

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

**ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ**

ИМ. К. А. ТИМИРЯЗЕВА

РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

---

*На правах рукописи*



**ЛАПШИН**

**Никита Константинович**

**Роль мембранных стеринов в регуляции активности  $H^+$ -АТФазы  
плазмалеммы клеток растений**

(1.5.21. – физиология и биохимия растений)

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: доктор биологических наук

Трофимова Марина Сергеевна

---

Москва – 2023

# ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Латеральная гетерогенность плазматической мембраны .....	11
1.2. Липиды – структурная основа биологических мембран.....	12
1.2.1. Стерины в клетках растений.....	16
1.2.2. Биосинтез фитостеринов.....	19
1.2.3. Влияние стерина на фазовое состояние липидного бислоя .....	22
1.3. Мембранные микродомены – рафты.....	26
1.3.1. Белки-транспортеры и липидные рафты.....	31
1.4. Общая характеристика протонной АТФазы плазмалеммы клеток растений .	38
1.4.1. Особенности структурной организации $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений.....	39
1.4.2. Фосфорилирование как основной способ регуляции активности $H^+$ - АТФазы плазмалеммы.....	45
1.4.3. Регуляция АТФаз Р-типа липидным окружением.....	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	51
2.1. Выделение протопластов .....	51
2.2. Извлечение стерина и размеры протопластов .....	51
2.3. Определение количества экстрагированных стерина .....	52
2.4. Закисление среды протопластами .....	54
2.5. Выращивание этиолированных проростков гороха .....	54
2.6. Выделение плазмалеммы .....	56
2.7. Определение содержания белка .....	57
2.8. Извлечение стерина из везикул изолированной плазмалеммы.....	57
2.9. Размеры мембранных везикул в присутствии M $\beta$ CD .....	57
2.10. Получение детергент устойчивой фракции плазмалеммы .....	58

2.11. Денатурирующий электрофорез мембранных белков в полиакриламидном геле.....	60
2.12. Вестерн блот анализ $H^+$ -АТФазы плазмалеммы .....	61
2.13. Голубой нативный гель-электрофорез (BN-PAGE).....	61
2.14. Гидролитическая активность $H^+$ -АТФазы везикул плазмалеммы .....	62
2.15. Измерение $H^+$ -транспортирующей активности $H^+$ -АТФазы плазмалеммы..	63
2.16. Генерация АТФ-зависимого трансмембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) везикулами плазмалеммы .....	63
2.17. Пассивная протонная проницаемость .....	64
2.18. Статистический анализ.....	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ .....	66
3.1. Экстракция стерина из протопластов мезофилла <i>Arabidopsis thaliana</i> L.....	66
3.2. Закисление среды протопластами: вклад $H^+$ -АТФазы плазмалеммы.....	71
3.3. Характеристика изолированной плазмалеммы, экстракция стерина и размеры везикул .....	73
3.4. Влияние М $\beta$ CD на содержание $H^+$ -АТФазы в детергент-устойчивых и детергент-солюбилизуемых фракциях плазмалеммы .....	79
3.5. Влияние стерина на гидролитическую активность $H^+$ -АТФазы везикул плазмалеммы .....	84
3.6. Влияние додецил мальтозида на активность и олигомеризацию $H^+$ -АТФазы плазмалеммы .....	87
3.7. АТФ-зависимый протонный транспорт в везикулах плазмалеммы с разным содержанием стерина.....	92
3.8. Пассивная протонная проницаемость везикул в присутствии М $\beta$ CD.....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	105
ВЫВОДЫ .....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	109

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**АБК** – абсцизовая кислота

**АГ** – аппарат Гольджи

**ДДМ** – додецил мальтозид

**ПМ** – плазмалемма

**ЭПР** – эндоплазматический ретикулум

**ASG** – ацилированные стерилгликозиды

**Cer** – церамиды

**DRM** – детергент-устойчивые мембранные фракции

**DSM** – детергент-солюбилизованные мембранные фракции

**GIPCs** – фосфорилированные гликозилинозитолцерамиды

**gluCer** – гликозилированные церамиды

**GPI** – гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки

**LCBs** – сфингоиды

**MEP** – метилэритрозфосфатный путь

**MVA** – мевалонатный путь

**M $\beta$ CD** – метил- $\beta$ -циклодекстрин

**PC** – фосфатидилхолин

**PE** – фосфатидилэтаноламин

**PG** – фосфатидилглицерин

**PI** – фосфатидилинозит

**PID** – Proliferation, Ion and Death – суперсемейство мембранных белков

**PIP** – Plasma membrane intrinsic protein – аквапорины плазмалемм

**PIPs** – фосфатидилинозитол фосфататы

**PS** – фосфатидилсерин

**SE** – эфиры стеринов

**SG** – гликозилированные стерины

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.**  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы клеток растений – электрогенная помпа, обеспечивающая трансмембранный перенос протонов и формирование  $\Delta\mu H^+$ , энергия которого используется в реакциях вторичного транспорта (Palmgren, 2001). В жизнедеятельности растительных организмов она принимает участие в таких фундаментальных физиологических процессах, как транспирация и газообмен, минеральное питание, осморегуляция, рост клеток растяжением, защита от патогенов и других (Morsomme and Boutry, 2000; Sondergaard et al., 2004; Elmore et al., 2011; Palmgren and Nissen, 2011; Haruta and Sussman, 2012; Minami et al., 2019). Несомненно, что функциональная активность этого фермента, его содержание и локализация в плазмалемме должны находиться под контролем на всех уровнях, включая транскрипционный, трансляционный и посттрансляционный, чтобы обеспечивать максимально быстрые ответные реакции растений на изменяющиеся условия окружающей среды (Haruta et al., 2018).

Солюбилизация мембранного материала в присутствии неонных детергентов вместе с флуоресцентной микроскопией высокого разрешения позволили установить, что плазматическая мембрана всех живых клеток является гетерогенной структурой, в которой присутствуют особые компартменты (микродомены или рафты), обогащенные стеринами и сфинголипидами, а также характеризующиеся специфическим белковым составом (Simons and Ikonen, 1997; Malinsky et al., 2013; Tarpen and Murphy, 2015). Некоторые экспериментальные данные показывают, что нарушение структуры мембранных микродоменов может приводить к изменению функциональной активности рафт-ассоциируемых белков, а также их содержанию в мембране (Minami et al., 2009; Li et al., 2011; Martinière and Zelazny, 2021).

При изучении роли мембранных микродоменов в регуляции активности входящих в их состав белков, особое внимание уделяют молекулам стеринам, так как их содержание в плазмалемме может достигать до 30% от общего количества

мембранных липидов (Cassim et al., 2019). Известно, что помимо своей структурной функции, они являются регуляторами фазового состояния липидного бислоя мембран, взаимодействуют преимущественно с насыщенными формами фосфолипидов и сфинголипидами, а также участвуют в доменной организации мембраны (Dufourc, 2008). Особенность биосинтеза стероидов в клетках растений подразумевает, что должна существовать сложная и скоординированная система транспорта этих липидов из эндоплазматического ретикулума в плазматическую мембрану как с помощью везикулярного транспорта, так и с участием липид-переносящих белков (Shaller, 2004; Pullido et al., 2012; Ferrer et al., 2017; Kumar et al., 2021). Кроме того, стероиды способны оказывать влияние на активность (конформацию) мембранных белков напрямую через специфические стероид-связывающие сайты, или опосредованно, формируя у них определенное липидное окружение (Levitan et al., 2014; Fantini et al., 2016).

Данные по получению, солюбилизации и протеомному анализу детергент-устойчивых фракций плазмалеммы клеток растений показали присутствие в них  $H^+$ -АТФаз Р-типа, что указывает на приуроченность этих ферментов к стероид-богатым доменам мембраны (Sandstrom and Cleland, 1989; Mongrand et al., 2006; Furt et al., 2007). Несмотря на то, что за последние десятилетия достигли большого прогресса в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений (Haruta et al., 2015; Falhof et al., 2016), каким образом на активность протонной помпы влияет ее липидное окружение, остается открытым. В данном случае, роль и участие стероидов в этих процессах заслуживает особого внимания, так как экспериментальные данные, полученные для разных Р-типа АТФаз, носят противоречивый характер (Morales-Cedillo et al., 2015; Hossain and Clarke, 2019).

**Цель работы** – выяснить механизмы модуляции активности  $H^+$ -АТФазы и трансмембранного  $H^+$ -транспорта, опосредованные содержанием стероидов в плазматических мембранах клеток растений, используя для извлечения стероидов метил- $\beta$ -циклодекстрин ( $M\beta CD$ ).

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

- 1) Оценить количество экстрагируемых в присутствии М $\beta$ CD стеринов, а также определить, сопряжено ли такое извлечение с изменением размеров протопластов и везикул плазмалеммы.
- 2) По интенсивности внеклеточного закисления среды протопластами выяснить, как экстракция стеринов влияет на активность Н<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы.
- 3) Изучить характер распределения Н<sup>+</sup>-АТФазы между детергент-устойчивыми и детергент-растворимыми фракциями плазмалеммы в зависимости от содержания стеринов в мембране.
- 4) Оценить влияние М $\beta$ CD на кинетические параметры гидролитической активности Н<sup>+</sup>-АТФазы в нативном липидном окружении плазмалеммы, а также – в солюбилизованном в присутствии додецил мальтозида.
- 5) Сопоставить активности АТФ-зависимого и пассивного Н<sup>+</sup>-транспорта на везикулярных препаратах плазмалеммы в зависимости от содержания в мембранах стеринов.

**Научная новизна.** Впервые было показано, что стерины являются аннулярным липидным окружением Н<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы клеток растений. Кроме того, Н<sup>+</sup>-АТФаза обладая повышенным сродством к стерин-богатому доменам плазматической мембраны, при этом не является резидентом этих мембранных структур. Установлено, что извлечение ~ 20% мембранных стеринов приводит к увеличению гидролитической активности Н<sup>+</sup>-АТФазы и к значительной стимуляции активного Н<sup>+</sup>-транспорта. Сопоставление данных по АТФ-зависимому формированию величины  $\Delta\mu\text{H}^+$  с результатами пассивной протонной проницаемости плазмалеммы в отсутствие АТФ позволяет нам высказать предположение, что содержание стеринов в плазмалемме клеток растений может

выступать фактором, координирующим работу ион-транспортных систем, участвующих в формировании и диссипации трансмембранного градиента рН.

**Практическая значимость.** Результаты диссертационной работы помогают дополнить имеющиеся фундаментальные знания о механизмах регуляции активности  $H^+$ -АТФазы Р-типа плазмалеммы клеток растений. Полученные данные также могут расширить понимание роли латеральной гетерогенности биологических мембран в модуляции функциональной активности рафт-ассоциируемых белков-транспортеров, что в дальнейшем может быть использовано в сельскохозяйственной сфере при разработке новых методов селекции для адаптации и устойчивости растений к действию неблагоприятных стресс-факторов.

**Достоверность результатов.** При выполнении работы использовались современные биохимические, биофизические и молекулярно-биологические методы. Эксперименты проводились в достаточных для построения достоверной статистики биологических и аналитических повторностях. Выводы соответствуют задачам исследования, обоснованы экспериментально и отражены в печатных работах.

#### **Основные положения диссертации, выносимые на защиту:**

1. Стерины входят в состав аннулярных липидов  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений.
2.  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы не является резидентом стерин-богатых мембранных доменов.
3. Извлечение стеринов из везикул плазмалеммы и протопластов не вызывает изменений их исходных размеров.
4. Экстракция до 20% мембранных стеринов у протопластов и везикул плазмалеммы способствует увеличению гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы.



5. Стимуляция АТФ-зависимого протонного транспорта при извлечении стерина имеет транзиторный характер и не коррелирует с результатами по гидролизу АТФ.

6. Отсутствие корреляции между данными по АТФ-зависимому  $H^+$ -транспорту и гидролитической активностью  $H^+$ -АТФазы обусловлено разной чувствительностью ионных каналов и/или транспортеров к содержанию стерина в плазматической мембране.

**Личный вклад соискателя.** Результаты, изложенные в диссертационной работе, получены соискателем в лаборатории мембран растительных клеток ФГБУН ИФР им. Тимирязева РАН в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема №121033000137-1). Личный вклад автора заключался в анализе литературных данных, планировании и проведении экспериментов, подготовке материалов к публикации.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на следующих научных мероприятиях: 71-й Всероссийской школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Нижний Новгород, 2018); IX Съезде Общества физиологов растений России (Казань, 2019); Всероссийской научной конференции с международным участием и школе для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее» (Москва, 2021) и других.

**Список публикаций по теме диссертации.** По материалам диссертации было опубликовано 9 работ, из которых 4 – статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

**В журналах, рекомендованных ВАК:**

1. Белугин Б.В., Жесткова И.М., Пиотровский М.С., **Лапшин Н.К.**, Трофимова М.С. (2017) Р1Р1-аквапорины, стерин и осмотическая водная проницаемость

плазмалеммы клеток этиолированных проростков гороха. Биологические мембраны. 34, 239–248.

2. Piotrovskii M.S., **Lapshin N.K.**, Andreev I.M., Trofimova M.S. (2019) Role of PIP-Aquaporin Phosphorylation in Redox-Dependent Modulation of Osmotic Water Permeability in Plasmalemma from Roots of Pea Seedlings // Russ. J. Plant Physiol., V. 66 (4), 637–645. DOI: 10.1134/S1021443719040113
3. **Lapshin N.K.**, Piotrovskii M.S., Trofimova M.S. (2021) Involvement of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in diamide-induced extracellular alkalization by roots from pea seedlings. Planta. 253,10. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03532-w>
4. **Lapshin N.K.**, Piotrovskii M.S., Trofimova M.S. (2021) Sterol Extraction from Isolated Plasma Membrane Vesicles Affects H<sup>+</sup>-ATPase Activity and H<sup>+</sup>-transport. Biomolecules. 11, 1891. <https://doi.org/10.3390/biom11121891>

**Структура и объем диссертации.** Материалы диссертации изложены на 127 страницах машинописного текста и включают 23 рисунка и 5 таблиц. Диссертационная работа состоит из разделов: «ВВЕДЕНИЕ», «ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ», «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ», «РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ», «ЗАКЛЮЧЕНИЕ», «ВЫВОДЫ» и «СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ». Список цитируемой литературы включает 201 источник, из которых 197 – на иностранном языке.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1. Латеральная гетерогенность плазматической мембраны

Особенностью всех живых клеток является наличие плазматической мембраны – особого селективного барьера, разграничивающего клеточное и внеклеточное пространства. Плазматическая мембрана, представляющая собой высокоорганизованную макромолекулярную структуру, выступает в роли сенсора изменений условий окружающей среды, обеспечивает обмен ионами и метаболитами и служит матрицей для протекания многих физиологических процессов в клетке. Предполагается, что такой широкий спектр химических реакций, протекающий на плазматической мембране, требует определенной гетерогенности в ее составе и структурной организации. Это необходимо живым клеткам для обеспечения быстрых и точных ответных реакций на изменение внешних условий. Однако, несмотря на то, что структурный состав мембран эукариотических клеток достаточно хорошо изучен, остается еще много вопросов о молекулярных механизмах, лежащих в основе такой гетерогенности.

Структурной основой любой биологической мембраны является липидный бислой и встроенные в него белки, которые взаимодействуют с липидами как во внешнем, так и во внутреннем слоях мембраны. Склонность гидрофобных остатков липидов к ассоциации и способность их гидрофильных групп взаимодействовать с водной средой и друг с другом являются физической основой формирования липидного бислоя клеточных мембран (Mouritsen, 1998). Такое уникальное химическое свойство липидов как амфифильность позволяет формировать естественные барьеры в водных растворах и отделить внутреннее содержание клетки от внешней среды. Этот же принцип действует и на субклеточном уровне, при образовывании внутренних мембран, окружающих каждую органеллу клетки (Simons and Saraio, 2011).

Важным событием в изучении структуры биологических мембран стала работа авторов Singer и Nicolson, опубликованная в 1972 году, в которой была

предложена модель их жидкостно-мозаичной организации (Singer and Nicolson, 1972). Эта модель описывала мембрану как непрерывный матрикс с равномерно распределенными в нем белками и липидами. Однако последующие исследования в данной области показали, что такое представление не всегда находит свое экспериментальное подтверждение, и во многих мембранах существуют особые домены, отличающиеся по своему составу от остальной части мембраны. Вторым важным прорывом в понимании структурной организации биологических мембран стала гипотеза о липидных рафтах, сформулированная Simons и Ikonen около 30 лет назад. Эта гипотеза предполагала, что липидные рафты, обогащенные сфинголипидами и холестерином, выступают в виде высокоупорядоченных мембранных «платформ», в которых белки, участвующие в передаче сигналов, способны избирательно взаимодействовать с молекулами эффекторов (Simons and Ikonen, 1997). Исследования последних лет в данной области, а также разработка новых методик, позволили установить, что биологические мембраны являются неоднородными по своей структуре, и такая гетерогенность является важным свойством для протекания различных мембранных процессов.

## **1.2. Липиды – структурная основа биологических мембран**

Все липиды по своей природе являются амфифильными молекулами. В их составе присутствуют как гидрофобные (неполярные), так и гидрофильные (легко взаимодействующие с водой) домены. Способность гидрофобных доменов к самоассоциации уменьшает их невыгодный контакт с водой, вследствие чего снижается энтропия бислоя, что, в свою очередь, приводит к минимальным энергетическим затратам для самоорганизации этих молекул в единую структуру. Гидрофильные домены липидов легко взаимодействуют с водой и другими полярными группами и, следовательно, энергетически стабильны в водной среде (Alberts et al., 2002).

Очень часто схематическое изображение мембран может дать неверное представление о том, что все биологические мембраны имеют преимущественно

плоскую структуру. Клеточные мембраны могут образовывать очень сложные мембранные компартменты, как, например, внутренние мембраны митохондрий и тилакоиды хлоропластов. Разные органеллы клетки характеризуются особым индивидуальным липидным составом, что может играть важную роль в определении их форм и размеров (Jarsch et al., 2016).

Структурной основой всех биологических мембран является липидный бислой с погруженными в него белками. Как белки, так и липиды обладают билатеральной (двусторонней) асимметрией – важным свойством, на поддержание которого клеткой расходуется значительное количество АТФ (van Meer, 2011). На сегодняшний день известно, что все клетки эукариот содержат 3 основные группы липидов, а именно: глицерофосфолипиды, сфинголипиды и стерины (Fantini et al., 2016; Luchini and Vitiello, 2020). Роль стеринов в клетках растений будет рассмотрена более подробно в следующем разделе.

Фосфолипиды являются главным структурным компонентом липидного бислоя, а их содержание может варьировать в зависимости от типа мембраны (Vance, 2015). Особенностью фосфолипидов является наличие остатка фосфорной кислоты, который образует сложноэфирную связь с гидроксильной группой глицерина (Watson, 2015). Эта связь обуславливает наличие у фосфолипидов отрицательного заряда в нейтральной области рН. Простейшей формой фосфолипидов являются фосфатидные кислоты – важнейшие предшественники в биосинтезе жиров и фосфолипидов (Narayana and Riezman, 2018). В зависимости от молекулы спирта, образующего сложноэфирную связь с остатком фосфорной кислоты, выделяют такие основные фосфолипиды, как: фосфатидилсерин (PS), фосфатидилхолин (PC), фосфатидилинозитол (PI), фосфатидилэтаноламин (PE) (Casares et al., 2019). Фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин являются основными фосфолипидами плазматических мембран растительных клеток, содержащих пальмитиновую и линоленовую кислоты в составе своих ацильных цепей, в то время как фосфатидилглицерин, фосфатидилинозитол,

фосфатидилсерин, а также фосфатидные кислоты, присутствуют в меньшем количестве (Mongrand et al., 2004).

Фосфоинозитиды (фосфатидилинозитол фосфататы, или (PIPs)) образуют сравнительно небольшую отдельную группу фосфолипидов, структурной основой которых является PI, который может содержать до 3 фосфатных групп на своем инозитольном фрагменте. Фосфоинозитиды вовлечены во многие регуляторные процессы в клетке, такие как передача клеточных сигналов и внутриклеточный мембранный трафик (Furt et al., 2010). На сегодняшний день активно используются специальные маркеры PIPs, позволяющие проследить их локализацию и распределение между органеллами клетки. Например, было показано, что существует концентрационный градиент фосфатидилинозитол-4-фосфата (PI4P) в клетке. Наибольшее количество PI4P обнаруживается в плазматической мембране, меньше – в транс-Гольджи сети и эндосомах, и совсем мало в самом аппарате Гольджи (АГ). PI3P (фосфатидилинозитол-3-фосфат), в свою очередь, присутствует в большом количестве в поздних эндосомах. Стоит также отметить, что фосфоинозитиды обнаруживаются в детергент-устойчивых мембранах – рафтах (Fratini et al., 2021).

Сфинголипиды по своему строению отличаются от глицерофосфолипидов наличием сфингозина – аминоспирта с длинной алифатической цепью вместо молекулы глицерина. Сфинголипиды являются обязательным компонентом всех биологических мембран и могут составлять до 10 % от всех липидов, а особенно ими обогащены мембраны нервной ткани и мозга (Lynch and Dunn, 2004). Растительные сфинголипиды принято делить на 4 основные группы: церамиды (Cer), гликозилированные церамиды (gluCer), фосфорилированные гликозилинозитолцерамиды (GIPCs) и свободные длинноцепочечные основания, или сфингоиды (LCBs) (Cacas et al., 2016).

Все сфинголипиды синтезируются из L-серина, который конденсируется с жирной кислотой с длинной цепью с образованием сфингоидного основания, также известного как LCB. Фитосфингозин (или 4D-гидроксисфинганин-2-

аминооктадеканетриол) является распространенным длинноцепочечным основанием растительного происхождения. Известно, что его фосфорилированная форма (фитосфингозин-1-фосфат) является сигнальной молекулой в АБК-зависимом закрывании устьиц (Coursol et al., 2005). В ряде работ также было установлено, что наличие гидроксильных групп в составе LCB является обязательным условием для нормального роста и развития растений. Например, мутанты *Arabidopsis thaliana* по двум генам, кодирующим гидролазы LCB (SBH1 и SBH2), характеризовались отсутствием нормального роста, нарушением перехода из вегетативного в генеративное состояние и повышенной экспрессией генов, участвующие в апоптозе (Chen et al., 2008).

Церамиды представляют собой производные сфингозина, ацилированные по аминогруппе остатками жирных кислот. Как основные предшественники всех других сфинголипидов, церамиды дают начало двум наиболее распространенным группам сфинголипидов в плазмалемме клеток растений: гликозилированным церамидам (gluCer) и соответственно GIPC (Luttgeharm et al., 2016). Синтез gluCer, локализованный в ЭПР, связан с работой гликозилцерамид синтазы в присутствии гликозилированных стероидов в качестве доноров гликанов. Самой распространенной группой сфинголипидов в растениях являются фосфорилированные гликозилинозитолцерамиды (GIPC), вероятные аналоги кислых ганглиозидов, обнаруживаемых в мембранах клеток животных (Gronnier et al., 2016). На начальных этапах биосинтеза GIPC в ЭПР их предшественники – церамиды подвергаются реакциям фосфорилирования и гидроксирования. Считается, что реакции гидроксирования играют важную роль в последующем взаимодействии гидроксильных групп GIPC со стеринами в плазматической мембране (Cacas et al., 2016). Дальнейшее преобразование церамидов в GIPC происходит уже в АГ, где они подвергаются последовательным реакциям гликозилирования (Liu et al., 2021).

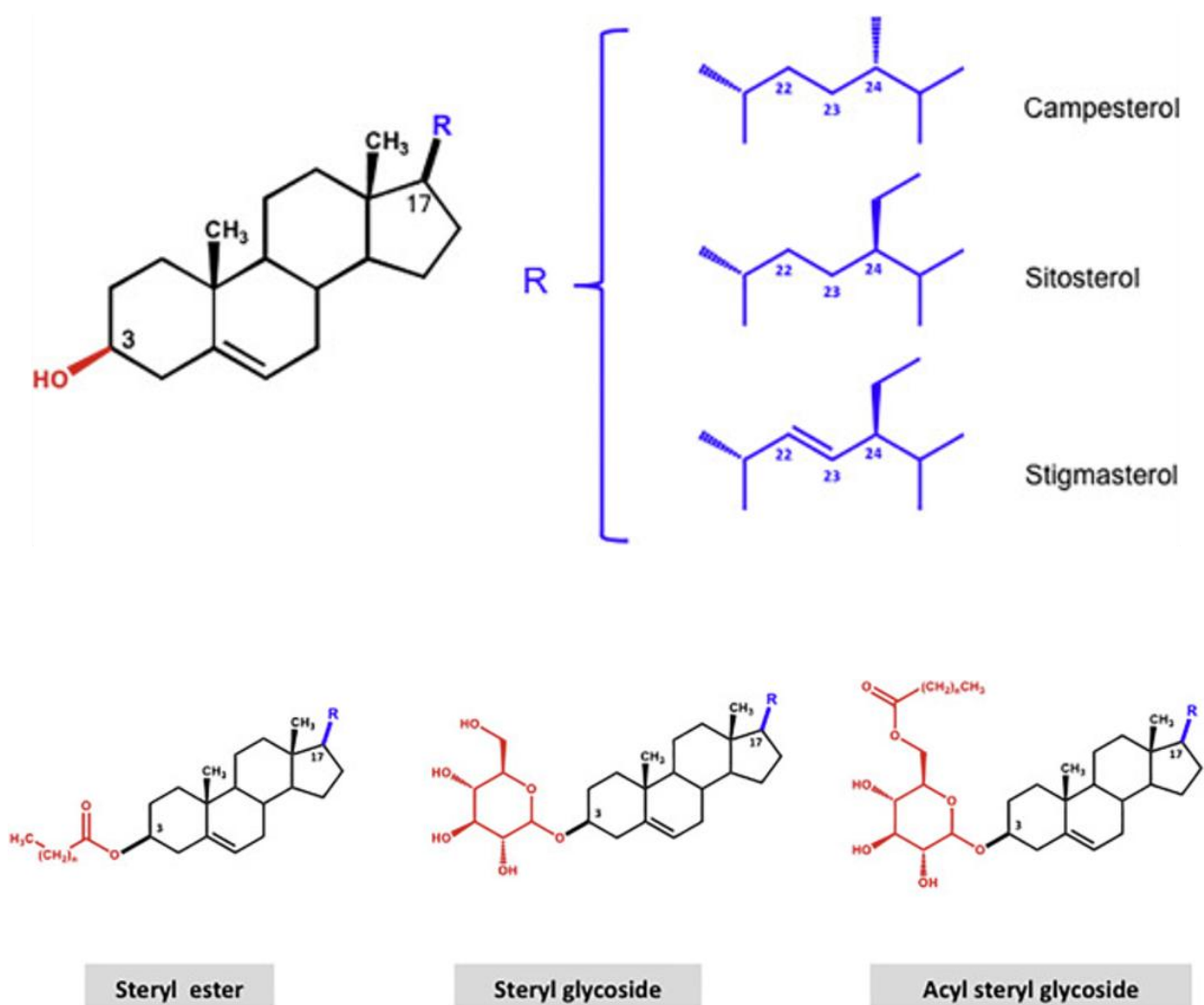
Исследования последних лет показали, что функциональная роль сфинголипидов в мембранах растений является более глобальной, чем

предполагалось ранее. Сфинголипиды помимо своей структурной функции вместе со стеринами являются обязательными компонентами мембранных микродоменов – рафтов (Mongrand et al., 2004; Simon-Plas et al., 2011). Кроме того, церамиды в растениях могут выступать в качестве агентов программируемой клеточной смерти (Liang et al., 2003). Особая группа сфинголипидов – ганглиозиды, содержащие остатки N-ацетилнейраминовой кислоты, участвуют в клеточных иммунных ответах и играют важную роль в передаче сигналов в животных клетках (Sonnino and Prinetti, 2010a). Растительные GIPS схожи по своей структуре с ганглиозидами и, соответственно, они могут выполнять схожие функции. Например, группа авторов (Lenarcic et al., 2017) показали, что GIPC, расположенные на внешней стороне плазматической мембраны растительных клеток, являются рецепторами группы токсинов семейства NLP (Necrosis and Ethylene-inducing Peptide 1-like), которые продуцируют некоторые бактерии, грибы и оомицеты.

### **1.2.1. Стерины в клетках растений**

Стерины, наряду с глицерофосфолипидами и сфинголипидами, являются неотъемлемым компонентом мембран эукариотических клеток. Синтезируемые в эндоплазматическом ретикулуме, они в большом количестве накапливаются в плазмалемме и могут составлять до 30-40% от общего содержания липидов (van Meer et al., 2008; Casares et al., 2019; Cassim et al., 2019). Грибы и животные синтезируют преимущественно один вид стерина – это эргостерин (в случае грибов), а также холестерин, который характерен для животных клеток. В отличие от других эукариот, клетки высших растений способны синтезировать и накапливать широкий спектр стерина и пентациклических тритерпенов: например, только из одного растения кукурузы была выделена 61 форма разнообразных стерина (Guo et al., 1995). Структурной основой всех стерина является циклопентанпергидрофенантрен, сформированный из четырех алифатических колец, содержащий гидроксильную группу в положении C3 и углеводородную цепь (от 8 до 10 атомов) в положении C17





**Рис. 1.** Химическая структура основных видов стерина и их конъюгированных форм в растительных клетках из (Ferrer et al., 2017).

Синим обозначены углеводородные остатки, отличающиеся между собой длиной цепи и наличием двойных связей. Красным отмечены химические группы, формирующие конъюгированные формы стерина: эфиры, гликозилированные стеринны и ацилированные стерилгликозиды.

(рис. 1) (Ferrer et al., 2017). В большинстве случаев во втором пиррольном кольце между 5 и 6 атомами углерода присутствует двойная связь. Наиболее распространенные фитостерины это – ситостерин, стигмастерин и кампестерин, которые отличаются между собой длиной углеводородной цепи по положению C17 и количеством дополнительных двойных связей (Валитова и др., 2016). В то время как ситостерин и стигмастерин участвуют в поддержании структурной и функциональной целостности клеточных мембран, кампестерин является предшественником в биосинтезе brassinosteroidов – фитогормонов, выполняющих важную роль в постэмбриональном развитии растений. У *Arabidopsis thaliana* мутации по генам, кодирующим ферменты, ответственные за синтез brassinosteroidов, приводят к аномальному развитию корней, снижению скорости роста и потери фертильности (Shaller, 2003). Также стеринны представляют собой субстрат для синтеза вторичных метаболитов: сапонинов, кардинолидов, гликоалкалоидов, экидистероидов (Bergenstrahle et al., 1996). Кроме того, не так давно было обнаружено, что исключительно в растениях, помимо свободных форм стериннов, присутствуют их конъюгированные формы.

Гликозилированные стеринны (SG) и ацилированные стерилгликозиды (ASG) представляют собой производные типичных мембраносвязанных молекул стериннов. Вид молекулы углеводов, их количество, а также характер связи со стеринами может варьировать. В большинстве случаев углеводный остаток представлен пиранозой (формой D-глюкозы), присоединенной к молекуле стерина в положении C3 через  $\beta$ -гликозидную связь. Реакцию катализирует фермент УДФ-глюкозостерил гликозилтрансфераза (SGT), локализованная на плазматической мембране. Предполагается, что SG выполняют запасающую функцию и регулируют уровень свободных форм стериннов в плазмалемме (Ullmann et al., 1993). Наконец, они могут быть ацилированы жирными кислотами по остатку углерода в положении C6, формируя отдельный класс конъюгированных стериннов – ASG. Любопытно, что соотношение между SG и ASG варьирует в зависимости от вида растения и условий прорастания. В экспериментах по закаливанию растений к

низким температурам было показано, что количественный состав ASG в ПМ меняется в ответ на действие холодового стресса (Palta et al., 1993).

Также, помимо двух выше представленных форм конъюгированных стеринов, в растениях обнаруживаются их эфиры (SE), в которых гидроксильная группа в положении С3 заменяется жирной кислотой. SE присутствуют во всех тканях растений, однако их количество значительно ниже по сравнению со свободными формами стеринов. Жирнокислотный остаток, входящий в состав SE, может сильно варьировать по длине (от С12 до С22), наиболее часто он представлен пальмитиновой, олеиновой, стеариновой и линоленовой кислотами. Считается, что эфиры стеринов, как и SG, выполняют важную роль в поддержании физиологического пула свободных форм стеринов в мембранах (Silvestro et al., 2013). Биохимический анализ показал, что больше всего SE накапливаются в клетках тапетума пыльников, пыльцевых зернах и стареющих листьях (Ferrer et al., 2017).

### **1.2.2. Биосинтез фитостеринов**

Синтез стеринов в растениях связан с биосинтезом изопреноидных соединений. Несмотря на то, что все свободно живущие организмы способны синтезировать изопреноиды, растения, несомненно, являются лидерами по их содержанию и многообразию (Rodríguez-Conserción, 2014). На сегодняшний день известно свыше десяти тысяч растительных изопреноидов. Наибольшее их число составляют вторичные метаболиты, которые принимают участие во взаимодействии растений с окружающей средой (Croteau et al., 2000). Они включают в себя различные пигменты, летучие вещества и защитные соединения, многие из которых активно нашли свое применение в промышленности и сельском хозяйстве. Помимо этого, у растений изопреноиды вовлечены в такие важные физиологические процессы, как дыхание (убихиноны), фотосинтез (каротиноиды, хлорофиллы, пласто- и филлохиноны), поддержание функциональной и структурной целостности мембран (стерины), а также в регуляции роста и развития

(брассиностероиды, цитокинины, гиббериллины, абсцизовая кислота, стриголактоны) (Bouvier et al., 2005).

Можно с уверенностью сказать, что еще одной особенностью растительных организмов является наличие двух независимых путей синтеза изопентилдифосфата (IPP) и диметилаллилдифосфата (DMAPP) – двух основных предшественников изопреноидных соединений (Hemmerlin et al., 2012; Vranova et al., 2013). В результате метилэритрозифосфатного пути (MEP), берущего свое начало в пластидах, из пирувата и глицероальдегид-3-фосфата образуется IPP и его изомер DMAPP, в то время как через мевалонатный путь (MVA), проходящий в цитозоле, IPP синтезируется из ацетил-КоА (рис. 2). После этого IPP способен конвертироваться в DMAPP под действием IPP-изомеразы (Pulido et al., 2012). На сегодняшний день известно, что все ферменты, участвующие в MEP-пути, имеют ядерное кодирование и расположены в пластидах. Напротив, ферменты MVA пути распределены между компартментами клетки. Например, гидроксиметилглутарил КоА-редуктаза (HMGR), активность которого является лимитирующей для всего MVA-пути, находится в эндоплазматическом ретикулуме, в то время как остальные ферменты были обнаружены как в цитозоле, так и в пероксисомах (Simkin et al., 2011). Стоит отметить, что, несмотря на разные места синтеза IPP и DMAPP, исследования с использованием различных мутантов, ингибиторного анализа и специальных меток показали, что эти соединения способны активно обмениваться между органеллами (Paetzold et al., 2010). Однако мутанты, у которых был полностью блокирован один из путей биосинтеза (MVA или MEP), характеризовались полным нарушением развития и неспособностью семян к прорастанию. Это свидетельствует о том, что отсутствие одного из двух путей биосинтеза изопреноидов в растениях не может быть скомпенсировано работой оставшегося (Pulido et al., 2012).

Независимо от пути синтеза IPP и DMAPP (будь то MVA- или MEP-пути), следующие этапы их преобразования происходят в цитозоле. Там под действием фарнезил-дифосфат синтазы (FPS) они конденсируются с образованием геранил-

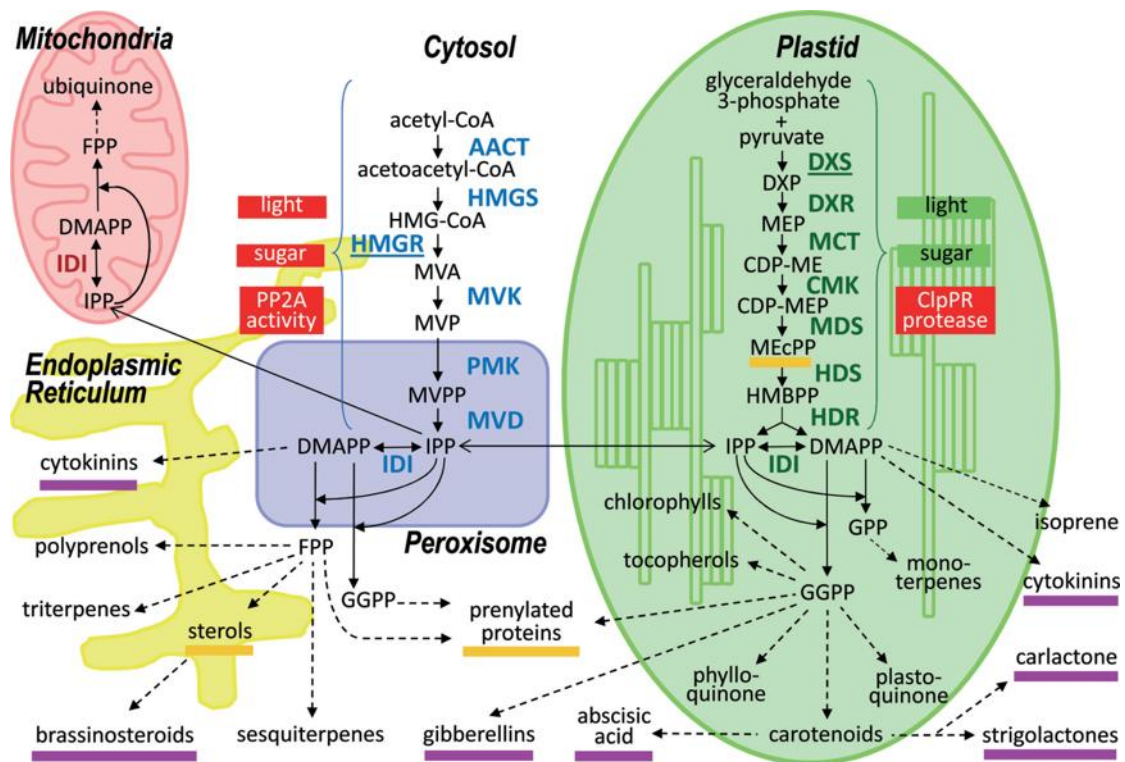


Рис. 2. Компарментализация биосинтеза стероидов в клетках растений из (Pulido et al., 2012).

дифосфата (GPP). Присоединение к GPP еще одной молекулы IPP формирует фарнезил-дифосфат (FPP) (Manzano et al., 2016), который в свою очередь, транспортируется в ЭПР, где под действием сквален синтазы (SQS) дает начало предшественнику всех форм стероидов в растениях, а именно, сквалену. На сегодняшний день известны почти все ферменты, вовлеченные в последующие этапы биосинтеза стероидов (Shaller, 2004). SQE (скваленэпоксидаза) катализирует первый этап преобразования молекулы сквалена, приводящий через ряд промежуточных соединений к образованию 24-метилэнлофенола. На следующих стадиях синтеза происходит разветвление: через один путь формируются основные структурные стероиды – ситостерин и стигмастерин, в то время как другой дает начало кампестерину – основному предшественнику brassinosteroidов. Стоит отметить, что сравнительно недавно, у *Arabidopsis thaliana* был обнаружен еще один путь синтеза стероидов (Ohyama et al., 2009). На стадии сквален эпоксида вместо циклоартенола образуется ланостерин. В этом процессе активно участвует ланостерин синтаза (LAS1), однако данный путь приводит к синтезу лишь небольшой доли от общего числа стероидов (1.5 %). Многие факты указывают на то, что данный путь не вовлечен в синтез структурных (мембранных) стероидов, однако он может играть важную роль в защитных реакциях растений.

### **1.2.3. Влияние стероидов на фазовое состояние липидного бислоя**

Важной особенностью стероидов является их способность влиять на фазовое состояние липидного матрикса. Стоит отметить, что в зависимости от температуры и состава липидов, мембранный бислой может находиться в нескольких фазовых состояниях, а именно: 1) жидкокристаллическом неупорядоченном (Ld), для которого характерна низкая степень упорядоченности жирных кислот липидов (параметр S) и высокий коэффициент их латеральной диффузии (параметр D); 2) твердокристаллическом (So), где жирные кислоты липидов обладают высокой степенью упорядоченности и низким параметром латеральной диффузии; 3) жидкокристаллическом упорядоченном (Lo), в котором жирные кислоты липидов

характеризуются высокой степенью упорядоченности (как и в случае твердокристаллической фазы), однако также сохраняется их высокая латеральная диффузия (van Meer et al., 2008). Обычно большинство мембран с высоким содержанием ненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах, находятся в жидкокристаллической неупорядоченной фазе. При значениях температуры ниже температуры плавления наблюдается переход бислоя из жидкокристаллической в твердокристаллическую фазу. Однако, сложные липидные системы, содержащие как фосфолипиды, так и молекулы стерина, формируют так называемое квазикристаллическое фазовое состояние (жидкокристаллическое упорядоченное, или  $L_0$ ), которое сочетает в себе свойства как жидко-, так и твердокристаллических фаз (Ipsen et al., 1987; McMullen et al., 2004). В этом случае жирнокислотные остатки фосфолипидов тесно контактируют друг с другом, но при этом сохраняется их высокая латеральная подвижность. Таким образом, можно сказать, что в физиологическом диапазоне температур для биологических мембран характерно сосуществование сразу двух фазовых состояний (жидкоупорядоченного и жидконеупорядоченного), отличающихся между собой по липидному составу и физическим параметрам, при этом фазы не смешиваются друг с другом (Sonnino and Prinetti, 2010b). Считается, что именно такая особенность биологических мембран лежит в основе их латеральной гетерогенности.

Как уже упоминалось ранее, особая роль в формировании жидкоупорядоченных доменов принадлежит молекулам стерина. На сегодняшний день хорошо известно, что стерин выступает в роли «уплотнителей» липидного матрикса, повышая механическую прочность мембраны, снижая ее пассивную проницаемость для воды, малых молекул и газов, регулируя текучесть и фазовое состояние. На молекулярном уровне эффекты упорядочивания и конденсации имеют двойственную природу и обусловлены способностью стерина взаимодействовать с фосфолипидами как в твердой, так и в жидкой фазе. Предполагается две основные гипотезы влияния стерина на физико-химические свойства липидного бислоя. «Модель зонтика» была предложена Huang и Feigenson

в 1999 году, в соответствии с которой неполярные молекулы стеринов, взаимодействуя с полярными группами фосфолипидов, погружаются в их углеводородную область, тем самым снижая для себя энергетически невыгодные контакты с водой (Huang and Feigenson, 1999). Альтернативная гипотеза предполагает, что эффект конденсации обусловлен взаимодействиями жесткого тетрапиррольного кольца стеринов с ацильными цепями фосфолипидов, которые более гибкие и способны подстраиваться под индивидуальные молекулы стеринов (Sugahara et al., 2001).

Различные виды стеринов по-разному способны влиять на мембранную проницаемость. Например, холестерин демонстрирует максимальное воздействие, а среди растительных стеринов, именно кампестерин обладает наиболее выраженным эффектом (Grunwald, 1971). Из всех известных молекул стеринов, холестерин изучен наиболее полно. Опыты на липосомах по исследованию влияния холестерина на изменение фазового состояния мембраны при изменении внешней температуры показали, что в присутствии холестерина фазовый переход липидов из твердокристаллического в жидкокристаллическое состояние становится плавным, причем величина эффекта линейно зависит от концентрации холестерина ниже 30 моль % (Dufourc, 2008).

Обладая схожей структурой, неудивительно, что подобные эффекты были обнаружены и у стеринов растительного происхождения. Известно, что фитостерины, в особенности  $\beta$ -ситостерин и кампестерин, играют важную роль в упорядоченности жирнокислотных остатков фосфо- и сфинголипидов, что, в свою очередь, может приводить к изменению проницаемости мембраны для молекул воды и различных ионов, а также активности мембраносвязанных белков (Ohvo-Rekilä et al., 2002; Dupont and Beney, 2011; Frallicciardi et al., 2022).

Стигмастерин, в отличие от  $\beta$ -ситостерина, имеет в своем углеводородном фрагменте двойную связь в положении C22, что делает всю алкильную цепь менее гибкой из-за жесткости двойной связи. Такая особенность влияет на его встраивание и характер распределения в липидном бислое. Было показано, что



включение стигмастерина между ненасыщенными и мононенасыщенными жирными кислотами снижает степень упорядоченности упаковки бислоя в большей степени, по сравнению с  $\beta$ -ситостерином (Hodzic et al., 2008). Таким образом, в клетках растений, степень упорядоченности и стабильность липидных доменов сильно зависит от вида, входящего в их состав фитостерина. Стоит также упомянуть, что еще одним фактором, способным влиять на проницаемость липидного бислоя, является присутствие сапонинов – производных тритерпенов. Их взаимодействие с молекулами холестерина приводит к образованию нерастворимых комплексов, образующих особые мембранные поры, что в свою очередь, приводит к увеличению проницаемости бислоя (Augustin et al., 2011).

Как уже упоминалось ранее, важной особенностью стерина является их высокое сродство к сфинголипидам, способствующее формированию липидных доменов – рафтов. В настоящее время под термином рафты подразумевают особые участки мембраны, обогащенные стеринами и сфинголипидами, а также характеризующиеся особым белковым составом, иными словами, рафты в биологических мембранах являются доменами с особым фазовым состоянием (Lo). Таким образом, можно еще раз подчеркнуть, что стерин выступает скорее не как «уплотнитель» липидного бислоя, а как регулятор его текучести, позволяя снизить кооперативность фазового перехода мембраны, повысить стабильность мембранных доменов и расширить температурный диапазон, благоприятный для протекания мембраносвязанных процессов (Dufourc, 2008).

В заключение можно отметить, что растения, ведущие неподвижный образ жизни и постоянно сталкивающиеся с разными климатическими условиями, должны обладать множеством стратегий для адаптаций. Наличие гибкого метаболизма позволяет растениям синтезировать широкий спектр веществ во время своей жизнедеятельности. Как видно на примере многообразия изопреноидов и, в частности стерина, такое многообразие соединений позволяет адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды (Shaller, 2003; Валитова и др., 2016).

### 1.3. Мембранные микродомены – рафты

Новым веянием в области изучения явлений гетерогенности биологических мембран стала гипотеза липидных рафтов. Она была сформулирована авторами Simons и Ikonen в своей работе (Simons and Ikonen, 1997), чтобы объяснить некоторые особенности внутриклеточного трафика сфинголипидов к плазматической мембране. Они выдвинули предположение, что рафтами являются небольшие участки плазмалеммы клеток, имеющие короткое время жизни, обогащенные сфинголипидами, холестерином и обладающие определенным белковым составом. Стоит отметить, что гипотеза о липидных рафтах формировалась на основе анализа ранее полученных экспериментальных данных и концептуальных предположений, кроме того, большую роль в этом сыграла разработка новых методов исследования. Первые доказательства их существования пришли еще в 70-х, когда при обработке мембран неионными детергентами при определенной температуре удалось обнаружить, что солубилизация приводит к появлению детергент-устойчивой (DRM) и детергент-растворимой (DSM) фракций плазмалеммы (Yu et al., 1973). Два основных события способствовали активному изучению этого феномена среди биологов: открытие того факта, что фракция DRM обогащена стеринами, сфинголипидами и фосфолипидами с насыщенными ацильными цепями, и исследования на искусственных модельных мембранах, позволяющие изучать солубилизацию бислоя в зависимости от его липидного состава. Группе биофизиков под руководством Ipsen в своих работах удалось показать, что мембраны, состоящие из насыщенных липидов с высокой температурой плавления, ненасыщенных фосфолипидов с низкой температурой плавления, и холестерина, можно разделить на две отдельные жидкие фазы: более текучую, в основном содержащую ненасыщенные липиды (так называемая жидко-неупорядоченная или (L<sub>d</sub>)), и плотноупакованную жидко-упорядоченную фазу (L<sub>o</sub>), обогащенную насыщенными липидами и холестерином (Ipsen et al., 1987). Еще одним подтверждением о наличии в мембранах особых доменов, обладающих различным липидным составом, явились данные об изучении белкового состава

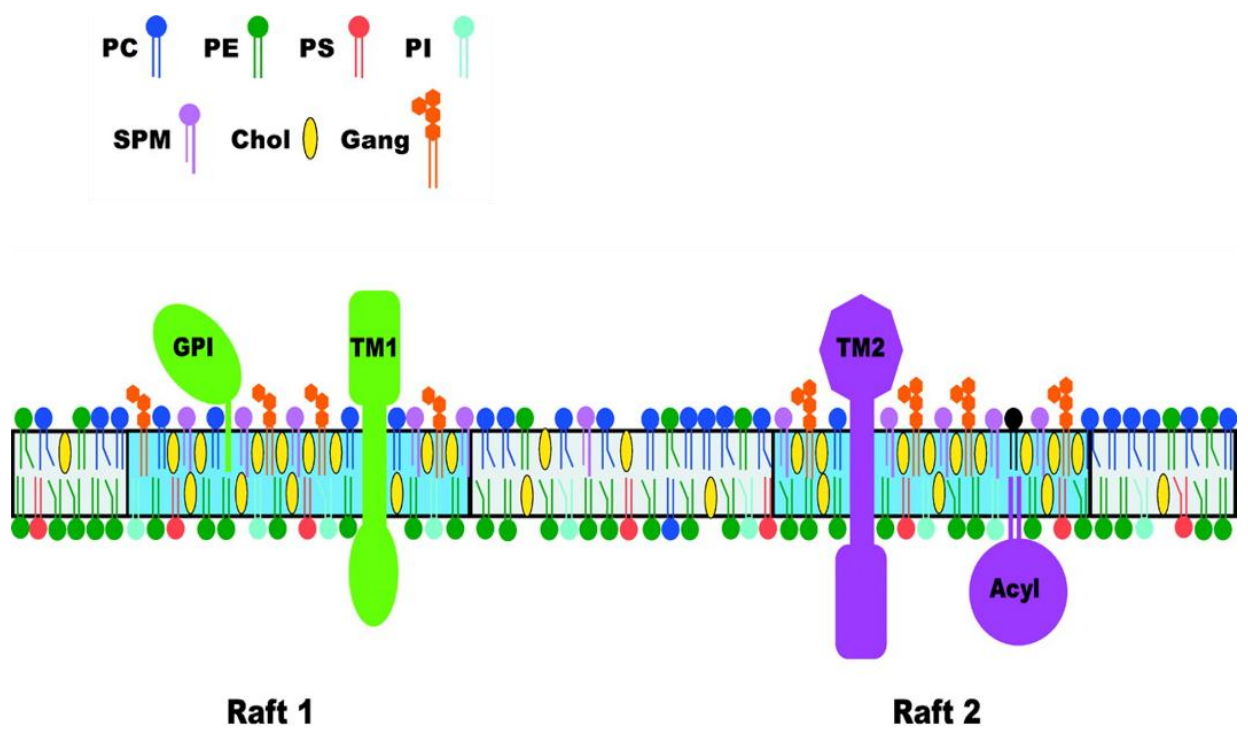
DRM. В частности, мембранные гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки (GPI) оказались устойчивы к солюбилизации Тритоном X-100 (Hooper and Turner, 1988). Далее при исследовании трафика этих белков авторы Brown и Rose (Brown and Rose, 1992), опираясь на ранее полученные данные из работ Ipsen, высказали идею о существовании в плазмалемме детергент-устойчивых доменов, в которые попадают GPI-белки. Наконец в 1997 году Ikonen и Simons сформулировали гипотезу о липидных рафтах – особых мембранных доменах с необычным липидным составом, включающих гликосфинголипиды, холестерин, фосфолипиды с насыщенными жирными кислотами, устойчивых к солюбилизации неионными детергентами при низких положительных температурах и обладающих высокой плавучей плотностью при центрифугировании в градиенте плотности сахарозы (Simons and Ikonen, 1997).

Параллельно с открытием детергент-устойчивых доменов в животных клетках стали проводиться исследования по изучению липидного и белкового состава этих мембранных структур клеток растений. Первыми доказательствами наличия в растительных организмах схожих микродоменов явились работы по выделению DRM-фракций из очищенной плазмалеммы некоторых видов растений (Peskan et al., 2000; Mongrand et al., 2004; Morel et al., 2006). Такие фракции содержали 5–10 % от общего содержания белка ПМ, а анализ их липидного состава выявил общее увеличение доли свободных и конъюгированных форм стеринов, присутствие фосфолипидов с насыщенными ацильными цепями, а также повышенное содержание наиболее распространенных растительных сфинголипидов, а именно GIPC. Протеомый анализ детергент-устойчивых фракций из клеточных мембран как животных, так и растений, показал, что, по сравнению с белковым составом плазмалеммы, в липидных рафтах выше содержание рецепторных белков, малых и гетеромерных G-белков, белков канального типа, транспортеров, а также протеинкиназ и протеинфосфатаз (Foster et al., 2003; Mongrand et al., 2004; Morel et al., 2006; Minami et al., 2009). Анализ DRM фракций, полученных из ПМ *Arabidopsis thaliana*, *Medicago trunculata* и *Nicotiana tabacum*

выявил, что в них содержится большое количество белков, участвующих в передаче сигналов в ответ на биотические и абиотические стрессы, везикулярном трафике и метаболизме клеточной стенки (Lefebvre et al., 2007; Stanislas et al., 2009; Takahashi et al., 2012). Как уже упоминалось выше, характерными маркерами рафтов являются GPI-заякоренные и ацилированные белки (Pike, 2003) (рис. 3). Также среди белков, имеющих предпочтительную локализацию (резиденты) в липидных рафтах выявляются: кавеолы, стоматины, аннексины, флотиллины, прохибитины, дефензины, некоторые из которых имеют стерин-связывающие сайты (Mongrand et al., 2004; Parton and Simons, 2007; Li et al., 2012).

Белок кавеолин участвует в формировании инвагинаций плазмалеммы клеток эпителия животных, где он образует особые структуры – кавеолы. На сегодняшний день, из всех рафтовых белков кавеолин наиболее хорошо изучен, однако он отсутствует в растениях. Аннексины, связываясь с фосфолипидами мембран, формируют ионные (в частности кальциевые) каналы (Lee et al., 2004). Стоматины, флотиллины, прохибитины и дефензины относятся к суперсемейству белков PID (Proliferation, Ion and Death). Свое название суперсемейство получило в связи с тем, что входящие в его состав белки принимают участие во многих глобальных физиологических процессах, как, например, пролиферация клеток, апоптоз, регуляция ионных каналов (Nadimpalli et al., 2000).

В литературе существует много подтверждений того, что результаты, полученные на основании анализа DRM фракций, как способе изучения мембранной организации, следует интерпретировать с осторожностью, так как термины «рафты» и «детергент-устойчивость» не являются синонимами, и значение у этих понятий разное (Tanner et al., 2011). Первым встал вопрос о возможности появления артефактов при использовании детергентов и низких температур, так как известно, что фазовое состояние липидного матрикса зависит от температуры, и одно только ее снижение может вызвать изменение в липидной организации. Также обработка мембран Тритоном X-100 способна приводить к появлению взаимодействий, которые не существуют в мембране *in vivo*.



**Рис. 3.** Структура липидных рафтов из (Pike, 2003).

Для мембранных микродоменов свойственно высокое содержание стерина, сфинголипидов, а также GPI-заякоренных и ацилированных белков, по сравнению с остальной областью плазматической мембраны. PC – фосфатидилсерин, PE – фосфатидилэтаноламин, PS – фосфотидилсерин; PI – фосфотидилинозитол; SPM – сфингомиелин; Chol – холестерин; Gang – ганглиозиды.

Более того, сам Тритон X-100 может способствовать формированию упорядоченных доменов в модельных липидных мембранах путем снижения и так невысокого уровня сфинголипидов и холестерина в Ld-фазах (Heerklotz, 2002). Наконец, когда детергент взаимодействует с мембраной, он может способствовать смещению динамического равновесия в сторону образования жидко-упорядоченных доменов, вызывая сегрегацию липидов и агрегацию белков, что, в свою очередь, может привести к слиянию уже существующих рафтов в большие мембранные агрегаты (Casadei et al., 2014). После того, как стеринам стала присваиваться центральная роль в гипотезе о липидных рафтах, широко стали применяться методы для удаления холестерина из мембран с помощью метил- $\beta$ -циклодекстрина (Zidovetski and Levitan, 2007). В растительных мембранах снижение содержания стерина приводит к увеличению неупорядоченности ацильных жирных цепей и к общему уменьшению гетерогенности липидного матрикса ПМ (Roche et al., 2008; Белугин и др., 2010).

Стоит сказать, что за последнее десятилетие сам термин «липидные рафты» стал все реже употребляться, так как изначально он вводился авторами Simons и Ikonen для того, чтобы охарактеризовать особые мембранные кластеры, в которые попадали определенные белки и липиды, полученные в результате обработки мембран неонными детергентами. Однако такая биохимическая связь между липидами и белками в DRM напрямую никак не доказывала наличие упорядоченных белок-липидных доменов в клетках *in vivo*, более того, на результаты сильно влиял тип используемого детергента и другие условия (Munro, 2003). Только с появлением новых методов высокоразрешающей флуоресцентной микроскопии удалось установить, что похожие нано- и микродомены действительно существуют в мембранах живых клеток.

Активное изучение структуры ПМ на протяжении последних десяти лет показало ее необычайно сложную организацию: разные по типам нанодомены могут объединяться для регуляции ее молекулярной структуры на микроуровне (Ott, 2017). На сегодняшний день не остается сомнений, что ПМ является высоко

гетерогенным динамическим компартментом, в котором существует множество мембранных доменов с различными свойствами и размерами. Белки, локализованные в нанодоменах, вовлечены во многие физиологические процессы, такие как полярный транспорт ауксина, АБК-сигналинг, иммунный ответ, симбиоз, кальциевый сигналинг, синтез клеточной стенки, эндоцитоз, образование мембранных плазмодесм и другие (Demir et al., 2013; Tarpen and Murphy, 2015; Bürstenbinder et al., 2017; Ott, 2017; Gronnier et al., 2018). Однако до сих пор сложной задачей остается определение всех основных компонентов, которые контролируют латеральную стабильность этих доменов и которые служат отправными точками для их сборки *de novo*. Наиболее вероятными из них являются элементы цитоскелета (актиновые филаменты и/или микротрубочки), которые необходимы для транспорта белков в нанодомены (Szymanski et al., 2015). Другими очевидными кандидатами могут выступать «скаффолд-белки», такие как флотиллины и реморины, так как известно, что они участвуют в сборке мембранных рецепторных комплексов (Bauer and Pelkmans, 2006; Raffaele et al., 2009). Наконец, не стоит исключать и липидное окружение, поскольку на сегодняшний день хорошо известно, что многие белки, входящие в состав нанодоменов, имеют повышенное сродство к определенным липидам, как, например, белки суперсемейства PID к стеринам.

### **1.3.1. Белки-транспортёры и липидные рафты**

Первым доказательством неравномерного распределения белков в плазматической мембране стала работа, в которой удалось визуализировать накопление трансмембранного переносчика ауксина (PIN1) в базальной части удлинённых клеток паренхимы ксилемы (Gälweiler et al., 1998). Данный факт явился основой для многих исследований, которые подтвердили важную роль сайт-специфического накопления белков и липидов в установлении клеточной полярности. Значительный вклад внесла конфокальная флуоресцентная микроскопия, позволившая изучать организацию микродоменов ПМ на клеточном

уровне. В частности, удалось установить, что такой полярной структурой обладают клетки эпидермиса корня и листа, а также пыльцевая трубка. В работе (Liu et al., 2009) с использованием флуоресцентных красителей лаурдана и di-4-ANEPDQ удалось установить, что в апикальной зоне растущих пыльцевых трубок *Picea meyerri* присутствуют микродомены с высоким содержанием стерина и НАДФН-оксидазы. Авторы показали, что такая ассоциация НАДФН-оксидазы со стеринами необходима для обеспечения функциональной активности фермента. Трансмембранные переносчики ауксина семейства PIN также проявляют повышенное сродство к мембранным доменам, обогащенным стеринами. Например, было показано, что в клетках эпидермиса корня белки PIN2 в плазмалемме собираются в функциональные кластеры, ограничивающие латеральную подвижность PIN2 и способствующие их накоплению в апикальной зоне эпидермальных клеток, что в свою очередь, обеспечивает полярный рост корня (Kleine-Vehn et al., 2011). Снижение активности ключевого фермента в биосинтезе стерина стерилметилтрансферазы SMT1 приводило к нарушению распределения PIN1 и PIN3 в плазматической мембране клеток корней у *Arabidopsis*, а мутанты по SMT1 проявляли дефекты в развитии (Willemsen et al., 2003).

Еще один переносчик ауксина – ABCB19, принадлежащий к суперсемейству ABC-транспортеров, также обнаруживается в детергент-устойчивых фракциях плазмалеммы. В работе (Titapiwatanakun et al., 2009) было показано, что ABCB19 способен непосредственно взаимодействовать в нанодоменах плазмалеммы с PIN1, обеспечивая полярный транспорт ауксина. Считается, что ABCB19 каким-то образом способен стабилизировать белок PIN1, тем самым регулируя его присутствие в нанодоменах. Это подтверждается экспериментальными данными, где отсутствие ABCB19 в клетке приводило к снижению содержания PIN1 на плазматической мембране (Titapiwatanakun et al., 2009). Любопытно, что при обработке клеток ингибиторами биосинтеза стерина и/или сфинголипидов при нормальной экспрессии ABCB19, значительно увеличивалось содержание PIN1 во



внутриклеточных компартментах вместо ПМ. У мутантов по синтезу стерин/сфинголипидов также наблюдалось снижение количества ABCB19 в плазмалемме. Все это свидетельствует о том, что белки ABCB19 и PIN1 проявляют высокое сродство к стерин-сфинголипид богатым участкам, и их ассоциация с нанодоменами ПМ крайне важна для поддержания функциональной активности всего ABCB19-PIN1 комплекса.

В липидных рафтах плазмалеммы *Arabidopsis thaliana* обнаруживаются белки водных каналов семейства PIP, которое включает в себя два подсемейства: PIP1 и PIP2 (Maurel et al., 2015). Анализ детергент устойчивых фракций разных видов растений с использованием высокоразрешающей микроскопии показал, что некоторые участники семейства PIP организованы на мембране в особые кластеры. Например, у наиболее распространенной в корнях *Arabidopsis* формы аквапорина PIP2;1 каждый кластер включает в себя до 4 молекул транспортера, что согласуется с данными кристаллографии, показывающей, что аквапорины существуют на ПМ в виде тетрамеров (Li et al., 2011). В нормальных условиях PIP2;1 рециркулирует между ПМ и эндосомами, подвергаясь клатрин-опосредованному эндоцитозу. Однако под действием солевого стресса наблюдалась интернализация PIP2;1 из плазматической мембраны с участием нанодомен-опосредованного эндоцитоза и без участия клатрина (Li et al., 2011). Было показано, что в присутствии 100 мМ NaCl значительно увеличивается ассоциация PIP2;1 с белком Flotillin 1 – постоянным резидентом нанодоменов (Borner et al., 2005). Ранее сообщалось, что флотиллин принимает непосредственное участие в клатрин-независимом эндоцитозе (Glebov et al., 2006). Более того, обработка мембран M $\beta$ CD, а также ингибитором синтеза стерин – фенпропиморфом, приводила к снижению доли локализованного внутриклеточно PIP2;1, что свидетельствует о важной роли стерин в эндоцитозе PIP2;1 (Li et al., 2011).

Похожие эффекты были обнаружены и в случае основного рецептора brassinостероидов – BRI1. BRI1 принадлежит к классу лейцин-богатых рецепторных протеинкиназ и играет ведущую роль в brassinостероид-зависимой

передаче сигнала, а также росте и развитии растений (Wang et al., 2001). В клетках корней *Arabidopsis* BRI1 обнаруживается в плазматической мембране, а также в ранних эндосомах (Geldner et al., 2007). Как и в случае аквапоринов, BRI1 подвергается конститутивному эндоцитозу с участием клатрина. В работе авторов (Wang et al., 2015) при обработке клеток корней *Arabidopsis* M $\beta$ CD, а также ингибитором синтеза сфинголипидов – PDMP (1-фенил-2-деканоиламино-3-морфолино-1-пропанол), наблюдалось снижение количества GFP-меченного BRI1 в эндосомальных мембранах, указывая на то, что нарушение структуры мембранных микродоменов влияет на эндоцитоз BRI1. В этой же работе было показано, что BRI1 способен подвергаться клатрин-независимому эндоцитозу с участием Flottilin 1. Любопытно, что извлечение стерина также приводило к ингибированию пути передачи сигнала с участием brassinosterоидов. Это может говорить о том, что микродомены ПМ выступают в роли мембранных платформ, обеспечивающих функциональную активность рецептора BRI1.

Исследования последних лет показали, что уровень содержания стерина в мембранах влияет на активность ионных каналов (Barbuti et al., 2004; Levitan et al., 2014; Meza et al., 2020). К сожалению, вопрос о молекулярных механизмах, лежащих в основе регуляции липидным окружением этих белков, остается открытым. Предполагается, что может существовать несколько способов регуляции стеринами ионных каналов. Наиболее простой вариант – это непосредственное влияние стерина на активность белка через связывание с его трансмембранными доменами. Например, было показано, что белки суперсемейства PID имеют в своей структуре особые стерин-связывающие сайты (Nadimpalli et al., 2000; Fantini et al., 2016). Также рассматривается механизм влияния стерина через изменение фазового состояния бислоя, что может приводить к изменению конформационной подвижности белка, и как следствие, его функции. Наконец, стерин может влиять на работу ионных каналов опосредованно через регуляцию активности (и/или изменения количественного

содержания в мембране) различных протеинкиназ и протеинфосфатаз, которые, в свою очередь, способны модулировать активность каналов.

В независимости от рассматриваемого способа регуляции стеринами ионных каналов, важным фактором в понимании механизмов такого взаимодействия является ассоциация этих белков со стерин-богатыми доменами.

Калиевый канал KAT1 был одним из первых ионных каналов, обнаруженных в мембранных нанодоменах, однако способы регуляции его активности липидным окружением остаются до конца неизвестны (Sutter et al., 2006). В работе (Reuff and Nomann, 2010) было показано, что KAT1 формирует отдельные кластеры, которые хаотично распределены по плазматической мембране клеток мезофилла, в то время как в замыкающих клетках устьиц этот канал демонстрирует четкую линейную ориентацию по всей радиальной плоскости клетки. Такая ориентация канала зависит от тургорного давления, так как было показано, что она исчезает в гипертонических условиях. При этом ориентация доменов KAT1 совпадает с расположением фибрилл целлюлозы и кортикальных участков микротрубочек, что свидетельствует о взаимодействии этого канала с элементами цитоскелета, очевидно влияющих на его латеральную подвижность. У *Arabidopsis* в связи с тесным взаимодействием между целлюлозой и конъюгированной формой стерина ситостерин- $\beta$ -гликозидом, наблюдается нарушение в синтезе и отложении элементов клеточной стенки при дефиците стерина (Schrick et al., 2012).

Аммоний является одним из источников поступления азота в растения, однако он токсичен при высоких концентрациях, поэтому его транспорт в клетку должен строго контролироваться. Транспортёр АМТ (Ammonium Transporter) отвечает за поступление порядка 90% аммония в корнях. АМТ имеет сродство к стерин/сфинголипид богатым доменам плазматической мембраны, а его содержание в плазмалемме зависит от концентрации  $\text{NH}_4^+$  в почве. Wang соавторами показали, что у мутанта по ключевому ферменту метаболизма азота – глутамин синтазы 1 наблюдалось увеличение доли интернализованного АМТ по сравнению с диким типом в условиях дефицита  $\text{NH}_4^+$  (Wang et al., 2013). Авторы

сделали предположение, что присутствие АМТ в мембранных нанодоменах зависит как от концентрации  $\text{NH}_4^+$  в почве, так и от его содержания во внутриклеточных мембранах. При этом интернализация АМТ в ответ на избыток аммония происходит с участием как клатрин, так и нанодомен-опосредованного эндоцитоза.

Помимо участия нанодоменов в реакциях клатрин-независимого эндоцитоза (Fan et al., 2015), по всей видимости, они также выступают в роли особых мембранных платформ для обеспечения сборки функциональных белковых комплексов. Например, было показано, что в замыкающих клетках устьиц анионный канал SLAN3 проявляет свою активность в присутствии АБК, а в неактивном состоянии обнаруживается в детергент-чувствительных мембранах (Demir et al., 2013). Активация SLAN3 и его локализация в нанодоменах зависит от взаимодействия с кальций-зависимой протеинкиназой СРК21 на плазматической мембране, однако, в отсутствие АБК такое взаимодействие невозможно из-за связывания сигнальной протеинфосфатазы АВІ1 с СРК21. В присутствии абсцизовой кислоты СРК21 освобождается от АВІ1, что приводит к образованию комплекса SLAN3/СРК21 и его миграции в стерин- и сфинголипид-обогащенные нанодомены ПМ (Demir et al., 2013). Расположение СРК21 в нанодоменах зависит от содержания стерина, так как обработка клеток М $\beta$ СD приводила к ее высвобождению из плазматической мембраны. Эти данные, на примере SLAN3/СРК21, свидетельствуют о важности мембранных нанодоменов в сборке и диссоциации белковых комплексов, определяющих их функциональную активность в ответ на внешние стимулы.

В работе (Morenilla-Palao et al., 2009) было показано, что активность канала TRPM8 клеток животных зависит от его ассоциации с мембранными нанодоменами. Известно, что этот канал активируется при низких температурах, а также в присутствии агониста – ментола. При обработке мембран М $\beta$ СD холод- и ментол-опосредованные реакции TRPM8 усиливаются. Кроме того, нарушение структуры нанодоменов приводило к температурному сдвигу порога активации канала в область более высоких температур.

Протеомный анализ детергент устойчивых фракций плазмалеммы растений выявил присутствие в них  $H^+$ -АТФазы Р-типа (Furt et al., 2007). В литературе существует большое количество данных, указывающих, что активность этого фермента меняется в зависимости от липидного состава мембраны. Например, увеличение доли фосфатидилхолина и фосфатидилсерина в содержащих фермент протеолипосомах, полученных из корней маша, оказывало стимулирующий эффект, в то время как присутствие фосфатидилинозитола снижало активность помпы (Kasamo and Yamanishi, 1991). Холестерин наряду со стигмастерином активировали  $H^+$ -АТФазу, особенно при низких концентрациях, в то время, как все другие растительные стеринны проявляли ингибирующее действие при любых концентрациях (Grandmougin-Ferjani et al., 1997; Rossard et al., 2010; Morales-Cedillo et al., 2015). Однако все эти результаты не дают четкого понимания о механизмах регуляции липидным окружением (в частности, нанодоменами) АТФазы *in vivo*, так как эксперименты по реконструкции в липосомы не отражают реальные физиологические процессы, протекающие в плазмалемме в нативных условиях. Более того, исследование эффектов отдельных мембранных липидов на активность  $H^+$ -АТФазы может и вовсе не иметь смысла, так как плазматическая мембрана представляет сложную гетерогенную систему, постоянно «подстраивающуюся» под изменения окружающей среды и, тем самым, изменяющую свой липидный и белковый состав. К тому же стоит помнить, что при изучении роли нанодоменов в модуляции активности любого «рафтового» белка полученные данные следует интерпретировать с осторожностью. Замена липидного состава нанодоменов (или нарушение их структуры) очень часто приводит к изменению активности не только белка интереса, но и всех резидентов рафтов, куда входят различные протеинкиназы и протеинфосфатазы, способные сами влиять на функциональную активность белков-мишеней. Более подробно о роли липидного окружения в регуляции активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений будет рассмотрено в следующем разделе.

#### 1.4. Общая характеристика протонной АТФазы плазмалеммы клеток растений

$H^+$ -АТФаза Р-типа плазмалеммы клеток растений представляет собой электрогенную помпу, создающую трансмембранный электрохимический градиент протонов, который обеспечивает поступление необходимых ионов и метаболитов и участвует в обменных процессах растущей клетки с внешней средой (Palmgren, 2001; Sondergaard et al., 2004). С тех пор, как J. Skou впервые открыл  $Na^+$ - $K^+$  АТФазу в клетках животных более 60 лет назад (Skou, 1957), количество известных АТФаз на сегодняшний день значительно увеличилось.  $H^+$ -АТФаза плазматической мембраны клеток растений принадлежит к суперсемейству АТФаз Р-типа, общей чертой которых является наличие консервативного остатка аспартата, фосфорилирование которого способствует подвижности цитоплазматических доменов белка и, в свою очередь, сопряжено с открыванием/закрыванием ион-связывающих сайтов и транслокацией через мембрану различных ионов (Palmgren and Nissen, 2011). Помимо  $H^+$ -АТФазы растений, к семейству Р-типа также относятся  $H^+$ -АТФаза грибов;  $Na^+$ - $K^+$  АТФаза клеток животных;  $H^+$ / $K^+$ -АТФаза эпителия желудка;  $Ca^{2+}$ -АТФазы эндоплазматического ретикулума и плазмалеммы клеток растений, животных и грибов;  $Ca^{2+}$ -АТФаза саркоплазматического ретикулума (SERCA); кальциевая АТФаза тонопласта; АТФазы тяжелых металлов (РІВ-АТФазы), а также бактериальная  $K^+$ -АТФаза и многие другие (Palmgren and Axelsen, 1998). В независимости от типа транспортируемого иона, общей характерной особенностью этих ферментов является преобразование энергии гидролиза молекул АТФ в электрохимический потенциал соответствующих ионов для обеспечения протекания физиологических процессов в клетке. Таким образом, можно сказать, что АТФазы Р-типа представляют собой широко распространенное, высоко консервативное и очень древнее семейство транспортных белков, встречающихся во всех живых организмах.

Как уже отмечалось ранее,  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы клеток растений, помимо создания химического градиента  $\Delta pH$ , также участвует в формировании

электрического мембранного потенциала (Morsomme and Boutry, 2000). Так как большинство белков-транспортеров, локализованных на плазмалемме, использует для своей работы энергию электрохимического потенциала протонов, в растительной физиологии уже очень давно считалось, что активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы является основной движущей силой, обеспечивающей рост и развитие как отдельных клеток и тканей, так и целого растения (Palmgren, 2001). Однако, несмотря на то, что биохимические свойства фермента были изучены достаточно давно (Serano 1984; Palmgren et al., 1991), а также была получена его кристаллическая структура (Pedersen et al., 2007), знания о молекулярных особенностях регуляции этого белка на мембранном уровне остаются неполными. Лишь благодаря использованию новых современных методов и подходов в области молекулярной биологии и биохимии удалось установить четкую взаимосвязь между регуляцией  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы на посттрансляционном уровне и физиологическими процессами, в которых она участвует (Haruta and Sussman, 2012; Haruta et al., 2018).

#### **1.4.1. Особенности структурной организации $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений**

Для каждого растительного организма характерно наличие целой группы генов (например, 11 для *Arabidopsis thaliana*), кодирующих разные виды протонной АТФазы плазмалеммы. Кроме того, известно, что клетки различных тканей могут экспрессировать сразу несколько функционально активных изоформ фермента. В *Arabidopsis thaliana* наиболее часто встречаемые формы  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы являются АНА1 и АНА2 (Autoinhibited  $H^+$ -АТФазе isoform 1,2) (Axelsen and Palmgren, 2001).

Характерной структурной особенностью всех АТФаз Р-типа является наличие единой полипептидной цепи, состоящей из 10 гидрофобных трансмембранных  $\alpha$ -спиралей (M1–M10), несколько раз пересекающих соответствующую мембрану (Pedersen et al., 2007; Falhof et al., 2016). Первые шесть

из них (M1–M6) являются высоко консервативными для всего семейства Р-типа и связаны с цитоплазматической частью белка, тем самым участвуя в каталитической активности фермента, в то время как оставшиеся (M7–M10), вероятнее всего, выполняют преимущественно структурную функцию, плотно удерживая весь полипептид в мембране и, тем самым обеспечивая функциональную стабильность всего трансмембранного домена, как было показано в случае  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы (SERCA) (Norimatsu et al., 2017).

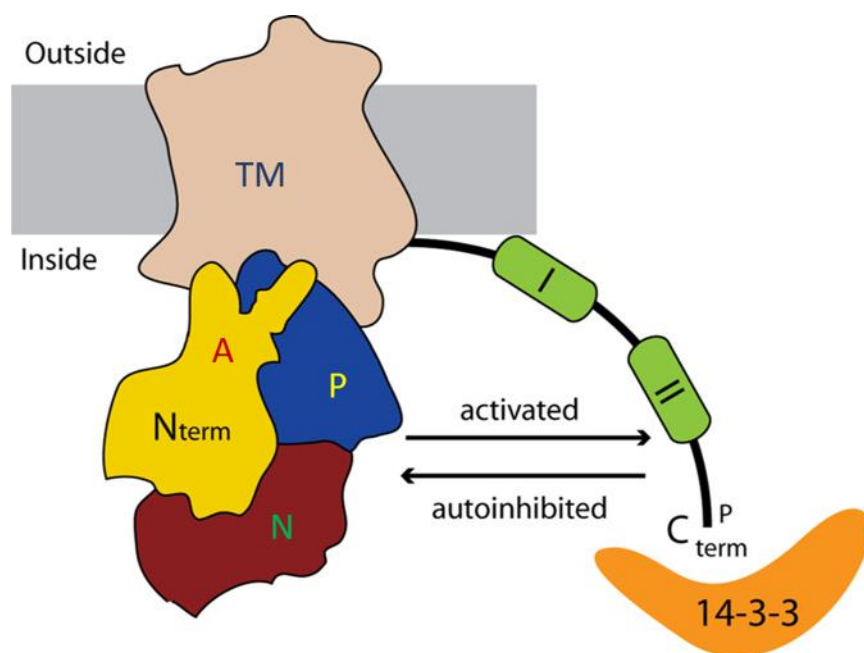
Исследование кристаллической структуры АНА2 у *Arabidopsis thaliana* выявило наличие в петле М6 остатка аспарагиновой кислоты (Asp684), высоко консервативного для всех  $\text{H}^{+}$ -АТФаз плазматической мембраны (Ekberg et al., 2013). Генетический анализ с участием мутантов по Asp684 показал, что он необходим для трансмембранного транспорта протонов и последующего перехода  $\text{H}^{+}$ -АТФазы в активированное состояние (Buch-Pedersen et al., 2003). Asp684 находится в тесном контакте с высококонсервативным Asn106, который локализован в петле М2, и между ними установлена водородная связь. Стоит отметить, что аспарагиновый остаток 684 является близким аналогом ранее показанного для SERCA Asp800, также расположенном в петле М6 и осуществляющим связь с катионами  $\text{Ca}^{2+}$  (Norimatsu et al., 2017). Это позволило сделать предположение, что в  $\text{H}^{+}$ -АТФазе, вероятнее всего, Asp684 вместе с Asn106 непосредственно участвуют в образовании протон-связывающего сайта. Более того, трансмембранный участок М2 непосредственно связан с цитоплазматическим доменом А (см далее), который инициирует дефосфорилирование по Asp329 на протяжении каталитического цикла фермента. Такая особенность позволила бы легко объяснить взаимосвязь между процессами образования сайта фосфорилирования в цитоплазматическом участке белка и окклюзией на протон-связывающем сайте пары Asp684–Asn106, расположенной между М2, М4 и М6 участками. Таким образом, основываясь на результатах анализа кристаллических структур SERCA и АНА2, на сегодняшний день предполагается, что трансмембранные М2, М4 и М6 всех АТФаз Р-типа способствуют формированию



определенных участков – карманов на поверхности фермента с низкой энергией активации, которые являются сайтами связывания для различных катионов. Функциональная роль доменов M1 и M5 изучена недостаточно, но предполагается, что M5 необходим для каталитической активности фермента, как было показано в случае PMA1 дрожжей (Dutra et al., 1998), в то время как M1, по всей видимости, выполняет структурную функцию и связан с регуляторным N-концом.

Каталитическая активность фермента связана с основной цитоплазматической частью белка, в которой принято выделять нуклеотидсвязывающий (N), фосфорилирующий (P) и актуаторный (A) домены (рис. 4) (Pardo and Serrano, 1988; Pedersen et al., 2007; Focht et al., 2017). В дополнение к ним со стороны цитозоля присутствуют еще два N-(не путать с нуклеотидсвязывающим) и С-терминальных домена, выполняющих регуляторную роль (Nguyen et al., 2018). Актуаторный домен представлен продолжением трансмембранного участка M2, соединенный с M1 и M3 с помощью линкеров и, как было упомянуто ранее, инициирует реакцию дефосфорилирования Asp329, локализованного на Р-домене. Это обеспечивается путем высокой ротационной подвижности А-домена и присоединения его к Р-домену в ходе каждого каталитического цикла фермента. Генетический анализ с использованием мутантов по варьированию длины линкеров А домена показал, что они должны иметь строго определенную длину цепей, чтобы, во-первых, обеспечивать необходимую подвижность всего домена для протекания реакций фосфорилирования/дефосфорилирования, а во-вторых, быть способными изменять конформационную структуру белка, необходимую для транспорта катионов (Vublitz et al., 2010). N-домен, расположенный рядом с Р-доменом, осуществляет связывание с молекулой АТФ, и, гидролизуя ее, переносит остаток фосфата на консервативный Asp329. Любопытно, что в отличие от N- и А-доменов, фосфорилирующий Р-домен наиболее консервативен для всего семейства АТФаз Р-типа (Focht et al., 2017).

С- и N- терминальные домены выполняют ключевую роль в регуляции активности всех протонных АТФаз растений. С-домен, состоящий приблизительно



**Рис. 4.** Схематическое изображение структуры  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений из (Ekberg et al., 2010). Буквами (N, P, A) обозначены цитозольные домены, обеспечивающие каталитический цикл фермента: N – нуклеотид-связывающий домен; P – фосфорилирующийся домен; A – актуаторный домен. TM – трансмембранный домен (M1 – M10  $\alpha$ -спирали). C<sub>term</sub> – автоингибиторный домен.

из 100 аминокислотных остатков, еще называют автоингибирующим, так как, находясь в нефосфорилированном состоянии, он способен полностью блокировать работу помпы путем взаимодействия с актуаторным доменом, ограничивая его подвижность (Pedersen et al., 2007). В таком положении сайты связывания для катионов (или для протонов, в случае  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы) становятся недоступными, тем самым полностью ингибируя каталитический цикл фермента (Palmgren et al., 1991, Pedersen et al., 2007). Фосфорилирование по предпоследнему остатку треонина в С-терминальном участке приводит к присоединению регуляторного 14-3-3 белка, снятию автоингибирования и последующей активации  $H^+$ -АТФазы (Jahn et al., 1997; Fuglsang et al., 2003). N-терминальный домен, по всей видимости, контролирует связывание 14-3-3 белков с С-доменом, так как удаление на нем первых 10 аминокислотных остатков приводило к значительному увеличению уровня фосфорилирования по предпоследнему треонину на последнем и, как следствие, присоединению 14-3-3, как было показано в случае дрожжевой РМА1 (Ekberg et al., 2010).

Исследования особенностей каталитического цикла  $H^+$ -АТФазы растений и дрожжей показали, что она существует на плазматической мембране в двух основных активных состояниях: автоингибированном (С-терминальный домен не фосфорилирован по остаткам треонина), когда гидролиз АТФ практически не связан с трансмембранным транспортом протонов, и в активированном, когда возрастает  $V_{max}$ , снижается  $K_M$  и рН-оптимум гидролиза сдвигается в щелочную область (Morsomme and Boutry, 2000).

На сегодняшний день, каталитический цикл этих ферментов достаточно хорошо изучен и представляет собой модель, основанную на работах Albers и Post, которые впервые опубликовали общий принцип работы АТФаз Р-типа (Albers et al., 1963; Post et al., 1972). Ключевой особенностью цикла является наличие фосфорилированного остатка аспартата, фосфорилирование и дефосфорилирование которого приводит к изменению конформационной структуры белка (E1 и E2 соответственно). E1 состояние характеризуется высоким

сродством к транспортирующему катиону со стороны цитозоля, в то время как для E2, наоборот, свойственна низкая аффинность к субстрату. При связывании фермента с соответствующим субстратом в его трансмембранном участке, а также с молекулой АТФ в N-домене, происходит переход белка из E1 в E1P состояние, сопровождающийся изменением пространственной локализации цитозольных доменов относительно друг друга. N-домен функционирует как киназа, задача которой переносить фосфатную группу от АТФ на консервативный аспарат (Asp329 у H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы), локализованный в P-домене. Актуаторный A-домен, в свою очередь, является по своей природе фосфатазой, мишенью которой также является аспарат, при дефосфорилировании которого происходит переход белка из E2P в E1 и последующее высвобождение соответствующего катиона на другую сторону мембраны. Считается, что реакция дефосфорилирования инициируется с помощью контрионов, как, например, протонов у Ca<sup>2+</sup>-АТФазы. В случае же H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы, донором выступает протонированная аминокислота Arg655 (Buch-Pedersen et al., 2003). Таким образом, поскольку мишенью обоих N- и A-доменов является один и тот же аспарат, должна существовать сложная скоординированная работа всего цитоплазматического участка белка на всех стадиях каталитического цикла (E1–E1P–E2P–E2–E1).

На сегодняшний день считается, что связывание с субстратом является необходимым условием для реакций фосфорилирования/дефосфорилирования и последующих конформационных изменений фермента. Однако, в определенных случаях, гидролиз АТФ может быть разобщен с транспортом соответствующего катиона, как было показано в случае дрожжевой PMA1 (Venema and Palmgren, 1995). По-видимому, это связано с молекулярными механизмами регуляции активности самого фермента и его переход из активированного в неактивное состояние (Bal et al., 2012). Регуляция активности протонной АТФазы является сложным процессом и затрагивает многие сигнальные, генетические и молекулярные системы растения. В следующем разделе эти механизмы будут рассмотрены более подробно.

#### 1.4.2. Фосфорилирование как основной способ регуляции активности $H^+$ -АТФазы плазмалеммы

Известно, что  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы Р-типа принимает участие во многих физиологических процессах, связанных с жизнедеятельностью растений, таких как движение устьиц, рост клеток растяжением, устойчивость к засолению, защита от патогенов и др. (Palmgren, 2001; Elmore and Coaker, 2011). Очевидно, что работа такого фермента должна находиться под строгим контролем со стороны клеточных регуляторных систем и быстро менять свою активность, подстраиваясь под изменения внешних условий окружающей среды. Как уже было сказано в предыдущем разделе, для  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы характерно наличие регуляторного (автоингибиторного) С-домена со стороны цитозоля, который блокирует работу помпы в отсутствие связывания фермента с 14-3-3 белком (Jahn et al., 1997). На сегодняшний день считается, что именно фосфорилирование по С-концу является основным способом изменения активности  $H^+$ -АТФазы, причем мишенями для фосфорилирования могут выступать разные аминокислотные остатки в зависимости от того, какой сигнальный путь был задействован. Любопытно, что механизмы активации помпы между растениями и грибами имеют существенные различия, так как их автоингибиторные домены сильно отличаются по аминокислотным последовательностям. Кроме того, С-домен  $H^+$ -АТФазы растений вдвое длиннее аналогичного дрожжевого, что, в свою очередь, подразумевает более сложную систему регуляции этого фермента.

В случае самых распространенных форм  $H^+$ -АТФазы у *Arabidopsis* (АНА1 и АНА2), исторически первым и наиболее изученным процессом фосфорилирования в регуляторном С-доме является его фосфорилирование по предпоследнему остатку треонина (Thr948 для АНА1 и Thr947 для АНА2 соответственно). Эти аминокислотные остатки при присоединении фосфатной группы способны формировать комплекс с 14-3-3 белками, а также прочно связываться с грибным токсином – фузикооксином, тем самым инициируя переход протонной помпы в необратимо-активированное состояние (Olsson, et al., 1998; Fuglsang et al., 2003).

Считается, что связывание 14-3-3 белков с предпоследним остатком треонина в С-регуляторном домене  $H^+$ -АТФазы является необходимым условием при трансдукции сигнала от ауксина, а также в рецепции синего света (Haruta et al., 2015). Абиотические стрессы, такие как низкие температуры, кислые почвы, а также присутствие АБК, приводят к снижению уровня фосфорилирования Thr947 и Thr948 в С-терминальном домене. Протеинкиназа, отвечающая за фосфорилирование предпоследних остатков треонина регуляторного домена у АНА1 и АНА2, еще не идентифицирована (Falhof et al., 2016).

Помимо Thr948 и Thr947, упомянутых выше, в С-домеене присутствуют другие аминокислоты, при фосфорилировании которых может меняться активность протонной помпы. Например, фосфорилирование Thr881 у АНА2 в присутствии стимулирующего рост пептида PSY1R способно активировать  $H^+$ -АТФазу даже без связывания с 14-3-3 белком, в то время как фосфорилирование по треонину 924 или серину 931 с помощью протеинкиназы PKS5, наоборот, ингибирует работу помпы и блокирует присоединение 14-3-3 к ферменту (Fuglsang et al., 2007; Fuglsang et al., 2014). Секретируемый пептид RALF, взаимодействуя с протеинкиназой FERONIA, способствует фосфорилированию по Ser889, что ингибирует протонный транспорт и вызывает внеклеточное защелачивание, приводя к замедлению клеточного роста (Haruta et al., 2014).

#### **1.4.3. Регуляция активности АТФаз Р-типа липидным окружением**

Хорошо известно, что фосфолипиды способны влиять на функциональную активность АТФаз Р-типа (Hossain and Clarke, 2019). Действительно, многие экспериментальные работы за последние 30 лет подтверждают тот факт, что Р-АТФазы проявляют высокую чувствительность к своему липидному окружению, а также физико-химическому состоянию бислоя. Например, было показано, что  $Ca^{2+}$ -АТФаза плазматической мембраны способна активироваться в присутствии кислых фосфолипидов и имеет для этого на своей поверхности специфические сайты связывания (Meneghelli et al., 2008). Такие же участки для взаимодействия с

фосфолипидами (а также со стеринами) были обнаружены и у SERCA, на основании чего было сделано предположение, что подобные структуры должны встречаться у всех АТФаз этого семейства.

Исторически первой молекулой, способной непосредственно активировать  $H^+$ -АТФазу плазмалеммы клеток растений, являлся моноацильный сигнальный липид – лизофосфотидилхолин (Palmgren and Sommarin, 1989). Он является продуктом гидролиза фосфатидилхолина под действием фермента – фосфолипазы А<sub>2</sub>, и давно рассматривается в качестве сигнальной молекулы у растений, например, при защите от патогенов (Wi et al., 2014). Известно, что лизофосфатидилхолин способен активировать растительную  $H^+$ -АТФазу даже в микромолярных концентрациях (Palmgren and Sommarin, 1989). В условиях *in vitro*, он, по-видимому, действует опосредовано через С- и N-регуляторные домены в отсутствие фосфорилирования по предпоследнему остатку треонина и без участия 14-3-3 белков (Wielandt et al., 2015). К тому же, удаление N- или С-доменов приводило к полному отсутствию чувствительности протонной помпы к лизофосфатидилхолину.

Стоит отметить, что АТФазы Р-типа по-разному меняют свою функциональную активность в зависимости от липидного состава мембран. Например, эксперименты на реконструированных липосомах показали, что  $Na^+K^+$  АТФаза клеток животных проявляет свою оптимальную активность в присутствии фосфатидилсерина и фосфатидилхолина, содержащих ненасыщенные жирные кислоты. Если же двойные связи отсутствовали, активность фермента сильно снижалась (Hossain and Clarke, 2019). Похожие эффекты были обнаружены и у  $H^+/K^+$ -АТФазы, где извлечение РС или РЕ приводило к ее ингибированию, а оптимальная активность помпы наблюдалась в присутствии РС с моно- и ди-ненасыщенными жирными кислотами.

В случае  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений, микросомы, полученные из корней кукурузы и содержащих РС, РА и РГ (фосфатидилглицерол), характеризовались увеличением скорости гидролиза АТФ,

хотя величина  $K_M$  менялась незначительно (Morales-Cedillo et al., 2015). К тому же, как и у АТФаз клеток животных, на ее активность сильно влияло наличие двойных связей и длина цепей жирнокислотного состава липидов. Таким образом можно сказать, что состав мембранных фосфолипидов важен для поддержания функциональной активности всех АТФаз Р-типа, причем степень ненасыщенности ацильных цепей жирных кислот играет в этом определяющую роль.

Роль сфинголипидов в регуляции АТФаз Р-типа клеток растений на сегодняшний день изучена недостаточно. Так как вместе со стеринами они являются компонентами детергент-устойчивых мембранных фракций (рафтов), и, принимая во внимание тот факт, что АТФазы Р-типа обнаруживаются в этих функциональных микродоменах (Mongrand et al., 2004; Minami et al., 2009), предполагается их влияние на активность и/или содержание этих белков в плазмалемме. Например, было показано, что РМА1 дрожжей уже на стадии биосинтеза в ЭПР обогащается церамидами, чтобы затем успешно транспортироваться в плазматическую мембрану. Если же синтез сфинголипидов нарушался в присутствии ингибиторов, комплексы РМА1 обнаруживались в вакуолярном компартменте с последующей их деградацией (Lee et al., 2002).  $H^+$ -АТФаза растений также обладает повышенным сродством к мембранным микродоменам. Вероятно, как и в случае других рафтовых белков, липидный состав этих доменов способен вызывать структурные модификации фермента, влияющие на его каталитическую активность.

Многие экспериментальные работы подтверждают тот факт, что активность АТФаз Р-типа крайне чувствительна к содержанию стерина в мембране. Несмотря на то, что исследования за последние 30 лет показали наличие взаимосвязи между каталитическими и транспортными характеристиками этих ферментов от качественного и количественного состава стерина, полученные данные зачастую носят противоречивый характер, и у физиологов растений до сих пор нет четкого понимания молекулярных механизмов, задействованных в этих процессах. Например, опыты на реконструированных липосомах с участием  $Na^+K^+$  АТФазы



животных показали, что в отсутствие холестерина гидролитические параметры фермента сильно снижались (García et al., 2019), а максимальная активность наблюдалась при концентрации холестерина 20 моль % от общего числа липидов (Cornelius, 1995; Habeck et al., 2015). Этот эффект сопровождался увеличением количества промежуточного фосфоинтермедиата, общего уровня фосфорилирования белка, а также выростала величина  $K_M$ . В случае  $H^+/K^+$ -АТФазы обнаруживаются противоположные эффекты, где увеличение процентного содержания холестерина в липосомах приводило к частичному ингибированию гидролиза АТФ и полному нарушению протонного транспорта (Ray et al., 1983). В отличие от  $Na^+/K^+$ - и  $H^+/K^+$ -АТФаз, активность SERCA была полностью невосприимчива к изменению уровня содержания стерина в протеолипосомах. Хотя в ряде экспериментальных работ действительно обнаруживали ингибиторные свойства холестерина на каталитические свойства фермента, по всей видимости, эти эффекты действуют опосредованно, а именно через физико-химические свойства самого бислоя (Drachmann et al., 2014). К тому же, низкую чувствительность SERCA к холестерину может объяснять тот факт, что она локализована на мембране ЭПР, где общее его содержание значительно ниже, чем в плазматической мембране.

Известно, что протонный транспорт и гидролитическая активность реконструированной  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений также способна меняться в зависимости от качественного и количественного состава стерина. Было показано, что холестерин вместе со стигмостерином стимулируют активность помпы, а также протонный транспорт, особенно в невысоких концентрациях, в то время как кампастерин, ситостерин и 24-метилхолестерин проявляют ингибиторный эффект в любом концентрационном диапазоне (Grandmougin-Ferjani et al., 1997). При этом протонный транспорт оказывался более чувствительным к изменению содержания стерина, нежели гидролиз АТФ. На основании этих данных можно сделать предположение, что фермент способен «распознавать» разные молекулы стерина, ведь, к примеру, ситостерин и стигмастерин

отличаются между собой только наличием дополнительной двойной связи в положении С-22 углеводородного хвоста у последнего. Также эти результаты могут указывать на то, что в наблюдаемых эффектах, по всей видимости, задействованы именно липид-белковые взаимодействия на молекулярном уровне, которые должны характеризоваться высокой структурной специфичностью. Активация  $H^+$ -АТФазы и протонного транспорта холестерином и стигмастерином даже в крайне малых концентрациях также говорит в пользу этой гипотезы, ведь только их низкое содержание в мембране неспособно кардинально поменять физико-химическое состояние бислоя (например, текучесть), влияющего на функциональную активность мембранных белков.

Анализ кристаллических структур  $Na^+K^+$  АТФазы животных и SERCA показал наличие у этих ферментов особых липидных и стерин-связывающих сайтов, которые взаимодействуют с интегральным (внутренним) окружением АТФаз, повышая структурную стабильность помпы (Cornelius et al., 2015; Hossain and Clarke, 2019). Несколько экспериментальных работ показали, что ассоциация холестерина с фосфатидилхолином на цитоплазматическом участке фермента способствует стабилизации его трансмембранных М8–М10 доменов, а также поддержанию равновесия между E1 и E2 состояниями в ходе каталитического цикла (Cornelius et al., 2015; Nabeck et al., 2017). Учитывая высокую структурную консервативность АТФаз Р-типа, можно предположить, что и в случае  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы растений, должны существовать подобные стерин- и липид-связывающие сайты, способные влиять на ее функциональную активность.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Выделение протопластов

Протопласты получали из листьев 8–10-ти недельных растений *Arabidopsis thaliana* L., выращенных при 25°C и фотопериоде 8/16 ч. Выделение протопластов проводили согласно методу «сэндвича» (Wu et al., 2009). Для этого листья фиксировали на ровной поверхности двусторонней клейкой лентой 3M Scotch (США), затем нижний эпидермис удаляли с помощью односторонней клейкой ленты 3M Scotch Magic tape (США) и помещали в ферментный раствор, содержащий 10 мМ Mes–КОН (pH 5.7), 0.4 М маннит, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1% целлюлазу Onozuka R10 и 1% мацерозим R10. Листья инкубировали с ферментным раствором в течение 40 мин в термостате при 26°C. После этого суспензию фильтровали через Miracloth (диаметр пор 22–25 мкм) с последующей отмывкой от ферментов путем двух циклов центрифугирования/ресуспендирования при 100 g в течение 5 мин в изотоническом растворе, содержащем 10 мМ Mes–КОН (pH 5.7), 0.4 М маннит, 10 мМ CaCl<sub>2</sub> и доводили суспензию до конечной концентрации 5×10<sup>5</sup> клеток/мл. Количество протопластов оценивали с помощью камеры Фукса-Розенталя на световом микроскопе («Carl Zeiss», Германия).

### 2.2. Извлечение стериннов и размеры протопластов

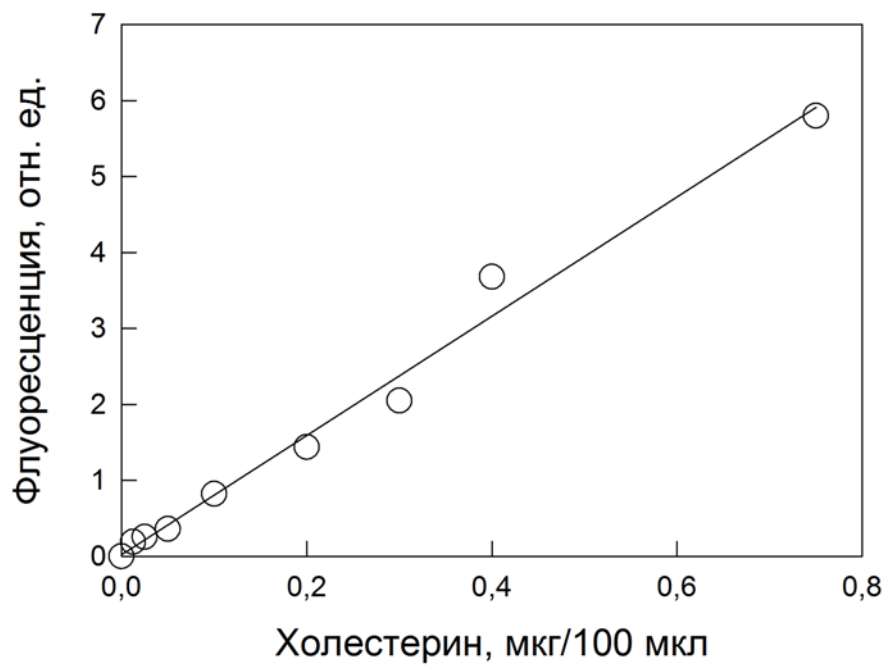
Для экстракции стериннов суспензию протопластов (5×10<sup>5</sup> клеток/мл) инкубировали с метил-β-циклодекстрином (МβCD) в конечной концентрации 5–20 мМ в течение 30 мин при комнатной температуре на свету, затем отмывали от МβCD однократным центрифугированием при 100g в течение 5 мин. Протопласты ресуспендировали в среде 10 мМ Mes–КОН (pH 5.7), 0.4 М маннит, 10 мМ CaCl<sub>2</sub>, а полученный супернатант отбирали и использовали в дальнейшем для определения количества экстрагированных стериннов. Размеры протопластов оценивали по

микрофотографиям, используя программное обеспечение Axio Vision 4.8 («Carl Zeiss», Германия).

### 2.3. Определение количества экстрагированных стеринов

Для количественного определения экстрагированных стеринов использовали набор Amplex Red Cholesterol Assay Kit («Invitrogen», США). Метод основан на сопряженных ферментативных реакциях, позволяющих выявить свободные стерины и их эфиры, при этом последние гидролизуются холинстеринэстеразой до стеринов, которые, в свою очередь, окисляются до кетонов и пероксида водорода с помощью холистериноксидазы. Далее пероксидаза хрена в присутствии образовавшегося  $H_2O_2$  окисляет реагент Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин) до флуоресцирующего резорурфина. 40 мкл контрольных и опытных образцов, содержащих экстрагированные стерины в среде выделения, смешивали с 10 мкл 5-кратного буфера для определения стеринов: 0.5 М фосфат калия, 0.25 М хлорид натрия, pH 7.4, 25 мМ холевая кислота, 0.5% Тритон X-100. После этого к образцам вносили по 50 мкл 1-кратного реакционного буфера, содержащего: 300 мкМ Amplex Red, холинстеринэстеразу из *Pseudomonas*, холистериноксидазу из *Streptomyces*, и пероксидазу хрена, перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Реакцию останавливали внесением 900 мкл фосфатного буфера (PBS) и регистрировали интенсивность флуоресценции на спектрофотометре Hitachi 850 (Япония) при 585 нм и возбуждении 550 нм. За стандарт брали раствор холестерина в 1-кратном буфере. Калибровочную кривую зависимости содержания стеринов от интенсивности флуоресценции резорурфина строили в диапазоне от 0 до 8 мкг/мл холестерина (рис. 5).

Для анализа содержания стеринов в протопластах использовали флуоресцентный аналог холестерина – NBD-холестерин («Sigma», США). К суспензии добавляли NBD-холестерин в конечной концентрации 20 мкМ и инкубировали 30 мин в темноте при комнатной температуре. Отмывку проводили при 100 g в течение 5 мин, протопласты ресуспендировали в изотонической среде и



**Рис. 5.** Калибровочная кривая зависимости флуоресценции резорубина. от концентрации холестерина (Amplex Red Cholesterol Assay Kit).

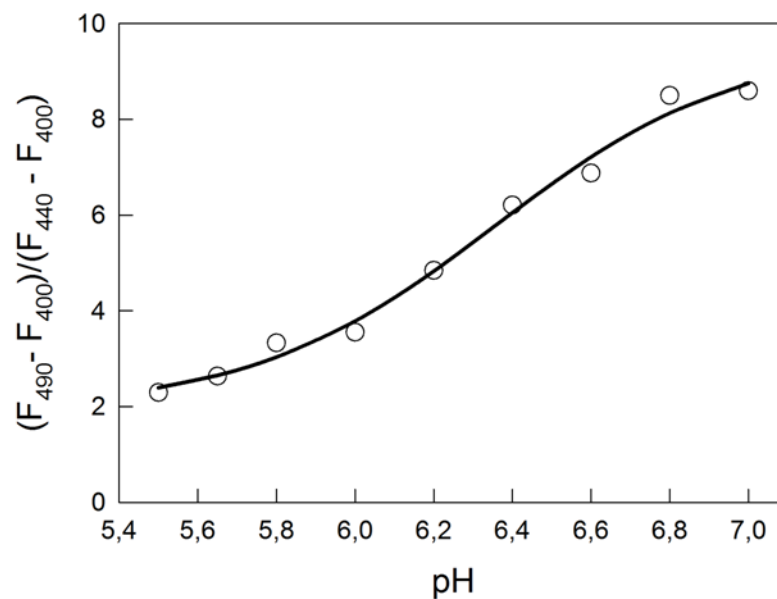
регистрировали флуоресценцию на флуоресцентном микроскопе AxioImager Z2 («Carl Zeiss», Германия) с использованием набора светофильтров 44 FITC. Интенсивность флуоресценции (CTCF) рассчитывали по фотографиям, используя следующую формулу: **CTCF = Integrated Density** (сумма значений пикселей в выделенной области) – **Area** (область выделения) × **Background** (значение фона) в программном обеспечении Image J (США).

#### 2.4. Закисление среды протопластами

Для оценки скорости внеклеточного закисления использовали краситель 5,6-карбоксифлуоресцеин, способный менять интенсивность своей флуоресценции в зависимости от pH раствора (Chelysheva et al., 1999). Протопласты, предварительно проинкубированные в присутствии 5 и 10 мМ МβCD, переносили в среду, содержащую 1 мМ Mes-бис трис пропан (pH 6.2), 0.4 М маннит, 1 мМ Ca<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 мМ K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 1 мкМ карбоксифлуоресцеина и далее, отбирая 1 мл среды, регистрировали в ней интенсивность флуоресценции pH-индикатора при 530 нм и возбуждении 440 и 490 нм каждые 30 мин в течение 2 ч на спектрофотометре Hitachi 557 (Япония). Корреляцию между внеклеточным закислением и активностью H<sup>+</sup>-АТФазы подтверждали в экспериментах с использованием ингибитора эритрозина В, в присутствии которого в конечной концентрации 20 мкМ обрабатывали протопласты в течение 15 мин, а далее отмывали однократным центрифугированием при 100 g. Значения pH среды определяли с помощью калибровочной кривой зависимости флуоресцентного отношения (F<sub>490</sub>-F<sub>400</sub>)/(F<sub>440</sub>-F<sub>400</sub>) от pH среды (рис. 6).

#### 2.5. Выращивание этиолированных проростков гороха

Исследования проводили с использованием 5-ти дневных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) сорта Альфа. Для этого семена замачивали в течение 12 ч и проращивали на влажной фильтровальной бумаге в термостате при 22°C 2 суток.



**Рис. 6.** Калибровочная кривая зависимости флуоресцентного отношения карбоксифлуоресцеина от рН среды.

Регистрировали спектры возбуждения флуоресценции 1 мкМ карбоксифлуоресцеина в растворах 5 мМ Mes-бис трис пропан буфера с разными значениями рН при 530 нм и рассчитывали величину отношения  $(F_{490} - F_{400}) / (F_{440} - F_{400})$ .

На 3 день проростки раскладывали в кюветы с отфильтрованной водопроводной водой на перфорированные пластины (диаметр отверстий 0.5 см, расстояние между отверстиями 1.5 см) и доращивали в темноте еще 2 суток при 24°C. На пятый день, корни обрезали, промывали в дистиллированной воде, взвешивали и использовали для получения плазмалеммы.

## **2.6. Выделение плазмалеммы**

Корни в соотношении 1:3 (в/о) помещали в среду, содержащую 300 мМ сахарозу, 100 мМ Трис–HCl (pH 8.0), 10 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 5 мМ метабисульфит калия, 1 мМ фенилметилсульфонилфторид и 0.6%-ный (в/о) поливинилпирролидон. Растительный материал гомогенизировали 3 раза по 30 с в блендере фирмы Moulinex при максимальных оборотах. Полученный гомогенат фильтровали через 2 слоя батистовой ткани и центрифугировали при 10000 g 15 мин. Осадок отбрасывали, а супернатант использовали для получения микросомальных мембран, которые осаждали центрифугированием супернатанта при 100000 g в течение 30 мин. Фракцию плазмалеммы получали с помощью водной двухфазной полимерной системы: 6.2%-ный (в/в) декстран T500 – 6.2% полиэтиленгликоль 3500 по методике (Larsson et al., 1994). Для этого полученный осадок микросомальных мембран ресуспендировали в фазовом буфере (6 мл), содержащем 300 мМ сахарозу, 5 мМ калий-фосфатный буфер (pH 7.8), 3 мМ KCl и 1 мМ дитиотреитол, и объединяли с фазовой смесью 6.2%-ный (в/в) декстран T500 – 6.2% полиэтиленгликоль 3500, тщательно перемешивали и центрифугировали при 2500 g в течение 5 мин. Верхнюю фазу, обогащенную плазмалеммой, переосаждали центрифугированием при 100000 g в течение 30 мин в среде суспендирования, содержащей 300 мМ сахарозу, 0.5 мМ ЭДТА и 5 мМ бис трис пропан–Mes (pH 7.2). Полученный осадок ресуспендировали в этой же среде, замораживали и хранили при –70°C. Все процедуры по выделению плазмалеммы вели при 4°C. Обогащение мембранной фракции плазмалеммой оценивали с помощью вестерн блот анализа и первичных антител против белков-маркеров



клеточных компартментов (AS07 260, AS07 266 и AS08 325 соответственно) против H<sup>+</sup>-АТФазы Р-типа, стерилметилтрансферазы (SMT1) и малой ГТФазы (ARF1) («Agrisera», Швеция).

## **2.7. Определение содержания белка**

Для определения содержания белка использовали метод Bradford (1976). Для этого мембраны в среде суспендирования солюбилизировали 0.05 % Тритоном X-100 и добавляли реактив Bradford (0.006% (в/о) Кумасси G250, 4.8% (о/о) этанол, 8.5% (о/о) ортофосфорная кислота) в соотношении 1:29, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин. Оптическую плотность образцов измеряли при 595 нм на спектрофотометре Genesys 10 («Thermo Fisher Scientific», США). Для калибровки в качестве стандарта применяли раствор БСА с 0.05 % Тритоном X-100.

## **2.8. Извлечение стерина из везикул изолированной плазмалеммы**

Для экстракции стерина суспензию мембранных везикул (2 мг белка/мл) разводили в 4 раза средой суспендирования без дитиотреитола с МβCD в конечной концентрации 5–30 мМ и инкубировали в течение 30 мин при 4°C, а затем, не изменяя объема, переосаждали однократным центрифугированием (100000 g, 30 мин). Супернатант отбрасывали, а фракции исходной и обработанной плазмалеммы ресуспендировали в среде без дитиотреитола. Количество оставшихся в мембране стерина определяли с помощью Amplex Red Cholesterol Assay Kit аналогично методике, описанной для протопластов. При измерениях проба содержала не более 5–10 мкг мембранного белка.

## **2.9. Размеры мембранных везикул в присутствии МβCD**

Размеры контрольных и опытных образцов оценивали с помощью метода динамического светорассеивания. Мембраны в среде суспендирования смешивали с двумя объемами гипотонического буфера, содержащего 10 мМ бис трис пропан–

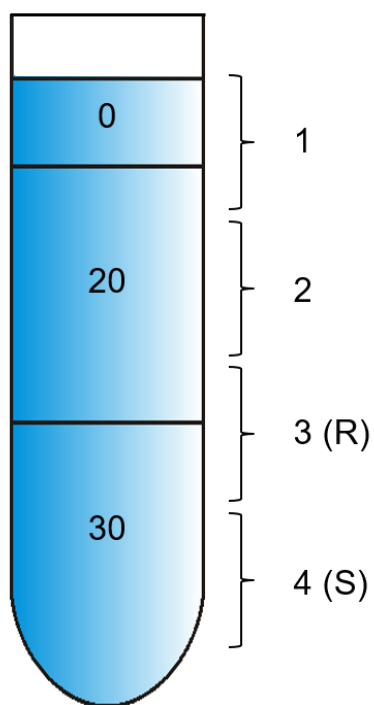
Mes (pH 7.2) и 1 mM MgSO<sub>4</sub>. К опытным образцам в гипотонический буфер добавляли MβCD в конечной концентрации 10 mM и инкубировали в течение 15 мин. Конечная концентрация белка в кювете составляла 100 мкг/мл. Измерения проводили на приборе Photocor compact-z (Россия). Обработку результатов измерений – с помощью встроенной программы DynaL.

### **2.10. Получение детергент-устойчивой фракции плазмалеммы**

Известно, что микродомены, обогащенные стеринами и сфинголипидами, характеризуются устойчивостью к солюбилизации в присутствии неионных детергентов (Mongrand et al., 2004). Для того, чтобы получить детергент-устойчивую и детергент-солюбилизируемую фракции плазмалеммы, суспензию мембранных везикул, предварительно обработанную 1% Тритоном X-100 (соотношение детергент/белок (в/в) 15:1) в течение 30 мин при 4°C, далее разделяли в градиенте плотности йодиксанола (OptiPrep) («Sigma», США) (Белугин и др., 2010). Для создания 3-х ступенчатого градиента смешивали исходный 60 % раствор OptiPrep с 6-кратной средой суспендирования (1.8 М сахарозы, 3 mM ЭДТА, 30 mM бис трис пропан–Mes pH 7.2) в соотношении 1:5 (o/o). Далее, полученный 50% раствор OptiPrep разводили средой суспендирования для создания 20 % и 0 % (чистая среда суспендирования) ступеней градиента. После этого 0.8 мл солюбилизированной Тритоном X-100 фракции мембран (600 мкг белка) смешивали с 1.2 мл 50% раствора йодиксанола и помещали на дно центрифужной пробирки. Сверху наслаивали 2 мл 20 % раствора и 0.5 мл среды суспендирования, тем самым создавая 3-х ступенчатый (30 % – 20 % – 0 %) градиент плотности OptiPrep (рис. 7). Солюбилизованную плазмалемму разделяли с помощью однократного центрифугирования в роторе SW55Ti («Beckman», США) при 100000 g в течение 2 ч.

После центрифугирования отбирали фракции по 1 мл (рис. 7), с последующим определением в них содержания белка и стерина. Фракции под

OptiPrep, %



**Рис 7.** Схема отбора фракций солюбилизированной Тритоном X-100 плазмалеммы после разделения в градиенте плотности OptiPrep.

1 – 4 соответствуют фракциям с плотностями 1.079, 1.127, 1.156 и 1.185 г/см<sup>3</sup>. Фракции 3 и 4 принимали за детергент-устойчивую (R) и детергент-солюбилизированную (S) соответственно.

номером 1 и 2 с плотностями 1.08 и 1.13 г/см<sup>-3</sup> имели низкое содержание белка (следовые количества) и далее не использовались в анализе. Фракции 3 и 4 (с плотностями 1.15 и 1.18 г/см<sup>-3</sup>) принимали за детергент-устойчивую и детергент-солюбилизованную плазмалемму. Значения плотности растворов OptiPrep определяли по измерению коэффициента преломления и далее соотносили полученные данные с табличными значениями изготовителя.

### **2.11. Денатурирующий электрофорез мембранных белков в полиакриламидном геле**

Для того чтобы изучить характер распределения Н<sup>+</sup>-АТФазы между стерин-обогащенными и остальными доменами мембраны, фракции 3 и 4 сначала преципитировали в присутствии 10% ТХУ, а затем дважды отмывали раствором 1 М Трис до нейтральных значений рН. Преципитат растворяли в 2% ДДСNa. Содержание белка определяли с помощью Bicinchoninic Acid Kit («Sigma», США). Перед электрофоретическим разделением мембранных белков образцы смешивали с 2-кратным буфером для образцов (125 мМ Трис-НCl, 2% ДДСNa, 20% глицерин, 200 мМ ДТТ, 0.02% бромфеноловый синий) и проводили денатурацию белка при 56°С в течение 30 мин. После солюбилизации, белки разделяли в 10% ДДСNa-ПАА геле по методу (Laemmli, 1970) в камере Mini-protean 3 Cell («Bio-Rad», США) при постоянном напряжении 200 В в течение часа. На дорожку геля обычно наносили до 10 мкг белка. Молекулярную массу белков после электрофоретического разделения оценивали по стандартным маркерам Prestained SDS-PAGE Standarts («Bio-Rad», США). Для визуализации белков гели окрашивали в течение 12 ч в растворе коллоидного Кумасси, содержащего 0.25 % G250, 25 % этанол и 11.25 % ТХУ. После окрашивания гели отмывали горячей дистиллированной водой до прозрачного фона. Сканирование гелей осуществляли в проходящем свете на сканере EPSON Perfection V700 Photo.

## **2.12. Вестерн блот анализ H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы**

После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Super («Amersham», Великобритания), используя TransBlot SD transfer cell («BioRad», США) по методике (Towbin et al., 1979). Для этого мембрану и листы Whatman 3MM такого же размера замачивали в среде для переноса, содержащей 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 0.1% ДДСNa и 20% метанол, и осуществляли перенос в течение 2 ч при плотности тока 2 мА/см<sup>2</sup>. Затем мембрану блокировали в течение 1 часа в PBST, содержащем PBS («Sigma», США), 0.05% Tween 20 (в/о) и 2% (в/о) обезжиренное сухое молоко. После этого раствор заменяли на свежий, содержащий первичные антитела (иммуноглобулины IgG против H<sup>+</sup>-АТФазы) AS07 260 («Agrisera», Швеция), и инкубировали в течение 12 ч при 4°C. На следующий день мембрану отмывали от первичных антител в PBST и инкубировали с вторичными флуоресцеин-мечеными антителами («Медгамал», Россия) при комнатной температуре в течение 2 ч. После инкубации, мембрану отмывали в растворе PBST, а затем в PBS. Визуализацию флуоресцирующих полос, содержащих комплексы H<sup>+</sup>-АТФазы, проводили с помощью Typhoon Trio Plus («GE Healthcare», США) при длине волны возбуждающего света 488 нм и с узкополосным фильтром (526 SP). Полученные изображения анализировали с помощью программного обеспечения Image Quant 5.2.

## **2.13. Голубой нативный гель-электрофорез (BN-PAGE)**

Чтобы выяснить, как додецил мальтозид (ДДМ) влияет на степень олигомеризации H<sup>+</sup>-АТФазы в плазмалемме, мембраны в среде суспендирования предварительно солюбилизировали в присутствии 2% додецил мальтозида при 4°C в течение 30 мин, а затем к солюбилизату добавляли раствор Кумасси (750 мМ аминокaproновая кислота, 5 % G-250) в соотношении 1:30 (о/о). Электрофорез проводили в камере Mini-protean 3 Cell («Bio-Rad», США) в градиентном 4–13 % разделяющем геле при 4° С с постоянным перемешиванием анодного буфера, токе ~ 2 мА на гель и постепенном повышении напряжения от 100 до 350 В (Piotrovskii

et al., 2019). Катодный буфер содержал 50 мМ Трицин/15 мМ Бис Трис–HCl (pH 7.0) и 0.02 % G250, анодный – 50 мМ Бис Трис–HCl (pH 7.0) (Reisinger and Eichacker, 2008). После электрофореза гель с разделившимися белковыми комплексами вынимали из стекол, инкубировали 40 мин при комнатной температуре в буфере: 10 мМ CAPS–NaOH (pH 11.0) и 10 % метанол. В этом же буфере влажным способом белковые комплексы переносили на мембрану Hybond-P («Amersham», Великобритания) в течение 2 ч при 50 В и токе 150 мА в камере Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell («Bio-Rad», США). После переноса мембрану отмывали от Кумасси метанолом и затем блокировали в течение 1 ч в PBST, содержащем PBS («Sigma», США), 0.05% Tween 20 (в/о) и 2% (в/о) обезжиренное сухое молоко. Дальнейшую иммунодетекцию комплексов, содержащих H<sup>+</sup>-АТФазу плазмалеммы, проводили аналогично методике, указанной для денатурирующего электрофореза.

#### **2.14. Гидролитическая активность H<sup>+</sup>-АТФазы везикул плазмалеммы**

О гидролитической активности H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы судили по изменению количества окисленного НАДН в сопряженной АТФ-регенерирующей системе (Palmgren, 1990). В кювету спектофотометра Shimadzu UV-2700 (Япония) вносили среду, содержащую 10 мМ Mes–бис трис пропан (pH 6.5), 50 мМ KCl, суспензию везикул плазмалеммы (25–50 мкг/мл), 0.25 мМ НАДН, 1 мМ фосфоенолпируват, АТФ в диапазоне концентраций от 0.1 до 4 мМ, 2.5 мкл смеси ферментов пируваткиназы и лактатдегидрогеназы («Sigma», США) на мл пробы. Реакцию гидролиза АТФ инициировали внесением 5 мМ MgSO<sub>4</sub>.

Кинетику окисления НАДН по снижению абсорбции при длине волны 340 нм регистрировали одновременно для всех образцов, используя 8-позиционную кювету. Коэффициент молярной экстинкции НАДН, используемый при расчетах, составлял 6.2 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. Кинетические параметры гидролиза V<sub>max</sub> и K<sub>M</sub> оценивали путем нелинейной аппроксимации экспериментальных данных в программе

SigmaPlot 12.3, используя модель одиночной прямоугольной гиперболы по формуле  $V_o = V_{\max} [ATP] / ([ATP] + K_M)$ .

В экспериментах с додецил мальтозидом к везикулам добавляли 10% детергент в соотношении ДДМ/белок 7:1 (в/в) до внесения в измерительную кювету АТФ.

### **2.15. Измерение $H^+$ -транспортирующей активности $H^+$ -АТФазы плазмалеммы**

Протон-транспортирующую активность  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы оценивали, следя за АТФ-зависимым закислением везикул с помощью  $\Delta pH$  индикатора акридинового оранжевого (Ершов и др., 2005). Для этого акридин оранжевый в конечной концентрации 6 мкМ добавлялся в среду, содержащую 10 мМ Mes-бис трис пропан (pH 6.5), 300 мМ сахарозу, 50 мМ KCl, суспензию везикул (содержание белка 15–20 мкг/мл) и 1 мМ АТФ. Реакцию запускали внесением 2 мМ  $MgSO_4$  и сразу регистрировали снижение разности абсорбции pH индикатора при 492 и 540 нм в двухволновом режиме на спектрофотометре (Hitachi 557, Япония). Величину создаваемого трансмембранного градиента pH оценивали по степени его диссипации путем внесения в измерительную кювету грамицидина Д в концентрации 2 мкМ.

### **2.16. Генерация АТФ-зависимого трансмембранного потенциала ( $\Delta\psi$ ) везикулами плазмалеммы**

Способность везикул к формированию трансмембранного потенциала определяли с помощью измерения разности абсорбции флуоресцентного красителя – оксонола VI в двухволновом режиме (580-620 нм) на спектрофотометре Hitachi 557) (Япония) (Wielandt et al., 2016). Для этого в среду, содержащую 10 мМ Mes-бис трис пропан (pH 6.5), 300 мМ сахарозу, 1 мМ АТФ и везикулы плазмалеммы (25-50 мкг белка/мл), вносили 2 мкМ оксонол VI. Реакцию инициировали

добавлением 2 мМ MgSO<sub>4</sub>. Величину созданного градиента Δψ разряжали в присутствии 50 мМ KCl.

Оксонол VI сорбируется MβCD, что влияет на оптические свойства флуоресцентного индикатора. Поэтому везикулы плазмалеммы сначала инкубировали в присутствии олигосахарида, а потом отмывали от него и его комплексов со стеринами центрифугированием (100000 g, 30 мин).

### **2.17. Пассивная протонная проницаемость**

Для оценки пассивной проницаемости плазмалеммы для протонов использовали метод искусственной генерации градиента pH (Clerc and Barenholz, 1998), когда (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> в конечной концентрации 250 мМ добавляли к мембранным везикулам (3 мг белка/мл) в среде суспендирования на холоду и инкубировали в течение нескольких минут. После этого 50 мкл таких везикул переносили в измерительную кювету, содержащую 2 мл среды (10 мМ Mes-бис трис пропан (pH 6.5), 300 мМ сахарозу, 50 мМ KCl) и акридиновый оранжевый (6 мкМ), после чего регистрировали быстрое закисление люмена везикул, обусловленное выходом нейтрального NH<sub>3</sub> и последующую медленную релаксацию, характеризующую пассивную проницаемость везикул для протонов. Чтобы определить, влияет ли извлечение стерина на пассивную протонную проницаемость плазмалеммы, после снижения разности абсорбции акридинового оранжевого, MβCD в конечных концентрациях 2–10 мМ непосредственно вносили в измерительную кювету. Скорость диссипации искусственно созданного градиента ΔpH отражает величину пассивной протонной проницаемости мембраны везикул. Так как перенос протонов через плазмалемму происходит с участием вторично активных мембранных транспортеров, которые могут проявлять разную чувствительность к содержанию стерина, аналогичные эксперименты проводили в средах, содержащих вместо 50 мМ KCl эквимольные концентрации холин хлорида (непроникающий катион) или сульфата калия (непроникающий анион). Чтобы оценить влияние трансмембранного потенциала со знаком «+» внутри везикул на протонную



проницаемость плазмалеммы, сопряженную с транспортом  $\text{Cl}^-$ , использовали валиномицин в конечной концентрации 50 нМ.

### **2.18. Статистический анализ**

Анализ полученных данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), используя программное обеспечение Sigma Plot 12 (США). Все результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение (SD) от 3–5 независимых (выделение плазмалеммы) экспериментов. Различия считались достоверным при  $p \leq 0.05$ .

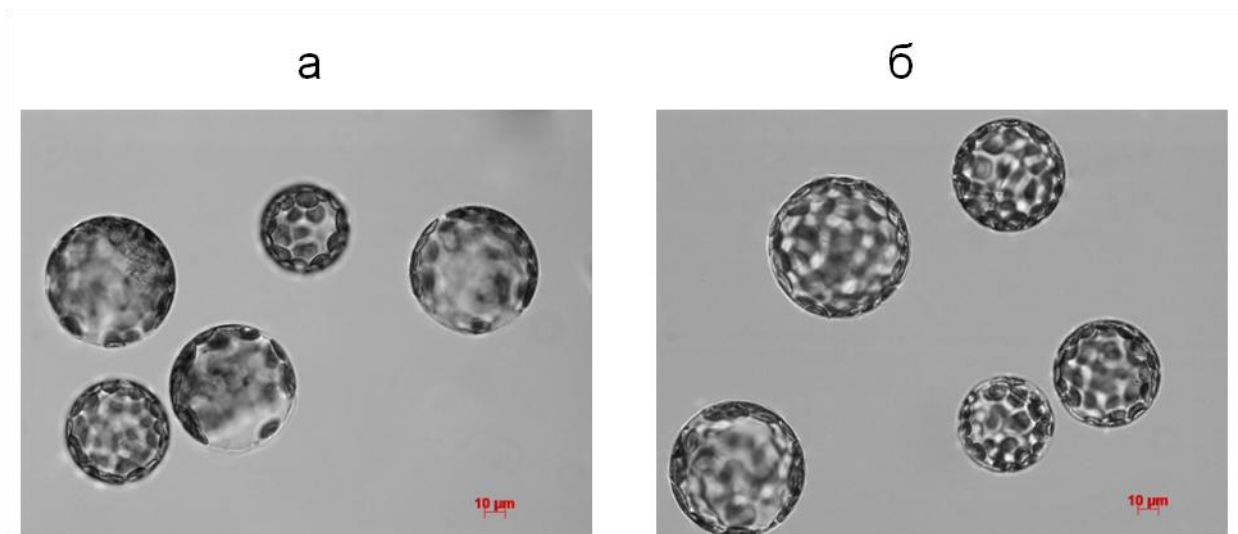
## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 3.1. Экстракция стеринов из протопластов мезофилла *Arabidopsis thaliana* L.

Суспензия протопластов является удобной модельной системой, позволяющей исследовать многие физиологические процессы на клеточном уровне. Метод «Tare *Arabidopsis sandwich*» с использованием клейких лент для удаления нижнего эпидермиса листа позволяет получить суспензию протопластов, практически лишенную механических воздействий, а также сократить время инкубации с ферментами до 40–60 мин (Wu et al., 2009). Во всех экспериментах по изучению роли стеринов и активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы использовали полученные таким образом протопласты.

Как уже упоминалось выше, М $\beta$ CD способен эффективно извлекать стерины из липидных бислоев, а конечный эффект зависит от концентрации олигосахаридов и количества клеток/везикул в растворе (Zidovetzki and Levitan, 2007). Экстракция стеринов из биологических мембран часто сопровождается изменением их водной/ионной проницаемости, а замещение стеринов молекулами воды приводит к нарушению плотности упаковки липидов в бислое в результате его обводненности и может отразиться на общей площади поверхности липидного матрикса (Mathai et al., 2008, Frallicciardi et al., 2022). На рисунке 8 представлены микрофотографии протопластов до и после их обработки 10 мМ М $\beta$ CD и проведена оценка начальных размеров клеток обеих суспензий (табл. 1). Видно, что внешний вид протопластов контрольного (рис. 8а) и опытного (рис. 8б) вариантов полностью идентичен, а статистический анализ показал, что их исходные размеры, выраженные через диаметр, не отличались. Снижение концентрации М $\beta$ CD до 5 мМ, или наоборот, увеличение до 20 мМ, также не сказывалось на размерах клеток. Поэтому можно сказать, что обработка

протопластов МβCD в диапазоне концентраций 5–20 мМ не влияла на их размеры и жизнеспособность.



**Рис. 8.** Контрольные (а) и обработанные 10 мМ МβCD (б) протопласты из мезофилла *Arabidopsis thaliana* L. Размеры для двух вариантов суспензий указаны в табл. 1.

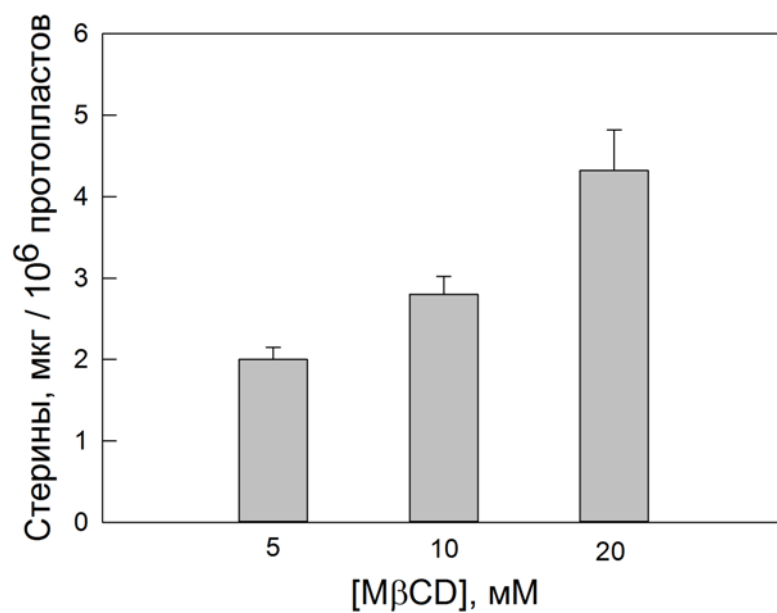
Чтобы оценить долю экстрагированных стероидов, протопласты инкубировали с различными концентрациями МβCD. После осаждения клеток определяли количество стероидов в супернатанте. При концентрации олигосахарида 20 мМ их доля в растворе составила  $4.32 \text{ мкг}/10^6$  протопластов, что в 2 раза больше, чем в случае 5 мМ (рис. 9). В качестве действующей оптимальной концентрации МβCD было выбрано значение в 10 мМ.

Для дополнительного подтверждения извлечения стероидов из плазмалеммы, проводили визуальную оценку протопластов с помощью NBD-холестерина, флуоресцентного аналога стероидов, полагая, что краситель легче встраивается в стерин-обедненные участки мембраны, о чем должно свидетельствовать разгорание зеленой флуоресценции. На микрофотографиях, представленных на рис. 10, параметр интенсивности флуоресценции у протопластов, обработанных 10 мМ МβCD, был в 2 раза выше, чем в контроле, что подтверждает данные об измерении извлеченных стероидов с использованием Amplex Red.

**Таблица 1.** Диаметры протопластов после извлечения стеринов в присутствии МβCD.

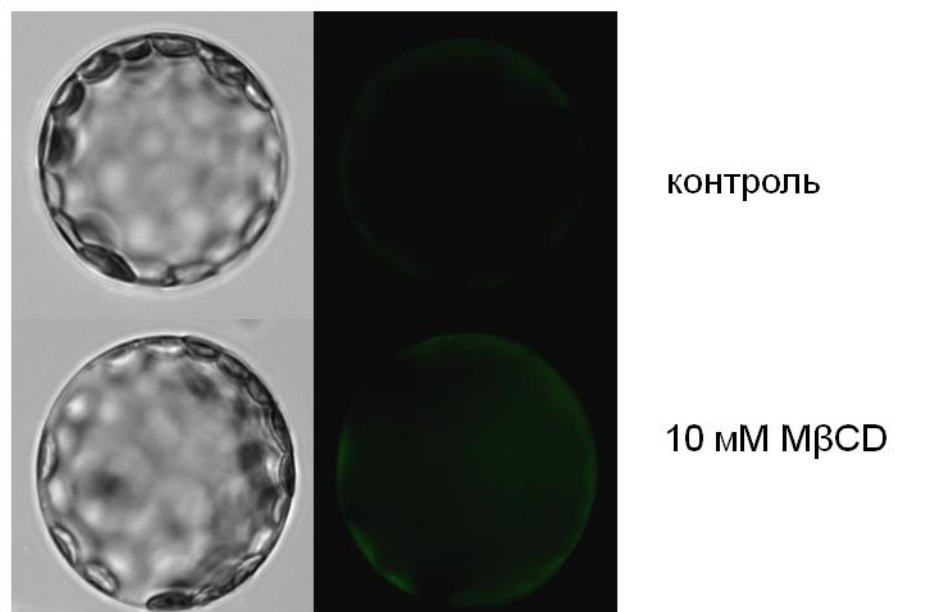
Вариант	Число протопластов	Диаметр, мкм
контроль	118	39.82 ± 6.45
10 мМ МβCD	110	41.22 ± 8.55

Протопласты инкубировали в изотонической среде с 10 мМ МβCD в течение 30 мин. Отмывку от МβCD и его комплексов со стеринами осуществляли с помощью однократного осаждения протопластов (100 г, 5 мин) и замены среды инкубации на свежую. Диаметры оценивали с помощью программы AxioVision 4.8. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.



**Рис. 9.** Оценка количества стерина, экстрагированного из протопластов.

Стерины определяли в среде инкубации после осаждения протопластов. Для этого использовали Amplex Red Cholesterol Assay Kit и калибровочную кривую зависимости интенсивности флуоресценции резорфуфина от концентрации холестерина, раствор которого использовали в качестве стандарта.

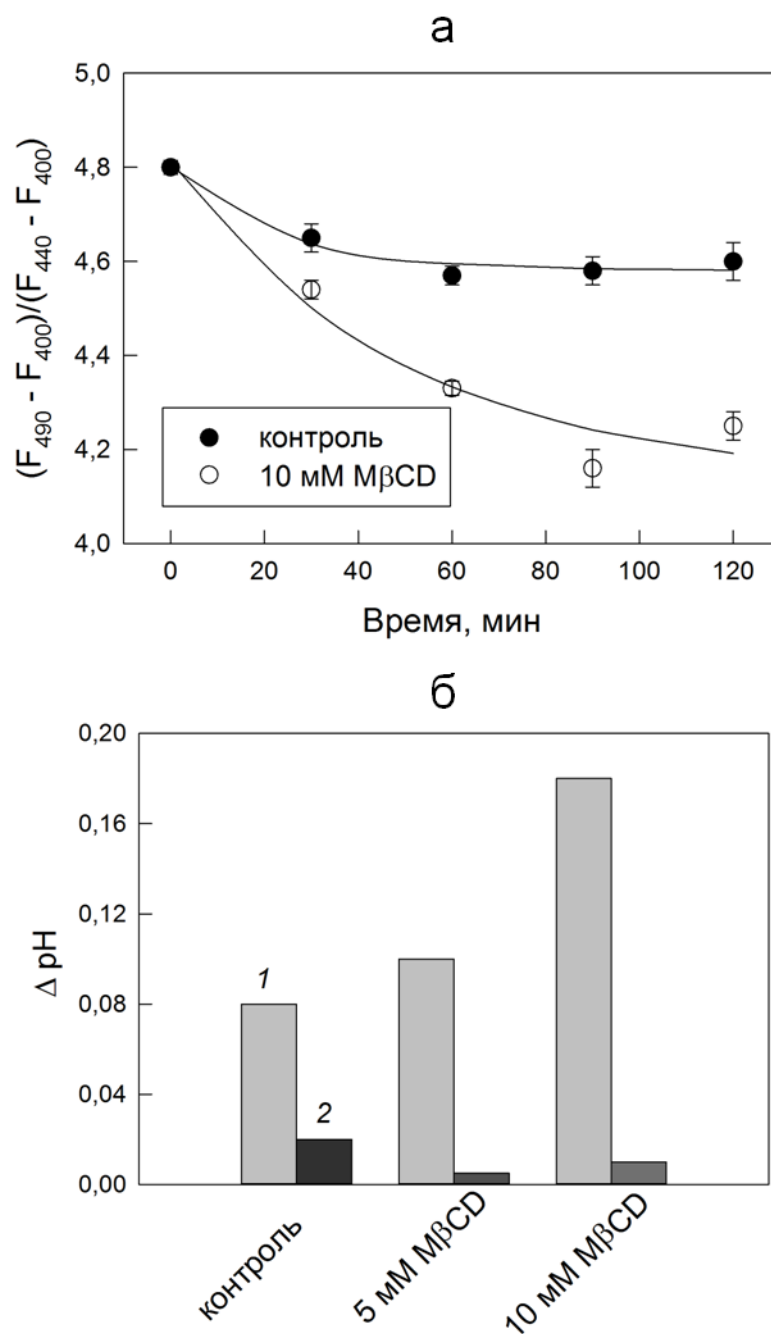


**Рис. 10.** Встраивание флуоресцентного аналога NBD-холестерина в конечной концентрации 20 мкМ в протопласты после извлечения стерина в присутствии МβСD.

Значения параметра интенсивности флуоресценции (СТСF) составили 27797137 и 61166371 рхs/протопласт в контроле и для 10 мМ МβСD соответственно. Для каждого варианта оценивали интенсивность флуоресценции не менее чем 10 индивидуальных протопластов.

### 3.2. Закисление среды протопластами: вклад $H^+$ -АТФазы плазмалеммы

Об эффективности протонного транспорта в данной модельной системе можно судить по закислению суспензией протопластов их буферного раствора в присутствии красителя карбоксифлуоресцеина, меняющего свою флуоресценцию в зависимости от рН среды. Протопласты, предварительно обработанные 5 и 10 мМ М $\beta$ CD соответственно, помещались в среду со значением рН=6.2 и регистрировали флуоресценцию рН-индикатора, отражающую изменения рН раствора, в течение 2 ч (рис. 11). Контрольная суспензия протопластов за 60 мин сдвигала величину рН среды с 6.2 до 6.08, при этом дальнейшее увеличение времени инкубации не имело какого-либо эффекта (рис. 11а). Протопласты, предварительно проинкубированные с 5 мМ М $\beta$ CD, имели близкую с контролем величину изменения  $\Delta$ рН (0.1 против 0.08 у контроля), однако обработка суспензии 10 мМ М $\beta$ CD приводила уже к более выраженному эффекту (рис. 11б), а значение  $\Delta$ рН в данном случае составляло 0.18 (т.е. рН среды после 2 ч инкубации составил 6.02 против изначального 6.2). Из литературы известно, что встраивание стеринов в протеолипосомы может сопровождаться усилением протонного транспорта и/или АТФазной активности, при этом эффекты, связанные с переносом  $H^+$ , как правило, наиболее выражены (Grandmougin-Ferjani et al., 1997). Кроме того, стоит отметить, что транспорт протонов через мембрану (и формирование величины  $\Delta$ рН) не может происходить без котранспорта соответствующих ионов (de Angeli et al., 2007), поэтому иногда полученные экспериментальные данные не обязательно могут свидетельствовать об увеличении активности  $H^+$ -АТФазы, а наблюдаемые эффекты возникают в результате изменения проницаемости мембраны для катионов и/или анионов (Felle, 2001; Geilfus, 2017). Чтобы удостовериться, что полученные нами результаты по закислению среды протопластами в ответ на извлечение стеринов, непосредственно связаны с активностью  $H^+$ -АТФазы, после переноса на новую среду во все образцы добавляли специфический ингибитор  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы – эритрозин В. Через час после внесения ингибитора все варианты



**Рис. 11.** Кинетика закисления среды протопластами (а) и изменение рН среды за 2 ч в ответ на извлечение стерина в присутствии МβCD (б).

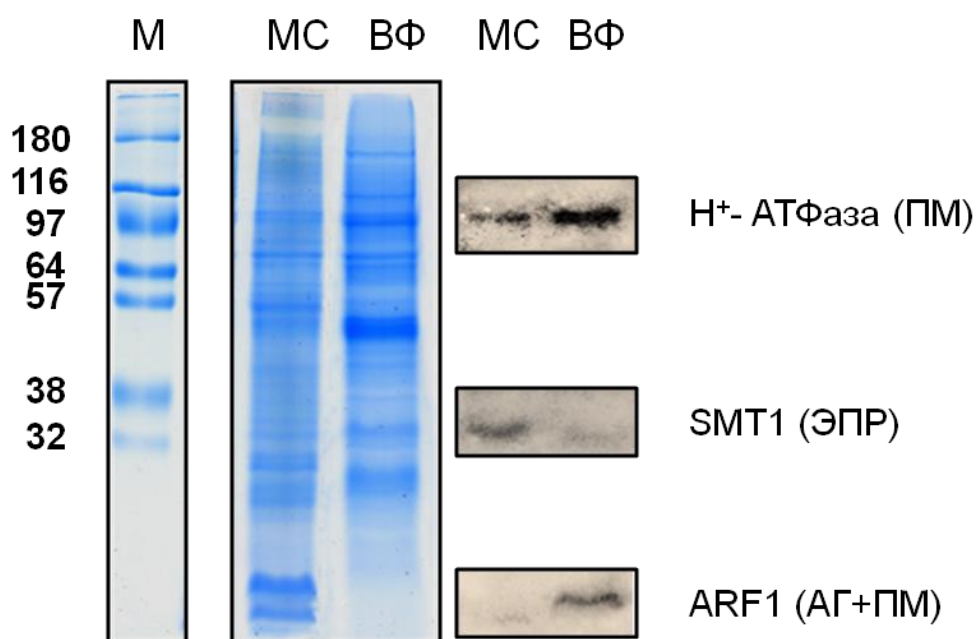
Протопласты, проинкубированные с 5 или 10 мМ МβCD, переносили на среду (рН = 6.2) с 1 мкМ карбоксифлуоресцеином. После осаждения протопластов флуоресценцию рН-индикатора в среде переводили в ΔрН. Вклад Н<sup>+</sup>-АТФазы проверяли путем добавления ко всем вариантам 20 мкМ эритрозина В на 15 мин с последующей отмывкой (1 – контроль; 2 – эритрозин В).



демонстрировали отсутствие изменений величины  $\Delta pH$ , и значения  $pH$  были близки к исходному буферу (рис. 11б). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что извлечение стерина у протопластов в присутствии 10 мМ M $\beta$ CD сопровождается усилением протонного транспорта через плазмалемму, и в данном процессе непосредственно принимает участие  $H^+$ -АТФаза плазмалеммы. В следующей части нашей работы для более подробного исследования обнаруженных эффектов была выбрана другая модельная система. – суспензия везикул плазмалеммы, изолированной из корней проростков гороха *Pisum sativum* L, позволяющая контролировать экспериментальные условия для изучения процессов, сопряженных с активным переносом протонов через мембрану.

### **3.3. Характеристика изолированной плазмалеммы, экстракция стерина и размеры везикул**

Получение фракции плазмалеммы путем разделения микросомальных мембран с использованием двухфазной полимерной системы декстран Т500 – ПЭГ 3500 является хорошо зарекомендовавшей себя методикой, позволяющей получить суспензию ПМ, практически лишенную мембран внутриклеточных компартментов (Larsson et al., 1994). Еще одним его преимуществом является то, что полученная суспензия содержит правильно ориентированные везикулы (цитоплазматической стороной внутрь), а после однократного цикла замораживания – размораживания можно получить суспензию, содержащей равную долю везикул, ориентированных цитоплазматической стороной внутрь и наружу. На рис. 12 представлены результаты электрофоретического разделения белков микросомальной (МС) и содержащей плазмалемму (ВФ) фракций в 12.5% ДДСNa-ПАА геле. Чистоту полученной фракции плазмалеммы оценивали с помощью вестерн блот анализа по характеру распределения первичных антител против основных маркерных белков клеточных мембран. Видно, что по сравнению с микросомальными мембранами, верхняя фаза была обогащена белком плазмалеммы –  $H^+$ -АТФазой Р-типа, а также



**Рис 12.** Иммунодетекция белков мембранных компартментов в микросомах (МС) и мембранах верхней фазы (ВФ) после их разделения в 12.5% ДДСNa-ПАА геле.

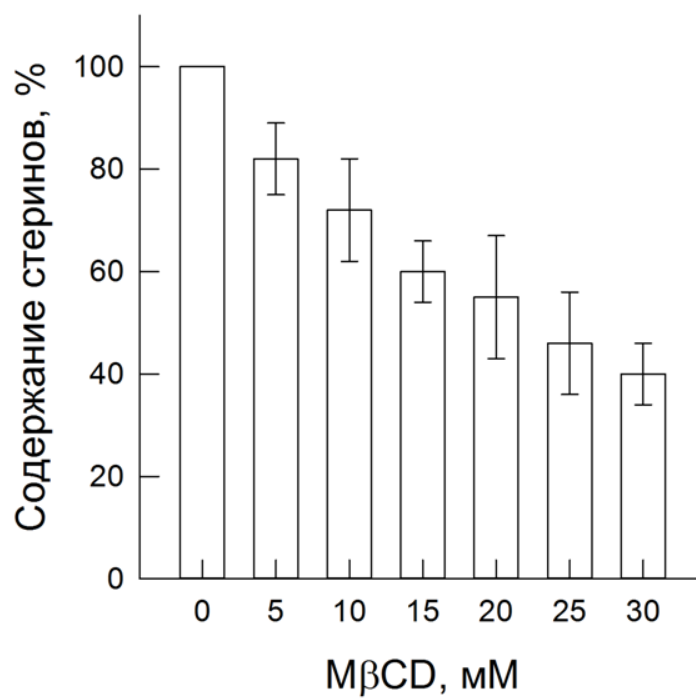
На дорожку наносили по 10 мкг мембранного белка. Для вестерн-блот анализа использовали первичные антитела против H<sup>+</sup>-АТФазы (~ 95 кДа), стерилметилтрансферазы SMT1(~ 38 кДа) и фактора АДФ-риболизирования 1 ARF1 (~ 21 кДа). Визуализацию осуществляли с помощью вторичных флуоресцеин-меченных антител. М – белковые маркеры в кДа.

белком везикулярного транспорта – малой ГТФазой (ARF1), но значительно обеднена маркером эндоплазматического ретикулума – стерилметилтрансферазой (SMT1).

Ранее было показано, что в ВФ не выявляется активность цитохром С оксидазы (маркера внутренней мембраны митохондрий) и примерно в 8–10 раз ниже активность нитрат-зависимого гидролиза АТФ – маркера тонопласта. Кроме того, полученная таким способом фракция плазмалеммы содержит низкую примесь ЭПР и была использована во всех последующих экспериментах.

Для того, чтобы оценить долю экстрагированных стеринов, везикулы осаждали центрифугированием в средах, содержащих разные концентрации М $\beta$ CD, и определяли в них остаточное содержание стеринов. На рис. 13 представлены данные о содержании стеринов в плазмалемме после их обработки в присутствии М $\beta$ CD. В исходной плазмалемме содержание стеринов составило  $85.6 \pm 8.6$  мкг/мг белка и постепенно снижалось после обработки, достигая практически 50 % от начального уровня в контрольной суспензии плазмалеммы при ее инкубации с 30 мМ М $\beta$ CD.

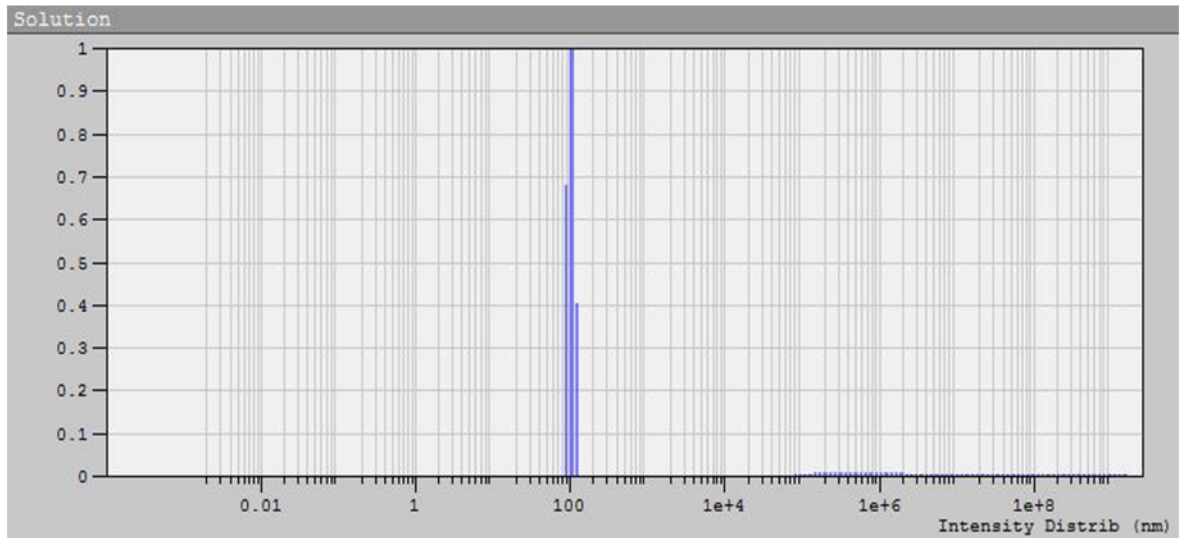
Известно, что физико-химические свойства мембраны зависят от ее липидного состава. Таким образом, извлечение стеринов в присутствии М $\beta$ CD может приводить к изменению таких важным параметров бислоя, как плотность упаковки липидов, его оводненность, а также фазовое состояние (McMullen et al., 2004; Frallicciardi et al., 2022). Такие эффекты, в конечном счете, могут сопровождаться увеличением общей площади поверхности мембраны и влиять на транспортные процессы с участием воды и ионов (Gensure et al., 2006). Чтобы проверить, способно ли извлечение стеринов приводить к изменению размеров везикул, суспензию предварительно обрабатывали в присутствии 10 мМ М $\beta$ CD, а затем регистрировали корреляционную функцию флуктуаций рассеянного света в суспензии везикул. Результаты ее обработки представлены на рис. 14. В данном случае размеры частиц, выраженные как радиус везикул, в обоих вариантах составляли около 95 нм и практически не различались (табл. 2). Любопытно, что в



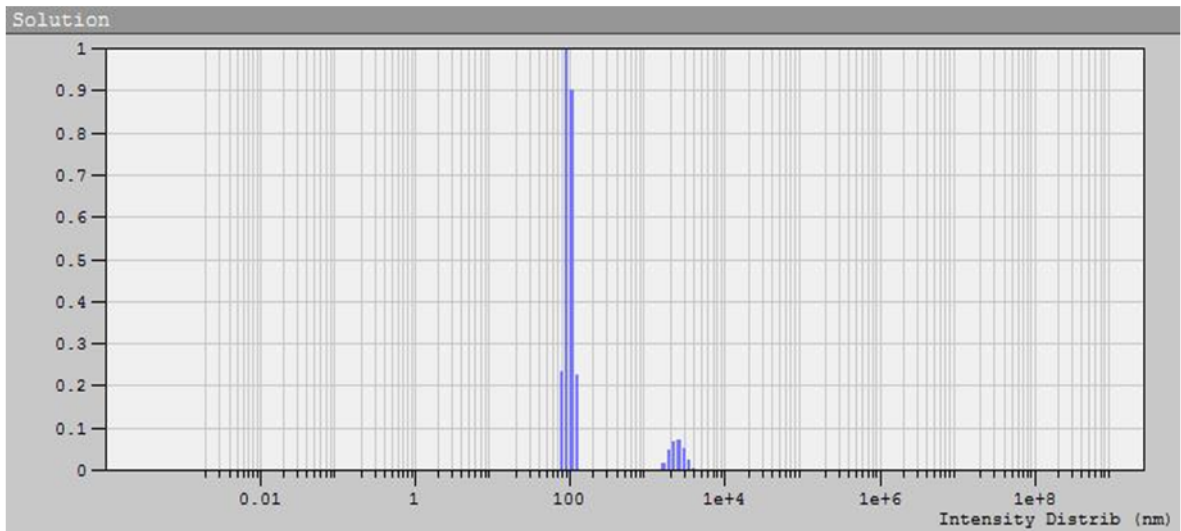
**Рис. 13.** Содержание стерина в плазмалемме при их извлечении MβCD.

100% соответствует содержанию стерина в исходной плазмалемме и составляет  $85.6 \pm 8.6$  мкг/мг белка.

а



б



**Рис. 14.** Распределение везикул плазмалеммы по размерам в отсутствие (а) и в присутствии 10 мМ МβСD (б) согласно данным динамического светорассеивания. Значения радиусов везикул представлены в табл. 2.

**Таблица 2.** Размеры везикул плазмалеммы после обработки МβCD.

Вариант	Площадь пика, отн. ед.	Радиус, нм
контроль	1	95.7±28.6
10 мМ МβCD	0.892	97.16±12.6
	0.102	2415±499

Значения радиусов частиц представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

в случае суспензии, обработанной 10 мМ МβCD, наблюдалось присутствие частиц размером порядка 2 мкм, что, по всей видимости, соответствует агрегатам МβCD, содержащих экстрагированные стеринны (рис. 14б).

#### **3.4. Влияние МβCD на содержание Н<sup>+</sup>-АТФазы в детергент-устойчивых и детергент-солюбилизированных фракциях плазмалеммы**

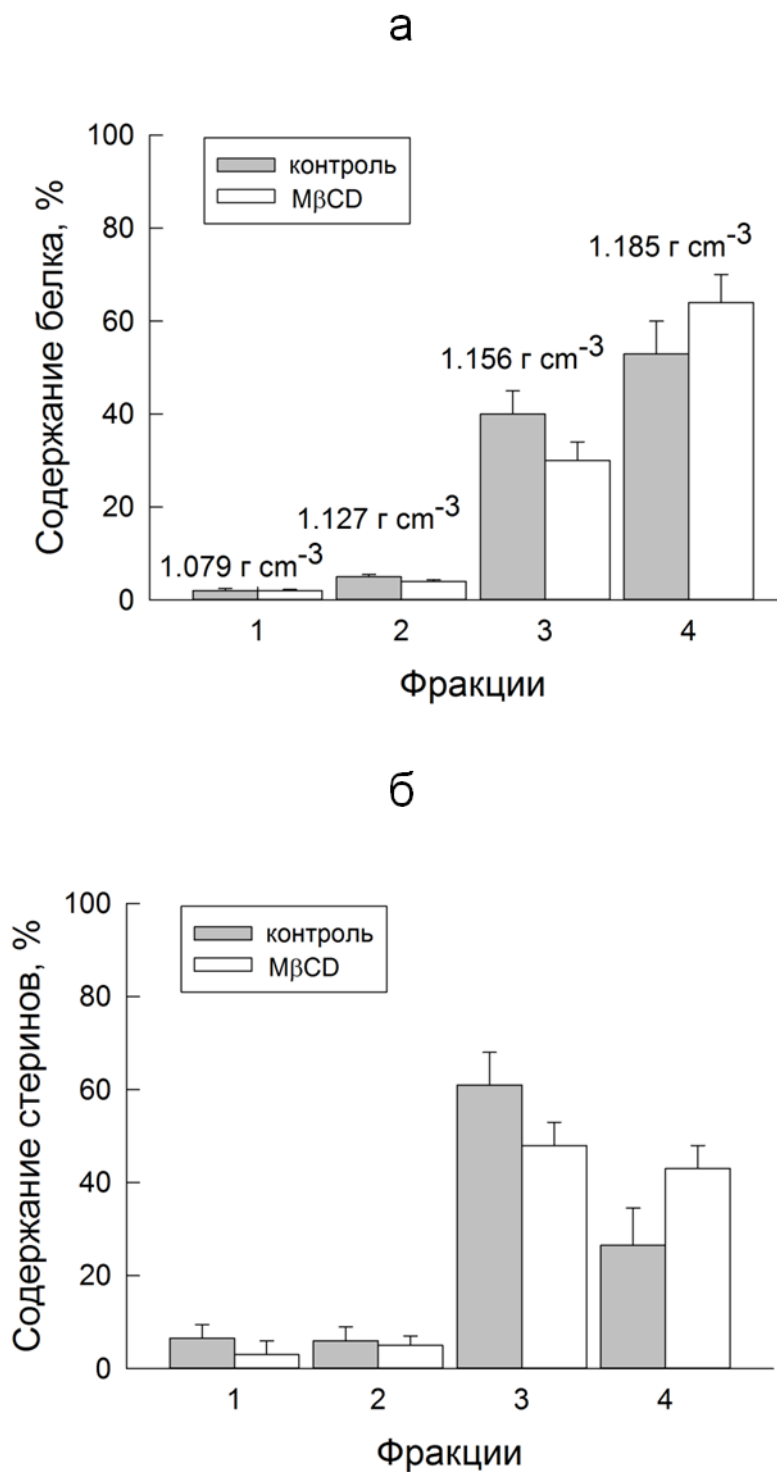
После того, как гипотеза о липидных рафтах получила свое широкое распространение и стала рассматриваться исследователями как современная модель, описывающая строение биологических мембран, стали активно проводиться исследования в области протеомного анализа этих участков мембраны (Mongrand et al., 2004; Morel et al., 2006; Minami et al., 2009). При изучении свойств белков, обладающих высоким сродством к стерин-богатым доменам, было получено много экспериментальных данных, свидетельствующих, что функциональная активность белков-транспортёров, каналов, а также белков, участвующих в передаче сигнала, способна изменяться в зависимости от их липидного окружения. Несмотря на то, что молекулярные механизмы, лежащие в основе такого липид-белкового взаимодействия, остаются до конца не выяснены, в литературе существует достаточно данных, показывающих, что нарушение структуры мембранных микродоменов может приводить как к изменению функциональной активности самого белка, так и к его содержанию в мембране (Meza et al., 2020; Martinière and Zelazny, 2021). Так как с рафтами ассоциируются получаемые экспериментально обогащенные стеринами и сфинголипидами детергент-резистентные фракции плазмалеммы, то исследование их белкового состава позволяет судить о том, локализован ли белок, которым мы интересуемся, гетерогенно в мембранной плоскости. В литературе есть данные о том, что растительная Н<sup>+</sup>-АТФаза Р-типа обнаруживается в стерин богатых доменах (Furt et al., 2007). Чтобы проверить данную гипотезу, были получены детергент-устойчивые образцы плазмалеммы с помощью фракционирования в градиенте плотности OptiPrep, а также использована предварительная обработка плазмалеммы МβCD, чтобы выяснить,

влияет ли извлечение стерина на характер распределения Н<sup>+</sup>-АТФазы между мембранными доменами с разным липидным составом.

Для получения детергент-устойчивых фракций обычно используют разделение в градиенте плотности сахарозы предварительно солюбилизированной в присутствии 1% Тритона X-100 плазмалеммы (Lingwood and Simons, 2007). Таким способом были получены и охарактеризованы детергент-устойчивые мембраны из многих видов растений, например, табак, *Arabidopsis thaliana*, лук-порей, люцерна, картофель, рис и другие (Takahashi et al., 2013). Использование вместо сахарозы менее вязкого раствора йодиксанола позволяет значительно сократить по времени процедуру фракционирования солюбилизированной плазмалеммы. Исходя из литературных данных, обычно плотность детергент-устойчивых фракций плазмалеммы растений соответствует значениям в диапазоне от 1.12 г/см<sup>3</sup> до 1.17 г/см<sup>3</sup>.

На рисунке 15 отображены результаты отбора фракций солюбилизированной плазмалеммы после разделения в градиенте OptiPrep. Значения плотности отобранных фракций после флотации контрольной и обработанной 10 мМ МβCD солюбилизированной плазмалеммы составили 1.079, 1.127, 1.156 и 1.185 г/см<sup>3</sup> соответственно. Первые две фракции с плотностью 1.079 и 1.127 г/см<sup>3</sup> практически не содержали белка, поэтому не использовались в последующем анализе (рис. 15а). Фракция 3 соответствует детергент-устойчивым фракциям плазмалеммы и обогащена стеринами (рис. 15б), в то время как фракция 4 содержит солюбилизированные белки. Отношение стерин/белок в 3 фракции было выше в 3–4 раза по сравнению с фракцией 4, в которой, однако, оказывалось больше половины внесенного в градиент OptiPrep мембранного белка. При обработке мембран 10 мМ МβCD, приводящей к экстракции стерина (рис. 13), наблюдалось увеличение доли солюбилизированного белка во фракции 4 (рис 15а). Это может быть следствием того, что экстракция стерина вызывает нарушение структуры мембранных нано/микродоменов (или их слияние), что, в свою очередь приводит к перераспределению белков между детергент-устойчивыми и



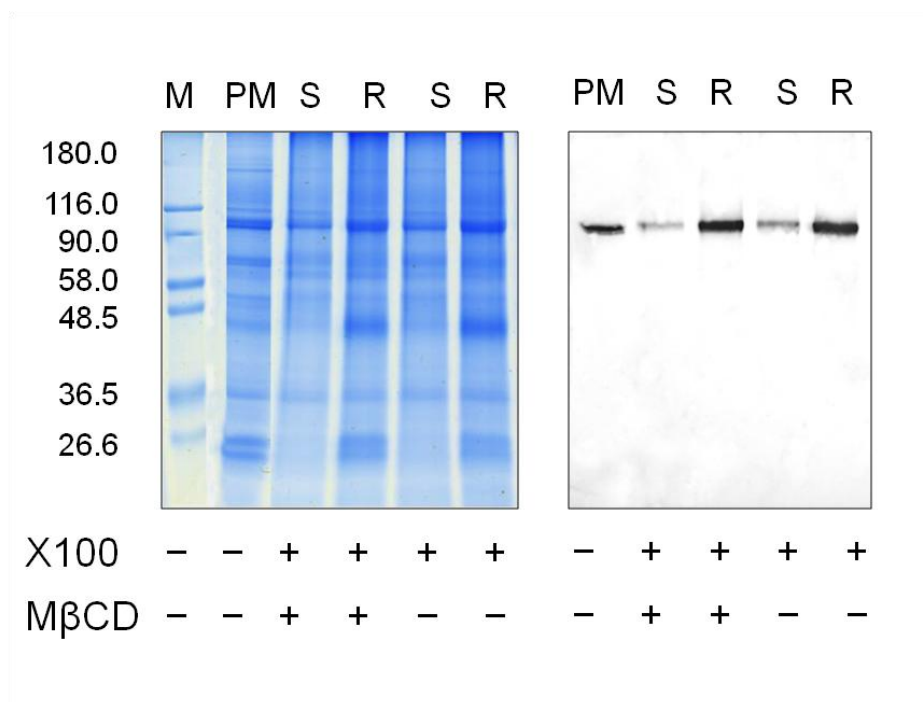


**Рис. 15.** Влияние МβCD на распределение белков (а) и стерина (б) между солубилизованными Тритоном X-100 фракциями плазмалеммы, разделенными в градиенте плотности OptiPrep. За 100 % принимали суммарное количество белка и стерина, собранных из одной центрифужной пробирки. Обработка плазмалеммы 10 мМ МβCD осуществляли перед добавлением Тритона X-100.

солюбилизированными фракциями плазмалеммы. При этом содержание стерина между фракциями 3 и 4 в присутствии МβCD выравнивалось (рис 15б). По всей видимости, сегрегация стерина в липидном бислое зависит от их содержания в мембране. Уменьшение общей доли стерина под действием МβCD может приводить к снижению их сегрегации и взаимодействия со сфинголипидами в присутствии Тритона X-100.

Для того чтобы оценить характер распределения H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы между детергент-устойчивой (3) и солюбилизированной (4) фракциями, белки подвергали денатурирующему электрофорезу с последующей иммунодетекцией H<sup>+</sup>-АТФаз с помощью вестерн блот анализа. Результаты представлены на рисунке 16. Видно, что H<sup>+</sup>-АТФаза, мономер которой соответствует молекулярной массе примерно 100 кД, одновременно выявлялся как в детергент-устойчивой (R), так и в детергент-солюбилизируемой (S) фракциях плазмалеммы, а ее содержание было выше во фракции 3. При этом экстракция стерина в присутствии МβCD увеличивала долю общего солюбилизированного белка (рис. 15а), но не приводило к выравниванию содержания H<sup>+</sup>-АТФазы между фракциями S и R (рис. 16). Такой эффект можно объяснить тем, что в клетках многие белки, обладающие средством к стерину/сфинголипид богатым доменам, принадлежат к так называемой «динамической» группе этой системы, то есть они часто проявляют гетерогенное распределение в бислое и изменяют свое содержание в микродоменах только под действием стимулов (Morel et al., 2006; Minami et al., 2009). К такой группе относятся белки, участвующие в передаче сигналов, многие белки канального типа, а также транспортеры. Напротив, постоянные резиденты рафтов, такие как реморины, флотилины, GPI-заякоренные белки, а также белки, участвующие в метаболизме клеточной стенки и везикулярном транспорте, как правило, не меняют характер своего распределения в мембранной плоскости и всегда являются компонентами стерин/сфинголипид богатых доменов (Kierszniowska et al., 2009).

H<sup>+</sup>-АТФаза плазмалеммы представляет собой белок-транспортер, обеспечивающий формирование градиента ΔμH<sup>+</sup>, энергия которого



**Рис. 16.** Влияние MβCD на распределение белков (слева) и H<sup>+</sup>-АТФаз (справа) между детергент-устойчивой (R) и солюбилизированной Тритоном X-100 (S) фракциями плазмалеммы после их разделения в градиенте плотности OptiPrep. Обработку везикул 10 мМ MβCD проводили перед добавлением к ним Тритона X-100. R и S соответствуют фракциям 3 и 4 из рисунка 15. PM – плазмалемма. M – белковые маркеры в кДа.

трансформируется в реакциях вторичного транспорта ионов и метаболитов. Не исключено, что, как и в случае других мембранных транспортеров (KAT1, PIP, SLAH3, PIN и других), ее повышенное сродство к стерин-богатым доменам имеет физиологический смысл. Было показано, что содержание многих каналов и транспортеров в плазмалемме меняется под действием внешних факторов (Homann and Thiel, 2002; Li et al., 2011; Demir et al., 2013; Wang et al., 2013), и, тем самым, влияя на активность транспортных процессов. Например, в работе (Minami et al., 2009), где проводилось закаливание растений *Arabidopsis* при низких температурах, протеомный анализ детергент-устойчивых мембран показал, что содержание в них H<sup>+</sup>-АТФаз, аквапоринов, а также белков везикулярного трафика значительно увеличивался по сравнению с контролем. Учитывая, что плотность многих протеинкиназ и протеинфосфатаз также повышена в мембранных микродоменах, где они способны изменять функциональную активность белков-мишеней, нельзя исключить похожий механизм и в случае Р-типа H<sup>+</sup>-АТФазы. Так было показано, что рецептор brassinosterоидов BRI1 может непосредственно взаимодействовать с АНА1 у *Arabidopsis*, приводя к активации помпы и гиперполяризации плазмалеммы (Minami et al., 2019).

### **3.5. Влияние стеринов на гидролитическую активность H<sup>+</sup>-АТФазы плазмалеммы**

Несмотря на то, что за последнее время были достигнуты большие успехи в области изучения молекулярных механизмов регуляции активности H<sup>+</sup>-АТФазы Р-типа (в частности, были идентифицированы многие аминокислотные остатки, являющиеся мишенями для различных протеинкиназ и протеинфосфатаз), роль липидного окружения в модуляции активности этих белков остается не ясной, так как зачастую полученные экспериментальные данные носят противоречивый характер (Habeck et al., 2014; Morales-Cedillo et al., 2015; Hossain and Clarke, 2019). Различные стерины способны по-разному влиять на активность этих ферментов, более того, конечный результат вообще зависит от вида Р-типа АТФаз. Как

показали исследования,  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы Р-типа из семейства SERCA вообще не чувствительны к содержанию стеринам (Cheng et al., 1986). Эксперименты, выполненные на реконструированной в липосомы  $\text{H}^+$ -АТФазой, хотя и позволяют оценивать влияние липид-белковых взаимодействий на кинетические параметры протонных помп, однако не способны в полной мере отражать процессы, имеющие место *in vivo* (Grandmougin-Ferjani et al., 1997). Кроме того, интерпретация полученных результатов осложняется тем фактом, что при изучении роли липидного окружения в отношении  $\text{H}^+$ -АТФаз необходимо учитывать, что экстракция стеринам может вызывать изменения не только кинетических параметров гидролиза АТФ и скорости активного протонного транспорта, но и усиливать протонные утечки, а также затрагивать функциональную активность ионных каналов и транспортеров, активность которых связана с  $\Delta\mu\text{H}^+$  (Gensure et al., 2006; Levitan et al., 2014).

При изучении роли липидного окружения в модуляции активности  $\text{H}^+$ -АТФазы Р-типа были использованы изолированные везикулы, обработанные М $\beta$ СD для изменения содержания стеринам в плазмалемме. Несмотря на то, что везикулы являются относительно простой модельной системой, как минимум два возможных механизма, каким образом извлечение стеринам может влиять на активный протонный транспорт были проверены. Во-первых, на одном и том же препарате плазмалеммы и в соответствующем концентрационном диапазоне М $\beta$ СD была определена активность  $\text{H}^+$ -АТФазы в отношении гидролиза АТФ, а во-вторых, оценено влияние стеринам на формирование и диссипацию  $\Delta\mu\text{H}^+$ .

Из данных литературы известно, что диффузия стеринам между липидным бислоем и гидрофобной полостью М $\beta$ СD может происходить в обоих направлениях (Zidovetzki and Levitan, 2007), поэтому в первой серии экспериментов по оценке  $\text{H}^+$ -транспортирующей и гидролитической активности  $\text{H}^+$ -АТФазы плазмалеммы, М $\beta$ СD непосредственно вносили в измерительную кювету. Кинетические параметры гидролиза, такие как  $V_{\text{max}}$  и  $K_{\text{M}}$ , отражают функциональное состояние фермента, а их изменение свидетельствует об

активации или ингибирования активности белка. Анализ кинетических кривых гидролиза АТФ с использованием сопряженной системы НАДН/АТФ показал, что изменение  $V_{\max}$ , характеризующая скорость оборачиваемости белка, выросла при внесении М $\beta$ CD до 10 мМ, при этом величина  $K_M$ , отражающая сродство фермента к субстрату, не менялась (табл. 3). Отсутствие изменений в параметре  $K_M$  говорит о том, что в данной системе не происходит непосредственной активации фермента при экстракции стерина. С другой стороны, низкие значения  $K_M$  ( $\sim 0.2$  мМ) могут

**Таблица 3.** Кинетические параметры гидролиза АТФ везикулами плазмалеммы в присутствии М $\beta$ CD.

М $\beta$ CD, мМ	$K_M$ , мМ	$V_{\max}$ , мкмоль АТФ $\text{мг}^{-1}$ белка $\text{мин}^{-1}$
0	$0.220 \pm 0.07$	$0.82 \pm 0.01$
2	$0.198 \pm 0.05$	$0.83 \pm 0.03$
5	$0.188 \pm 0.04$	$1.18 \pm 0.04$
10	$0.204 \pm 0.08$	$1.32 \pm 0.05^*$
15	$0.192 \pm 0.07$	$0.70 \pm 0.02$

Измерения проводили в среде, содержащей 50 мМ КСl и М $\beta$ CD в конечных концентрациях от 0 до 15 мМ. Данные приведены в виде средних значений  $\pm$  стандартное отклонение для суспензий везикул, полученных в трех независимых выделениях плазмалеммы. \* указывает на достоверность различий  $V_{\max}$  ( $p \leq 0.05$ ).

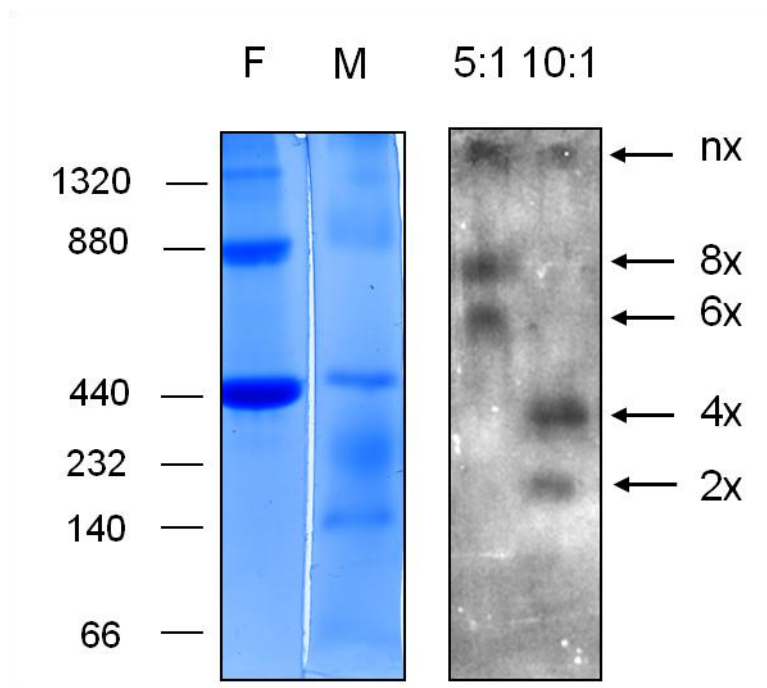
свидетельствовать об уже активном его состоянии, когда сродство  $\text{H}^+$ -АТФазы к АТФ достаточно высоко, и помпа находится в активированном состоянии. Например, в работе (Wielandt et al., 2015) экспрессированная в клетках дрожжей АНА2 имела величину  $K_M$  порядка 1.2 мМ, но в присутствии

лизофосфатидилхолина  $K_M$  падала до 0.2 мМ, а рН оптимум смещался в щелочную область.

### **3.6. Влияние додецил мальтозида на активность и олигомеризацию $H^+$ -АТФазы плазмалеммы**

В наших предыдущих экспериментах для солюбилизации мембранного материала с последующей визуализацией  $H^+$ -АТФазы был использован ионный детергент ДДСNa, который способен нарушать белок-липидные и белок-белковые взаимодействия, в результате чего  $H^+$ -АТФаза визуализируется с помощью иммунодетекции в виде мономеров массой 100 кД (рис. 12 и 16). Солюбилизация плазмалеммы в присутствии неионного детергента – додецил мальтозида (ДДМ), напротив, позволяет сохранить белок-белковые взаимодействия и не извлекать так называемые интегральные липиды, расположенные между субъединицами белка и попадающие на стадии его биосинтеза в ЭПР (Reisinger and Eichacker, 2008). Из данных литературы известно, что  $H^+$ -АТФаза, солюбилизированная ДДМ и реконструированная в нанодиски, обладает активностью в мономерной форме, но при нативном разделении обычно выявляется как набор олигомеров разного порядка (Justesen et al., 2013). Однако в литературе присутствует и другая точка зрения о том, что активация фермента происходит в его гексамерном комплексе (Kanczewska et al., 2005). Как было показано в работе Kanczewska с соавторами, взаимодействие дрожжевой  $H^+$ -АТФазы РМА2, очищенной из обработанных фузикоцином клеток ВУ2, с 14-3-3 белками сдвигает молекулярную массу комплекса в полосу геля, соответствующую гексамеру. Только в этой полосе выявлялись как фосфорилирование самого фермента по предпоследнему треонину, так и мембрансвязанные 14-3-3 белки.

На рисунке 17 приведены данные о размерах, содержащих  $H^+$ -АТФазу мультибелковых комплексах плазмалеммы, разделенных BN-PAGE после солюбилизации ДДМ при разном соотношении детергент/белок. Во всех случаях наблюдалось наличие высокомолекулярного комплекса, превышающего тетрамер



**Рис. 17.** Влияние солюбилизации плазмалеммы додецил мальтозидом при разном соотношении детергент/белок на размеры комплексов, содержащих  $H^+$ -АТФазу. Суспензия мембранных везикул была солюбилизирована при соотношении детергент/белок (в/в) 5:1 и 10:1 соответственно. Стрелками указано примерное количество субъединиц  $H^+$ -АТФазы в белковых комплексах, полученных с помощью вестерн-блот анализа. М – белковые маркеры (НМВ) для BN-PAGE (Amersham, США) и F – ферритин в кДа.



ферредоксина 1320 кД. Похожие олигомеры также были обнаружены в случае дрожжевой  $H^+$ -АТФазы РМА1 (Lee et al., 2002). Было показано, что такие комплексы образуются на стадии синтеза и последующей олигомеризации мономеров белка в единый комплекс в ЭПР, а весь процесс зависит от биосинтеза церамидов. Если же синтез сфинголипидов был нарушен, РМА1 обнаруживалась в мембране только в виде мономера. Кроме того, белок Gasp1, имеющий фосфатидилинозитольный якорь и являющийся типичным маркером микродоменов, оказывался неспособным транспортироваться из ЭПР в АГ, что в свою очередь сильно снижало стабильность РМА1 в плазматической мембране. Эти данные позволяют сделать вывод, что липидное окружение белков на стадии сборки *de novo* является существенным условием их корректной локализации и олигомеризации в плазматической мембране. Эти результаты также хорошо согласуются с тем фактом, что у клеток дрожжей роль сфинголипидов (в отличие от клеток животных и растений, где преобладающую роль отдают стеринам) в формировании мембранных микродоменов имеет фундаментальное значение, и так как РМА1 является «рафтовым» белком, значимость церамидов в ее жизненном цикле не вызывает сомнений (Malinsky et al., 2013).

Если отношение детергент/белок составляло 5:1, то комплексы, с которыми реагировали антитела, располагались как две полосы ниже маркера 880 кД. При увеличении отношения детергент/белок (10:1) в образце выявлялись две полосы с молекулярными массами в диапазоне 232 и 440 кД (рис. 17). Таким образом можно сказать, что увеличение содержания ДДМ в пробе сильно влияло на диапазон разделенных BN-PAGE полос, содержащих АТФазу. Такая особенность может свидетельствовать об отсутствии жестких взаимодействий между мономерами в мультибелковых комплексах и предположить роль сфинголипидов, которые способны извлекаться ДДМ, для олигомеризации фермента (Lee et al., 2002).

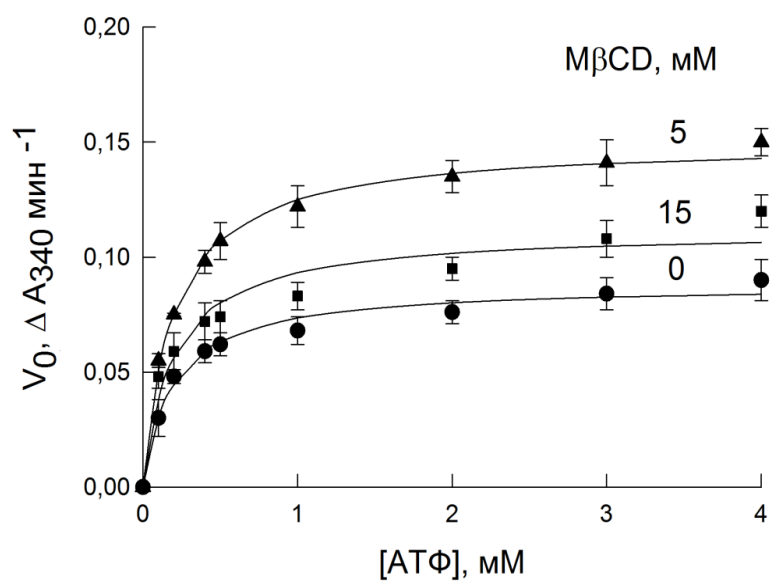
Известно, что детергенты в большинстве случаев оказывают стимулирующее воздействие на гидролитическую активность  $H^+$ -АТФаз, что не удивительно, так как будучи по своей природе амфипатическими молекулами, они способны

нарушать барьерные свойства мембран, тем самым обеспечивая повышенный доступ фермента к АТФ, а ингибиторные свойства детергентов проявляются только при их избыточно-высоких концентрациях. Ранее было показано, что неионный детергент ДДМ при солюбилизации мембранного материала сохраняет структурную и конформационную целостность  $H^+$ -АТФазы, при этом освобождая ее от нативного липидного окружения, включающего и аннулярные липиды (Sandstrom and Cleland, 1989). Из рисунка 18 видно, что в отсутствие додецил мальтозида сохранялась нелинейная зависимость скорости гидролиза от содержания стерина в плазмалемме. Однако при удалении липидного окружения, вызванного солюбилизацией мембранного материала с помощью ДДМ, происходило почти двукратное усиление гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы, и все варианты (после их обработки М $\beta$ СD) демонстрировали практически одинаковые значения  $V_{max}$ . (табл.4). При этом величины  $K_M$

**Таблица 4.** Кинетические параметры гидролиза АТФ везикулярной и солюбилизированной в присутствии додецил мальтозида (ДДМ) фракции плазмалеммы с разным содержанием стерина.

М $\beta$ СD, мМ	Стерины мкг/мг <sup>-1</sup> белка	$K_M$ мМ <sup>-1</sup>		$V_{max}$ мкмоль АТФ мг <sup>-1</sup> белка мин <sup>-1</sup>	
		- ДДМ	+ ДДМ	- ДДМ	+ ДДМ
0	85 ± 8.6	0.196 ± 0.03	0.201 ± 0.02	0.73 ± 0.02	1.19 ± 0.03*
5	65.5 ± 9.4	0.200 ± 0.04	0.219 ± 0.03	1.21 ± 0.03*	1.27 ± 0.05*
15	38.4 ± 8.2	0.215 ± 0.03	0.197 ± 0.03	0.93 ± 0.03	1.17 ± 0.03*

Перед внесением АТФ в измерительную кювету добавляли ДДМ в соотношении детергент/белок (7:1). \* обозначает различия ( $p \leq 0.05$ ) с плазмалеммой с исходным содержанием стерина.



**Рис. 18.** Концентрационная зависимость скорости гидролиза АТФ везикулами плазмалеммы с разным содержанием стерина.

Суспензия плазмалеммы была проинкубирована в присутствии МβСD и отмыта от МβСD/стерин комплексов однократным центрифугированием (30 мин, 100000 g).

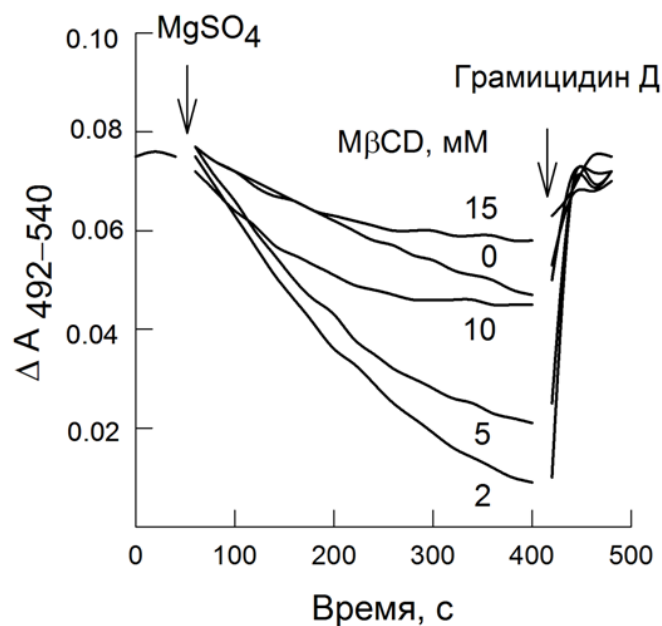
не изменялись. Эти эффекты можно объяснить следующим образом. По всей видимости, аннулярные липиды (а именно стеринны), которые полностью извлекаются ДДМ, играют важную роль в поддержании конформационной подвижности  $H^+$ -АТФазы и, как следствие, обеспечивают работу ее каталитического цикла через изменение положения актуаторного (А) домена фермента (Ekberg et al., 2013). Лизофосфатидилхолин, который в присутствии ДДМ усиливает эффект активации  $H^+$ -АТФазы через повышение сродства к АТФ, имеет иной механизм регуляции гидролитического цикла фермента (Wielandt et al., 2015).

Тот факт, что обработка ДДМ приводила к двухкратному увеличению скорости гидролиза  $V_{max}$  и не зависела от того, сколько стериннов содержали везикулярные мембраны до солубилизации (табл. 4) свидетельствует в пользу того, что именно стеринны непосредственно выступают в роли аннулярного липидного окружения протонной помпы.

Известно, что активированное состояние  $H^+$ -АТФазы должно сопровождаться усилением сопряжения  $H^+$ /АТФ, т.е. на одну молекулу гидролизованной ферментом АТФ переносится больше протонов (Venema and Palmgren, 1995). Учитывая полученные нами данные по внеклеточному закислению среды протопластами и увеличению  $V_{max}$  при извлечении стериннов из везикулярной плазмалеммы, дальнейшие эксперименты были посвящены изучению АТФ-зависимого формирования величины  $\Delta\mu H^+$ .

### **3.7. АТФ-зависимый протонный транспорт в везикулах плазмалеммы с разным содержанием стериннов**

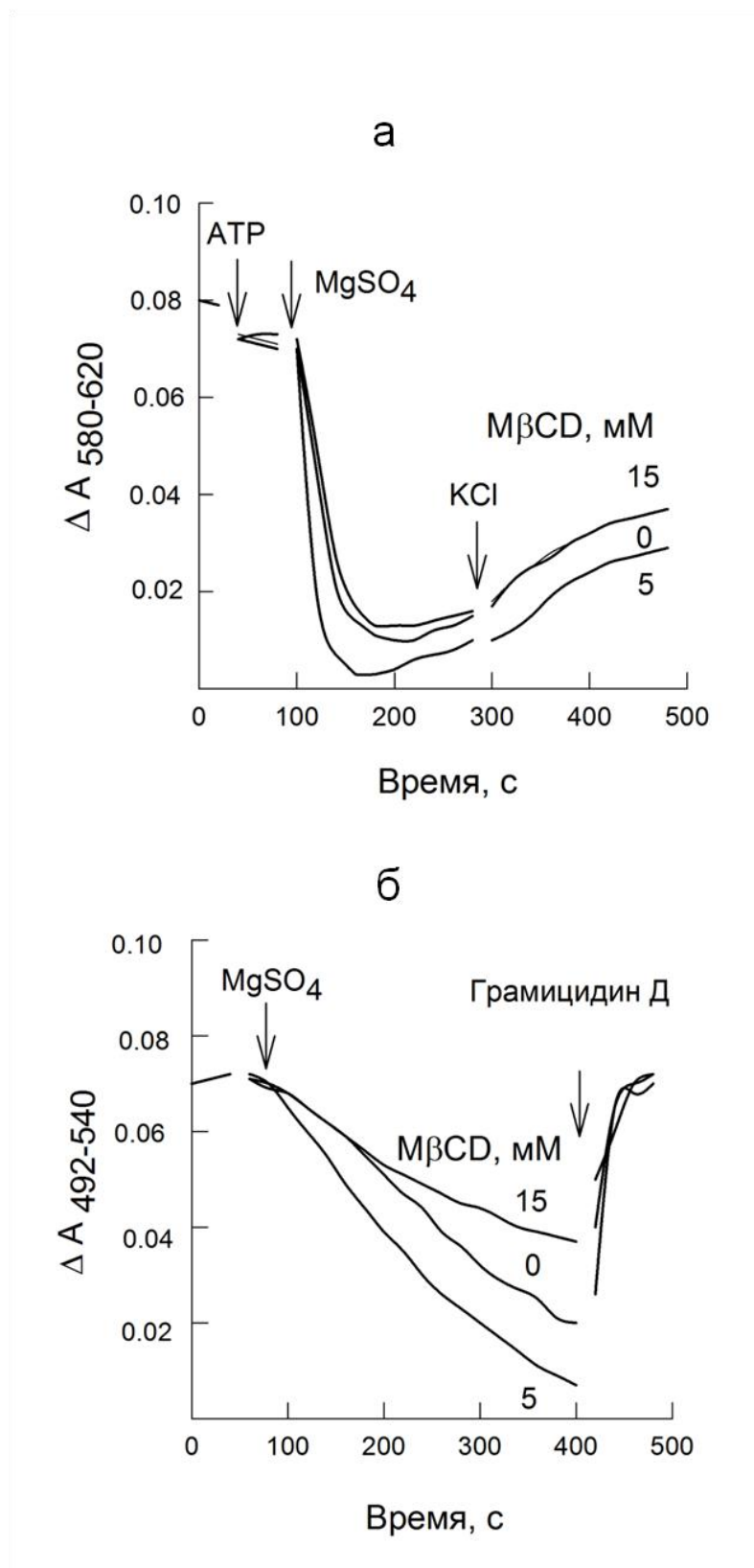
На рисунке 19 отображены кинетические кривые по АТФ-зависимой генерации  $\Delta pH$  через плазмалемму везикул в присутствии разных концентраций М $\beta$ CD. Реакция запускалась добавлением  $Mg^{2+}$  и сопровождалась снижением абсорбции акридинового оранжевого вследствие закисления внутреннего пространства везикул. Видно, что низкие концентрации М $\beta$ CD (2 и 5 мМ



**Рис. 19.** Влияние M $\beta$ CD на АТФ-зависимый протонный транспорт. Эксперименты проводили в среде, содержащей 50 мМ КСl. Реакцию запускали путем внесения в измерительную кювету 2 мМ MgSO<sub>4</sub>. Величину  $\Delta pH$ , сформированную в результате АТФ-зависимого H<sup>+</sup>-транспорта, сбрасывали внесением 2 мкМ грамицидина Д. На рисунке представлены характерные кинетические кривые для везикул плазмалеммы одного из выделений.

соответственно) значительно стимулировали протонный транспорт. Однако, при увеличении содержания М $\beta$ CD в растворе, наблюдаемый эффект снижался, а при достижении концентрации олигосахарида в 15 мМ, скорость АТФ-зависимого протонного транспорта достигала контрольных значений. Полученные результаты согласуются с данными работы Grandmougin-Ferjani с соавторами. На протеолипосомах с реконструированной в них Н<sup>+</sup>-АТФазой было показано, что величина АТФ-зависимого протонного транспорта нелинейно зависела от содержания стерина в бислое (Grandmougin-Ferjani et al., 1997). Стоит отметить, что экстракция стерина из липидного бислоя может приводить к изменению физико-химического состояния мембраны, тем самым увеличивая или, наоборот, снижая ее проницаемость для протонов, при этом наблюдаемый эффект зачастую носит противоречивый характер. В работе (Gensure et al., 2006) на липосомах, состоящих только из молекул фосфотидилхолина, было продемонстрировано, что эффект извлечения холестерина на протонную проницаемость имел транзитный характер и менялся нелинейно, хотя в сложных липидных системах, содержащих разные фосфолипиды, протонная проницаемость снижалась прямо пропорционально доли экстрагированных стерина. По всей видимости, определяющую роль в этом играет состав фосфолипидов и их взаимодействие с молекулами стерина. Тем не менее, при изучении активного АТФ-зависимого протонного транспорта, эффектами стерина на физико-химические свойства бислоя можно пренебречь, так как известно, что скорость транспорта протонов через мембрану путем их диффузии на несколько порядков ниже, чем в случае работы каналов или транспортеров (Paula et al., 1996).

Известно, что результатом АТФ-зависимого протонного транспорта является перенос положительных зарядов через мембрану с последующим формированием величины  $\Delta\mu\text{H}^+$ , представленной суммой концентрационной ( $\Delta\text{pH}$ ) и электрической ( $\Delta\psi$ ) составляющих. Отрицательно заряженный потенциал-чувствительный флуоресцентный краситель оксонол VI, проникая в везикулы по электрическому



**Рис. 20.** Генерация  $\Delta\psi$  (а) и  $\Delta pH$  (б) везикулами плазмалеммы с разным содержанием стерина. Суспензию везикул, предварительно проинкубированную с M $\beta$ CD, отмывали при 100000 g (30 мин). Разрядку  $\Delta\psi$  и  $\Delta pH$  осуществляли внесением 50 mM KCl или 2 мкМ грамицидина Д соответственно.

потенциалу со знаком «+» в люмене, позволяет оценивать величину  $\Delta\psi$ , создаваемого в результате переноса протонов  $H^+$ -АТФазой (Wielandt et al., 2016).

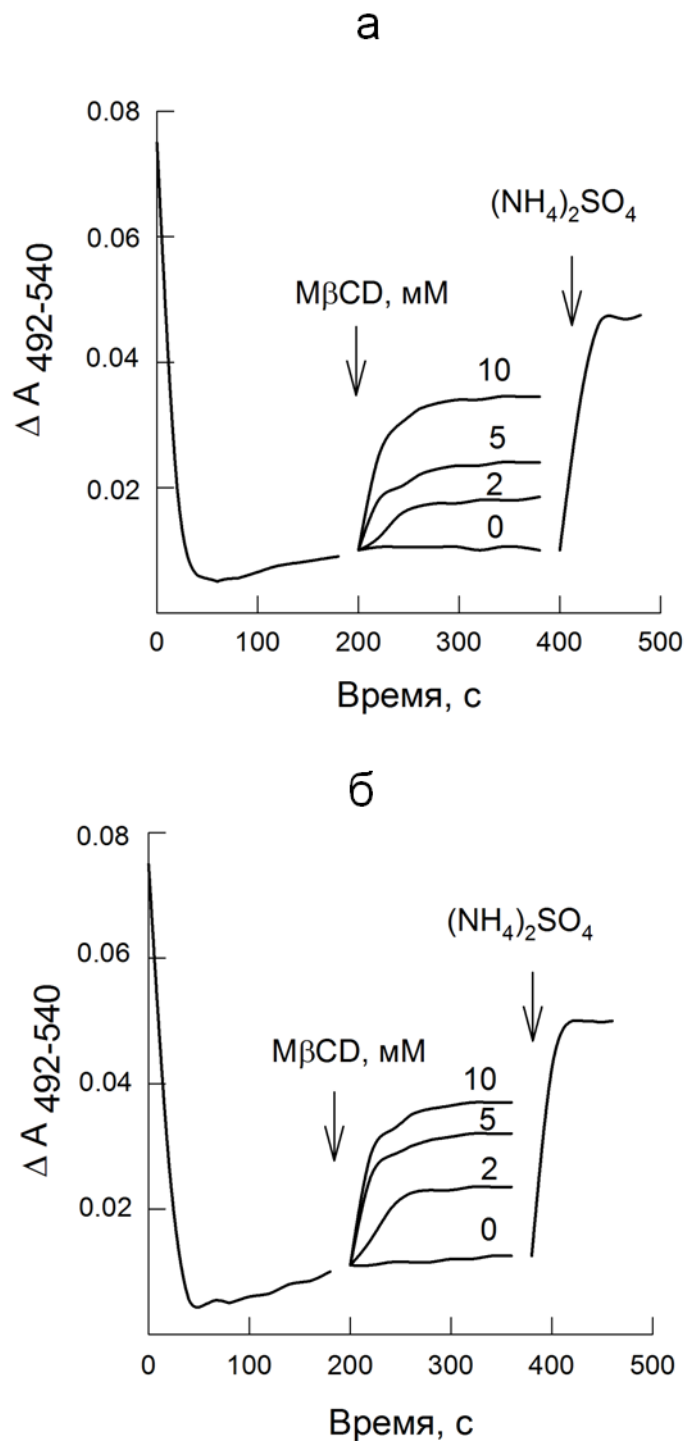
Ранее мы обнаружили, что оксонол VI взаимодействует с гидрофобной полостью М $\beta$ CD в растворе с изменением спектральных характеристик. Поэтому везикулы предварительно обрабатывали М $\beta$ CD, а затем отмывали от М $\beta$ CD-комплексов, содержащих экстрагированные стеринны. В отсутствие каких-либо проникающих ионов, все образцы сохраняли способность генерировать величину  $\Delta\psi$ , при этом скорость снижения разности абсорбции оксонола VI была наиболее выраженной при инкубации везикул с 5 мМ М $\beta$ CD, а добавление в среду KCl приводило к полной диссипации мембранного потенциала во всех вариантах (рис. 20а). Это согласуется с ранее полученными нами экспериментальными данными по гидролизу АТФ, где обработка везикул М $\beta$ CD вызывала увеличение параметра  $V_{max}$  (табл. 3 и 4). Таким образом, можно сказать, что извлечение стериннов способствует увеличению гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы, что, в свою очередь, стимулирует АТФ-зависимый перенос протонов через мембрану. Однако, если обратить внимание на результаты по АТФ-зависимому протонному транспорту в среде, содержащей KCl (рис. 19 и 20б), можно увидеть, что концентрации М $\beta$ CD, которые вызывали наиболее сильный ответ (до 5 мМ) не совпадали с полученными данными по гидролизу АТФ (5–10 мМ). Наиболее очевидным объяснением этому может быть тот факт, что извлечение стериннов помимо активации самой  $H^+$ -АТФазы также усиливает пассивные протонные утечки через мембрану с участием анионов или катионов ( $K^+$  или  $Cl^-$ ). Чтобы проверить, оказывает ли влияние содержание стериннов на пассивную протонную проницаемость плазмалеммы и связана ли транзиторность наблюдаемых эффектов на формирование  $\Delta pH$  с работой других транспортных систем, были проведены эксперименты по диссипации протонного градиента при отсутствии в системе АТФ.



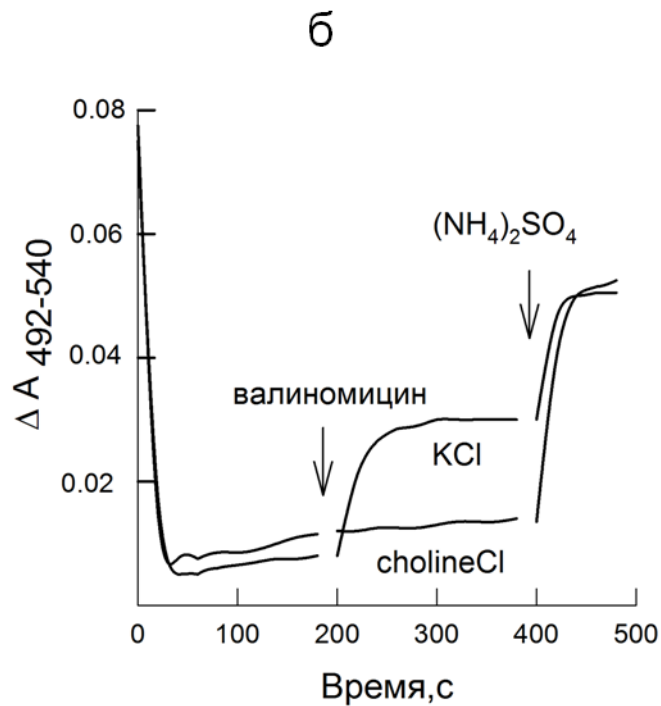
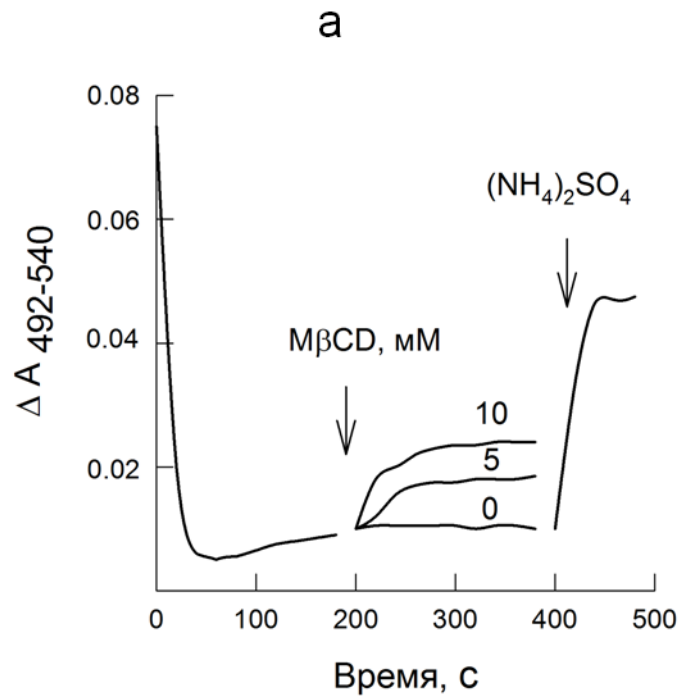
### 3.8. Пассивная протонная проницаемость везикул в присутствии M $\beta$ CD

О пассивной проницаемости плазмалеммы для протонов судили по кинетике диссипации искусственно созданного градиента  $\Delta\text{pH}$ . Везикулы плазмалеммы в малом объеме, предварительно обработанные  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , переносили в кювету спектрофотометра на среду, не содержащую  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Метод основан на регистрации скорости изменения абсорбции акридинового оранжевого, поступающего в люмен везикул, что обусловлено быстрым выходом  $\text{NH}_3$  по градиенту концентрации и внутривезикулярным закислением. Последующая релаксация ответа абсорбции отражает пассивный транспорт протонов через мембрану. В отсутствие M $\beta$ CD протонная проницаемость плазмалеммы была на низком уровне (рис. 21). Извлечение стерина добавлением в среду с KCl M $\beta$ CD в концентрациях 2–10 мМ приводило к усилению пассивной проницаемости мембраны для протонов, и эффект усиливался при повышении содержания M $\beta$ CD (рис. 21а). Таким образом, экстракция стерина способствует увеличению протонных утечек через мембрану, а обнаруженные эффекты транзитной стимуляции АТФ-зависимого  $\text{H}^+$  транспорта в присутствии M $\beta$ CD в аналогичных условиях, по всей видимости, обусловлены постепенной активацией транспортеров, работа которых сопряжена с переносом протонов. Для выяснения природы этих транспортных механизмов были проведены эксперименты со средами, содержащими слабопроникающие катионы и анионы: холинхлорид (рис. 21б) и  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (рис. 22а).

Эксперименты с холинхлоридом в среде измерения (рис. 21б) показали, что экстракция стерина в присутствии M $\beta$ CD значительно стимулировала пассивный транспорт протонов, а скорость диссипации  $\Delta\text{pH}$  соответствовала контрольному варианту, содержащему KCl (рис. 21а). Это позволяет высказать предположение, что пассивная протонная проницаемость плазмалеммы скорее всего слабо зависит от природы катиона. Если среда содержала эквимолярное количество  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (рис. 22а), величина диссипации искусственного градиента  $\text{pH}$  была примерно в 2 раза



**Рис. 21.** Влияние МβСD на пассивный Н<sup>+</sup>-транспорт (роль анионных транспортеров). Везикулы плазмалеммы, предварительно проинкубированные с 250 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, переносили в среду, содержащую 50 мМ КСl (а) или 50 мМ холин хлорид (б). После снижения абсорбции акридинового оранжевого добавляли МβСD в концентрациях от 2 до 10 мМ. Диссипацию ΔрН осуществляли внесением 10 мМ(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. На рисунке представлены характерные кинетические кривые.



**Рис. 22.** Влияние МβCD на пассивный Н<sup>+</sup>-транспорт (роль катионных транспортеров). Везикулы, предварительно проинкубированные с 250 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, переносили на среду, содержащую 25 мМ K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (а) или 50 мМ KCl/холин хлорид (б). После снижения абсорбции акридинового оранжевого добавляли МβCD в конечной концентрации 5–10 мМ (а) или 50 нМ валиномицина (б). Диссипацию ΔрН осуществляли внесением 10 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

ниже, чем в случае среды с KCl или холинхлоридом (рис. 21). Из полученных результатов можно сделать вывод, что в условиях эксперимента извлечение стерина приводит к изменению активности как катионных, так и анионных транспортеров.

Градиент  $K^+$ , направленный внутрь везикул, может выступать движущей силой для обмена на  $H^+$  с помощью катион/протонного антипортера. Ситуация же с анионами менее очевидна, так как градиент  $Cl^-$  также ориентирован в люмен, а для диссипации  $\Delta pH$  с участием анион/протонного симпортера необходимо присутствие аниона в одном компартменте с протоном. Проверка этой гипотезы была проведена в экспериментах с валиномицином,  $K^+$ -специфичным ионофором, осуществляющим перенос катиона по электрохимическому градиенту. Генерация потенциала со знаком «+» внутри везикул в присутствии валиномицина также активировала протонную утечку (рис. 22б).

Таким образом, можно полагать, что в результате извлечения стерина усиление диссипации  $\Delta pH$  может происходить в результате активности, по крайней мере, двух механизмов, связанных с трансмембранным транспортом анионов: Чтобы запустить  $H^+$ /анионный котранспорт,  $Cl^-$  должен войти в люмен везикул. В таблице 5 дано сопоставление скоростей активного и пассивного протонного транспорта в зависимости от концентрации MβCD. Видно, что при увеличении содержания MβCD в пробе активация АТФ-зависимой генерации  $\Delta pH$ , сопряженной с переносом аниона, имеет транзиторный характер в отличие от линейной концентрационной зависимости диссипации протонного градиента. Таким образом можно полагать, что системы генерации и диссипации  $\Delta pH$  на плазматической мембране имеют разную чувствительность к содержанию в ней стерина.

В растениях выявлено несколько семейств анионных транспортеров, работа которых сопряжена с переносом протонов через мембрану. Например, некоторые белки семейства CLC функционируют в качестве протонных антипортеров, использующих энергию  $\Delta pH$  для создания анионных градиентов (de Angeli et al.,

2017), однако они отсутствуют на плазмалемме. Протон/хлоридные симпортеры семейства NPF (NITRATE TRANSPORTER 1 (NRT1)/PEPTIDE TRANSPORTER (PTR) family) были обнаружены на плазматической мембране *Chara corallina*, дрожжей, а также высших растений (Wege et al., 2017).

**Таблица 5.** Влияние МβCD на скорость АТФ-зависимого и пассивного Н<sup>+</sup>-транспорта в везикулах плазмалеммы.

МβCD, мМ	АТФ-зависимый Н <sup>+</sup> - транспорт, Δ А 103 мин <sup>-1</sup>	Пассивный Н <sup>+</sup> - транспорт, Δ А 103 мин <sup>-1</sup>
0	8 ± 3	2 ± 1
2	25 ± 8*	7 ± 3*
5	21 ± 6*	11 ± 5*
10	14 ± 4	14 ± 5*
15	8 ± 4	н.о.

Измерения проводили в среде, содержащей 50 мМ КСl и МβCD в конечных концентрациях от 0 до 15 мМ. Данные приведены в виде средних значений ± стандартное отклонение для суспензий везикул, полученных в трех независимых выделениях плазмалеммы. \* указывает на достоверность различий ( $p \leq 0.05$ ) с плазмалеммой в отсутствие МβCD.

В присутствии МβCD активируется хлорид/протонный симпортер, инициирующий выход хлора вместе с протонами. В этой роле могут выступать транспортеры семейства NPF с широкой субстратной специфичностью, обнаруженные в клетках высших растений (Krapp et al., 2014). Было показано, что они обладают селективностью в присутствии анионов Сl<sup>-</sup>. У кукурузы белок Zm-NPF6.4, являющейся гомологом NPF6.3 у *Arabidopsis*, транспортирует хлор в достаточно высоких концентрациях (Wen et al., 2017).

В корнях *Arabidopsis* протеинкиназа СРК23 через взаимодействие с  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсором СВL фосфорилирует и регулирует активность NPF6.3 в ответ на содержание нитрата в окружающей среде (Chu et al., 2021). Мишенью этой протеинкиназы также является калиевый канал АКТ1 (Sanchez-Barrena et al., 2020). Протеомный анализ показал, что белки семейства СВL являются резидентами детергент-устойчивых фракций плазмалеммы, а нарушение их функциональной активности в пятерном *cbl*-мутанте приводило к изменению распределения их белков-партнеров таких, как нитратный транспортер NRT 2.1 и АНА2, между солюбилизируемыми и Тритон X100-устойчивыми фракциями плазмалеммы, изменяло уровень их фосфорилирования и влияло на поглощение нитрата корнями (Chu et al., 2021).

$\text{H}^+$ -АТФаза плазмалеммы в инвертированных везикулах плазмалеммы как электрогенная помпа для генерации  $\Delta\text{pH}$  требует присутствия проникающих анионов для сбрасывания электрической составляющей  $\Delta\mu\text{H}^+$  (Bennett and Spanswick, 1983; Гайворонская и др., 1987). Этот процесс может быть связан с активностью анионных каналов семейства SLAH/SLAC (Colcombet et al., 2005). Как было показано модуляция функциональной активности канала через взаимодействие с протеинкиназой СРК21 связана с миграцией SLAH3 в детергент-устойчивые фракции плазмалеммы, что является важным условием прохождения АБК сигналинга в замыкающих клетках устьиц (Demir et al., 2013). Таким образом, можно полагать, что содержание стеринов в мембране, влияет на активность белков не только через создание комфортного липидного окружения, но и обеспечивает контакты белков-транспортеров с соответствующими регуляторными протеинкиназами/протеинфосфатазами, мишенями которых они являются. Интерес исследователей к этому аспекту проблемы регуляции транспортных активностей через создание в плазмалемме платформ со специфическим липидным и белковым составом значительно вырос в последнее время (Martiniere and Zhelazny, 2021).

Стоит отметить, что нельзя полностью исключать влияние катионов, так как опыты с везикулами, помещенными в среду, содержащую  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , также

демонстрировали наличие протонных утечек в присутствии МВCD (рис. 22а), хотя наблюдаемые эффекты были значительно ниже по сравнению с КСl. На эту роль могут претендовать протон/катионные антипортеры суперсемейства CPA (СНХ). Эти транспортеры присутствуют во всех живых организмах, осуществляя трансмембранный перенос  $K^+$ ,  $Na^+$ , и  $Ca^{2+}$  в обмен на протон в ответ на изменения условий окружающей среды, тем самым регулируя ионный гомеостаз в клетке (Tsuji et al., 2020). В растениях белки CPAs выполняют важную роль при солевом стрессе, например,  $Na^+/H^+$  антипортер SOS1 у *Arabidopsis thaliana* обеспечивает выход  $Na^+$  из цитоплазмы, так как его высокие концентрации токсичны, а у растений отсутствуют  $Na^+/K^+$ -АТФазы. С помощью  $K^+/H^+$  антипортера СНХ14 растения регулируют концентрацию  $K^+$  внутри клетки, а мутанты по гену  $\Delta chx14$  характеризовались ингибированием роста корневой системы и избыточно высоким уровнем  $K^+$  в цитозоле (Zhao et al., 2015).

Подводя итог можно сказать, что роль липидного окружения в модуляции активности АТФаз Р-типа является комплексным и сложным процессом, затрагивающие многие молекулярные аспекты в клетке. Несмотря на то, что экспериментальные работы по изучению влияния разных липидов (и, в частности стериннов) на функциональную активность АТФаз стали появляться еще три десятилетия назад (Cheng et al., 1986; Kasamo and Yamanishi, 1991; Cornelius, 1995), а также были получены кристаллические структуры основных участников семейства Р-типа (Bublitz et al., 2010; Focht et al., 2017), до сих пор остается еще много вопросов о молекулярных механизмах белок-липидного взаимодействия этих ферментов с их нативным липидным окружением, а также физиологическим эффектам, к которым они приводят. Дополнительные трудности в понимании этих процессов также является то, что даже в присутствии одних и тех же молекул стериннов, функциональная активность разных АТФаз Р-типа изменяется по-разному. Скорее всего, для каждой АТФазы Р-типа характерен свой особый способ взаимодействия с липидным окружением, зависящий от особенностей изменения

ее структурной конформации в течение каталитического цикла, а также физико-химического состояния бислоя, в котором она функционирует. Таким образом, несмотря на то, что все АТФазы этого семейства проявляют высокую гомологию, по всей видимости, в ходе эволюционного развития каждая из них адаптировалась к своему особому мембранному окружению.

В случае же  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы клеток растений вопрос стоит еще более остро. Известно, что растения ведут неподвижный образ жизни и постоянно сталкиваются с изменениями условий окружающей среды. В данном случае, регуляция активности протонной помпы имеет первостепенное значение, так как она обеспечивает работу белков вторичного транспорта, необходимого для повышения устойчивости, например, к осмотическому стрессу или действию токсичных ионов. Изменение состава стеринов в плазматической мембране под действием антропогенных факторов, и, как следствие, их влияние на функциональную активность  $H^+$ -АТФазы, может отображать наличие еще одного способа регуляции этого фермента, без участия реакций фосфорилирования, как, например, в случае эффекта лизофосфодилхолина. Хотя фосфорилирование является значительно более быстрым процессом, приводящим к моментальным физиологическим ответам (например, при патогенезе), по сравнению с изменением липидного состава мембраны, можно предположить, что во втором случае задействованы иные механизмы адаптации, а именно повышение устойчивости растений к неблагоприятным факторам при их долговременном воздействии.

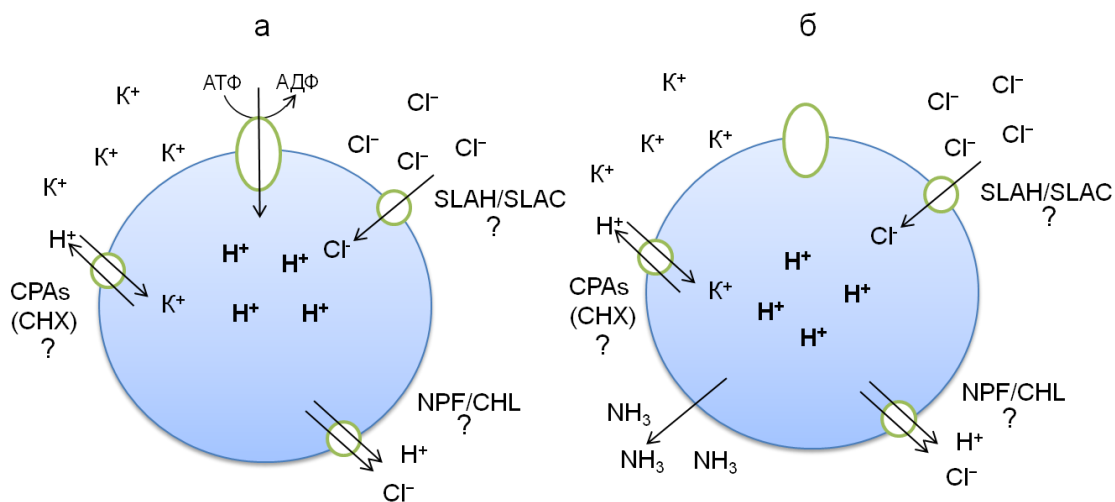


## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На рисунке 23 представлена схема, отображающая наиболее вероятные молекулярные механизмы стимуляции АТФ-зависимого и пассивного протонного транспорта в ответ на извлечение стерина из плазмалеммы в присутствии М $\beta$ CD. Многократное усиление АТФ-зависимой генерации  $\Delta\psi$  после обработки плазмалеммы низкими концентрациями М $\beta$ CD в диапазоне 2–5 мМ обусловлено как увеличением скорости гидролиза АТФ, так и изменением активности анионных каналов, обеспечивающих трансформацию  $\Delta\psi$  в  $\Delta\psi$  (SLAH/SLAC на схеме) (рис. 23а). Отсутствие же корреляции между кинетическими параметрами гидролитической активности и АТФ-зависимым протонным транспортом при повышении содержания М $\beta$ CD до 10 мМ и выше, когда Н<sup>+</sup>-АТФаза активна, а генерация  $\Delta\psi$  снижается, указывает на вовлечение локализованных в плазмалемме ионных котранспортеров (CPA/CHX и NPF/CHL на схеме), активность которых приводит к диссипации протонного градиента. Эксперименты в отсутствие активной Н<sup>+</sup>-АТФазы (рис. 23б) позволили сделать предположение, что не только протонная помпа, но и вторично-активные транспортные системы обладают разной чувствительностью к содержанию мембранных стерина. Например, как было показано в клетках животных, многие потенциал-чувствительные каналы и рецепторы некоторых нейротрансмиттеров проявляют высокую чувствительность к своему липидному окружению, а увеличение, или наоборот, снижение доли холестерина в плазмалемме приводило к нарушению их функциональной активности (Meza et al., 2020).

Результаты измерения параметров гидролиза Н<sup>+</sup>-АТФазы везикул плазмалеммы с разным содержанием стерина в присутствии додецил мальтозида показали, что обработка неионным детергентом приводила к увеличению параметра  $V_{\max}$  у всех вариантов, и в данной модельной системе скорость гидролиза достигала своих максимальных значений. Этот эффект говорит о том, что стерин непосредственно выступают в роли аннуляющего липидного окружения Н<sup>+</sup>-АТФазы, способного влиять на конформационную подвижность

фермента. Учитывая повышенное сродство  $H^+$ -АТФазы к стерин-богатым доменам и ее попадание в детергент-устойчивые фракции, можно предположить, что, как в случае многих других мембранных транспортеров, ее функциональная активность реализуется через ее латеральную сегрегацию в плазмалемме.



**Рис. 23.** Схема, которая отражает зависящие от содержания стероидов процессы, участвующие в АТФ-зависимом (а) и пассивном (б) транспорте протонов через плазмалемму.

Извлечение стероидов в присутствии МβCD приводит к увеличению скорости гидролиза ( $V_{max}$ ) H<sup>+</sup>-АТФазы и сопровождается значительным усилением активного протонного транспорта, сопряженного с активацией анионных каналов с участием Cl<sup>-</sup> (например, семейства SLAH/SLAC). Усиление пассивной протонной проницаемости везикул плазмалеммы в ответ на обработку МβCD может быть связано с активацией вторичных транспортных систем, таких как транспортеры семейства NPF/CHL, а также катион/протонных антипортеров суперсемейства CPAs через которые происходит диссипация протонного градиента. На схеме изображены ориентированные цитоплазматической стороной наружу везикулы плазмалеммы.

## ВЫВОДЫ

- 1)  $H^+$ -АТФаза Р-типа обнаруживается как в устойчивых, так и в детергент-солюбилизируемых мембранах, а снижение содержания стерина в плазмалемме не изменяет характер ее распределения между фракциями.
- 2) Обработка протопластов мезофилла *Arabidopsis thaliana* (L.) в присутствии М $\beta$ СD приводит к увеличению активности  $H^+$ -АТФазы плазмалеммы, что выражается в активации закисления внешней среды.
- 3) Обработка плазмалеммы везикул и протопластов М $\beta$ СD в конечной концентрации 10 мМ и извлечение до 50 % стерина не вызывало изменений их исходных размеров.
- 4) Анализ гидролитической активности  $H^+$ -АТФазы в везикулах плазмалеммы с измененным содержанием стерина выявил активацию фермента, которая выражалась в увеличении  $V_{max}$ . Скорость гидролиза была максимальной, когда плазмалемму обрабатывали в присутствии додецилмальтозида, что свидетельствует в пользу того, что стерин является аннулирующим липидным окружением  $H^+$ -АТФазы.
- 5) Обработка везикул плазмалеммы низкими концентрациями М $\beta$ СD вызывала многократное усиление АТФ-зависимого  $H^+$ -транспорта, которое было транзиторно и не коррелировало с результатами гидролитической активности.
- 6) Такой транзиторный эффект М $\beta$ СD на активный  $H^+$ -транспорт связан с разной чувствительностью ионных каналов/транспортеров, локализованных в плазмалемме и участвующих в формировании градиента рН, к содержанию мембранных стерина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Белугин Б.В., Жесткова И.М., Трофимова М.С.** (2010) Средство PIP-аквапоринов к стерин-обогащенным доменам плазмалеммы клеток этиолированных проростков гороха. *Биологические мембраны*, **27**, 394-403.
2. **Валитова Ю.Н., Сулкарнаева А.Г., Минибаева Ф.В.** (2016) Растительные стерины: многообразие, биосинтез, физиологические функции. *Биохимия*, **81**, 1050-1068.
3. **Гайворонская Л.М., Трофимова М.С., Молотковский Ю.Г.** (1987) Протонный контроль электрогенной H<sup>+</sup>-АТФазы в везикулах плазматических мембран из клеток суспензионной культуры сахарной свеклы. *Доклады АН СССР*, **292**, 759-762.
4. **Ершов П.В., Решетова О.С., Трофимова М.С., Бабаков А.В.** (2005) Активность ионных транспортеров и солеустойчивость ячменя. *Физиология растений*, **52**, 867-875.
5. **Albers R.W., Fanh S., Koval G.J.** (1963) The role of sodium ions in the activation of electrophorus electric organ adenosine triphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50**, 474-481.
6. **Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.** (2002) *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science, 1616 p.
7. **Augustin J.M., Kuzina V., Andersen S.B., Bak S.** (2011) Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry*, **72**, 435-57.
8. **Axelsen K.B., Palmgren M.G.** (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **126**, 696-706.
9. **Bal N.C., Maurya S.K., Sopariwala D.H., Sahoo S.K., Gupta S.C., Shaikh S.A., Pant M., Rowland L.A., Bombardier E., Goonasekera S.A., Tupling A.R., Molkentin J.D., Periasamy M.** (2012) Sarcolipin is a newly identified regulator of muscle-based thermogenesis in mammals. *Nat. Med.*, **18**, 1575-1579.
10. **Barbuti A., Gravante B., Riolfo M., Milanese R., Terragni B., DiFrancesco D.** (2004) Localization of pacemaker channels in lipid rafts regulates channel kinetics. *Circ. Res.*, **94**, 1325-1331.

11. **Bauer M., Pelkmans L.** (2006) A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds. *FEBS Lett.*, **580**, 5559-5564.
12. **Bennett A.B., Spanswick, R.M.** (1983) Optical measurements of  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\psi$  in corn root membrane vesicles: kinetic analysis of  $\text{Cl}^-$  effects on a proton-translocating ATPase. *J. Membrin Biol.*, **71**, 95–107.
13. **Bergenstrahle A., Borga P., Jonsson L.** (1996) Sterol composition and synthesis in potato tuber discs in relation to glycoalkaloid synthesis. *Phytochemisry*, **41**, 155–161.
14. **Borner G.H., Sherrier D.J., Weimar T., Michaelson L.V., Hawkins N.D., Macaskill A., Napier J.A., Beale M.H., Lilley K.S., Dupree P.** (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.*, **137**, 104-116.
15. **Bouvier F., Rahier A., Camara B.** (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lip. Res.*, **44**, 357-429.
16. **Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
17. **Brown D., Rose J.** (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, **68**, 533–544.
18. **Bublitz M., Poulsen H., Morth J.P., Nissen P.** (2010) In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **20**, 431-439.
19. **Buch-Pedersen M.J., Palmgren M.G.** (2003) Conserved Asp684 in transmembrane segment M6 of the plant plasma membrane P-type proton pump AHA2 is a molecular determinant of proton translocation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 17845-17851.
20. **Bürstenbinder K., Möller B., Plötner R., Stamm G., Hause G., Mitra D., Abel S.** (2017) The IQD Family of calmodulin-binding proteins links calcium signaling to microtubules, membrane subdomains, and the nucleus. *Plant Physiol.*, **173**, 1692-1708.
21. **Cassim A., Gouguet P., Gronnier J., Laurent N., Germain V., Grison M., Boutté Y., Gerbeau-Pissot P., Simon-Plas F., Mongrand S.** (2019) Plant lipids: Key players of plasma membrane organization and function. *Prog. Lipid Res.*, **73**, 1-27. doi: 10.1016/j.plipres.2018.11.002.
22. **Cacas J.L., Bure C., Grosjean K., Gerbeau-Pissot P., Lherminier J., Rombouts Y., Maes E., Bossard C., Gronnier J., Furt F., Fouillen L., Germain V., Bayer E., Cluzet**

- S., Robert F., Schmitter J.M., Deleu M., Lins L., Simon-Plas F., Mongrand S.** (2016) Revisiting plant plasma membrane lipids in tobacco: a focus on sphingolipids. *Plant Physiol.*, **170**, 367-384.
23. **Casadei B.R., Domingues C.C., de Paula E., Riske K.A.** (2014) Direct visualization of the action of Triton X-100 on giant vesicles of erythrocyte membrane lipids. *Biophys. J.*, **106**, 2417-2425.
24. **Casares D., Escribá P.V., Rosselló C.A.** (2019) Membrane lipid composition: effect on membrane and organelle structure, function and compartmentalization and therapeutic avenues. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2167. doi: 10.3390/ijms20092167.
25. **Chelysheva V.V., Smolenskaya I.N., Trofimova M.C., Babakov A.V., Muromtsev G.S.** (1999) Role of the 14-3-3 proteins in the regulation of H<sup>+</sup>-ATPase activity in the plasma membrane of suspension-cultured sugar beet cells under cold stress. *FEBS Lett.*, **456**, 22-26.
26. **Chen M., Markham J.E., Dietrich C.R., Jaworski J.G., Cahoon E.B.** (2008) Sphingolipid long-chain base hydroxylation is important for growth and regulation of sphingolipid content and composition in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **20**, 1862-1878.
27. **Cheng K.H., Lepock J.R., Hui S.W., Yeagle P.L.** (1986) The role of cholesterol in the activity of reconstituted Ca-ATPase vesicles containing unsaturated phosphatidylethanolamine. *J. Biol. Chem.*, **261**, 5081–5087.
28. **Chu L.C., Offenborn J.N., Steinhorst L., Wu X.N., Xi L., Li Z., Jacquot A., Lejay L., Kudla J., Schulze W.X.** (2021) Plasma membrane calcineurin B-like calcium-ion sensor proteins function in regulating primary root growth and nitrate uptake by affecting global phosphorylation patterns and microdomain protein distribution. *New Phytol.*, **229**, 2223-2237.
29. **Clerc S., Barenholz Y.** (1998) A quantitative model for using acridine orange as a transmembrane pH gradient probe. *Anal. Biochem.*, **259**, 104-111.
30. **Colcombet J., Lelièvre F., Thomine S., Barbier-Brygoo H., Frachisse J.M.** (2005) Distinct pH regulation of slow and rapid anion channels at the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* hypocotyl cells. *J. Exp. Bot.*, **56**, 1897-1903.
31. **Cornelius F.** (1995) Cholesterol modulation of molecular activity of reconstituted shark Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1235**, 205-212.

32. **Cornelius F., Habeck M., Kanai R., Toyoshima C., Karlisch S.J.** (2015) General and specific lipid-protein interactions in Na,K-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1848**, 1729-1743.
33. **Coursol S., Le Stunff H., Lynch D.V., Gilroy S., Assmann S.M., Spiegel S.** (2005) *Arabidopsis* sphingosine kinase and the effects of phytosphingosine-1-phosphate on stomatal aperture. *Plant Physiol.*, **137**, 724-737.
34. **Croteau R., Kutchan T.M., Lewis N.G.** (2000) Natural Products (Secondary Metabolites). In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) Haboken: Wiley-Blackwell, pp. 1250-1319.
35. **de Angeli A., Thomine S., Frachisse J.M., Ephritikhine G., Gambale F., Barbier-Brygoo H.** (2007) Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Lett.*, **581**, 2367-2374.
36. **Demir F., Horntrich C., Blachutzik J.O., Scherzer S., Reinders Y., Kierszniowska S., Schulze W.X., Harms G.S., Hedrich R., Geiger D., Kreuzer I.** (2013) *Arabidopsis* nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 8296-8301.
37. **Drachmann N.D., Olesen C., Møller J.V., Guo Z., Nissen P., Bublitz M.** (2014) Comparing crystal structures of Ca<sup>2+</sup>-ATPase in the presence of different lipids. *FEBS J.*, **281**, 4249-4262.
38. **Dufourc E.J.** (2008) Sterols and membrane dynamics. *J. Chem. Biol.*, **1**, 63-77.
39. **Dupont S., Beney L., Ferreira T., Gervais P.** (2011) Nature of sterols affects plasma membrane behavior and yeast survival during dehydration. *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 1520-1528.
40. **Dutra M.B., Ambesi A., Slayman C.W.** (1998) Structure-function relationships in membrane segment 5 of the yeast Pma1 H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **273**, 17411-17417.
41. **Ekberg K., Palmgren M.G., Veierskov B., Buch-Pedersen M.J.** (2010) A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of the protein. *J. Biol. Chem.*, **285**, 7344-7350.
42. **Ekberg K., Wielandt A.G., Buch-Pedersen M.J., Palmgren M.G.** (2013) A conserved asparagine in a P-type proton pump is required for efficient gating of protons. *J. Biol. Chem.*, **288**, 9610-9618.



43. **Elmore J.M., Coaker G.** (2011) The role of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in plant-microbe interactions. *Mol. Plant.*, **4**, 416-427. doi: 10.1093/mp/ssq083.
44. **Falhof J., Pedersen J.T., Fuglsang A.T., Palmgren M.** (2016) Plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase regulation in the center of plant physiology. *Mol. Plant.*, **9**, 323-337. doi: 10.1016/j.molp.2015.11.002.
45. **Fan L., Li R., Pan J., Ding Z., Lin J.** (2015) Endocytosis and its regulation in plants. *Trends Plant Sci.*, **20**, 388-397.
46. **Fantini J., Di Scala C., Baier C.J., Barrantes FJ.** (2016) Molecular mechanisms of protein-cholesterol interactions in plasma membranes: Functional distinction between topological (tilted) and consensus (CARC/CRAC) domains. *Chem. Phys. Lipids*, **199**, 52-60.
47. **Felle H.H.** (2001) pH: signal and messenger in plant cells. *Plant Biol.*, **3**, 577-591.
48. **Ferrer A., Altabella T., Arro M., Boronat A.** (2017) Emerging roles for conjugated sterols in plants. *Prog. Lipid Res.*, **67**, 27-37.
49. **Focht D., Croll T.I., Pedersen B.P., Nissen P.** (2017) Improved model of proton pump crystal structure obtained by interactive molecular dynamics flexible fitting expands the mechanistic model for proton translocation in P-Type ATPases. *Front Physiol.*, **8**, 202. doi: 10.3389/fphys.2017.00202.
50. **Foster L.J., De Hoog C.L., Mann M.** (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5813-5818.
51. **Frallicciardi J., Melcr J., Siginou P., Marrink S.J., Poolman B.** (2022) Membrane thickness, lipid phase and sterol type are determining factors in the permeability of membranes to small solutes. *Nat. Com.*, **13**, 1605. doi: 10.1038/s41467-022-29272-x.
52. **Fratini M., Krishnamoorthy P., Stenzel I., Riechmann M., Matzner M., Bacia K., Heilmann M., Heilmann I.** (2021) Plasma membrane nano-organization specifies phosphoinositide effects on Rho-GTPases and actin dynamics in tobacco pollen tubes. *Plant Cell*, **33**, 642-670.
53. **Fuglsang A.T., Borch J., Bych K., Jahn T.P., Roepstorff P., Palmgren M.G.** (2003) The binding site for regulatory 14-3-3 protein in plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: involvement of a region promoting phosphorylation-independent interaction in addition to the phosphorylation-dependent C-terminal end. *J. Biol. Chem.*, **278**, 42266-42272.

54. **Fuglsang A.T., Guo Y., Cuin T.A., Qiu Q., Song C., Kristiansen K.A., Bych K., Schulz A., Shabala S., Schumaker K.S., Palmgren M.G., Zhu J.K.** (2007) *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *Plant Cell*, **19**, 1617-1634.
55. **Fuglsang A.T., Kristensen A., Cuin T.A., Schulze W.X., Persson J., Thuesen K.H., Ytting C.K., Oehlenschläger C.B., Mahmood K., Sondergaard T.E., Shabala S., Palmgren M.G.** (2014) Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. *Plant J.*, **80**, 951-964.
56. **Furt F., Lefebvre B., Cullimore J., Bessoule J.J., Mongrand S.** (2007) Plant lipid rafts: fluctuat nec mergitur. *Plant Signal Behav.*, **2**, 508-511.
57. **Furt F., König S., Bessoule J.J., Sargueil F., Zallot R., Stanislas T., Noirot E., Lherminier J., Simon-Plas F., Heilmann I., Mongrand S.** (2010) Polyphosphoinositides are enriched in plant membrane rafts and form microdomains in the plasma membrane. *Plant Physiol.*, **152**, 2173-2187.
58. **Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K.** (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, **282**, 2226-2230.
59. **Garcia A., Lev B., Hossain K.R., Gorman A., Diaz D., Pham T.H.N., Cornelius F., Allen T.W., Clarke R.J.** (2019) Cholesterol depletion inhibits Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase activity in a near-native membrane environment. *J. Biol. Chem.*, **294**, 5956-5969.
60. **Geilfus C.M.** (2017) The pH of the apoplast: dynamic factor with functional impact under stress. *Mol. Plant*, **10**, 1371-1386. doi: 10.1016/j.molp.2017.09.018.
61. **Geldner N., Hyman D.L., Wang X., Schumacher K., Chory J.** (2007) Endosomal signaling of plant steroid receptor kinase BRI1. *Genes. Dev.*, **21**, 1598-1602.
62. **Gensure R.H., Zeidel M.L., Hill W.G.** (2006) Lipid raft components cholesterol and sphingomyelin increase H<sup>+</sup>/OH<sup>-</sup> permeability of phosphatidylcholine membranes. *Biochem. J.*, **398**, 485-495.
63. **Glebov O.O., Bright N.A., Nichols B.J.** (2006) Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 46-54.
64. **Grandmougin-Ferjani A., Schuler-Muller I., Hartmann M.A.** (1997) Sterol modulation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity from corn roots reconstituted into soybean lipids. *Plant Physiol.*, **113**, 163-174.

65. **Gronnier J., Germain V., Gouguet P., Cacas J.L., Mongrand S.** (2016) GIPC: Glycosyl Inositol Phospho Ceramides, the major sphingolipids on earth. *Plant Signal Behav.*, **11**. doi: 10.1080/15592324.2016.1152438.
66. **Grunwald C.** (1971) Effects of free sterols, steryl ester, and steryl glycoside on membrane permeability. *Plant Physiol.*, **48**, 653-655.
67. **Guo D., Venkatramesh M., Nes W.D.** (1995) Developmental regulation of sterol biosynthesis in *Zea mays*. *Lipids*, **30**, 203-219.
68. **Habeck M., Haviv H., Katz A., Kapri-Pardes E., Ayciriex S., Shevchenko A., Ogawa H., Toyoshima C., Karlisch S.J.D.** (2015) Stimulation, inhibition, or stabilization of Na,K-ATPase caused by specific lipid interactions at distinct sites. *J. Biol. Chem.*, **290**, 4829-4842.
69. **Habeck M., Kapri-Pardes E., Sharon M., Karlisch S.J.** (2017) Specific phospholipid binding to Na,K-ATPase at two distinct sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 2904-2909.
70. **Harayama T., Riezman H.** (2018) Understanding the diversity of membrane lipid composition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **19**, 281-296.
71. **Haruta M., Sussman M.R.** (2012) The effect of a genetically reduced plasma membrane protonmotive force on vegetative growth of Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **158**, 1158-1171.
72. **Haruta M., Sabat G., Stecker K., Minkoff B.B., Sussman M.R.** (2014) A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science*, **343**, 408-411.
73. **Haruta M., Gray W.M., Sussman M.R.** (2015) Regulation of the plasma membrane proton pump (H<sup>+</sup>-ATPase) by phosphorylation. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **28**, 68-75.
74. **Haruta M., Tan L.X., Bushey D.B., Swanson S.J., Sussman M.R.** (2018) Environmental and genetic factors regulating localization of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.*, **176**, 364-377.
75. **Heerklotz H.** (2002) Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. *Biophys. J.*, **83**, 2693-2701.
76. **Hemmerlin A., Harwood J.L., Bach T.J.** (2012) A raison d'être for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis? *Prog. Lipid Res.*, **51**, 95-148.

77. **Hodzic A., Rappolt M., Amenitsch H., Laggner P., Pabs G.** (2008) Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol, *Biophys. J.*, **94**, 3935-3944.
78. **Homann U., Thiel G.** (2002) The number of K(+) channels in the plasma membrane of guard cell protoplasts changes in parallel with the surface area. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 10215-10220.
79. **Hooper N.M., Turner A.J.** (1988) Ectoenzymes of the kidney microvillar membrane. Differential solubilization by detergents can predict a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. *Biochem. J.*, **250**, 865-869.
80. **Hossain K.R., Clarke R.J.** (2019) General and specific interactions of the phospholipid bilayer with P-type ATPases. *Biophys. Rev.*, **11**, 353-364.
81. **Huang J., Feigenson G.W.** (1999) A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys J.*, **76**, 2142-2157.
82. **Ipsen J.H., Karlström G., Mouritsen O.G., Wennerström H., Zuckermann M.J.** (1987) Phase equilibria in the phosphatidylcholine-cholesterol system. *Biochim. Biophys. Acta*, **905**, 162-172.
83. **Jahn T., Fuglsang A.T., Olsson A., Brüntrup I.M., Collinge D.B., Volkmann D., Sommarin M., Palmgren M.G., Larsson C.** (1997) The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Cell*, **9**, 1805-1814.
84. **Jarsch I.K., Daste F., Gallop J.L.** (2016) Membrane curvature in cell biology: an integration of molecular mechanisms. *J. Cell Biol.*, **214**, 375-387.
85. **Justesen B.H., Hansen R.W., Martens H.J., Theorin L., Palmgren M.G., Martinez K.L., Pomorski T.G., Fuglsang A.T.** (2013) Active plasma membrane P-type H<sup>+</sup>-ATPase reconstituted into nanodiscs is a monomer. *J. Biol. Chem.*, **288**, 26419-29.
86. **Kanczewska J., Marco S., Vandermeeren C., Maudoux O., Rigaud J.L., Boutry M.** (2005) Activation of the plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation and binding of 14-3-3 proteins converts a dimer into a hexamer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 11675-11680.
87. **Kasamo K., Yamanishi H.** (1991) Functional Reconstitution of Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase from Mung Bean (*Vigna radiata* L.) Hypocotyls in Liposomes Prepared with Various Molecular Species of Phospholipids. *Plant and Cell Physiol.*, **32**, 1219-1225.

88. **Kleine-Vehn J., Wabnik K., Martinière A., Langowski Ł., Willig K., Naramoto S., Leitner J., Tanaka H., Jakobs S., Robert S., Luschig C., Govaerts W., Hell S.W., Runions J., Friml J.** (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Mol. Syst. Biol.*, **7**, 540. doi: 10.1038/msb.2011.72.
89. **Kierszniowska S., Seiwert B., Schulze W.X.** (2009) Definition of *Arabidopsis* sterol-rich membrane microdomains by differential treatment with methyl-beta-cyclodextrin and quantitative proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 612-623. doi: 10.1074/mcp.M800346-MCP200.
90. **Krapp A., David L.C., Chardin C., Girin T., Marmagne A., Leprince A.S., Chaillou S., Ferrario-Méry S., Meyer C., Daniel-Vedele F.** (2014) Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, **65**, 789-98.
91. **Kumar K., Gibbs H.C., Yeh A.T., Griffing L.R.** (2021) The sterol trafficking pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.*, **12**, 616631. doi:10.3389/fpls.2021.616631.
92. **Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
93. **Larsson C., Sommarin M., Widell S.** (1994) Isolation of highly purified plasma membranes and the separation of inside-out and right-side-out vesicles. *Meth. Enzymol.*, **228**, 451-469.
94. **Lee M.C., Hamamoto S., Schekman R.** (2002) Ceramide biosynthesis is required for the formation of the oligomeric H<sup>+</sup>-ATPase Pma1p in the yeast endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.*, **277**, 22395-22401.
95. **Lee S., Lee E.J., Yang E.J., Lee J.E., Park A.R., Song W.H., Park O.K.** (2004) Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **16**, 1378-1391.
96. **Lefebvre B., Furt F., Hartmann M.A., Michaelson L.V., Carde J.P., Sargueil-Boiron F., Rossignol M., Napier J.A., Cullimore J., Bessoule J.J., Mongrand S.** (2007) Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol.*, **144**, 402-418.

97. **Lenarčič T., Albert I., Böhm H., Hodnik V., Pirc K., Zavec AB., Podobnik M., Pahovnik D., Žagar E., Pruitt R., Greimel P., Yamaji-Hasegawa A., Kobayashi T., Zienkiewicz A., Gömann J., Mortimer JC., Fang L., Mamode-Cassim A., Deleu M., Lins L., Oecking C., Feussner I., Mongrand S., Anderluh G., Nürnberger T.** (2017) Eudicot plant-specific sphingolipids determine host selectivity of microbial NLP cytolysins. *Science*, **358**, 1431-1434.
98. **Levitan I., Singh D.K., Rosenhouse-Dantsker A.** (2014) Cholesterol binding to ion channels. *Front Physiol.*, **5**, 65. doi: 10.3389/fphys.2014.00065.
99. **Li X., Wang X., Yang Y., Li R., He Q., Fang X., Luu D.T., Maurel C., Lin J.** (2011) Single-molecule analysis of PIP<sub>2</sub> dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell*, **23**, 3780-3797.
100. **Li R., Liu P., Wan Y., Chen T., Wang Q., Mettlich U., Baluska F., Samaj J., Fang X., Lucas W.J., Lin J. A.** (2012) Membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *Plant Cell*, **24**, 2105-2122.
101. **Liang H., Yao N., Song J.T., Luo S., Lu H., Greenberg J.T.** (2003) Ceramides modulate programmed cell death in plants. *Genes Dev.*, **17**, 2636-2641.
102. **Lingwood D., Simons K.** (2007) Detergent resistance as a tool in membrane research. *Nat. Protoc.*, **2**, 2159-2165. doi: 10.1038/nprot.2007.294.
103. **Liu N.J., Hou L.P., Bao J.J., Wang .LJ., Chen X.Y.** (2021) Sphingolipid metabolism, transport, and functions in plants: recent progress and future perspectives. *Plant Commun.*, **2**, 100214. doi: 10.1016/j.xplc.2021.100214.
104. **Liu P., Li R.L., Zhang L., Wang Q.L., Niehaus K., Baluska F., Samaj J., Lin J.X.** (2009) Lipid microdomain polarization is required for NADPH oxidase-dependent ROS signaling in *Picea meyeri* pollen tube tip growth. *Plant J.*, **60**, 303-313.
105. **Luchini A., Vitiello G.** (2020) Mimicking the mammalian plasma membrane: an overview of lipid membrane models for biophysical studies. *Biomimetics (Basel)*, **6**, 3. doi: 10.3390/biomimetics6010003.
106. **Luttgeharm K.D., Kimberlin A.N., Cahoon E.B.** (2016) Plant Sphingolipid Metabolism and Function. *Subcell. Biochem.*, **86**, 249-286.

107. **Lynch D.V., Dunn T.M.** (2004) An introduction to plant sphingolipids and a review of recent advances in understanding their metabolism and function. *New Phytol.*, **16**, 677-702.
108. **Malinsky J., Opekarová M., Grossmann G., Tanner W.** (2013) Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **64**, 501-529.
109. **Manzano D., Andrade P., Caudepon D., Altabella T., Arro M., Ferrer A.** (2016) Suppressing farnesyl diphosphate synthase alters chloroplast development and triggers sterol-dependent induction of jasmonate and related responses. *Plant Physiol.*, **172**, 93-117.
110. **Martinière A., Zelazny E.** (2021) Membrane nanodomains and transport functions in plant. *Plant Physiol.*, **187**, 1839-1855.
111. **Mathai J.C., Tristram-Nagle S., Nagle J.F., Zeidel M.L.** (2008) Structural determinants of water permeability through the lipid membrane. *J. Gen. Physiol.*, **131**, 69-76.
112. **Maurel C., Boursiac Y., Luu D.T., Santoni V., Shahzad Z., Verdoucq L.** (2015) Aquaporins in Plants. *Physiol. Rev.*, **95**, 1321-1358.
113. **McMullen T. P., Lewis R. N., McElhaney R. N.** (2004) Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered phase and lipid rafts in model and biological membranes. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.*, **8**, 459-468.
114. **Meneghelli S., Fusca T., Luoni L., De Michelis M.I.** (2008) Dual mechanism of activation of plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase by acidic phospholipids: evidence for a phospholipid binding site which overlaps the calmodulin-binding site. *Mol. Membr. Biol.*, **25**, 539-546.
115. **Meza U., Delgado-Ramírez M., Romero-Méndez C., Sánchez-Armass S., Rodríguez-Menchaca A.A.** (2020) Functional marriage in plasma membrane: Critical cholesterol level – optimal protein activity. *Br. J. Pharmacol.*, **177**, 2456-2465.
116. **Minami A., Fujiwara M., Furuto A., Fukao Y., Yamashita T., Kamo M., Kawamura Y., Uemura M.** (2009) Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 341-359.

117. **Minami A., Takahashi K., Inoue S.-I., Tada Y., Kinoshita T.** (2019) Brassinosteroid induces phosphorylation of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase during hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, **60**, 935-944.
118. **Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J. P., Hartmann M.A., Bonneu M., Simon-Plas F., Lessire R., Bessoule J.J.** (2004) Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *Biol. Chem.*, **279**, 36277-36286.
119. **Morales-Cedillo F., González-Solís A., Gutiérrez-Angoa L., Cano-Ramírez D.L., Gavilanes-Ruiz M.** (2015) Plant lipid environment and membrane enzymes: the case of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Cell Rep.*, **34**, 617-629.
120. **Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J.J., Blein J.P., Simon-Plas F.** (2006) Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol. Cell Proteomics*, **5**, 1396-1411.
121. **Morenilla-Palao C., Pertusa M., Meseguer V., Cabedo H., Viana F.** (2009) Lipid raft segregation modulates TRPM8 channel activity. *J. Biol. Chem.*, **284**, 9215-9524.
122. **Morsomme P., Boutry M.** (2000) The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: structure, function and regulation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1465**, 1-16.
123. **Mouritsen O.I.** (1998) Self-assembly and organization of lipid-protein membranes. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.*, **3**, 78-87.
124. **Munro S.** (2003) Lipid rafts: elusive or illusive? *Cell*, **115**, 377-388.
125. **Nadimpalli R., Yalpani N., Johal G.S., Simmons C.R.** (2000) Prohibitins, stomatins, and plant disease response genes compose a protein superfamily that controls cell proliferation, ion channel regulation, and death. *J. Biol. Chem.*, **275**, 29579-29586.
126. **Nguyen T.T., Sabat G., Sussman M.R.** *In vivo* cross-linking supports a head-to-tail mechanism for regulation of the plant plasma membrane P-type H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **293**, 17095-17106.
127. **Norimatsu Y., Hasegawa K., Shimizu N., Toyoshima C.** (2017) Protein-phospholipid interplay revealed with crystals of a calcium pump. *Nature*, **545**, 193-198.
128. **Ohvo-Rekilä H., Ramstedt B., Leppimäki P., Slotte J.P.** (2002) Cholesterol interactions with phospholipids in membranes. *Prog. Lipid Res.*, **41**, 66-97.



129. **Ohyama K., Suzuki M., Kikuchi J., Saito K., Muranaka T.** (2009) Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 725-730.
130. **Olsson A., Svennelid F., Ek B., Sommarin M., Larsson C.** (1998) A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14-3-3 binding. *Plant Physiol.*, **118**, 551–555.
131. **Ott T.** (2017) Membrane nanodomains and microdomains in plant–microbe interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **40**, 82-88.
132. **Paetzold H., Garms S., Bartram S., Wieczorek J., Urós-Gracia E.M., Rodríguez-Concepción M., Boland W., Strack D., Hause B., Walter M.H.** (2010) The isogene 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2 controls isoprenoid profiles, precursor pathway allocation, and density of tomato trichomes. *Mol. Plant*, **3**, 904-16. doi: 10.1093/mp/ssq032.
133. **Palmgren M.G., Sommarin M.** (1989) Lysophosphatidylcholine stimulates ATP dependent proton accumulation in isolated oat root plasma membrane vesicles. *Plant Physiol.*, **90**, 1009-1014.
134. **Palmgren M.G.** (1990) An H-ATPase Assay: Proton Pumping and ATPase Activity Determined Simultaneously in the Same Sample. *Plant Physiol.*, **94**, 882-886.
135. **Palmgren M.G., Sommarin M., Serrano R., Larsson C.** (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H(+)-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 20470-20475.
136. **Palmgren M.G., Axelsen K.B.** (1998) Evolution of P-type ATPases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 37-45.
137. **Palmgren M.G.** (2001) Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **52**, 817-845.
138. **Palmgren M.G., Nissen P.** (2011) P-type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.*, **40**, 243-266.
139. **Palta J. P., Whitaker B. D., Weiss L. S.** (1993) Plasma membrane lipids associated with genetic variability in freezing tolerance and cold acclimation of solanum species, *Plant Physiol.*, **103**, 793-803.
140. **Pardo J.M., Serrano R.** (1989) Structure of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8557-8562.

141. **Parton R.G., Simons K.** (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 185-194.
142. **Paula S., Volkov A.G., Van Hoek A.N., Haines T.H., Deamer D.W.** (1996) Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness. *Biophys. J.*, **70**, 339-348.
143. **Pedersen B.P., Buch-Pedersen M.J., Morth J.P., Palmgren M.G., Nissen P.** (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, **450**, 1111-4.
144. **Peskan T., Westermann M., Oelmüller R.** (2000) Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6989-6995.
145. **Pike L.J.** (2003) Lipid rafts: bringing order to chaos. *J. Lipid. Res.*, **44**, 655-667.
146. **Piotrovskii M.S., Lapshin N.K., Andreev M.S., Trofimova M.S.** (2019) Role of PIP-aquaporin phosphorylation in redox-dependent modulation of osmotic water permeability in plasmalemma from roots of pea seedlings. *Rus. J. Plant Physiology*, **66**, 637-645.
147. **Post R.L., Hegyvary C., Kume S.** (1972) Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **247**, 6530-6340.
148. **Pulido P., Perello C., Rodriguez-Concepcion M.** (2012) New Insights into plant isoprenoid metabolism. *Mol. Plant*, **5**, 964–967. doi: 10.1093/mp/sss088.
149. **Raffaele S., Bayer E., Lafarge D., Cluzet S., German Retana S., Boubekour T., Leborgne-Castel N., Carde J.P., Lherminier J., Noirot E., Satiat-Jeunemaître B., Laroche-Traineau J., Moreau P., Ott T., Maule A.J., Reymond P., Simon-Plas F., Farmer E.E., Bessoule J.J., Mongrand S.** (2009) Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell*, **21**, 1541-1555.
150. **Ray T.K., Nandi J., Dannemann A., Gordon G.B.** (1983) Role of cholesterol in the structure and function of gastric microsomal vesicles. *J. Cell Biochem.*, **21**, 141-150.
151. **Reisinger V., Eichacker L.A.** (2008) Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *J. Proteom.*, **71**, 277–283. doi: 10.1016/j.jprot.2008.05.004.
152. **Reuff M., Mikosch M., Homann U.** (2010) Trafficking, lateral mobility and segregation of the plant K channel KAT1. *Plant. Biol. (Stuttg)*, **12**, 99-104.

153. **Roche Y., Gerbeau-Pissot P., Buhot B., Thomas D., Bonneau L., Gresti J., Mongrand S., Perrier-Cornet J.M., Simon-Plas F.** (2008) Depletion of phytosterols from the plant plasma membrane provides evidence for disruption of lipid rafts. *FASEB J.*, **22**, 3980-3991.
154. **Rodríguez-Concepción M.** (2014) Plant isoprenoids: a general overview. *Meth. Mol. Biol.*, **1153**, 1-5.
155. **Rossard S., Roblin G., Atanassova R.** (2010) Ergosterol triggers characteristic elicitation steps in *Beta vulgaris* leaf tissues. *J. Exp. Bot.*, **61**, 1807-1816.
156. **Sánchez-Barrena M.J., Chaves-Sanjuan A., Raddatz N., Mendoza I., Cortés Á., Gago F., González-Rubio J.M., Benavente J.L., Quintero F.J., Pardo J.M., Albert A.** (2020) Recognition and Activation of the Plant AKT1 Potassium Channel by the Kinase CIPK23. *Plant Physiol.*, **182**, 2143-2153.
157. **Sandstrom R.P., Cleland R.E.** (1989) Selective delipidation of the plasma membrane by surfactants: enrichment of sterols and activation of ATPase. *Plant Physiol.*, **90**, 1524-1531.
158. **Shaller H.** (2003) The role of sterols in plant growth and development. *Prog. Lipid Res.*, **42**, 163-175.
159. **Schaller H.** (2004) New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiol. Biochem.*, **42**, 465-476.
160. **Schrick K., DeBolt S., Bulone V.** (2012) Deciphering the molecular functions of sterols in cellulose biosynthesis. *Front. Plant Sci.*, **3**, 84. doi: 10.3389/fpls.2012.00084.
161. **Serrano R.** (1984) Purification of the proton pumping ATPase from plant plasma membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **121**, 735-40.
162. **Silvestro L. D., Andersen T. G., Schaller H., Jensen P. E.** (2013) Plant sterol metabolism. D7-sterol-C5-desaturase (STE1/DWARF7), D5,7-sterol-D7-reductase (DWARF5) and D24-sterol-D24-reductase (DIMINUTO/DWARF1) show multiple subcellular localizations in *Arabidopsis thaliana* (Heynh) L. *PLoS One.*, **8**. doi: 10.1371/journal.pone.0056429.
163. **Simkin A.J., Guirimand G., Papon N., Courdavault V., Thabet I., Ginis O., Bouzid S., Giglioli-Guivarc'h N., Clastre M.** (2011) Peroxisomal localisation of the final steps of the mevalonic acid pathway in planta. *Planta*, **234**, 903-914.

164. **Simon-Plas F., Perraki A., Bayer E., Gerbeau-Pissot P., Mongrand S.** (2011) An update on plant membrane rafts. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **14**, 642-649.
165. **Simons K., Ikonen E.** (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-572.
166. **Simons K., Sampaio J.L.** (2011) Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**. doi: 10.1101/cshperspect.a004697.
167. **Singer J., Nicolson L.** (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, **175**, 720-731.
168. **Scou J.C.** (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 394-401.
169. **Sondergaard, T.E., Schulz A., Palmgren, M.G.** (2004) Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Plant Physiol.*, **136**, 2475-2482.
170. **Sonnino S., Prinetti A.** (2010a) Gangliosides as regulators of cell membrane organization and functions. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **688**, 165-184.
171. **Sonnino S., Prinetti A.** (2010b) Lipids and membrane lateral organization. *Front Physiol.*, **1**, 153. doi: 10.3389/fphys.2010.00153.
172. **Stanislas T., Bouyssie D., Rossignol M., Vesa S., Fromentin J., Morel J., Pichereaux C., Monsarrat B., Simon-Plas F.** (2009) Quantitative proteomics reveals a dynamic association of proteins to detergent-resistant membranes upon elicitor signaling in tobacco. *Mol. Cell. Proteomics*, **8**, 2186-98. doi: 10.1074/mcp.M900090-MCP200.
173. **Sugahara M., Uragami M., Yan X., Regen S.** (2001) The structural role of cholesterol in biological membranes. *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7939-7940.
174. **Sutter J.U., Campanoni P., Tyrrell M., Blatt M.R.** (2006) Selective mobility and sensitivity to SNAREs is exhibited by the *Arabidopsis* KAT1 K<sup>+</sup> channel at the plasma membrane. *Plant Cell*, **18**, 935-54.
175. **Szymanski W.G., Zauber H., Erban A., Gorka M., Wu X.N., Schulze W.X.** (2015) Cytoskeletal Components Define Protein Location to Membrane Microdomains. *Mol. Cell Proteomics*, **14**, 2493-509. doi: 10.1074/mcp.M114.046904.
176. **Takahashi D., Kawamura Y., Uemura M.** (2013) Detergent-resistant plasma membrane proteome to elucidate microdomain functions in plant cells. *Front Plant Sci.*, **4**, 27. doi: 10.3389/fpls.2013.00027.

177. **Tanner W., Malinsky J., Opekarová M.** (2011). In plant and animal cells, detergent-resistant membranes do not define functional membrane rafts. *Plant Cell*, **23**, 1191-1193.
178. **Tapken W., Murphy A.** (2015) Membrane nanodomains in plants: capturing form, function, and movement. *J. Exp. Bot.*, **66**, 1573-1586.
179. **Titapiwatanakun B., Blakeslee J.J., Bandyopadhyay A., Yang H., Mravec J., Sauer M., Cheng Y., Adamec J., Nagashima A., Geisler M., Sakai T., Friml J., Peer W.A., Murphy A.S.** (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **57**, 27-44.
180. **Towbin H., Staehelin T., Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
181. **Tsujii M., Tanudjaja E., Uozumi N.** (2020) Diverse Physiological Functions of Cation Proton Antiporters across Bacteria and Plant Cells. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4566. doi: 10.3390/ijms21124566.
182. **Ullmann P., Ury A., Rimmele D., Benveniste P., Bouvier-Nave P.** (1993) UDP-glucose sterol- $\beta$ -D-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of plants: enzymatic, properties and lipid dependence. *Biochimie*, **75**, 713-723.
183. **van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W.** (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 112-124.
184. **van Meer G.** (2011) Dynamic transbilayer lipid asymmetry. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**. doi: 10.1101/cshperspect.a004671.
185. **Vance J.E.** (2015) Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells. *Traffic*, **16**, 1-18.
186. **Venema K., Palmgren M.G.** (1995) Metabolic modulation of transport coupling ratio in yeast plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **270**, 19659-19667.
187. **Vranová E., Coman D., Gruissem W.** (2013) Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **64**, 665-700.
188. **Wang L., Li H., Lv X., Chen T., Li R., Xue Y., Jiang J., Jin B., Baluška F., Šamaj J., Wang X., Lin J.** (2015) Spatiotemporal Dynamics of the BRI1 Receptor and its Regulation by Membrane Microdomains in Living *Arabidopsis* Cells. *Mol. Plant*, **8**, 1334-49. doi: 10.1016/j.molp.2015.04.005.

189. **Wang Q., Zhao Y., Luo W., Li R., He Q., Fang X., Michele R.D., Ast C., von Wirén N., Lin J.** (2013) Single-particle analysis reveals shutoff control of the *Arabidopsis* ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 13204-13209.
190. **Wang Z.Y., Seto H., Fujioka S., Yoshida S., Chory J.** (2001) BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature*, **410**, 380-383.
191. **Watson H.** (2015) Biological membranes. *Essays Biochem.*, **59**, 43-69.
192. **Wege S., Gilliam M., Henderson S.W.** (2017) Chloride: not simply a 'cheap osmoticum', but a beneficial plant macronutrient. *J. Exp. Bot.*, **68**, 3057-3069.
193. **Wen Z., Tyerman S.D., Dechorgnat J., Ovchinnikova E., Dhugga K.S., Kaiser B.N.** (2017) Maize NPF6 Proteins Are Homologs of *Arabidopsis* CHL1 That Are Selective for Both Nitrate and Chloride. *Plant Cell*, **29**, 2581-2596.
194. **Wi S.J., Seo Sy., Cho K., Nam M.H., Park K.Y.** (2014) Lysophosphatidylcholine enhances susceptibility in signaling pathway against pathogen infection through biphasic production of reactive oxygen species and ethylene in tobacco plants. *Phytochemistry*, **104**, 48-59.
195. **Wielandt A.G., Pedersen J.T., Falhof J., Kemmer G.C., Lund A., Ekberg K., Fuglsang A.T., Pomorski T.G., Buch-Pedersen M.J., Palmgren M.** (2015) Specific Activation of the Plant P-type Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase by Lysophospholipids Depends on the Autoinhibitory N- and C-terminal Domains. *J. Biol. Chem.*, **290**, 16281-16291.
196. **Wielandt A.G., Palmgren M.G., Fuglsang A.T., Günther-Pomorski T., Justesen B.H.** (2016) Measuring H(+) Pumping and Membrane Potential Formation in Sealed Membrane Vesicle Systems. *Methods Mol. Biol.*, **1377**, 171-80. doi: 10.1007/978-1-4939-3179-8\_17.
197. **Willemsen V., Friml J., Grebe M., van den Toorn A., Palme K., Scheres B.** (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell*, **15**, 612-625.
198. **Wu F.H., Shen S.C., Lee L.Y., Lee S.H., Chan M.T., Lin C.S.** (2009) Tape-*Arabidopsis* Sandwich – a simpler *Arabidopsis* protoplast isolation method. *Plant Methods*, **5**, 16. doi: 10.1186/1746-4811-5-16.

199. **Yu J., Fischman D.A., Steck T.L.** (1973) Selective solubilization of proteins and phospholipids from red blood cell membranes by nonionic detergents. *J. Supramol. Struct.*, **1**, 233-248.
200. **Zhao J., Li P., Motes C.M., Park S., Hirschi K.D.** (2015) CHX14 is a plasma membrane K-efflux transporter that regulates K(+) redistribution in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.*, **38**, 2223-2238.
201. **Zidovetzki R., Levitan I.** (2007) Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta*, **1768**, 1311-1324.