикул в ответ на их осмотическое сжатие (рис.1 и 2). Видно, что наблюдаемые амплитуда и скорость изменения светорассеяния везикулярных суспензий пропорциональны величине трансмембранного осмотического градиента.

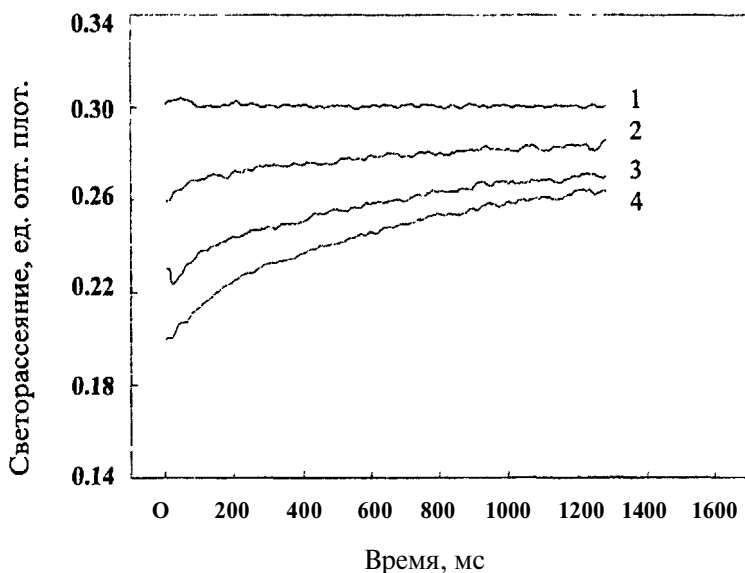


Рис. 1. Кинетика изменения интенсивности светорассеяния при осмотическом сжатии везикул плазмалеммы корней кукурузы. Мембраны (200 мкг белка/мл) в среде содержащей 100 мМ сахарозу, смешивали со средой того же состава с другой концентрацией сахарозы. Конечная концентрация осмотика в наружной среде после смешивания составила: 100 (1), 200 (2), 300(3) и 400 (4) мМ.

Кинетические кривые изменения светорассеяния суспензий везикул плазмалеммы (рис. 1) и внутриклеточных мембран (рис. 2) корней этиолированных проростков кукурузы, обусловленного их осмотическим сжатием хорошо аппроксимировались простыми экспоненциальными зависимостями ($R > 0.98$) с существенно различающимися константами скорости.

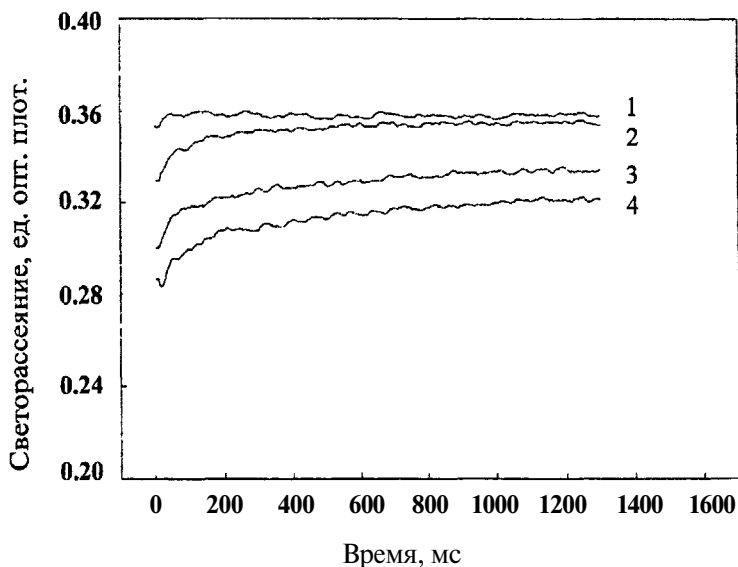


Рис. 2. Кинетика изменения интенсивности светорассеяния при осмотическом сжатии везикул внутриклеточных мембран корней кукурузы. Мембраны (250 мкг белка/мл) в среде, содержащей 100 мМ сахарозу, смешивали со средой того же состава с другой концентрацией сахарозы. Конечная концентрация осмотика в наружной среде после смешивания составила 100 (1), 200 (2), 300 (3) и 400 (4) мМ.

Согласно полученным нами данным электронномикроскопического анализа средний диаметр везикул плазмалеммы составляет 150 ± 52 нм, а внутриклеточных мембран - 175 ± 54 нм. Константы скорости и величины диаметров были использованы для расчета коэффициентов осмотической водной проницаемости исследуемых мембран ($P_{ос}$). Рассчитанное значение этого параметра для внутриклеточных мембран (165 ± 7 мкм сек⁻¹) превышало соответствующую

величину для плазмалеммы ($11+2$ мкм сек⁻¹). Столь существенное различие в коэффициентах водной проницаемости мембран может указывать на функционирование в них различных механизмов транспорта воды.

Достаточно высокая величина рассчитанной водной проницаемости внутриклеточных мембран, по-видимому, отражает процесс облегченной диффузии воды через главную составляющую этих мембран - тонопласт. Гораздо более высокая водная проницаемость тонопласта, по отношению к соответствующей величине для плазмалеммы выявлена и для некоторых других растительных объектов. Близкие значения водной проницаемости, полученные с использованием такого же метода измерения, обнаруживают и вакуолярные мембраны, изолированные из корней пшеницы (86 мкм сек⁻¹) (Niemietz and Tyerman 1997) и клеток суспензионной культуры табака (660 мкм сек⁻¹) (Maurel et al. 1997). Высокие значения водной проницаемости, измеренные в работе (Maurel et al. 1997), по-видимому, обусловлены функциональной однородностью исходного растительного материала, использованного для получения вакуолярных мембран. Хотя обстоятельное объяснение физиологического значения такого различия в водной проницаемости основных клеточных мембран высших растений еще отсутствует, предполагается, что оно может лежать в основе буферной роли вакуоли в осморегуляции растительной клетки, т.е. различия в объемах цитозоля и вакуоли компенсируются разной интенсивностью трансмембранных потоков воды при осмотическом стрессе.

Относительно низкая водная проницаемость плазмалеммы (11 мкм сек⁻¹), измеренная в наших экспериментах, может объясняться низким содержанием аквапоринов или отсутствием их в этой мембране. С другой стороны, нельзя исключить и ту возможность, что низкая водная проницаемость плазмалеммы обусловлена слабой активностью локализованных в ней аквапоринов из-за пребывания водных каналов большинства этих белков в закрытом состоянии. По имеющимся в литературе данным (Johansson et al. 1998), одним из факторов, контролирующих открывание водных каналов аквапоринов может быть фосфорилирование/дефосфорилирование этих белков.

Ингибирование водной проницаемости мембран соединениями ртути.

Выявление активности аквапоринов в клеточных мембранах *in vitro* может

базироваться на чувствительности трансмембранных потоков воды к ртуть - содержащим соединениям. Соединения ртути могут обратимо блокировать трансмембранный водный поток путем связывания с сульфгидрильными группами цистеиновых остатков, расположенных в районе водной поры (Daniels et al. 1994; Agre et al. 1998). Связывание ртути может вызывать конформационные перестройки в молекулах аквапоринов (Barone et al. 1997).

Концентрационные зависимости ингибирующего действия ртутьсодержащих соединений хлорида ртути (HgCl_2) и *n*-сульфофенилмеркуриохлорида (ПХМБС) на водную проницаемость плазмалеммы и внутриклеточных мембран корней кукурузы представлены на рис. 3 и 4. Коэффициент осмотической водной проницаемости ($P_{ос}$) внутриклеточных мембран, рассчитанный на основе аппроксимации кинетических кривых экспоненциальными зависимостями, значительно уменьшался с ростом концентрации в среде как одного, так и другого ингибитора. Ингибирующее действие ПХМБС (рис. 4, кривая 1) проявлялось в диапазоне концентраций, на порядок превышающих HgCl_2 (рис. 3, кривая 1).

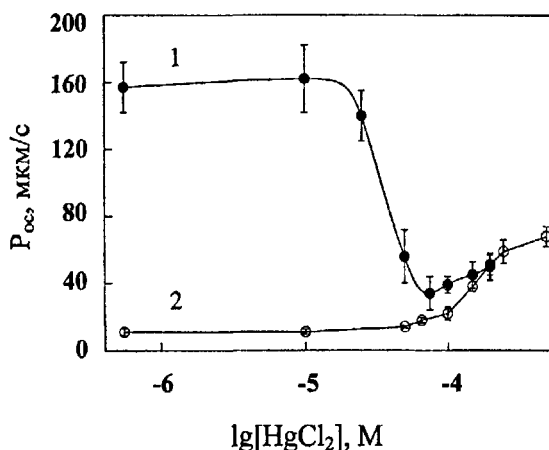


Рис. 3. Концентрационная зависимость влияния HgCl_2 на осмотическую водную проницаемость внутриклеточных мембран (1) и плазмалеммы (2) корней 7-дневных этиолированных проростков кукурузы.

Значительное замедление в присутствии как HgCl_2 , так и ПХМБС кинетики осмотического сжатия везикул внутриклеточных мембран свидетельствует о снижении их водной проницаемости. Проще всего это можно объяснить инактивацией аквапоринов из-за связывания ртути с SH-группами их цистеиновых остатков. Инактивация может быть следствием конформационной перестройки,

происходящей как в молекулах аквапоринов в результате блокирования SH-групп цистеинов, контролирующих проводимость их водного канала, так и, возможно, в других мембранных белках. Таким образом, изменение параметров трансмембранного осмотического водного транспорта под влиянием ртути содержащих соединений свидетельствует в пользу участия в нем аквапоринов.

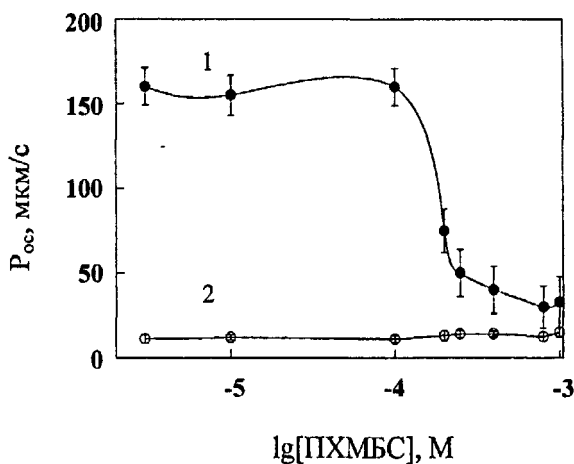


Рис. 4. Концентрационная зависимость влияния ПХМБС на осмотическую водную проницаемость внутриклеточных мембран (1) и плазмалеммы (2) корней 7-дневных этиолированных проростков кукурузы.

Отсутствие влияния выбранных реагентов на кинетику осмотического сжатия везикул плазмалеммы и даже ускорение этого процесса относительно высокими концентрациями $HgCl_2$ являются неожиданными (рис.3, кривая 2). Эти наблюдения трудно объяснить в рамках традиционных представлений о природе ингибирующего действия ртути на трансмембранные потоки воды в клеточных мембранах. Следует обратить внимание, что величина осмотической водной проницаемости плазмалеммы гораздо меньше, чем соответствующая величина для внутриклеточных мембран. Это, скорее всего, обусловлены низким содержанием в плазмалемме аквапоринов и/или инактивацией их в условиях *in vitro*. Кроме того, аквапорины, локализованные в этой мембране, могут быть не чувствительны к действию ртути. Вместе с тем, аномальный эффект высоких концентраций ртути на водную проницаемость плазмалеммы может быть также следствием особого действия ингибитора, как это недавно продемонстрировано в случае аквапорина AQP-6 в эпителиальных клетках крысы (Yasui et al. 1999; Hasama et al. 2002), где при высоких концентрациях $HgCl_2$ в среде наблюдалась активация водного транспорта. Таким

образом, неэффективность ингибирующего действия руги на трансмембранный поток воды еще не может служить индикатором отсутствия в мембранах аквапоринов. Если ограничиться полученными результатами, то вряд ли можно заключить, что аквапорины не включаются в транспорт воды через плазмалемму корней кукурузы. Тем не менее, независимо от природы наблюдаемого стимулирующего эффекта действия ионов руги, устойчивость потока воды через плазмалемму к умеренно низким концентрациям ингибитора в целом позволяет говорить о низкой активности аквапоринов в этой мембране по отношению к соответствующей активности их во внутриклеточных мембранах.

Из сказанного выше следует вывод о том, что плазмалемма и внутриклеточные мембраны из корней кукурузы заметно различаются по вкладу аквапоринов в их осмотическую водную проницаемость, если судить об этом по чувствительности трансмембранного движения воды к выбранным ругтгусодержащим реагентам.

Содержание аквапоринов в плазматических мембранах с различной водной проницаемостью. Для получения ответа на вопрос о размерах пула аквапоринов в плазмалемме был проведен вестерн-блот анализ с использованием антител против конъюгата БСА с пептидом, в котором состав аминокислот и их последовательность (-DYKEPPAPLFEPGELSSWS-) соответствовали консервативной области, локализованной в N-концевом домене аквапоринов растений, принадлежащих PIP1- и PIP2- подсемействам.

Проведенный иммунологический анализ белкового спектра микросомальных, вакуолярных и плазматических мембран корней кукурузы показал, что плазмалемма наиболее обогащена аквапоринами PIP-типа, в тонопласте они практически отсутствуют, но обнаруживаются в микросомальных мембранах (рис. 5). Из полученных результатов иммунодетекции можно сделать вывод о весьма низкой функциональной активности аквапоринов, локализованных в плазмалемме корней, поскольку эти мембраны обнаруживали слабую водную проницаемость.

Для установления связи между активностью аквапоринов и водной проницаемостью мембран из корней, мезокотилей и колеоптилей этиолированных проростков кукурузы, были изолированы плазматические мембраны. Оценка

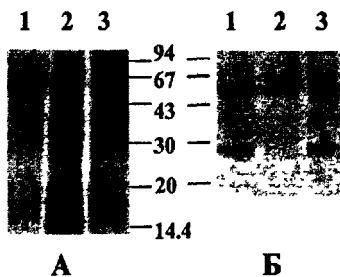


Рис. 5. Электрофоретическое разделение (А) мембранных белков и иммунодетекция (Б) аквапоринов PIP-семейства в препаратах плазмалеммы (1), тонопласта (2) и микросом (3) из корней 7-дневных этиолированных проростков кукурузы. На трек нанесено 15 мкг белка.

осмотической водной проницаемости мембран, сделанная на основе аппроксимации кинетических кривых сжатия везикул показала, что водная проводимость плазмалеммы coleoptилей значительно превышает таковую мезокотилей и корней (рис. 6).

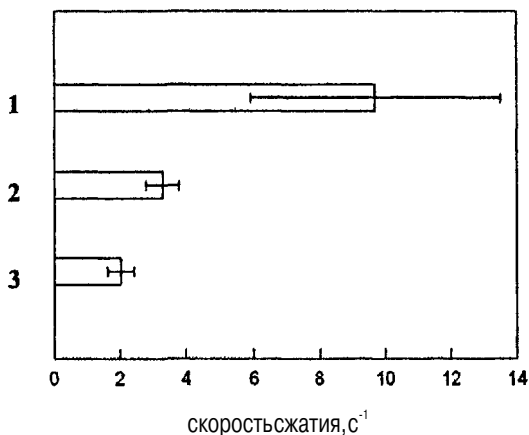


Рис. 6. Экспоненциальная скорость осмотического сжатия везикул плазматических мембран, полученных из coleoptилей (1), мезокотилей (2) и корней (3) 7-дневных этиолированных проростков кукурузы. Величина осмотического градиента - 200 мМ сахарозы.

Для выяснения причин, лежащих в основе различий в водной проницаемости плазматических мембран из разных частей проростков кукурузы, были предприняты исследования по определению содержания в этих мембранах аквапоринов (рис. 7). С помощью вестерн-блот анализа PIP-аквапоринов было установлено, что обогащенность этими белками плазмалеммы из корней (рис. 7 А, дорожка 1) и

мезокотилей (дорожка 2) значительно уступает плазмалемме колеоптилей, где их содержание достигает достаточно высокого уровня (дорожка 3). Иммунодетекция аквапоринов плазматических мембран показала не только их наличие в плазмалемме, но и прямую зависимость осмотической водной проницаемости от обогащенности аквапоринами тканей исследованных органов, что особенно ярко видно при сопоставлении величины $P_{ос}$ и результата иммунологического анализа плазмалеммы колеоптилей.

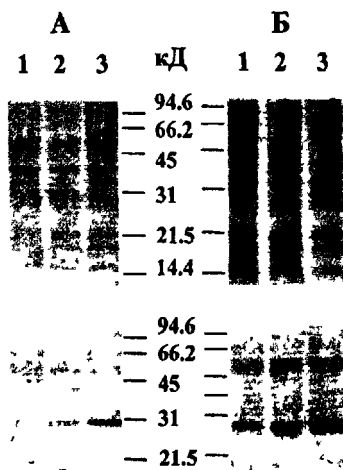


Рис. 7. ДДС-ПААГ электрофорез (вверху) мембранных белков и вестерн-блот анализ (внизу) аквапоринов PIP-семейства в препаратах: плазматических (А), и микросомальных (Б) мембран из корней (1), мезокотилей (2) и колеоптилей (3) 7- дневных этиолированных проростков кукурузы.

На трек нанесено 7 мкг белка плазмалеммы и 15 мкг белка микросом

Представленные на рис. 7 Б результаты иммунодетекции аквапоринов семейства PIP, демонстрируют их присутствие в микросомальных мембранах. Следует отметить, что в микросомальной фракции, согласно активности маркерных ферментов (Briskin et al. 1987), содержание плазматических мембран, как правило, не превышает 20%. Судя по интенсивности окрашивания, содержание аквапоринов плазмалеммы, выявляемое в микросомальной фракции заметно выше. Вероятно, это связано с тем, что во фракции внутриклеточных мембран присутствуют везикулы, транспортирующие аквапорины. Это предполагает возможность везикулярного транспорта аквапоринов в растительных клетках как способа обогащения ими клеточных мембран.

Таким образом, можно заключить, что аквапорины в той или иной степени обеспечивают осмотическую водную проницаемость мембран растительных клеток

Через изменение их количества и активности осуществляется регуляция интенсивности трансмембранного потока H_2O . Один из возможных путей аквапорин-опосредованной регуляции трансмембранной водной проводимости растительных мембран, скорее всего, связан с изменением содержания этих белков на единицу площади мембраны и в реализации этого пути может принимать участие везикулярный транспорт (Briskin et al. 1987).

Функциональная роль аквапоринов в регуляции осмотической водной проницаемости клеточных мембран *Mesembryanthemum crystallinum* при переходе с C_3 -типа фотосинтеза на САМ. Предположение о важной роли регуляции водной проницаемости мембран при адаптации растений к стрессорным условиям пока не имеет достаточных экспериментальных доказательств. Для исследования участия аквапоринов в регуляции водной проницаемости мембран была измерена скорость осмотической водной проницаемости и обогаченность аквапоринами мембран *Mesembryanthemum crystallinum* L. (сем. Aizocaceae). Этот вид проявляет генетически детерминированный переход с C_3 -типа фотосинтеза на САМ, который реализуется в условиях стресса, а также на поздних стадиях генеративного развития. Для растений засушливых местообитаний переход на САМ является адаптивным механизмом, позволяющим не только эффективно ассимилировать CO_2 , но и регулировать водный обмен в целом, снижая интенсивность транспирации. Поэтому САМ часто определяют как водосберегающую стратегию адаптации, позволяющую минимизировать общие потери воды (Luttge 1993).

Для исследований были выделены две возрастные группы растений, различающихся по способности к индукции САМ и интенсивности протекания этого процесса. Согласно измерениям суточной разности титруемой кислотности клеточного сока для растений 4-5-недельного возраста она не превышала 1 мкэкв H^+ /г сырой массы, что характеризует их как растения с C_3 -типом фотосинтеза. Для 8-9-недельных растений разница между значениями этого параметра, определенного утром и вечером, достигала примерно 50 мкэкв H^+ /г сырой массы, что характерно для сформированного САМ (Adams et al. 1998; Winter and Gademan 1991). В другой серии экспериментов 4-5-недельные растения подвергали 2-недельному солевому воздействию (400 мМ NaCl). Измерения титруемой кислотности клеточного сока в

конец этого периода показали, что суточная разница титруемой кислотности составляла для контрольных растений около 20, а для засоленных - около 100 мэкв H^+ /г сырой массы. Таким образом, стресс-индуцируемый переход на САМ был более выраженным по сравнению с онтогенетически регулируемым.

Из всех групп растений, протестированных на развитие САМ, были получены клеточные мембраны, представленные микросомальными мембранами, плазмалеммой и внутриклеточными мембранами. Анализ активности маркерных ферментов показал, что после разделения микросомальных мембран в двухфазной полимерной системе верхняя фаза содержит высокоочищенную плазмалемму (таблица). Нижняя фаза значительно обогащена тонопластом, но содержит также мембраны эндоплазматического ретикулума и небольшую примесь плазмалеммы.

Удельные активности маркерных ферментов в мембранных фракциях из листьев *Mesembryanthemum crystallinum*, полученных методом разделения в двухфазной полимерной системе

Маркерные ферменты	МФ	ВФ	НФ
Na_2VO_4 -чувствительная H^+ -АТФаза (мкмоль Р, мг ⁻¹ белка ч ⁻¹)	0,3	2,0	0,1
KNO_3 -чувствительная H^+ -АТФаза (мкмоль Р, мг ⁻¹ белка ч ⁻¹)	3,5	Отс.	6,9
НАДН-редуктаза (нмоль цит с мг ⁻¹ белка ч ⁻¹)	175	30	150
Цит с-оксидаза (нмоль цит с мг ⁻¹ белка ч ⁻¹)	32	16	50

Примечание: МФ-микросомальная фракция; ВФ-препарат плазмалеммы из верхней фазы, НФ-препарат внутриклеточных мембран из нижней фазы, обогащенный тонопластом; Отс-отсутствие активности

На рис. 8 приведены результаты измерений скорости осмотического сжатия мембранных везикул из корней и листьев растений с C_3 -типом фотосинтеза и САМ, переход к которому был индуцирован онтогенетически или засолением. Кривые, отражающие сжатие везикул микросомальных мембран, изолированных из корней *M crystallinum*, хорошо аппроксимировались суммой двух экспонент. Значение средневзвешенной константы скорости осмотического сжатия для этих мембран уменьшалось примерно в 3 раза при переходе растений на САМ (рис. 8.). Изменения кинетики светорассеяния при осмотическом сжатии везикул плазмалеммы и внутриклеточных мембран, изолированных из листьев, хорошо аппроксимировались

одноэкспоненциальными зависимостями с близкими значениями константы скорости процесса. Из этого следует, что величины водной проницаемости этих мембран сопоставимы. С переходом растений на САМ этот параметр уменьшался как в листьях, так и в корнях *M. crystallinum* независимо от индуцирующего фактора (Рис. 8).

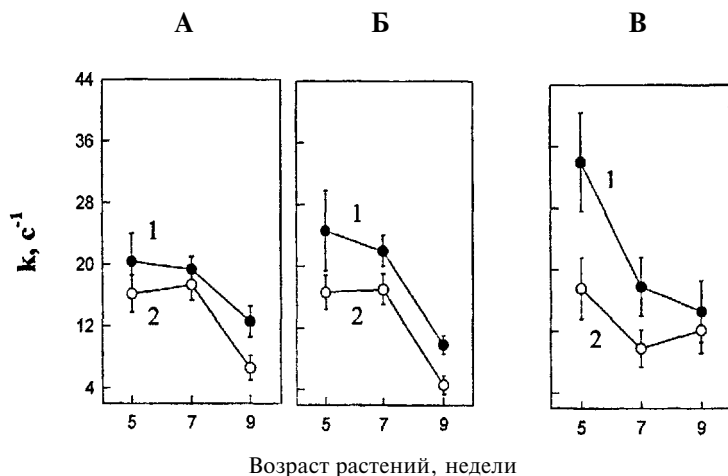


Рис. 8. Изменения скорости осмотического сжатия плазматических (А) и внутриклеточных (Б) мембран листьев и микросомальных (В) мембран корней растений *M. crystallinum* разного возраста. Величина осмотического градиента ЮОМ сахарозы.

1 - контроль, 2 - засоление (24 ч, 400 мМ NaCl).

Представленные данные позволяют заключить, что с возрастом растений и переходом их на САМ при засолении увеличивается сопротивление мембран водному потоку. Это означает, что дневное подавление транспирации при формировании САМ сопровождается снижением интенсивности трансмембранного транспорта воды.

Полученные данные достаточно хорошо согласуются с результатами Rygol et al. (1989), которые использовали зонд давления для изучения осмотической водной проницаемости мембран клеток мезофилла у растений с NaCl-индуцированным САМ. Вместе с тем, для C_3 -растения *Arabidopsis thaliana*, как было показано Morillon и Chrispeels (2001), в условиях подавленной транспирации активность трансмембранного переноса воды, напротив, возрастала. По-видимому, регуляция

водной проницаемости мембран может носить не только компенсаторный характер, но и указывать на изменение водного статуса растения в целом

Обогащенность исследуемых мембран аквапоринами оценивали на основе интенсивности окраски при иммунологической идентификации изоформ MIP A, MIP B и MIP C (Рис. 9.). Основные белковые полосы на иммуноблотах были локализованы

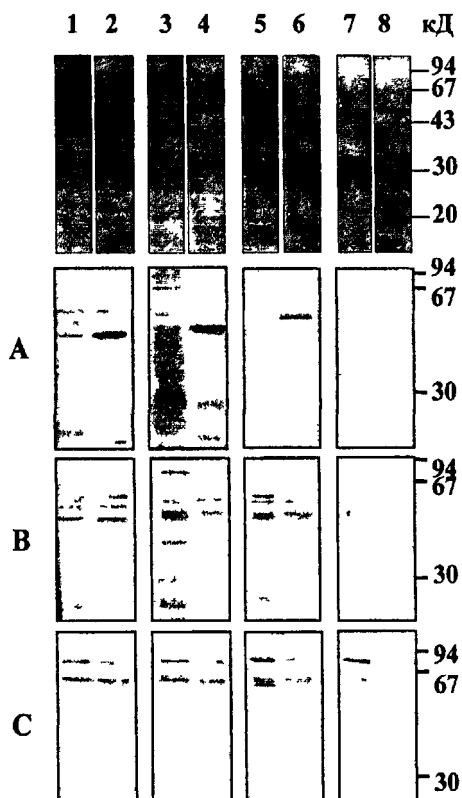


Рис. 9. ДДС-ПААГ-электрофорез мембранных белков и иммунологическая идентификация MIP A (A), MIP B (B), MIP C (C) в препаратах мембранного белка из *C₃* и *CAM*- растений *M Crystallinum*

Мембраны из корней (1-4) и листьев (5-8) четырех-(1,2,5,6) и девятидневных (3,4,7,8) растений. На каждую дорожку нанесено по 7 мкг мембранного белка.

в интервале масс ди- и тримеров аквапоринов: 43-67 кД, в то время как массы мономеров аквапоринов имеют значения 20-30 кД. Наблюдаемая агрегация, по-

видимому, достаточно характерна для интегральных мембранных белков в ДДС-буфере (Veenhof et al. 2002).

Согласно полученным данным, с переходом на САМ МІР А и МІР В в мембранах из листьев практически исчезали (рис. 9, дорожки 5-6 и 7-8), в то время как их содержание в мембранах корней заметно не изменялось (Рис. 9., дорожки 1-2 и 3-4). Относительное содержание МІР А во внутриклеточных мембранах из корней и листьев значительно превосходило его содержание в плазмалемме. МІР С обнаруживался во всех исследуемых препаратах мембран, причем обогащенность плазмалеммы этой изоформой всегда превосходила таковую внутриклеточных мембран. Возраст растений практически не влиял на содержание МІР С. Полученные данные позволяют заключить, что переход *M. crystallinum* с С3-типа фотосинтеза на САМ сопровождается резко выраженным снижением содержания в листьях всех трех исследованных изоформ аквапоринов.

В настоящее время самую возможность изменения осмотической водной проницаемости биологических мембран связывают с присутствием в их составе белков - аквапоринов. Для *M. crystallinum* охарактеризовано 14 генов, кодирующих изоформы белков, гомологичных аквапоринам плазмалеммы и тонопласта (Yamada et al. 1995; Kirch et al. 2000). Проведенная в данной работе иммунологическая идентификация трех изоформ с использованием антител, полученных на специфические последовательности аквапоринов плазмалеммы МІР А, МІР В и МІР С, выявила присутствие этих белков во всех препаратах исследуемых клеточных мембран. При этом только МІР С преимущественно выявлялся во фракции плазмалеммы, для двух других изоформ иммунологическое окрашивание проявлялось и во фракции внутриклеточных мембран. Появление иммуноокрашивания в этой фракции может быть связано, с одной стороны, с недостаточно полным выделением плазмалеммы из микросомальной фракции. Вместе с тем, принимая во внимание результаты работы (Barkla et al. 1999), этот факт можно объяснить иммунной реакцией аквапоринов, локализованных в везикулах эндомембранной системы, доставляющих к плазматической мембране наряду с аквапоринами другие, необходимые для ее биогенеза компоненты, или транспортирующих подлежащий утилизации мембранный материал от плазмалеммы в литическую вакуоль. Анализ

активности маркерных ферментов (таблица) не подтвердил существенной примеси плазмалеммы во фракциях используемых нами внутриклеточных мембран.

Характер изменений в содержании изоформ в мембранах листьев у растений, переход которых на САМ был индуцирован засолением или онтогенетическим развитием, оказался близким (рис. 10). В микросомальных мембранах, изолированных из листьев растений, подвергнутых 2-недельному солевому воздействию и проявлявших выраженный САМ, содержание исследуемых изоформ резко снижалось. В мембранах же, изолированных из корней тех же растений, напротив, наблюдалось некоторое усиление окраски при иммунодетекции, особенно выраженное у МР В, что свидетельствовало об увеличении его содержания. После кратковременного действия солевого стресса (3 ч, 400 мМ NaCl) каких-либо существенных изменений в содержании изоформ в мембранах еще не наблюдалось.

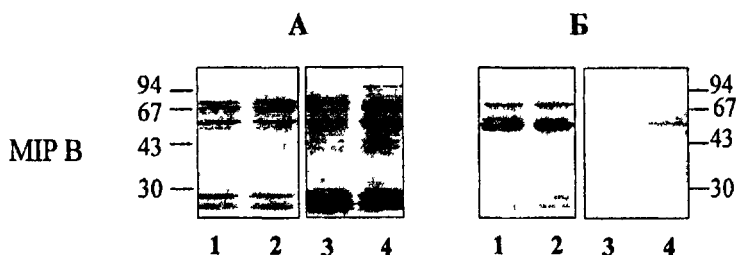


Рис. 10. Влияние засоления 400 мМ NaCl в течение 3 ч (1) и 14 суток (3) на относительную обогащенность аквапоринами микросомальных мембран из корней (А) и листьев (Б) растений *M. crystallinum* пяти (1, 2) и семинедельного (3, 4) возраста.

Контроль - четные дорожки.

Наиболее важным, на наш взгляд, является заметное снижение содержания всех исследованных изоформ аквапоринов в мембранах из листьев САМ-растений. Это было свойственно растениям, перешедшим на САМ как в результате естественного старения (рис. 9), так и в ответ на солевой стресс (рис. 10). Нельзя при этом исключать, что засоление лишь стимулировало изменения в содержании аквапоринов, наблюдаемые в ходе онтогенеза. Таким образом, можно предположить, что уменьшение водной проницаемости мембран, обусловленное снижением в них содержания аквапоринов, является важной особенностью перехода растений на САМ. Аналогичные результаты о низком суммарном содержании аквапоринов в клеточных

мембранах облигатного САМ - растения *Graptopetalum paraguayense* по сравнению с мембранами, изолированными из C_3 -растения, были сообщены ранее (Oshima et al. 2001). Авторы высказывают предположение о существовании корреляции между развитием суккулентности и снижением интенсивности трансмембранных водных потоков в растении, проявляющейся в низком содержании в клеточных мембранах аквапоринов.

Принципиально иная картина наблюдалась в мембранах, изолированных из корней растений разного возраста. В этом случае практически не обнаруживалось изменений в содержании тех же изоформ, выявляемых в мембранах с антителами к МІР А, МІР В и МІР С (рис. 9). Это происходило на фоне снижения осмотической водной проницаемости микросомальных мембран (рис. 8.). Нельзя исключить, что снижение их осмотической водной проницаемости обусловлено действием регуляторного механизма, способного приводить к увеличению пула «закрытых» молекул аквапоринов, например, в результате их дефосфорилирования (Johansson et al. 2000)

Согласно результатам работы, все исследуемые нами изоформы аквапоринов МІР А, МІР В и МІР С присутствуют в клеточных мембранах корней и листьев *M. crystallinum*. Переход растений хрустальной травки на САМ-тип фотосинтеза сопровождается уменьшением их содержания в мембранах листьев, но не корней. Сопоставление этих результатов с данными о функциональной активности аквапоринов, основанной на оценке осмотической водной проницаемости мембран, позволяет заключить, что регуляция активности одних и тех же изоформ этих белков в разных органах и тканях растения, осуществляется разными путями. В одном месте она реализуется через изменение уровня экспрессии генов аквапоринов. Это позволяет изменять их содержание в мембранах. В другом - за счет механизма посттрансляционной модификации, в том числе, фосфорилирования-дефосфорилирования, результатом действия которого будет смещение равновесия между пулами с открытой (активной) и закрытой (неактивной) формами молекул.

ВЫВОДЫ

1. Осмотическая водная проницаемость плазматических мембран, изолированных из разных тканей этиолированных проростков кукурузы увеличивается в ряду: корень < мезокотиль < колеоптиль.
2. В той же последовательности возрастает интенсивность взаимодействия антител к консервативной последовательности аквапоринов PIP-типа с мембранным белком с молекулярной массой, характерной для аквапоринов. Сопоставление скорости осмотического сжатия везикул с результатами иммуноанализа выявляет положительную корреляцию между водной проницаемостью мембран и их обогащенностью аквапоринами.
3. Ртутьсодержащие соединения обратимо и с различной степенью эффективности снижают осмотическую водную проницаемость мембран. Степень подавления трансмембранного переноса воды ингибиторами этого типа может служить показателем вклада аквапорин-опосредованной компоненты в общий поток воды через мембраны.
4. У растений *Mesembryanthemum crystallinum*, способных в процессе своего жизненного цикла переходить на водосберегающую стратегию фотосинтеза (CAM), такой переход сопряжен с уменьшением осмотической водной проницаемости клеточных мембран.
5. Такой характер изменений не зависит от фактора, индуцирующего переход на CAM - стадии онтогенетического развития или солевого стресса. Предполагается, что снижение водной проницаемости мембран имеет адаптивное значение, состоящее в необходимости минимизации общих потерь воды растением.
6. В плазматических мембранах, изолированных из корней и листьев *Mesembryanthemum crystallinum*, выявлен ряд изоформ аквапоринов PIP-типа: MIP A, MIP B и MIP C. Обнаружена заметная гетерогенность их содержания в зависимости от органа, из которого изолированы мембраны.
7. С переходом на CAM в плазмалемме листьев, но не корней, снижается содержание всех трех изоформ аквапоринов. При этом снижение обогащенности мембран изоформой MIP C минимально. Осмотическая водная

проницаемость мембран из растений, полностью перешедших на САМ, снижается как в корнях, так и в листьях. Согласно этим фактам, регулирование активности одних и тех же изоформ аквапоринов в различных органах и тканях осуществляется разными путями.

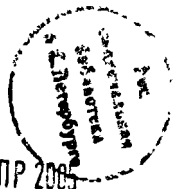
По материалам диссертации опубликованы следующие работы:

1. Божко К.Н. Измерение водной проницаемости мембран корней кукурузы. Тез. 1-ой молодежной научной конференции // Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии. Москва. 2001. С. 5.
2. Trofimova M.S., Zhestkova I.M., Bozhko K.N., Sorokin E.M. Osmotic water permeability of plant cell membranes, isolated from maize roots. // Int. Symposium "Plant under Environmental Stress". Moscow. 2001. P. 302.
3. Трофимова М.С., Жесткова И.М., Божко К.Н., Сорокин Е.М. Роль аквапоринов в регуляции осмотической водной проницаемости растительных мембран. // V съезд Общества физиологов растений России. Пенза. 2003. С. 165.
4. Божко К.Н. Изменение содержания аквапоринов *Mip A*, *Mip B* и *Mip C* в клеточных мембранах *Mesembryanthemum crystallinum* L. при переходе на САМ. // V съезд Общества физиологов растений России. Пенза. 2003. С. 250.
5. Божко К.Н., Ампилогова Я.Н., Жесткова И.М., Трофимова М.С. Водная проницаемость плазматических мембран, изолированных из корней, мезокотилей и колеоптилей проростков кукурузы, и содержание в них аквапоринов. // Международная конференция «Проблемы физиологии растений Севера». Петрозаводск. 2004. С. 21.
6. Божко К.Н., Жесткова И.М., Трофимова М.С., Холодова В.П., Кузнецов Вл.В. Изменение содержания аквапоринов в клеточных мембранах *Mesembryanthemum crystallinum* при переходе с С3-типа фотосинтеза на САМ. // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 887-885.
7. Ампилогова Я.Н., Божко К.Н. Водная проницаемость плазмалеммы корней, мезокотилей и колеоптилей кукурузы и содержание в них аквапоринов. // XVII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» Москва. 2005. С. 84.

Подписано в печать 22.03.2005 г. Формат 60x90, 1/16.
Объем 1,5 п.л. Тираж 100 экз. Заказ №140

Отпечатано в ООО "Фирма Блок"
107140, г. Москва, ул. Краснопрудная, вл. 13. т. 264-30-73
www.blok01centre.narod.ru

Изготовление брошюр, авторефератов, печать и переплет диссертаций.



22 АПР 2005

850