

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ АНИОННЫХ КАНАЛОВ NPPB И DIDS НА СОСТОЯНИЕ МИТОХОНДРИЙ И РОСТ ПЫЛЬЦЕВОЙ ТРУБКИ ТАБАКА

© М. А. Брейгина,¹ А. В. Смирнова, М. В. Масленников,
Н. П. Матвеева, И. П. Ермаков

*Кафедра физиологии растений биологического факультета
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова
¹электронный адрес: pollen-ions@rambler.ru*

Методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитометрии изучали влияние ингибиторов анионных каналов NPPB и DIDS на состояние митохондрий и рост пыльцевой трубки табака. NPPB (40 мкМ) блокировал рост пыльцевых трубок без изменения их диаметра. DIDS (20—80 мкМ) вызывал разбухание трубок и разрыв их мембраны, что свидетельствует об участии DIDS-чувствительных анионных каналов в поддержании осмотического баланса трубки. При низкой концентрации DIDS (20 мкМ) нарушение осмотического баланса не сопровождалось изменением скорости роста трубок. Картирование распределения трансмембранного потенциала вдоль растущей пыльцевой трубки, проведенное с использованием красителя Di-4-ANEPPS, показало, что продольный градиент потенциала поддерживается при участии анионных каналов, чувствительных к NPPB и нечувствительных к DIDS. С использованием потенциалзависимого красителя DiOC₃(3) и DCFH (чувствительного к АФК) установлено, что DIDS (но не NPPB) вызывает гиперполяризацию внутренней мембраны митохондрий и влияет на содержание в них АФК, а также на выход АФК из митохондрий в окружающую среду. Таким образом, NPPB и DIDS по-разному влияли на распределение трансмембранного потенциала на плазмалемме пыльцевой трубки, ее осмотический баланс и показатели, характеризующие работу митохондрий. Эти данные позволяют предполагать, что рост пыльцевой трубки зависит от активности анионных каналов, различных по локализации и функциям.

Ключевые слова: пыльцевая трубка, мембранный потенциал, митохондрии пыльцевой трубки.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, DCFH — 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein, DCFH-DA — 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, Di-4-ANEPPS — 3-(4-(2-(6-(dibutylamino)-2-naphthyl)-trans-ethenyl)pyridinium)propanesulfonate, DIDS — 4, 4'-diisocyanato-stilbene-2, 2'-disulfonic acid, DiOC₃(3) — 3, 3'-dipentylloxycarbocyanine iodide, NAO — 10-N-nonyl acridine orange, NPPB — (5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid).

Анионные каналы в клетках растений, как и в клетках животных, участвуют в процессах осморегуляции, транспорта и компарментализации метаболитов, в поддержании электрохимических градиентов и трансдукции сигналов. Эти каналы обнаружены в различных клеточных мембранах, включая плазмалемму, тонопласт, мембраны ЭПР, митохондрий, хлоропластов и др. (De Angeli et al., 2009).

В прорастающем пыльцевом зерне ионные механизмы регуляции играют ключевую роль. Явления, связанные с формированием трансмембранных потоков протонов, калия и кальция в растущей пыльцевой трубке, детально рассмотрены в обзорных работах последних лет (Holdaway-Clarke et al., 2003; Hepler et al., 2006; Michard et al., 2009). Наименее ясным остается вопрос о роли анионных потоков в регуляции роста пыльцевой трубки. Отмечается, в частности, неоднозначность интерпретации результатов микроэлектродных исследований трансмембранных потоков Cl⁻ через апикальную плазмалемму пыльцевой трубки (Hepler et al., 2006; Sze et al., 2006).

Трансмембранный перенос Cl⁻ в процессе активации пыльцевого зерна, предшествующей прорастанию, был

изучен более детально посредством ингибиторного анализа с использованием ионоселективных электродов (Матвеева и др., 2003) и флуориметрии (Брейгина и др., 2009а, 2009б). В этих экспериментах специфичный ингибитор анионных каналов NPPB блокировал прорастание пыльцевых зерен и одновременно подавлял выход из них анионов, в частности Cl⁻. Другой ингибитор анионного транспорта DIDS также подавлял прорастание, но без снижения скорости выхода Cl⁻ из пыльцевых зерен. Это позволяет предположить, что некоторые эффекты DIDS могут быть обусловлены его взаимодействием с внутриклеточными анионными каналами. Однако данные об изучении этих каналов в пыльцевом зерне или трубке в доступной литературе отсутствуют. В то же время DIDS-чувствительные анионные каналы обнаружены во внутренней и наружной мембранах митохондрий животных клеток и соматических клеток растений (Godbole et al., 2003; O'Rourke, 2007; Kusano et al., 2009).

Ранее было высказано предположение о том, что NPPB- и DIDS-чувствительные анионные каналы в пыльцевой трубке контролируют трансмембранные потоки Cl⁻

и что их основной функцией является регуляция осмотического баланса (Zonia et al., 2002). Результаты недавних работ выявили новые важные функции NPPB-чувствительных каналов в пыльцевой трубке. Обнаружено, что их блокирование нарушает организацию движения органелл и их компарментализацию (Брейгина и др., 2009а), которая является необходимым условием полярного роста (Cheung, Wu, 2008). Показано также, что от активности этих каналов зависит трансмембранный потенциал на плазмалемме пыльцевого зерна и трубки (Брейгина и др., 2009а, 2009б). Эти данные указывают на множественность функций анионных каналов в прорастающей пыльце, но в то же время возникает вопрос о локализации белков-мишеней для ингибиторов этих каналов: входят ли в их число белки плазмалеммы и (или) внутриклеточных органелл? Высокая скорость роста пыльцевой трубки и, следовательно, большая потребность этого процесса в энергии позволяют предполагать участие каналов митохондрий в этом процессе.

В настоящей работе изучали вклад NPPB- и DIDS-чувствительных анионных каналов в регуляцию роста пыльцевой трубки и состояния митохондрий, используя флуоресцентную микроскопию и проточную цитометрию.

Материал и методика

Материал и подготовка проб. Объектами служили растения табака *Nicotiana tabacum* L. сорта Petit Havana SR1, выращенные из семян в климатической камере (25 °C, 16-часовой световой день). Пыльники извлекали из цветков накануне их раскрытия и помещали в термостат (25 °C) на 3 сут. Пыльцу из раскрывшихся пыльников собирали в пробирки и хранили при –20 °C. После размораживания пыльцевые зерна отмывали гексаном от трифины и высушивали на воздухе. Навески сухой пыльцы инкубировали во влажной камере при 25 °C (2 ч), после чего их использовали для получения культур пыльцевых зерен.

Пыльцу прорастивали в стандартной среде в чашках Петри диаметром 10 см или пластиковых плашках с диаметром ячейки 16 мм. Ингибиторы анионных каналов DIDS и NPPB добавляли в суспензию пыльцы через 75 мин инкубации. Время воздействия ингибиторов на пыльцевые трубки составляло 10 мин, конечная концентрация NPPB 40 мкМ, DIDS — 10—80 мкМ.

Среднюю скорость роста трубок определяли по изменению средней длины трубки в препаратах, фиксированных через 70 и 85 мин инкубации. Клетки фиксировали 1%-ным параформальдегидом в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7.4.

Митохондрии выделяли (Hajek et al., 2004) из пыльцы, которая прорастала в стандартной среде в течение 2.5 ч. Ее собирали на нейлоновом фильтре с диаметром пор 40 мкм, промывали буфером для промывки и переносили в буфер для выделения. Пыльцу разрушали с помощью гомогенизатора D1ax 900 (Heidolph, Германия) при 17 000 об/мин в течение 45 с. Очистка митохондрий включала в себя осаждение крупных клеточных фрагментов посредством двухступенчатого центрифугирования (1500 г, 5 мин, затем 6000 г, 10 мин), осаждение митохондрий центрифугированием (12 000 g, 10 мин), перевод их в новую порцию буфера и фракционирование полученной суспензии в градиенте перколлы (40 % — нижний слой,

23 % — верхний) при 12 000 g в течение 30 мин. Митохондриальная фракция образовывала полосу в верхнем слое перколлы. Ее отмывали буфером для промывки на мембранном фильтре с диаметром пор 0.22 мкм, хранили и окрашивали в том же буфере при 4 °C. Концентрация митохондриального белка, определенного по Лоури, в исследуемых пробах составляла 114 мкг/мл.

Реактивы. Использовали 4, 4'-diisocyanato-stilbene-2, 2'-disulfonic acid (DIDS); 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid (NPPB); 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA); carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (CCCP); phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF); смесь ингибиторов протеаз (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma, США); 3-(4-(2-(6-(dibutylamino)-2-naphthyl)-transethenyl)pyridinium)propanesulfonate (Di-4-ANEPPS); 3, 3'-dipentylloxycarbocyanine iodide (DiOC₅(3)); 10-N-nonyl acridine orange (NAO) от фирмы Molecular probes (Нидерланды).

Стандартная питательная среда содержала 0.3 М сахарозу, 1.6 мМ H₃BO₃, 3 мМ Ca(NO₃)₂, 0.8 мМ MgSO₄ и 1 мМ KNO₃ в 25 мМ буфере MES-Tris, pH 5.9. Буферный раствор для выделения митохондрий (Hajek et al., 2004) включал в себя 0.3 М маннит, 2 мМ ЭГТА, 2 мМ MgCl₂, 4 мМ цистеин, 0.4 мМ PMSF и 1 мкл/мл смеси ингибиторов протеаз, растворенные в 25 мМ буфере HEPES, pH 7.5. Буферный раствор для промывки митохондрий (pH 7.2) не содержал цистеина и ингибиторов.

Окрашивание пыльцевых трубок и изолированных митохондрий. Распределение трансмембранного потенциала на плазмалемме пыльцевых трубок выявляли с помощью потенциалзависимого красителя Di-4-ANEPPS (Loew, 1996). Пыльцевые трубки окрашивали в капле на предметном стекле, смешивая суспензию проросших пыльцевых зерен с раствором красителя (10 мкМ) в соотношении 1 : 1 и немедленно микроскопировали. Митохондрии в составе пыльцевых трубок окрашивали потенциалзависимым катионным красителем DiOC₅(3) (Plasek, Sigler, 1996) в конечной концентрации 1 мкМ. Продолжительность окрашивания составляла 5 мин при 25 °C. Изолированные митохондрии окрашивали в течение 10 мин при 4 °C. Кроме того, использовали митохондриальный потенциалнезависимый краситель NAO (Mileykovskaya et al., 2001) и АФК-чувствительный краситель DCFH-DA (Halliwell, Whiteman, 2006). Время окрашивания в NAO (1 мкМ) составляло 10 мин, в DCFH-DA (10 мкМ) — 60 мин.

Разобщитель дыхательной цепи CCCP (20 мкМ) и ингибитор анионных каналов NPPB (40 мкМ) или DIDS (80 мкМ) добавляли в суспензию митохондрий за 5 мин до начала окрашивания.

АФК, выделяемые митохондриями в окружающий раствор, регистрировали по изменению флуоресценции чувствительного к окислению красителя DCFH (деацетилированного DCFH-DA) (Cathcart et al., 1983; Смирнова и др., 2009).

Анализ флуоресценции изолированных митохондрий, окрашенных NAO, DiOC₅(3) или DCFH-DA, проводили на проточном цитометре FACSCalibur (Becton Dickinson, США) с аргоновым лазером (488 нм). В каждой пробе просчитывали 10 000 событий, попавших в выделенный регион. Флуоресценцию считывали в канале F-1 (530 ± 15 нм). Обработку данных проводили с помощью программы FlowJo (Treestar Inc., США).

Микроскопия и компьютерный анализ изображения. Исследовательский микроскоп AxioPlan

Влияние ингибиторов анионных каналов NPPB и DIDS на скорость роста пыльцевых трубок и их диаметр в субапикальной части

Вариант опыта	Скорость роста трубки, мкм/ч	Диаметр трубки, мкм
Контроль	83 ± 11	7.9 ± 0.2
NPPB, 40 мкМ	1 ± 2	7.5 ± 0.1
DIDS, 20 мкМ	65 ± 6	9.5 ± 0.2

2 imaging MOT (Zeiss, Германия) был оснащен цифровой камерой AxioCam HRC (Zeiss). Флуоресценцию возбуждали ртутной лампой. Для анализа флуоресценции использовали следующие блоки фильтров (Zeiss, Германия). Для DiOC₃(3): возбуждение в диапазоне 475—495 нм и регистрация при 515—565 нм; для Di-4-ANEPPS: возбуждение при 475—495 нм (синяя область) или 540—552 нм (зеленая область), а регистрация при длинах волн, превышающих 590 нм; аутофлуоресценцию возбуждали при 359—371 нм, а регистрировали при длинах волн, превышающих 397 нм. Препараты фотографировали с использованием скоростной автоматической заслонки. Получение и анализ изображения проводили с помощью пакета программ AxioVision 4.7 (Zeiss).

Статистическая обработка. Достоверность различий определяли по критерию Стьюдента при уровне значимости 0.05 или 0.01. На рисунках и в таблице приведены средние значения и их стандартная ошибка.

Результаты

Для изменения активности анионных каналов в работе использовали два ингибитора — NPPB и DIDS. На основании ранее полученных данных (Матвеева и др., 2003; Брейгина и др., 2009а) NPPB был взят в концентрации 40 мкМ, при которой блокируется прорастание пыльцевых зерен и нарушается компартиментализация органелл в пыльцевой трубке. Мы обнаружили, что NPPB полностью подавлял рост пыльцевых трубок без изменений их диаметра (см. таблицу).

Другой ингибитор — DIDS, напротив, вызывал увеличение диаметра трубок в субапикальной области (см.

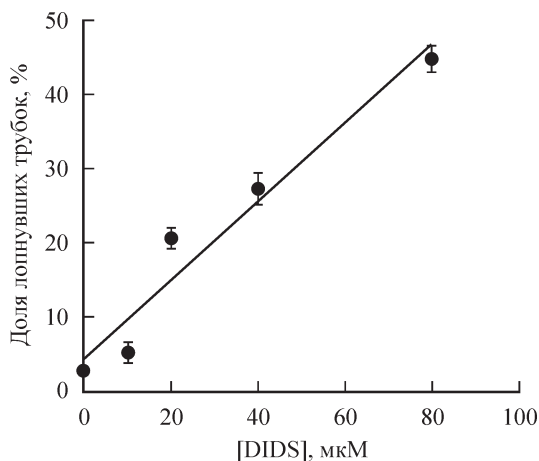


Рис. 1. Концентрационная зависимость влияния ингибитора анионных каналов DIDS на осмотический баланс в пыльцевых трубках.

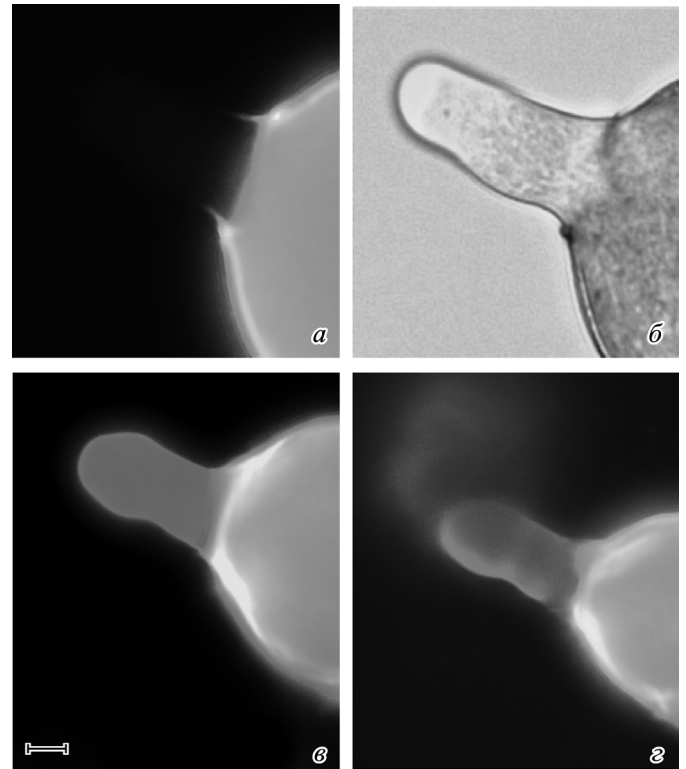


Рис. 2. Флуоресценция DIDS в цитоплазме пыльцевой трубки.

a — аутофлуоресценция пыльцевого зерна с трубкой в контрольном препарате в отсутствие ингибитора; *б* — тот же объект в светлом поле; *в* — трубка, которую инкубировали в среде, содержащей DIDS, а затем отмыли от ингибитора; *г* — та же трубка, снятая через 5 мин, когда в ее апикальной части образовался разрыв, через который вышли органеллы, связавшие DIDS. Все кадры флуоресценции сняты при одной выдержке. Масштабная линейка — 5 мкм.

таблицу) и разрывы их плазматической мембраны (рис. 1, 2), причем число лопнувших трубок линейно возрастало с увеличением концентрации DIDS (рис. 1). Поэтому в дальнейшем при работе с трубками мы использовали DIDS в концентрации 20 мкМ, при которой наблюдалось осмотическое действие (увеличение диаметра трубки), но доля лопнувших трубок была сравнительно невелика. DIDS в этой концентрации не блокировал рост трубок (см. таблицу).

Вопрос о том, проникают ли указанные ингибиторы в цитоплазму пыльцевой трубки или они могут взаимодействовать только с плазмалеммой, с определенностью может быть решен для DIDS (рис. 2), поскольку он флуоресцирует при возбуждении в УФ-свете. В присутствии DIDS цитоплазма трубки начинала интенсивно флуоресцировать (рис. 2, *в*), что позволяет говорить о внутриклеточной локализации этого ингибитора. В тех случаях, когда содержимое трубки вытекало через место разрыва, было видно, что DIDS связан с органеллами (рис. 2, *г*).

Влияние ингибиторов анионных каналов на трансмембранный потенциал на плазмалемме изучали с помощью потенциалзависимого красителя Di-4-ANEPPS. Измеряли интенсивность флуоресценции красителя, связанного с плазматической мембраной, по длине пыльцевой трубки на расстоянии 3—35 мкм от кончика. При этом регистрировали интенсивность флуоресценции, возбуждаемой в синей (Fb) и зеленой (Fg) областях спектра, и рассчитывали отношение величин Fb/Fg (Montana et al.,

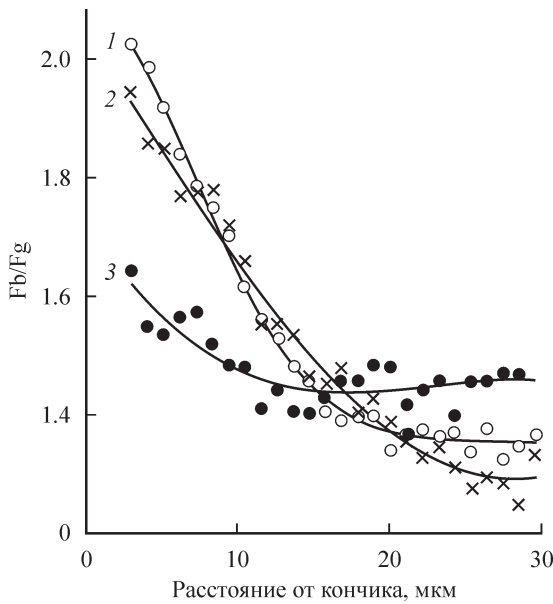


Рис. 3. Влияние ингибиторов анионного транспорта NPPB (40 мкМ) и DIDS (20 мкМ) на продольный градиент трансмембранного потенциала в пыльцевой трубке.

Градиент потенциала оценивали с помощью флуоресцентного красителя Di-4-ANEPPS. Рассчитывали отношение F_b/F_g , где F_b и F_g — величины интенсивности флуоресценции плазмалеммы окрашенной трубки при возбуждении в синей и зеленой областях спектра соответственно. 1 — контроль, 2 — DIDS, 3 — NPPB. Приведены кривые, усредненные по 5—7 биологическим повторностям; стандартные ошибки для отдельных точек кривой не превышали 6 %.

1989). Как было отмечено нами ранее (Брейгина и др. 2009а), в интервале расстояний 3—20 мкм происходит снижение этой величины по мере удаления от кончика с последующим выходом на плато (рис. 3), что свидетельствует о существовании градиента мембранного потенциала вдоль трубки. Этот градиент не изменялся в присутствии ингибитора DIDS, но его полностью снимал NPPB (рис. 3). Можно было предположить, что на плазматической мембране имеются NPPB-чувствительные анионные

каналы, контролирующие распределение мембранного потенциала. Вместе с тем нельзя было исключить, что наблюдаемый эффект обусловлен нарушениями функций митохондрий вследствие блокирования в них анионных каналов.

Поскольку вопрос о наличии внутриклеточных анионных каналов в пыльцевом зерне и трубке ранее не изучался, необходимо было установить, способны ли изолированные митохондрии реагировать на NPPB и DIDS. С этой целью изучали способность митохондрий включать потенциалзависимый катионный краситель $DiOC_5(3)$, используя метод проточной цитометрии. Анализируемую популяцию частиц выделяли, пользуясь показателями малоуглового и бокового рассеяния (рис. 4, а). Селективное окрашивание этих частиц с помощью NAO (рис. 4, б), который специфически связывается с кардиолипином митохондриальных мембран (Mileykovskaya et al., 2001), подтверждает, что частицы, попавшие в выбранный для измерения регион, являются митохондриями. Функциональную активность митохондрий контролировали по их способности к деполяризации в ответ на действие разобщителя электрон-транспортной цепи CCCP (20 мкМ) (рис. 4, в).

Интенсивность флуоресценции окрашенных $DiOC_5(3)$ митохондрий и, следовательно, потенциал на внутренней митохондриальной мембране не изменялся в присутствии NPPB, в то время как DIDS вызывал гиперполяризацию (рис. 5). Эти данные выявляют присутствие DIDS-чувствительных анионных каналов в митохондриальных мембранах. В то же время, поскольку митохондрии не реагировали на NPPB, можно исключить участие анионных каналов митохондрий в реализации эффекта NPPB на продольный градиент мембранного потенциала в пыльцевой трубке (рис. 3).

Функционирование митохондрий сопровождается идущими в них процессами образования и ликвидации АФК, которые могут поступать в цитоплазму (Rhoads et al., 2006). С использованием флуоресцентного АФК-зависимого красителя DCFH-DA было установлено, что под действием DIDS снижается содержание АФК в изолированных митохондриях (рис. 6, а). Вместе с тем усиливает-

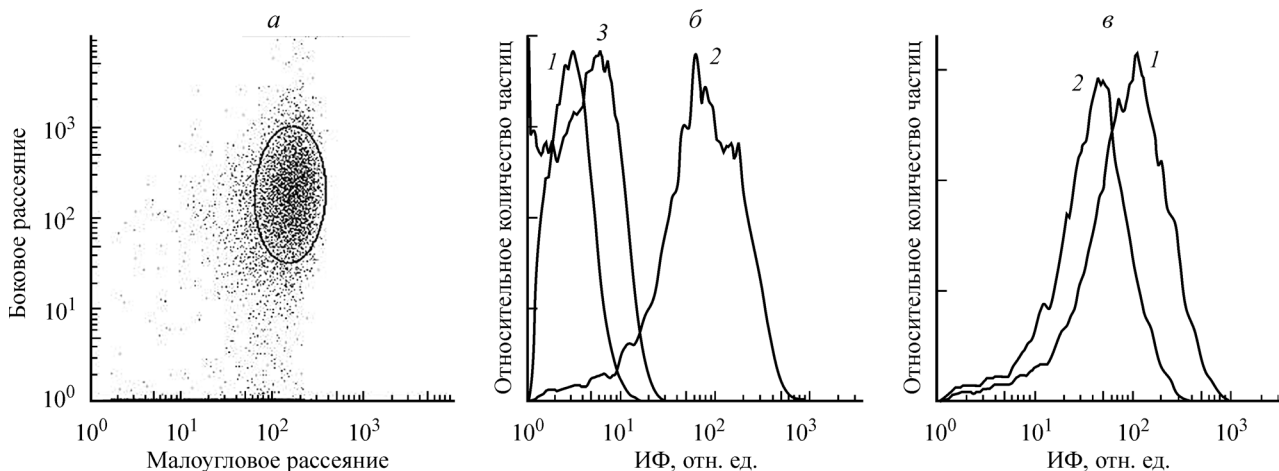


Рис. 4. Результаты проточной цитометрии митохондрий, окрашенных специфическим митохондриальным красителем NAO (б) и потенциалзависимым красителем $DiOC_5(3)$ (в).

а — диаграмма, связывающая малоугловое и боковое рассеяние, выделена измеряемая область; б — распределение интенсивности флуоресценции (ИФ) неокрашенных митохондрий (1), митохондрий, окрашенных NAO (2), и раствора красителя (3, дано для сравнения); в — ИФ $DiOC_5(3)$ в контроле (1) и сдвиг ИФ (деполяризация) в ответ на добавление разобщителя дыхательной цепи CCCP (2). Приведены результаты одного характерного наблюдения.

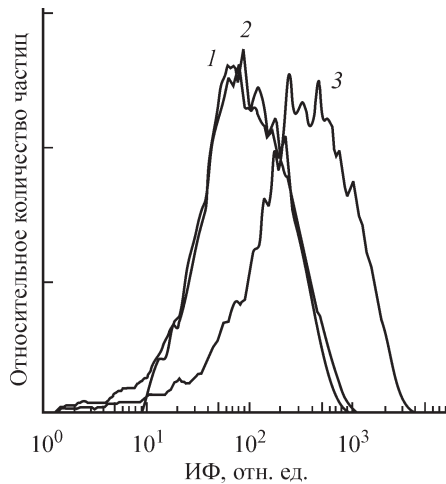


Рис. 5. Влияние ингибиторов анионных каналов NPPB и DIDS на интенсивность флуоресценции (ИФ) потенциалзависимого красителя DiOC₅(3) в изолированных митохондриях.

1 — контроль, 2 — в присутствии NPPB, 3 — в присутствии DIDS (гиперполяризация). Приведены результаты одного характерного наблюдения.

ся процесс выделения митохондриями АФК в окружающую среду (рис. 6, б). Эти данные подтверждают наличие в митохондриях DIDS-чувствительных анионных каналов, которые играют важную роль в регуляции работы митохондрий.

Таким образом, можно предположить наличие в плазмалемме растущей пыльцевой трубки NPPB-чувствительных анионных каналов, контролирующих потенциал на этой мембране, а в мембранах митохондрий — DIDS-чувствительных анионных каналов, которые влияют на функционирование этих органелл. В связи с этим возникает вопрос: в какой мере зависит состояние митохондрий в пыльцевой трубке от активности анионных каналов плазмалеммы? Анализ пыльцевых трубок, окрашенных DiOC₅(3), показал, что связывание митохондриями красителя и их распределение в трубке в присутствии DIDS на качественном уровне не изменились (рис. 7) —

митохондрии обнаруживались как ярко окрашенные частицы. NPPB существенно изменял картину: содержимое трубок выглядело как ярко окрашенный гомогенный материал.

Обсуждение

Ингибиторы анионных каналов NPPB и DIDS, широко используемые в исследованиях клеток животных и растений (Jentsch et al., 2002; Roberts, 2006), эффективно блокируют прорастание пыльцы (Матвеева и др., 2003). По некоторым данным, оба ингибитора нарушают осмотический баланс в пыльцевых трубках и подавляют их рост (Zonia et al., 2002). Наши данные подтверждают осмотический эффект DIDS в пыльцевых трубках, однако мы не обнаружили снижения скорости их роста при действии DIDS в низких концентрациях, а NPPB полностью блокировал рост пыльцевых трубок, не влияя при этом на осмотический баланс (см. таблицу). Возможно, различия в наблюдаемых эффектах обусловлены тем, что в наших опытах время роста трубок и время воздействия на них ингибиторов были существенно короче (75 мин без ингибитора и 10 мин с ингибитором против 3 и 1 ч в экспериментах указанных выше авторов). Наши данные позволяют предположить существование в пыльцевой трубке анионных каналов, различных по локализации и функциям.

Это предположение было подтверждено при изучении потенциала на плазматической мембране и на внутренней мембране митохондрий. Блокирование NPPB-чувствительных каналов снимало продольный градиент потенциала на плазмалемме пыльцевой трубки (рис. 3), выявляемый с помощью потенциалзависимого красителя Di-4-ANEPPS (Брейгина и др., 2009б). Тем самым обнаруживается участие этих каналов в регуляции трансмембранного потенциала на плазмалемме пыльцевой трубки, что хорошо согласуется с данными, полученными нами ранее (Брейгина и др., 2009а) с помощью другого потенциалзависимого красителя — DiBAC₄(3) (Bis(1, 3-dibutylbarbituric acid(5)) trimethine oxonol). Бло-

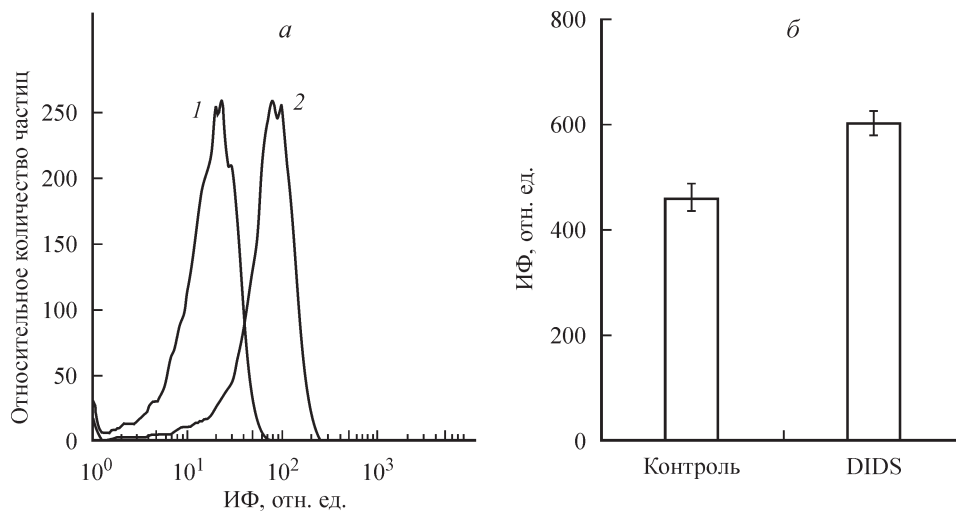


Рис. 6. Влияние ингибитора DIDS на интенсивность флуоресценции (ИФ) красителя DCFH (чувствительного к содержанию активных форм кислорода) в изолированных митохондриях (а) и окружающем их растворе (б).

а — данные проточной цитометрии по выявлению АФК: 1 — через 10 мин в присутствии 80 мкМ DIDS, 2 — контроль; приведены результаты одного характерного наблюдения. б — увеличение ИФ по данным спектрофлуориметрии.

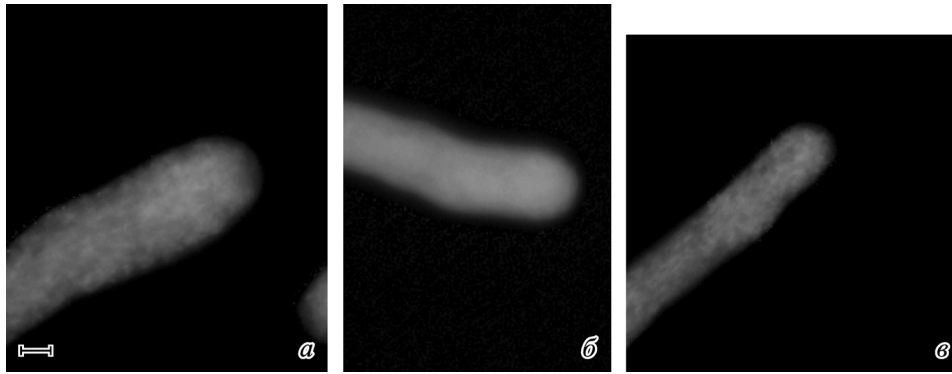


Рис. 7. Влияние ингибиторов анионных каналов на состояние митохондрий в составе пыльцевых трубок.

Пыльцевые трубки окрашены DiOC₅(3), который включается в активные митохондрии; а — контроль; б, в — действие на трубки ингибиторов NPPV и DIDS соответственно. Масштабная линейка — 5 мкм.

кирование DIDS-чувствительных каналов не влияло на распределение потенциала вдоль трубки (рис. 3). Вместе с тем DIDS проникал в пыльцевую трубку и связывался с органеллами (рис. 2), что позволяет предположить наличие анионных каналов в мембранах пыльцевых митохондрий. Подтверждения этому были получены при изучении функционального состояния изолированных митохондрий, которое оценивали по изменению потенциала на их внутренней мембране и продукции АФК (рис. 5, 6).

В присутствии DIDS существенно изменялись как величина потенциала (рис. 5), так и содержание АФК в митохондриях и окружающем их растворе (рис. 6). Эти данные выявляют присутствие DIDS-чувствительных анионных каналов в мембранах митохондрий, но не позволяют определить их принадлежность к наружной или внутренней мембране.

В исследованиях клеток животных такие каналы были найдены в наружных мембранах митохондрий — VDAC (voltage-dependent anion channels) (O'Rourke, 2007), а также в их внутренних мембранах — IMAC (inner membrane anion channel) и HP (half-permeability transition pore) (Beavis, Davatol-Hag, 1996; Zoratti et al., 2009). Отметим, что каналы HP, как и митохондриальные анионные каналы из пыльцевых трубок (рис. 5), не чувствительны к NPPV (Zoratti et al., 2009). Полагают, что каналы внутренней мембраны митохондрий играют важную роль в изменениях их трансмембранного потенциала и влияют на образование АФК в этих органеллах (Zoratti et al., 2009). VDAC, расположенный в наружной мембране, служит еще и для выхода супероксидного анион-радикала из митохондрий в цитозоль (Han et al., 2003). DIDS-чувствительные каналы VDAC обнаружены и в соматических клетках растений (Kusano et al., 2009). Предполагают, что они также участвуют в индукции апоптоза. В недавних работах описаны растительные каналы IMAC (PIMAC — plant IMAC) (Laus et al., 2008).

Флуоресцентная микроскопия пыльцевых трубок выявила активное накопление DiOC₅(3) в митохондриях (рис. 7). В присутствии DIDS, как и в контроле, они имели вид дискретных интенсивно флуоресцирующих частиц (рис. 7, а, б), которые двигались вдоль трубки по характерной траектории обращенного фонтана. Сходную картину наблюдали ранее при окрашивании пыльцевых трубок табака и лилии катионными потенциалзависимыми красителями (Derksen et al., 1995; Lovy-Wheeler et al., 2007). Под действием NPPV митохондрии сливались в ин-

тенсивно флуоресцирующую и достаточно гомогенную массу (рис. 7, в). Это можно объяснить изменением формы и (или) размеров митохондрий, в результате чего размеры некоторых митохондрий (или их частей) стали ниже разрешения светового микроскопа. Известно, что митохондрии способны изменять свою форму и положение в течение нескольких секунд в зависимости от функционального состояния, взаимодействия с цитоскелетом и прочих факторов (Logan, Leaver, 2000; Boldogh, Pon, 2007).

Результаты настоящей работы свидетельствуют о том, что NPPV-чувствительные анионные каналы плазмалеммы играют важную роль в распределении трансмембранного потенциала вдоль растущей пыльцевой трубки. Тем самым они влияют на работу потенциалзависимых транспортных белков плазмалеммы, интенсивность пересекающих ее ионных потоков и формирование ионных градиентов в цитозоле. Ионная зональность в трубке может влиять на поведение митохондрий в разных ее частях. В то же время энергетическое состояние митохондрий зависит от активности DIDS-чувствительных анионных каналов, обнаруженных в их мембранах. Блокирование этих каналов вызывает увеличенный выход АФК из митохондрий в окружающую среду. Осмотический баланс трубки зависит от DIDS-чувствительных анионных каналов, которые локализованы предположительно в ее плазматической мембране. Таким образом, в регуляции роста пыльцевой трубки участвуют два типа различных по функциям анионных каналов плазмалеммы, а также митохондриальные анионные каналы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-00746).

Список литературы

- Брейгина М. А., Матвеева Н. П., Ермаков И. П. 2009а. Роль Cl⁻ в прорастании пыльцевого зерна и росте пыльцевой трубки. Онтогенез. 40 (3) : 199—207.
- Брейгина М. А., Смирнова А. В., Матвеева Н. П., Ермаков И. П. 2009б. Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки. Цитология. 51 (10) : 815—823.
- Матвеева Н. П., Андреев Д. С., Ермаков И. П. 2003. Трансмембранный перенос Cl⁻ при прорастании пыльцевого зерна табака. Биохимия. 68 (11) : 1550—1555.

- Смирнова А. В., Матвеева Н. П., Полеская О. Г., Ермаков И. П. 2009. Образование активных форм кислорода при прорастании пыльцевого зерна. *Онтогенез*. 40 (6) : 425—435.
- Beavis A. D., Davatol-Hag H. 1996. The mitochondrial inner membrane anion channel is inhibited by DIDS. *J. Bioenerg. Biomemb.* 28 : 207—214.
- Boldogh I. R., Pon L. A. 2007. Mitochondria on the move. *Tr. Cell Biol.* 17 : 502—510.
- Cathcart R., Schwiers E., Ames B. N. 1983. Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay. *Anal. Biochem.* 134 : 111—116.
- Cheung A. Y., Wu H.-M. 2008. Structural and signaling networks for the polar cell growth machinery in pollen tubes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59 : 547—572.
- De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Frachisse J.-M., Thomine S., Gambale F., Barbier-Brygoo H. 2009. CLC-mediated anion transport in plant cells. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 364 : 195—201.
- Derksen J., Rutten T., Lichtscheidl I. K., de Win A. H. N., Pierson E. S., Rongen G. 1995. Quantitative analysis of the distribution of organelles in tobacco pollen tubes: implications for exocytosis and endocytosis. *Protoplasma*. 188 : 267—276.
- Godbole A., Varghese J., Sarin A., Mathew M.K. 2003. VDAC is a conserved element of death pathways in plant and animal systems. *Biochim. biophys. acta*. 1642 : 87—96.
- Hajek T., Honys D., Capkova V. 2004. New method of plant mitochondria isolation and sub-fractionation for proteomic analyses. *Plant Sci.* 167 : 389—395.
- Halliwell B., Whiteman M. 2004. Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br. J. Pharmacol.* 142 : 231—255.
- Han D., Antunes F., Canali R., Rettori D., Cadenas E. 2003. Voltage-dependent anion channels control the release of the superoxide anion from mitochondria to cytosol. *Biol. Chem.* 278 : 5557—5563.
- Hepler P. K., Lovy-Wheeler A., McKenna S., Kunkel J. G. 2006. Ions and pollen tube growth. In: *The pollen tube*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 47—69.
- Holdaway-Clarke T. L., Hepler P. K. 2003. Control of pollen tube growth: role of ion gradients and fluxes. *New Phytologist*. 159 : 539—563.
- Jentsch T. J., Stein V., Weinreich F., Zdebik A. 2002. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol. Rev.* 82 : 503—568.
- Kusano T., Tateda C., Berberich T., Takahashi Y. 2009. Voltage-dependent anion channels: their roles in plant defense and cell death. *Plant Cell Rep.* 28 : 1301—1308.
- Laus M. N., Soccio M., Trono D., Cattivelli L., Pastore D. 2008. Plant inner membrane anion channel (PIMAC) function in plant mitochondria. *Plant Cell Physiol.* 49 : 1039—1055.
- Loew L. M. 1996. Potentiometric dyes: imaging electrical activity of cell membranes. *Pure Appl. Chem.* 68 : 1405—1409.
- Logan D. C., Leaver C. J. 2000. Mitochondria-targeted GFP highlights the heterogeneity of mitochondrial shape, size and movement within living plant cells. *J. Exp. Bot.* 51 : 865—871.
- Lovy-Wheeler A., Cardenas L., Kunkel J. G., Hepler P. K. 2007. Differential organelle movement on the actin cytoskeleton in lily pollen tubes. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 64 : 217—232.
- Michard E., Alves F., Feijo J. A. 2009. The role of ion fluxes in polarized cell growth and morphogenesis: the pollen tube as an experimental paradigm. *Int. J. Develop. Biol.* 52 : 2296.
- Mileykovskaya E., Dowhan W., Birke R. L., Zheng D., Luttorodt L., Haines T. H. 2001. Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Lett.* 507 : 187—190.
- Montana V., Farkas D. L., Loew L. M. 1989. Dual wavelength ratiometric fluorescence measurements of membrane potential. *Biochemistry.* 28 : 4536—4539.
- O'Rourke B. 2007. Mitochondrial ion channels. *Annu. Rev. Physiol.* 69 : 19—49.
- Plašek J., Sigler K. 1996. Slow fluorescent indicators of membrane potential: a survey of different approaches to probe response analysis. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 33 : 101—124.
- Rhoads D. M., Umbach A. L., Subbaiah C. C., Siedow J. N. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganelle signaling. *Plant Physiol.* 141 : 357—366.
- Roberts S. K. 2006. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist*. 169 : 647—666.
- Sze H., Frietsch S., Li X., Bock K. W., Harper J. F. 2006. Genomic and molecular analyses of transporters in the male gametophyte. In: *The pollen tube*. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 71—93.
- Zonia L., Cordeiro S., Tupy J., Feijo J. A. 2002. Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3, 4, 5, 6-tetrakisphosphate. *Plant Cell.* 14 : 2233—2249.
- Zoratti M., De Marchi U., Gulbins E., Szabò I. 2009. Novel channels of the inner mitochondrial membrane. *Biochim. biophys. acta.* 1787 : 351—363.

Поступила 16 X 2009

EFFECTS OF ANION CHANNEL BLOCKERS NPPB AND DIDS ON TOBACCO POLLEN TUBE GROWTH AND ITS MITOCHONDRIA STATE

M. A. Breygina,¹ A. V. Smirnova, M. V. Maslennikov,
N. P. Matveeva, I. P. Yermakov

Moscow State University, School of Biology, Plant Physiology Department;
¹ e-mail: pollen-ions@rambler.ru

Influence of anion channel blockers NPPB and DIDS on pollen tube growth and its mitochondria functioning was studied by means of fluorescence microscopy and flow cytometry. NPPB (40 μ M) blocked pollen tube growth completely, but did not change its diameter. DIDS (20—80 μ M) caused pollen tube swelling and bursting, suggesting that DIDS-sensitive channels take part in the regulation of pollen tube osmotic balance. The osmotic effect of low DIDS concentration (20 mM) was not accompanied by changes in the tube growth rate. The mapping of membrane potential on the pollen tube plasmalemma using Di-4-ANEPPS revealed the involvement of NPPB-sensitive but not DIDS-sensitive anion channels in the maintenance of the longitudinal membrane po-

tential gradient along the tube surface. The study of isolated pollen mitochondria showed that DIDS increased their capacity to take up potential-dependent dye DiOC₃(3), i. e. caused hyperpolarization of mitochondrial membranes. At the same time DIDS influenced on intramitochondrial ROS content and excretion of ROS from mitochondria. Thus, NPPB and DIDS differently influenced on transmembrane potential distribution along pollen tube plasmalemma, on its osmotic balance, and on mitochondria functioning. This set of data suggests that pollen tube growth is dependent on activity of anion channels that differ in localization and functions.

Key words: pollen tube, membrane potential, pollen tube mitochondria.
