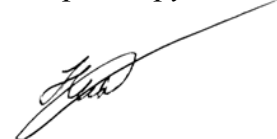


На правах рукописи



Лапшин Никита Константинович

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

1.5.21. – физиология и биохимия растений

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в лаборатории мембран растительных клеток Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Трофимова Марина Сергеевна

Официальные оппоненты:

Бабакон Алексей Владимирович,

доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории стрессоустойчивости растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии».

Бибикова Татьяна Николаевна,

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры физиологии растений Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова».

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского».

Защита диссертации состоится 17 октября 2023 г. в 11 часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание степени кандидата наук, на соискание степени доктора наук 24.1.138.01 по специальности 1.5.21. – «Физиология и биохимия растений» (биологические науки) при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук по адресу: 127276, Москва, Ботаническая ул., 35. Телефон/факс: (499) 678-54-20; электронная почта: m-azarkovich@mail.ru; ifr@ippras.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук и на сайте www.ippras.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета:

кандидат биологических наук



Азаркович Марина Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 неионных 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 стерина в клетках растений подразумевает, что должна существовать сложная и скоординированная система транспорта этих молекул из эндоплазматического ретикулума в плазматическую мембрану как с помощью везикулярного транспорта, так и с участием стерин-переносящих белков (Shaller, 2004; Pullido et al., 2012; Ferrer et al., 2017; Kumar et al., 2021). Кроме того, стерин способен оказывать влияние на активность (конформацию) мембранных белков напрямую через специфические стерин-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 стерин-богатым доменам мембраны (Sandstrom and Cleland, 1989; Mongrand et al., 2006; Furt et al., 2007). Несмотря на то, что в последние десятилетия наблюдается большой прогресс в понимании молекулярных механизмов, лежащих в основе регуляции H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток растений (Haruta et al., 2015; Falhof et al., 2016), остается открытым вопрос о том, каким образом на активность протонной помпы влияет ее липидное окружение. В данном случае роль и участие стерина в этих процессах заслуживает особого внимания, так как экспериментальные данные, полученные для разных АТФаз Р-типа, 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 стерина в плазматических мембранах клеток растений, используя для извлечения стерина метил- β -циклодекстрин ($M\beta CD$).

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

- 1) Оценить количество экстрагируемых в присутствии М β 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⁺-АТФазы плазмалеммы.
- 3) Изучить характер распределения Н⁺-АТФазы между детергент-устойчивыми и детергент-растворимыми фракциями плазмалеммы в зависимости от содержания стеринов в мембране.
- 4) Оценить влияние М β CD на кинетические параметры гидролитической активности Н⁺-АТФазы в нативном липидном окружении плазмалеммы, а также – в солюбилизованном в присутствии додецил мальтозида.
- 5) Сопоставить активности АТФ-зависимого и пассивного Н⁺-транспорта на везикулярных препаратах плазмалеммы в зависимости от содержания в мембранах стеринов.

Научная новизна. Впервые было показано, что стерины являются аннулярным липидным окружением Н⁺-АТФазы плазмалеммы клеток растений. Кроме того, Н⁺-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⁺-АТФазы и к значительной стимуляции активного Н⁺-транспорта. Сопоставление данных по АТФ-зависимому формированию величины $\Delta\mu\text{H}^+$ с результатами пассивной протонной проницаемости плазмалеммы в отсутствие АТФ позволяет 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 стероидов 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 стероидов в плазматической мембране.

Личный вклад соискателя. Результаты, изложенные в диссертационной работе, получены соискателем в лаборатории мембран растительных клеток ФГБУН ИФР им. К.А. 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» (Нижегород, 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).

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

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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Обзор литературы

Обзор литературы содержит информацию о латеральной гетерогенности биологических мембран, особенностях структурной организации и механизмах регуляции H^+ -АТФазы плазмалеммы клеток растений, в том числе связанных с ее липидным окружением в мембране.

Глава 2. Материалы и методы

Объекты исследования. Объектами исследования служили протопласты из мезофилла *Arabidopsis thaliana* (L.) экотипа Columbia и везикулы плазмалеммы, изолированной из корней 5-ти дневных этиолированных проростков гороха *Pisum sativum* L. (сорт Альфа). Протопласты получали из листьев 8–10-ти недельных растений *Arabidopsis thaliana* (L.) по методу «сэндвича» согласно (Wu et al., 2009). Выделение плазмалеммы проводили методом фракционирования микросомальных мембран с помощью водной двухфазной полимерной системы: 6.2%-ный (в/в) декстран Т500 – 6.2% полиэтиленгликоль 3500 по методике (Larsson et al., 1994). Полученную суспензию везикул плазмалеммы замораживали и хранили при $-70^{\circ}C$. Во всех экспериментах использовалась однократно размороженная плазмалемма.

Для экстракции стериннов из плазмалеммы протопластов и везикул использовали метил- β -циклодекстрин (М β CD) в конечных концентрациях от 5 до 20 мМ. После 30 мин инкубации протопласты и везикулы отмывали от М β CD однократным центрифугированием.

Размеры протопластов до и после обработки M β CD оценивали по микрофотографиям, используя программное обеспечение Axio Vision 4.8 («Carl Zeiss», Германия). Размеры везикул – с помощью метода динамического светорассеивания на приборе Photocor compact-z (Россия).

Для количественного определения экстрагированных стеринов использовали набор Amplex Red Cholesterol Assay Kit («Invitrogen», США) согласно протоколу изготовителя и/или флуоресцентный аналог холестерина – NBD-холестерин.

Для оценки скорости закисления среды протопластами использовали флуоресцентный pH-индикатор 5,6-карбоксифлуоресцеин (Chelysheva et al., 1999).

Для получения детергент-устойчивой и детергент-солюбилизированной фракций плазмалеммы, суспензию мембранных везикул, обработанную 1% Тритоном X-100, разделяли в градиенте плотности йодиксанола (OptiPrep) («Sigma», США) как в (Белугин и др., 2010).

Денатурирующий электрофорез мембранных белков проводили в 10% ДДСNa-ПАА геле по методу (Laemmli, 1970) в камере Mini-protean III Cell («Bio-Rad», США). Для определения содержания белка использовали метод Bradford (1976).

Вестерн блот анализ H⁺-АТФазы плазмалеммы. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Super («Amersham», Великобритания) полусухим способом, используя TransBlot SD transfer cell («BioRad», США) по методике (Towbin et al., 1979). Иммунодетекцию H⁺-АТФазы проводили с помощью первичных антител AS07 260 («Agriser», Швеция) и вторичных флуоресцеин-меченых антител («Медгамал», Россия).

Для оценки степени олигомеризации H⁺-АТФазы плазмалемму солюбилизировали 2% додецил мальтозидом и белковые комплексы разделяли в градиентном 4–13% разделяющем геле методом голубого нативного электрофореза (BN-PAGE) (Reisinger and Eichacker, 2008).

Гидролитическую активность H^+ -АТФазы везикул плазмалеммы регистрировали в сопряженной АТФ-регенерирующей системе (Palmgren, 1990).

АТФ-зависимый протонный транспорт оценивали с помощью ΔpH индикатора – акридинового оранжевого на спектрофотометре (Hitachi 557, Япония) в двухволновом режиме (Ершов и др., 2005).

Генерацию АТФ-зависимого трансмембранного потенциала ($\Delta\psi$) везикулами плазмалеммы определяли с помощью измерения разности абсорбции флуоресцентного красителя оксонола VI в двухволновом режиме на спектрофотометре (Hitachi 557, Япония) (Wielandt et al., 2016).

Пассивную протонную проницаемость плазмалеммы оценивали методом искусственной генерации градиента pH с помощью загрузки везикул $(NH_4)_2SO_4$ (Clerc and Varenholz, 1998).

Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), используя программное обеспечение Sigma Plot 12 (SYSTAT Software, США).

Глава 3. Результаты и их обсуждение

Экстракция стерина и размеры протопластов. Извлечение стерина из биологических мембран часто сопровождается изменением их водной/ионной проницаемости, а замещение стерина молекулами воды приводит к нарушению плотности упаковки липидов в бислое в результате его оводненности и может отразиться на общей площади поверхности липидного матрикса (Mathai et al., 2008; Frallicciardi et al., 2022). В табл. 1 представлены размеры протопластов до и после их обработки 10 мМ М β CD. Видно, что их размеры, выраженные через диаметр, не отличались. Снижение концентрации М β CD до 5 мМ, или наоборот, увеличение до 20 мМ, также не сказывалось на размерах клеток.

Табл. 1. Диаметры протопластов после извлечения стерина в присутствии М β CD.

Вариант	Число протопластов	Диаметр, мкм
контроль	118	39.82 \pm 6.45
10 мМ М β CD	110	41.22 \pm 8.55

Закисление среды протопластами: вклад Н⁺-АТФазы плазмалеммы. Об эффективности протонного транспорта можно судить по закислению суспензией протопластов их внешнего буферного раствора. Контрольная суспензия 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. 1а). Протопласты, предварительно проинкубированные с 5 мМ М β CD, имели близкую с контролем величину изменения Δ рН, однако обработка 10 мМ М β CD приводила уже к более выраженному эффекту, а значение Δ рН в данном случае составляло 0.18 (рис. 1б). Чтобы удостовериться, что обнаруженные эффекты непосредственно связаны с активностью Н⁺-АТФазы, а не с изменением проницаемости мембраны для катионов и/или анионов, ко всем образцам добавляли специфический ингибитор

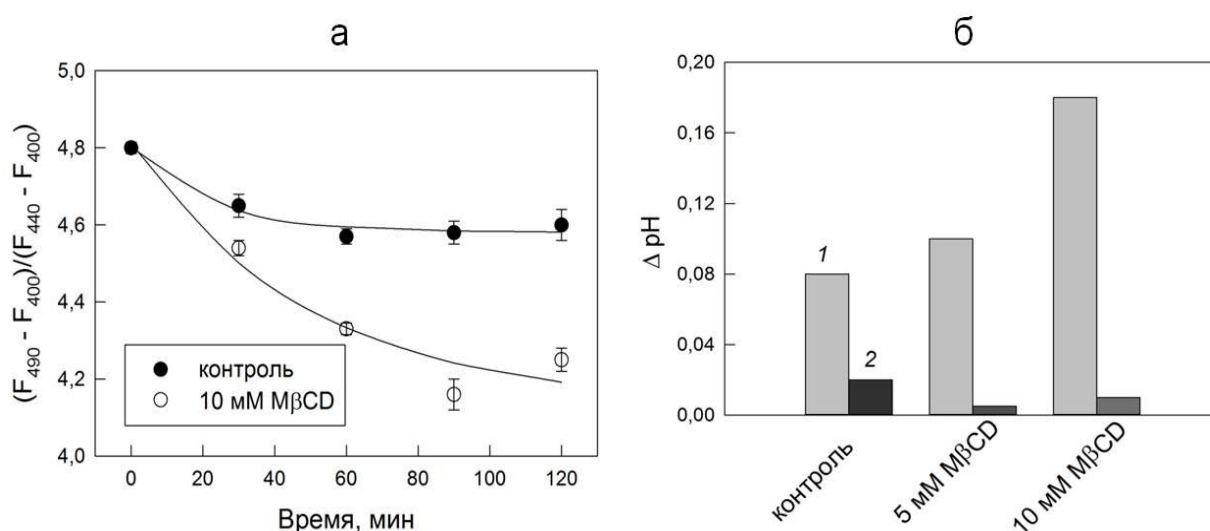


Рис. 1. Кинетика закисления среды протопластами (а) и изменение рН среды в ответ на извлечение стерина в присутствии М β CD (б). (1 – контроль; 2 – эритрозин В).

H⁺-АТФазы плазмалеммы – эритрозин В (20 мкМ). Через час после внесения ингибитора все варианты демонстрировали отсутствие изменений величины ΔpH (рис. 1б), что подтверждает участие H⁺-АТФазы плазмалеммы в этом процессе.

Экстракция стерина и размеры везикул изолированной плазмалеммы. В исходной плазмалемме содержание стерина составило 85.6 ± 8.6 мкг/мг белка и постепенно снижалось после обработки, достигая практически 50 % от начального уровня при ее инкубации с 30 мМ МβCD (не представлено). Чтобы проверить, способно ли извлечение стерина приводить к изменению размеров везикул, суспензию плазмалеммы предварительно обрабатывали 10 мМ МβCD, а затем регистрировали корреляционную функцию флуктуаций рассеянного света.

Табл. 2. Размеры везикул плазмалеммы после обработки МβCD. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение.

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

В данном случае размеры частиц, выраженные как радиус везикул, в обоих вариантах составляли около 95 нм и практически не различались (табл. 2). Также в опытном варианте наблюдалось присутствие частиц размером порядка 2 мкм, что, по всей видимости, соответствует агрегатам МβCD с экстрагированными стеринами (Ryzhakov et. al., 2016).

Влияние МβCD на содержание H⁺-АТФазы в детергент-устойчивых и детергент-солюбилизированных фракциях плазмалеммы. Имеются сведения о том, что H⁺-АТФаза Р-типа клеток растений обнаруживается в стерин богатых доменах плазмалеммы (Furt et al., 2007). Чтобы проверить эти данные для наших объектов, 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⁺-АТФазы между мембранными доменами с разным липидным составом (рис. 2). Фракция 3 соответствует детергент-устойчивым фракциям плазмалеммы и обогащена стеринами, в то время как фракция 4 содержит солюбилизированные белки. При обработке мембран 10 мМ МβCD наблюдалось увеличение доли солюбилизированного белка во фракции 4 (рис. 2а), а содержание стерина между фракциями 3 и 4 в присутствии МβCD выравнивалось (рис. 2б). Для того чтобы оценить характер распределения Н⁺-АТФазы плазмалеммы между детергент-устойчивой (3) и солюбилизированной (4)

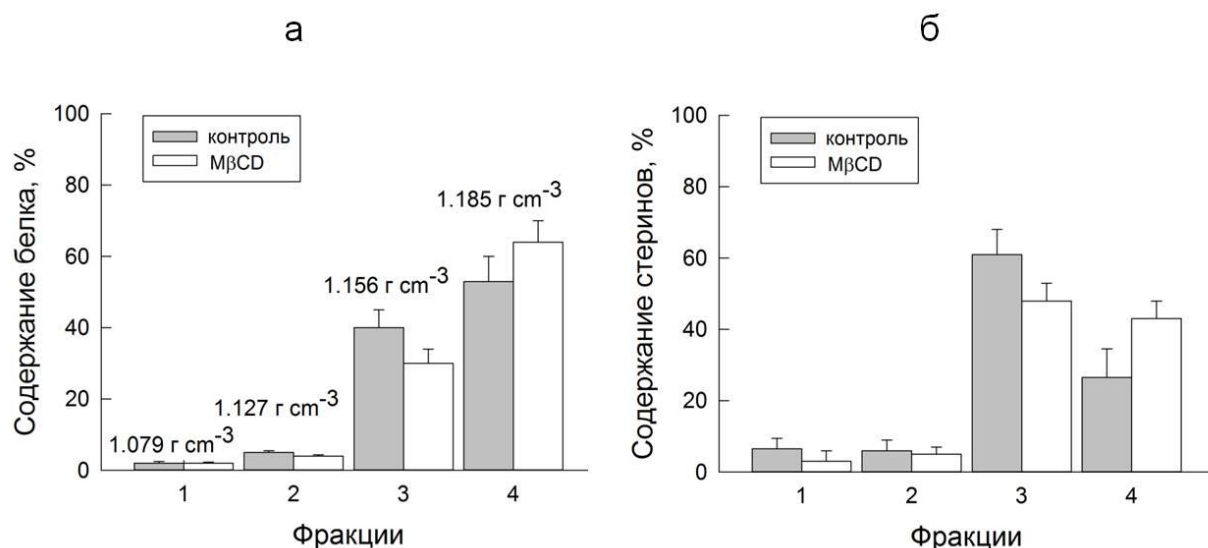


Рис. 2. Влияние МβCD на распределение белков (а) и стерина (б) между фракциями плазмалеммы, разделенными в градиенте плотности OptiPrep.

фракциями, белки подвергали денатурирующему электрофорезу с последующей иммунодетекцией Н⁺-АТФазы (рис. 3). Видно, что мономеры Н⁺-АТФазы (~ 100 кД) одновременно выявлялись как в детергент-устойчивой (R), так и в детергент-солюбилизированной (S) фракциях, а содержание было выше во фракции 3. При этом экстракция стерина в присутствии МβCD увеличивала долю общего солюбилизированного белка (рис. 2а), но не приводило к выравниванию содержания Н⁺-АТФазы между фракциями S и R (рис. 3).

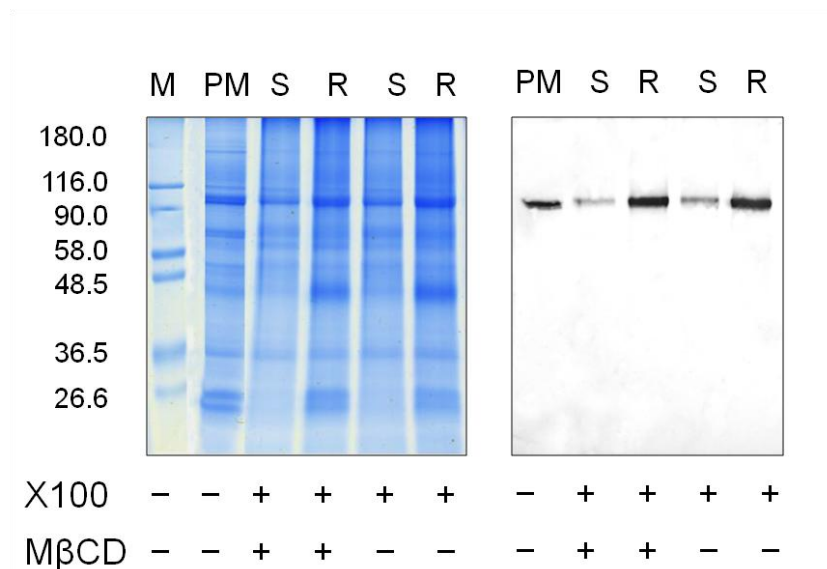


Рис. 3. Влияние MβCD на распределение белков (слева) и H⁺-АТФаз (справа) между детергент-устойчивой (R) и солюбилизированной (S) фракциями плазмалеммы.

Влияние стерина на гидролитическую активность H⁺-АТФазы плазмалеммы. При изучении роли липидного окружения в модуляции активности H⁺-АТФазы Р-типа были использованы изолированные везикулы, обработанные MβCD для изменения содержания стерина в плазмалемме. Анализ кинетических кривых гидролиза АТФ с использованием сопряженной системы НАДН/АТФ показал, что изменение V_{max}, характеризующее скорость оборачиваемости белка, выросла при внесении MβCD до 10 мМ, при этом величина K_M, отражающая сродство фермента к субстрату, не менялась (табл. 3).

Табл. 3. Кинетические параметры гидролиза АТФ везикулами плазмалеммы в присутствии MβCD. * указывает на достоверность различий V_{max} (p ≤ 0.05).

MβCD, мМ	K _M , мМ	V _{max} , мкмоль АТФ мг ⁻¹ белка мин ⁻¹
0	0.220 ± 0.07	0.82 ± 0.01
2	0.198 ± 0.05	0.83 ± 0.03
5	0.188 ± 0.04	1.18 ± 0.04
10	0.204 ± 0.08	1.32 ± 0.05*
15	0.192 ± 0.07	0.70 ± 0.02

Влияние додецил мальтозида на активность H⁺-АТФазы плазмалеммы.

Солюбилизация плазмалеммы в присутствии додецил мальтозида (ДДМ) позволяет сохранить белок-белковые взаимодействия и не извлекать интегральные липиды, расположенные между субъединицами белка и попадающие на стадии биосинтеза в ЭПР. Ранее было показано, что 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 табл. 4 видно, что в присутствии ДДМ происходило почти двукратное усиление гидролитической активности H⁺-АТФазы, и все варианты (после их обработки МβСD) демонстрировали практически одинаковые значения V_{max}, а K_M оставалась без изменений. Тот факт, что обработка ДДМ приводила к двукратному увеличению скорости гидролиза V_{max} и не зависела от того, сколько стерина содержали везикулярные мембраны до солюбилизации, свидетельствует в пользу того, что именно стерин непосредственно выступают в роли аннулярного липидного окружения протонной помпы.

Табл. 4. Кинетические параметры гидролиза АТФ везикулярной и солюбилизированной в присутствии додецил мальтозида (ДДМ) фракции плазмалеммы с разным содержанием стерина. * обозначает достоверность различия (p ≤ 0.05) с плазмалеммой с исходным содержанием стерина.

МβСD, мМ	Стерины, мкг мг ⁻¹ белка	K _M , мМ		V _{max} , мкмоль АТФ мг ⁻¹ белка мин ⁻¹	
		- 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*

АТФ-зависимый протонный транспорт везикул плазмалеммы с разным содержанием стерина. Результатом АТФ-зависимого протонного транспорта является перенос положительных зарядов через мембрану и формирование величины $\Delta\mu\text{H}^+$, представленной суммой концентрационной (ΔpH) и электрической ($\Delta\psi$) составляющих. В отсутствие каких-либо проникающих ионов, все образцы сохраняли способность генерировать величину $\Delta\psi$, при этом эффект был наиболее выраженным при инкубации везикул с 5 мМ М β CD (рис. 4а). Это согласуется с ранее полученными нами данными по гидролизу АТФ, где обработка везикул М β CD вызывала увеличение параметра V_{max} (табл. 3 и 4).

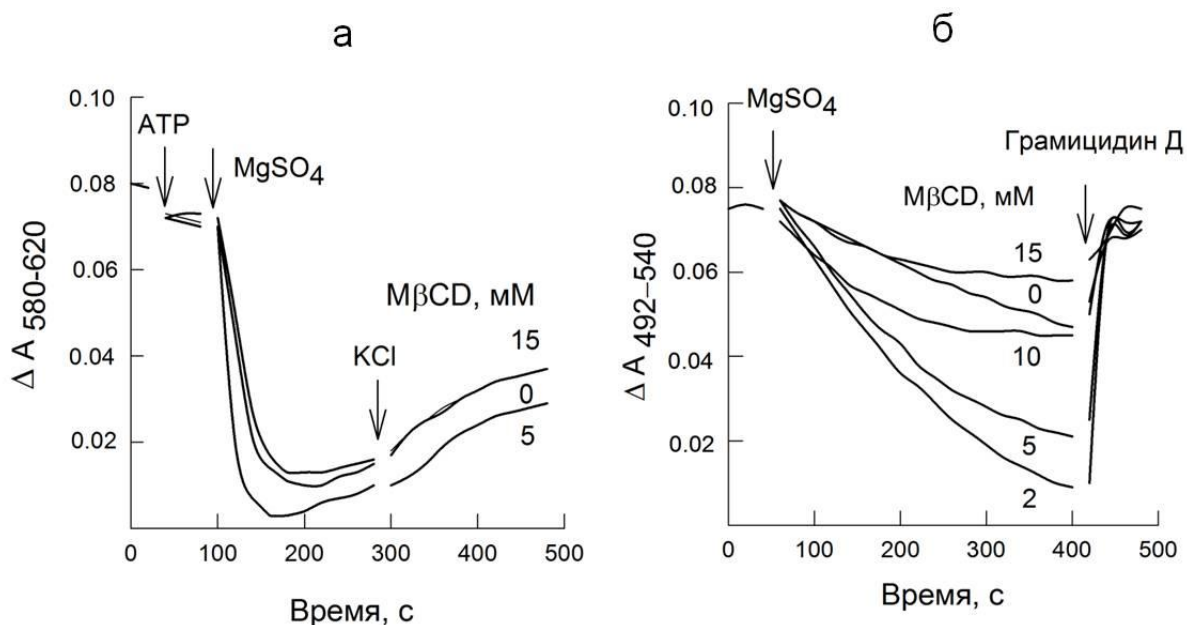


Рис. 4. Генерация $\Delta\psi$ (а) и ΔpH (б) везикулами плазмалеммы с разным содержанием стерина.

Однако если обратить внимание на результаты по АТФ-зависимому протонному транспорту в среде, содержащей KCl (рис. 4б), можно увидеть, что концентрации М β CD, которые вызывали наиболее сильный ответ (до 5 мМ) не совпадали с полученными данными по гидролизу АТФ (5–10 мМ). Это можно объяснить тем фактом, что извлечение стерина помимо активации самой H^+ -АТФазы также усиливает пассивные протонные утечки через мембрану с участием анионов или катионов (K^+ или Cl^-).

Пассивная протонная проницаемость везикул. В отсутствие М β CD протонная проницаемость плазмалеммы была на низком уровне (рис. 5). Извлечение стерина добавлением в среду с КСl М β CD в концентрациях 2–10 мМ приводило к усилению пассивной проницаемости мембраны для протонов (рис. 5а). Таким образом, экстракция стерина способствует увеличению протонных утечек через мембрану, а обнаруженные эффекты транзиторной стимуляции АТФ-зависимого Н⁺ транспорта в присутствии М β CD обусловлены постепенной активацией транспортеров, работа которых сопряжена с переносом протонов. Для выяснения природы этих транспортных механизмов были проведены эксперименты со средами, содержащими холинхлорид (рис. 5б) и К₂SO₄ (рис. 6а). Видно, что в среде с холин хлоридом экстракция стерина значительно стимулировала пассивный транспорт протонов, а скорость диссипации Δ pH соответствовала контрольному варианту (рис. 5б). Если среда содержала К₂SO₄ (рис. 6а), величина диссипации искусственного градиента pH была примерно в 2 раза ниже, чем в случае среды с КСl (рис. 5а). Из полученных результатов можно сделать вывод, что извлечение стерина приводит к изменению активности как анионных, так и катионных

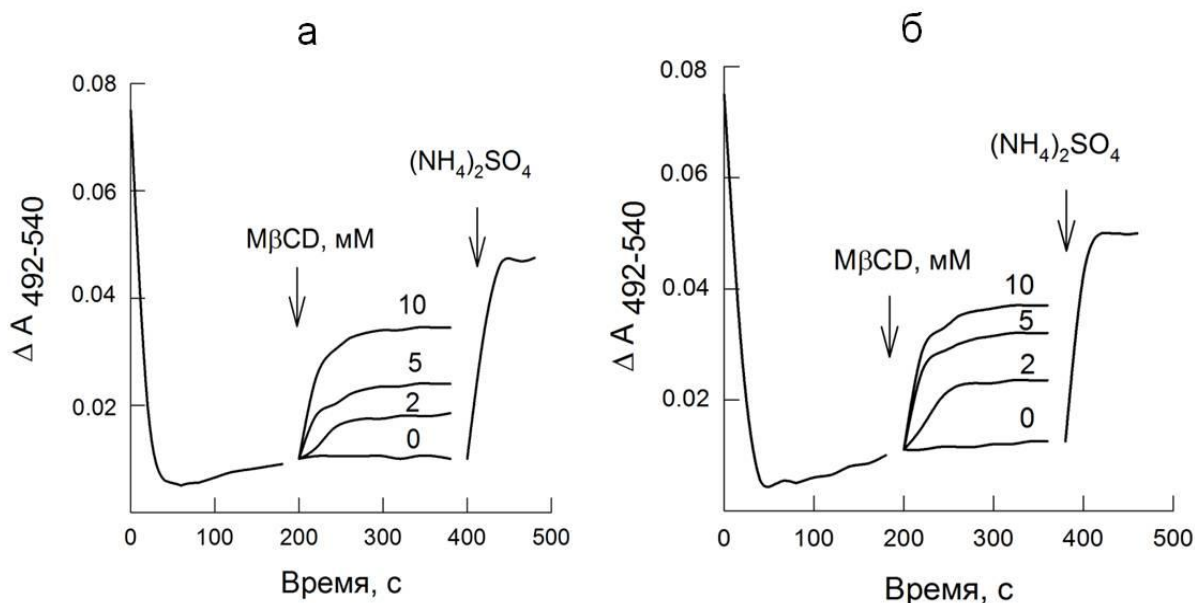


Рис. 5. Влияние М β CD на пассивный Н⁺-транспорт (роль анионных транспортеров). Везикулы плазмалеммы, предварительно проинкубированные с (NH₄)₂SO₄, переносили в среду, содержащую 50 мМ КСl (а) или 50 мМ холин хлорид (б).

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 ΔpH с участием анион/протонного симпортера необходимо присутствие аниона в одном компартменте с протоном. Проверка этой гипотезы была проведена в экспериментах с валиномицином. Результаты экспериментов показали, что генерация потенциала со знаком «+» внутри везикул в присутствии валиномицина также активировала протонную утечку (рис. 6б).

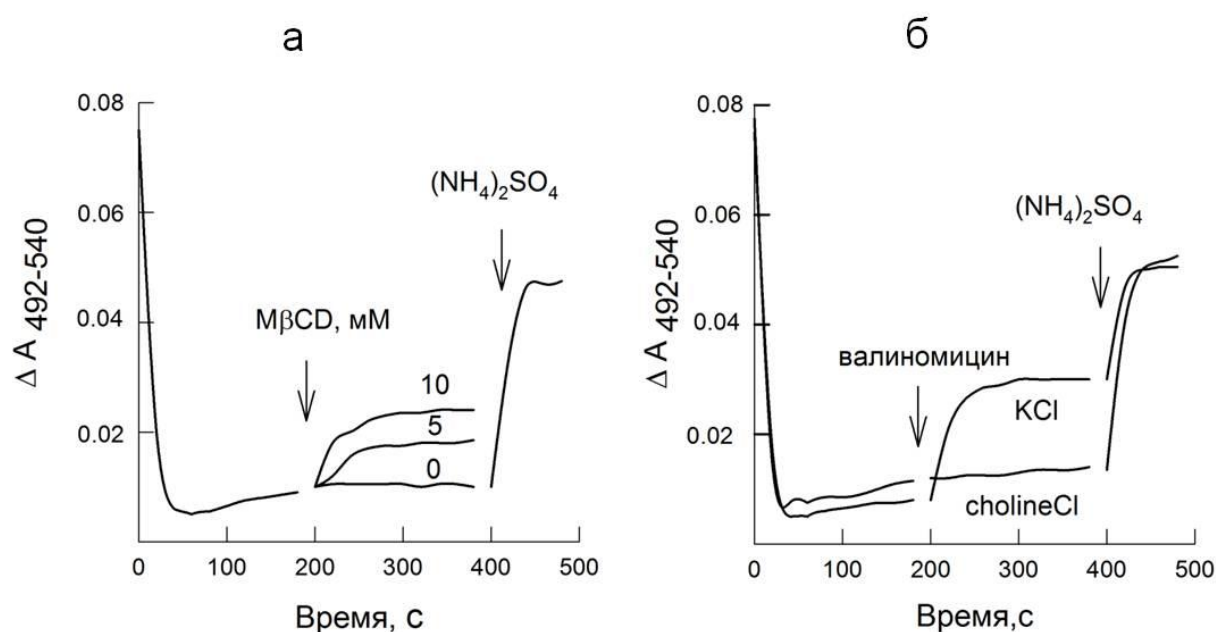


Рис. 6. Влияние M β CD на пассивный H^+ -транспорт (роль катионных транспортеров). Везикулы, предварительно проинкубированные с $(NH_4)_2SO_4$, переносили в среду, содержащую 25 мМ K_2SO_4 (а) или 50 мМ KCl/холин хлорид (б).

Таким образом, можно полагать, что в результате извлечения стероидов усиление диссипации ΔpH может происходить в результате активности, по крайней мере, двух механизмов, связанных с трансмембранным транспортом анионов. На первом этапе Cl^- должен войти в люмен везикул (например, с помощью анионного канала семейства SLAH/SLAC), чтобы затем инициировался H^+ /анионный котранспорт. На роль хлорид/протонного симпортера могут претендовать транспортеры семейства NPF, обладающие широкой субстратной специфичностью (Wege et al., 2017). В

табл. 5 дано сопоставление скоростей активного и пассивного протонного транспорта в зависимости от концентрации МβCD. Видно, что при увеличении содержания МβCD в пробе активация АТФ-зависимой генерации ΔрН, сопряженной с переносом аниона, имеет транзиторный характер в отличие от линейной концентрационной зависимости диссипации протонного градиента. Стоит отметить, что нельзя полностью исключать и влияние катионов, так как опыты с везикулами, помещенных в среду, содержащую K₂SO₄ (рис. 6а), также демонстрировали наличие протонных утечек в присутствии МβCD, хотя наблюдаемые эффекты были значительно ниже, по сравнению с КСl. Из полученных данных можно сделать вывод, что системы генерации и диссипации ΔрН на плазматической мембране имеют разную чувствительность к содержанию в ней стероидов.

Табл. 5. Влияние МβCD на скорость АТФ-зависимого и пассивного Н⁺-транспорта в везикулах плазмалеммы.

МβCD, мМ	АТФ-зависимый Н ⁺ - транспорт, Δ А 10 ³ мин ⁻¹	Пассивный Н ⁺ -транспорт, Δ А 10 ³ мин ⁻¹
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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На рис. 7 представлена схема, отображающая наиболее вероятные молекулярные механизмы стимуляции АТФ-зависимого и пассивного протонного транспорта в ответ на извлечение стероидов из плазмалеммы в присутствии М β CD. Многократное усиление АТФ-зависимой генерации ΔpH после обработки плазмалеммы низкими концентрациями М β CD в диапазоне 2–5 мМ обусловлено как увеличением скорости гидролиза АТФ, так и изменением активности анионных каналов, обеспечивающих трансформацию $\Delta\Psi$ в ΔpH (SLAH/SLAC на схеме) (рис. 7а). Отсутствие же корреляции между кинетическими параметрами гидролитической активности и АТФ-зависимым протонным транспортом при повышении содержания М β CD до 10 мМ и выше, когда H^+ -АТФаза активна, а

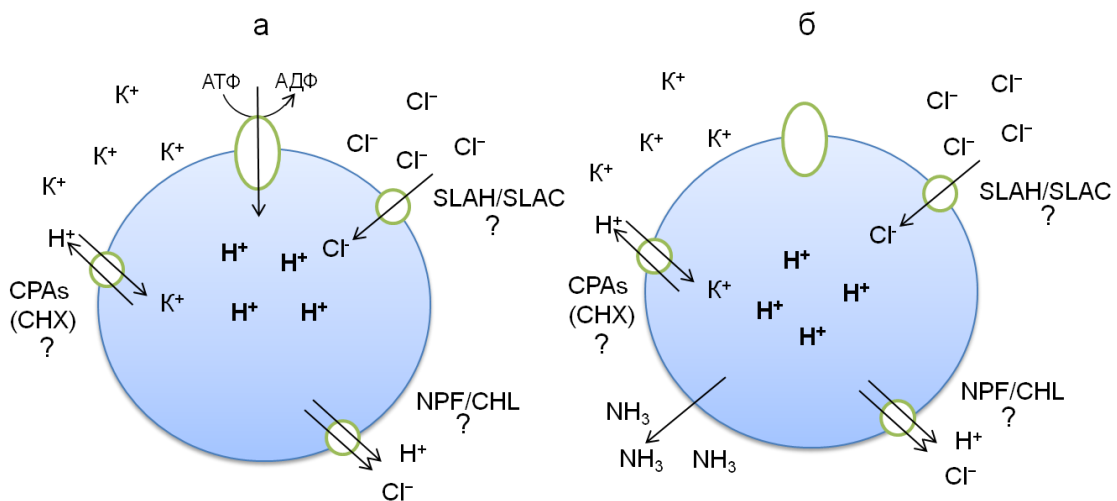


Рис. 7. Схема зависящих от содержания стероидов процессов, участвующих в АТФ-зависимом (а) и пассивном (б) транспорте протонов через плазмалемму.

Извлечение стероидов в присутствии М β CD приводит к увеличению скорости гидролиза (V_{max}) H^+ -АТФазы и сопровождается значительным усилением активного протонного транспорта, сопряженного с активацией анионных каналов с участием Cl^- (например, семейства SLAH/SLAC). Усиление пассивной протонной проницаемости везикул плазмалеммы в ответ на обработку М β CD 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 везикулы плазмалеммы, ориентированные цитоплазматической стороной наружу.

генерация ΔpH 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 H^+ -АТФазы (рис. 7б) позволили сделать предположение, что не только протонная помпа, но и вторично-активные транспортные системы обладают разной чувствительностью к содержанию мембранных стеринов. 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 H^+ -АТФазы везикул плазмалеммы с разным содержанием стеринов 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 стеринны непосредственно выступают в роли аннулярного липидного окружения H^+ -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.

ВЫВОДЫ

- 1) H^+ -АТФаза Р-типа обнаруживается как в устойчивых, так и в детергент-солюбилизируемых мембранах, а снижение содержания стеринов в плазмалемме не изменяет характер ее распределения между фракциями.
- 2) Обработка протопластов мезофилла *Arabidopsis thaliana* (L.) в присутствии МβCD приводит к увеличению активности H^+ -АТФазы плазмалеммы, что выражается в активации закисления внешней среды.

- 3) Обработка плазмалеммы везикул и протопластов МβCD 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 додецил мальтозида, что свидетельствует в пользу того, что стерин является аннуляющим липидным окружением H⁺-АТФазы.
- 5) Обработка везикул плазмалеммы низкими концентрациями МβCD вызывала многократное усиление АТФ-зависимого H⁺-транспорта, которое было транзиторно и не коррелировало с результатами гидролитической активности.
- 6) Такой транзиторный эффект МβCD на активный H⁺-транспорт связан с разной чувствительностью ионных каналов/транспортёров, локализованных в плазмалемме и участвующих в формировании градиента рН, к содержанию мембранных стерина.

СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендованных ВАК:

1. Белугин Б.В., Жесткова И.М., Пиотровский М.С., **Лапшин Н.К.**, Трофимова М.С. (2017) PIP1-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⁺-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⁺-ATPase Activity and H⁺-transport. *Biomolecules*. 11, 1891. <https://doi.org/10.3390/biom11121891>

Публикации в сборниках конференций:

1. М.С. Пиотровский, **Н.К. Лапшин**, М.С. Трофимова (2017) Связана ли редокс-модуляция осмотической водной проницаемости плазмалеммы с изменением редокс-статуса РР-аквапоринов. Материалы II Международного симпозиума «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений», под ред. Максимова И.В. и др., Уфа: ООО «Первая типография», С. 203–205.
2. Пиотровский М.С., **Лапшин Н.К.**, Трофимова М.С. (2017) Потенциальная роль редокс-активных протеинфосфатаз в модуляции фосфорилирования РР-аквапоринов, сопряженного с изменением осмотической водной проницаемости плазмалеммы. В сб: *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*, под ред. Зинченко В.П. и Бережнова А.В. Пушкино: цифровая типография Fix-Print. С. 875–878.
3. **Лапшин Н.К.**, Пиотровский М.С. Влияние метил-β-циклодекстрина на осмотическую водную проницаемость протопластов и везикул плазмалеммы. (2018) *71-я Всероссийская школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление»* (тезисы докладов). Нижний Новгород, С. 132.
4. Трофимова М.С., Пиотровский М.С., **Лапшин Н.К.** (2019) Латеральная гетерогенность биологических мембран. . IX Съезд Общества физиологов растений России (тезисы докладов), Казань, Россия, С. 440.
5. **Лапшин Н.К.**, Пиотровский М.С., Трофимова М.С. (2021) Редокс-зависимое защелачивание апопласта и активность Н⁺-АТФазы плазмалеммы клеток корней этиолированных проростков гороха. *Всероссийская научная конференция с международным участием и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее»*. Годичное собрание общества физиологов растений России (тезисы докладов), Москва, Россия, С. 192.