

СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ РЕГУЛИРУЕМЫХ ЦИКЛИЧЕСКИМИ НУКЛЕОТИДАМИ ИОННЫХ КАНАЛОВ (CNGC) В КЛЕТКАХ КОРНЕЙ КАРТОФЕЛЯ ПРИ БИОТИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

А.С. Романенко, Л.А. Ломоватская, Н.В. Филинова
ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН,
Иркутск, e-mail: rom@sifibr.irk.ru; lidal@sifibr.irk.ru; filinova@sifibr.irk.ru

Сигнальная трансдукция вторичного мессенджера кальция через кальциевые каналы используется растениями для восприятия и ответа на различного рода стрессы. Одним из путей транслокации ионов кальция являются открываемые циклическими нуклеотидами ионные каналы (cyclic nucleotide-gated ion channels, CNGCs). CNGCs представляют собой неселективные катионные каналы, представленные в животных и растительных клетках (Kaplan et al., 2007). Биологическая роль и регуляция этих каналов у животных хорошо изучены, тогда как исследование CNGCs растений началось сравнительно недавно (Chin et al., 2009). CNGCs активируются (открываются) при связывании циклических нуклеотидов (сAMP или сGMP) с одним доменом и подавляются (закрываются) при взаимодействии Ca^{2+} -кальмодулина с другим доменом. Полагают, что некоторые CNG-каналы локализованы на плазматической мембране растений, однако до сих пор остается открытым вопрос, присутствуют ли такие каналы в мембранах клеточных органелл.

В работе использовали растения картофеля *in vitro* двух сортов, контрастных по устойчивости к возбудителю кольцевой гнили *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (*Cms*) (сорт Луговской – резистентный, сорт Лукьяновский – восприимчивый) и экзополисахариды (ЭПС) вирулентного и мукоидного штамма *Cms* 5369. Корни, не отделенные от растений картофеля, выдерживали в течение 7 ч в среде роста (контроль) или инкубировали такое же время в среде с добавлением в конечной концентрации 0,03 % ЭПС *Cms* (опыт). Фрагменты корней длиной 5–8 мм от их кончика фиксировали по стандартной для электронной микроскопии схеме, подробно описанной в (Романенко, Ломоватская, 2017). Для проведения иммуноцитохимической реакции использовали первичные поликлональные кроличьи антитела (ПАТ), полученные к синтетическому полипептидному фрагменту (21 аминокислотный остаток) канала CNGC α 2 крысы (NCBI, NP_037060.1) (Ruiz et al., 1996) и вторичные козы антитела (БАТ), меченные золотом с размером частиц 20 нм. Для проверки вероятности специфического связывания ПАТ с предполагаемыми CNG каналами клеток картофеля программой BLASTP проводили анализ сходства аминокислотных последовательностей между пятым трансмембранным участком S5 и участком поры канала CNG α 2 предсердия крысы, к которым были получены ПАТ (Ruiz et al., 1996) с аминокислотными последовательностями 20 CNG каналов картофеля. Максимальное сходство (38 %) наблюдалось при сравнении последовательностей аминокислот исследуемого полипептидного фрагмента канала крысы с аналогичным фрагментом канала CNGC18 картофеля. Аминокислотные последовательности анализируемых фрагментов остальных 19 CNG каналов картофеля имели гораздо меньшее совпадение с фрагментом канала CNGC α 2 крысы. Количественную оценку локализации CNG каналов проводили в пределах каждого изображения участков клеток на ультратонких срезах, производя замеры длины пограничной мембраны и мембран клеточных органелл с последующим подсчетом в них электроноплотных частиц маркера вторичных антител, отражающих локализацию CNG каналов, используя программу SigmaScanPro 5. Полученные величины пересчитывали на 1 мкм длины мембран анализируемого компартмента. По каждому варианту использовали 15–18 изображений, результаты обрабатывали статистически с использованием программы SigmaPlot 12.

Результаты показали, что конъюгированные с вторичными антителами коллоидные частицы золота наблюдались в таких мембранных образованиях клеток корня картофеля, как плазмалемма, в том числе, в районе плазмодесм, тонопласт, наружная мембрана и кристы митохондрий, а также эндоплазматический ретикулум. Неспецифическая реакция вторичных антител с клеточными структурами (обработка ультратонких срезов только ВАТ или козьей немеченой золотом иммунной сывороткой, затем ВАТ, меченными золотом), за редким исключением, отсутствовала.

Сравнение контрольных вариантов резистентного и восприимчивого сортов показало, что в зависимости от сортовой устойчивости распределение меток по компартаментам заметно различалось (табл. 1). Так, в клетках растений восприимчивого сорта присутствовало в 2 раза меньшее количество частиц на плазмалемме, тонопласте и на мембранах эндоплазматического ретикулума по сравнению с соответствующими компартаментами клеток растений резистентного сорта. В варианте обработки корней ЭПС *Сms* количество частиц золота существенно снизилось на плазмалемме и тонопласте клеток резистентного сорта, отсутствовало на тонопласте клеток восприимчивого сорта, но возросло на плазмалемме и появилось в небольшом количестве на мембранах крист митохондрий клеток восприимчивого сорта и на наружной мембране митохондрий клеток резистентного сорта. Соотношение частиц золота (контроль/опыт) в мембранах эндоплазматического ретикулума в пределах каждого сорта почти не изменилось (см. табл. 1).

Таблица 1

Количество гранул золота, шт./мкм, на плазмалемме и мембранах компартиментов клеток сортов картофеля, контрастных по устойчивости к кольцевой гнили

Сорт	Вариант	Мембраны				ЭР
		Плазмалемма	Тонопласт	Митохондрия		
				НМ	Кристы	
Луговской (резистентный)	- ЭПС	0,18±0,04	0,25±0,02	0,03±0,01	0,05±0,01	0,38±0,10
	+ ЭПС	0,07±0,02 (<i>p</i> < 0,05)	0,05±0,01 (<i>p</i> < 0,01)	0,22±0,08 (<i>p</i> = 0,02)	0	0,35±0,09 (<i>p</i> = 0,8)*
Лукьяновский (восприимчивый)	- ЭПС	0,08±0,01	0,13±0,03	0	0	0,17±0,06
	+ ЭПС	0,22±0,01 (<i>p</i> < 0,01)	0 (<i>p</i> < 0,01)	0,04±0,01	0,17±0,04 (<i>p</i> < 0,01)	0,16±0,04 (<i>p</i> > 0,8)*

Известно, что в клетках картофеля обоих сортов функционируют трансмембранная и растворимая аденилатциклазы (АЦ), причём, активность обеих АЦ в ответ на обработку корней растений ЭПС была многократно выше и возникала значительно раньше в клетках корней резистентного сорта, в отличие от активности АЦ восприимчивого сорта (Ломоватская и др., 2007). Следует добавить, что АЦ могут быть кальций-зависимыми ферментами, как это показано на вакуолях клеток столовой свеклы (Ломоватская и др., 2014). Кроме того, ранее на плазмалемме клеток картофеля тех же сортов были обнаружены рецепторы к ЭПС, проявляющие свойства элиситоров для устойчивого сорта, и супрессоров – для восприимчивого сорта. В литературе продемонстрирована интернализация рецепторов путём эндоцитоза совместно с сигнальным лигандом (Клячко, 2010) и, вероятно, с CNG каналами. Благодаря такому процессу, возможно, под воздействием ЭПС, в плазмалемме устойчивого сорта снижается количество CNG каналов, которые сбрасываются в вакуоль путем слияния эндосом с тонопластом. В клетках восприимчивого сорта возрастание количества CNG каналов на плазмалемме можно объяснить перемещением каналов из отдаленных участков плазматической мембраны к её фронтальным краям (путём направленного движения вдоль мембраны или обратным встраиванием в неё эндосом) для повышения эффективности восприятия рецепторами клетки внешнего сигнала тревоги. В отношении других мембранных органелл, в частности митохондрий, считается доказанным, что наружная мембра-

на митохондриях как таковая не существует, фактически являясь протяжёнными и высокомолекулярными образованиями эндоплазматического ретикула (ЭР), по тяжам которого передвигаются эти органеллы, обладающие только внутренней мембраной, представляющей собой кристы (Гамалей, 2006). В этом случае каналы в так называемой наружной мембране будут периодически появляться в нужном месте (при наличии стрессового сигнала) и исчезать (после прохождения сигнала вглубь клетки) по мере продвижения митохондрий внутри ЭР.

Таким образом, представленные результаты позволяют сделать вывод о том, что на плазмалемме и в мембранах клеточных органелл растений картофеля, вероятно, присутствуют активируемые циклическими нуклеотидами Ca^{2+} -каналы, локализация которых может количественно изменяться в ответ на биотический стресс.

Литература

Гамалей Ю.В. Подвижная сетевая организация пластид и митохондрий растительных клеток // Цитология. – 2006. – Т. 48 (4). – С. 271–282.

Клячко Н.Л. Сигнальные эндосомы и транспорт эндосом у растений // Физиология растений. – 2010. – Т. 57 (2). – С. 304–311.

Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Криволапова Н.В., Копытчук В.Н. Функционирование «растворимой» и связанной с мембраной форм аденилатциклазы в органеллах растительных клеток при биотическом стрессе // Биологические мембраны. – 2007. – Т. 24 (5). – С. 363–371.

Ломоватская Л.А., Романенко А.С., Рыкун О.В. Влияние Ca^{2+} и H_2O_2 на изменение уровня сАМР в вакуолях клеток корнеплодов столовой свеклы при биотическом стрессе // Биологические мембраны. – 2014. – Т. 31 (3). – С. 194–203.

Романенко А.С., Ломоватская Л.А. Влияние экзополисахаридов бактериального возбудителя кольцевой гнили на субклеточную локализацию регулируемых циклическими нуклеотидами ионных каналов (CNGC) в клетках корней картофеля // Биологические мембраны. – 2017. – Т. 34. – С. 1–8.

Chin K., Moeder W., Yoshioka K. Biological roles of cyclic-nucleotide-gated ion channels in plants: What we know and don't know about this 20 member ion channel family // Botany. – 2009. – V. 87. – P. 668–677.

Kaplan B., Sherman T., Fromm H. Cyclic nucleotide-gated channels in plants // FEBS Lett. – 2007. – V. 581. – P. 2237–2246.

Romanenko A.S., Lomovatskaya L.A., Shafikova T.N., Borovskii G.B., Krivolapova N.V. Potato cell plasma membrane receptors to ring rot pathogen extracellular polysaccharides // J. Phytopathol. – 2003. – V. 151. – P. 1–6.

Ruiz M.L., London B., Nadal-Ginard B. Cloning and characterization of an olfactory cyclic nucleotide-gated channel expressed in mouse heart // J. Mol. Cell Cardiol. – 1996. – V. 28. – P. 1453–1461.