

ДИСКУССИИ

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ЛАТЕРАЛЬНЫЙ ГРАДИЕНТ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ПЛАЗМАЛЕММЕ РАСТУЩЕЙ ПЫЛЬЦЕВОЙ ТРУБКИ ПРОРАСТАЮЩЕГО ПЫЛЬЦЕВОГО ЗЕРНА?¹© *И. М. Андреев**Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва;
электронный адрес: pmembrane@ippras.ru*

Проведен критический анализ данных, представленных в статье Брейгиной и соавторов (2009) и касающихся измерения электрического мембранного потенциала ($\Delta\psi$) на плазматической мембране растущей пыльцевой трубки прорастающего пыльцевого зерна с помощью флуоресцентного потенциал-чувствительного красителя di-4-ANEPPS. Основная цель этого комментария состоит в выяснении вопроса о том, действительно ли полученные данные указывают на наличие на указанной мембране латерального градиента мембранного потенциала. Рассмотрение описанных материалов показало, что основной вывод ее авторов о наличии полярного распределения $\Delta\psi$ на плазмалемме растущей пыльцевой трубки не согласуется с рядом известных особенностей поведения di-4-ANEPPS в биологических мембранах, выясненных к настоящему времени, и поэтому требует основательного пересмотра. В этой связи рассмотренные результаты данной статьи вполне допускают совершенно иную интерпретацию и, на мой взгляд, могут быть истолкованы как свидетельства в пользу наличия на указанной мембране не только трансмембранного электрического потенциала $\Delta\psi$, но и латерального градиента внутримембранного дипольного потенциала. В краткой форме рассмотрены также некоторые недостатки методологии, использованной авторами работы для измерения $\Delta\psi$ с помощью другого флуоресцентного потенциал-чувствительного красителя DiBAC₃(3).

Ключевые слова: плазмалемма, мембранный потенциал, пыльцевая трубка, потенциал-чувствительный зонд.

В одном из последних номеров журнала Цитология за 2009 г. опубликована статья Брейгиной и соавторов (2009), в которой представлены данные, свидетельствующие, по мнению авторов, о неоднородном, полярном распределении мембранного потенциала в плазматической мембране растущей пыльцевой трубки прорастающего пыльцевого зерна. Приведенные в этой работе результаты, полученные с использованием потенциал-чувствительных красителей DiBAC₃(3) и di-4-ANEPPS, обращают на себя особое внимание и даже вызывают удивление по той причине, что с теоретической или физической точки зрения такое поведение мембранного потенциала на клеточной мембране представляется возможным только в исключительных случаях. Это утверждение согласуется с тем обстоятельством, что до сих пор в литературе описаны только единичные прецеденты такого поведения трансмембранного электрического потенциала в клеточных мембранах живых организмов (см., например: Kgorf, 1986). Анализ материалов, представленных в рассматриваемой статье (Брейгина и др., 2009), говорит о том, что выводы авторов вряд ли можно считать надежно обоснованными, поскольку их аргументация выглядит, на наш

взгляд, неубедительной, ввиду того что результаты этой работы вполне допускают совершенно иную интерпретацию. В этой связи следует отметить следующее.

1. Хорошо известно, что согласно определению мембранного потенциала он представляет собой разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) между двумя водными фазами, разделенными мембраной. Поэтому очевидно, что при условии непрерывности этих фаз величина $\Delta\psi$ должна быть одной и той же по всей поверхности мембраны и не зависеть от того, в каком конкретно месте ее локализован генератор $\Delta\psi$ той или иной природы. Хотя к настоящему времени убедительно доказано, что цитоплазма растущих пыльцевых трубок сильно поляризована, что выражается в весьма неоднородном распределении в ней различных внутриклеточных органелл, а также таких ее параметров, как pH и pCa, нет никаких данных, свидетельствующих об отсутствии непрерывности водных фаз, омывающих их плазматическую мембрану. Тем не менее неравномерное распределение указанных ионов в цитоплазме растущей пыльцевой трубки дает некоторые основания рассматривать ее как электрический диполь, обусловленный наличием разности электрических потенциалов между ее базальной и апикальной областями (Michard et al., 2009). Однако такая ранее предложенная модель электрической поляризации растущего мужского гаметофита остается до сих пор не доказанной не только с экспериментальной, но даже с теоретической точки зрения.

¹ Комментарий к материалам статьи: Брейгина М. А., Смирнова А. В., Матвеева Н. П., Ермаков И. П. Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки. Цитология. 2009. 51 (10) : 815—823.

Решение этой проблемы сильно осложняется не только наличием большого числа ионов разного типа, одновременно транспортируемых через плазматическую мембрану растущей пыльцевой трубки, но и отсутствием соответствующей информации о механизмах их трансмембранного транспорта, исключающим точную оценку баланса трансмембранных ионных потоков в данной системе (Michard et al., 2009).

2. Что касается цитируемых авторами работ, якобы представляющих, как считают авторы, прецеденты неоднородного распределения мембранного потенциала по поверхности некоторых животных клеток, то имеющиеся в них материалы на самом деле не дают оснований для таких заключений. Так, данные, полученные на клетках нейробластомы с использованием потенциал-чувствительного красителя di-4-ANEPPS (Zhang et al., 1998), говорят о том, что наблюдаемые авторами вариации величины R (соотношение интенсивностей флуоресценции этого индикатора, измеренных при возбуждении ее при двух различных длинах волн) вдоль клеточной поверхности отражают соответствующие изменения величины дипольного, а не мембранного потенциала. В отличие от мембранного потенциала дипольный потенциал отражает интенсивность электрического поля внутри гидрофобной зоны мембраны (Sevc, 1990; Clarke, 2001), и, как показано (Gross et al., 1994), величина R оказывается гораздо чувствительнее (почти на порядок) именно к этому типу электрических потенциалов клеточных мембран. О низкой чувствительности электрохромных красителей, быстро реагирующих на изменения электрического поля внутри мембраны, таких как di-4-ANEPPS, к вариациям мембранного потенциала свидетельствуют и данные, полученные в последние годы другими авторами (Demchenko et al., 2009; Clarke, 2010).

Весьма существенные изменения дипольного потенциала могут происходить после внедрения в клеточные мембраны ряда гидрофобных или амфифильных соединений (Gross et al., 1994; Clarke, Lupfert, 1999; Vitha, Clarke, 2007; Matos et al., 2008). Важно, кроме того, отметить, что в работе (Robinson, Messerli, 2003), также цитируемый Брейгиной и коллегами (2009), авторы утверждают, ссылаясь на собственные неопубликованные данные, что, несмотря на предпринятые ими интенсивные усилия, им не удалось обнаружить какую-либо неоднородность в распределении мембранного потенциала в плазмалемме растущих пыльцевых трубок.

3. Принимая во внимание отмеченные выше замечания, результаты экспериментов, описанных Брейгиной и коллегами, могут быть интерпретированы следующим образом. Во-первых, при использовании красителя di-4-ANEPPS, подобного по своей химической структуре и свойствам di-4-ANEPPS, естественно ожидать, что при его встраивании в плазматическую мембрану пыльцевой трубки или пыльцевого зерна измеряемая величина параметра R также будет реагировать в основном на дипольный потенциал мембраны, значения которого могут различаться в разных зонах ее. Эта вариация в R , действительно наблюдаемая авторами, судя по данным флуоресцентной микроскопии, может отражать различия в липидном составе тех или иных зон плазмалеммы пыльцевой трубки, формируемых в ходе ее роста. Во-вторых, следует ожидать только слабую чувствительность величины R к агентам, способным модулировать мембранный потенциал ($\Delta\psi$) на плазмалемме пыльцевой трубки, таким как, например, ортованадат и фузикоцин — хорошо

известным как соответственно ингибитор и стимулятор функционирующего на этой мембране АТФ-зависимого протонного насоса. Именно это и наблюдается в экспериментах, описанных Брейгиной и сотрудниками, в которых, судя по данным, представленным на рис. 7, эффект этих соединений практически отсутствует. Вместе с тем, вопреки мнению авторов, нет оснований считать, что действие фузикоцина локализовано в зоне апекса пыльцевой трубки, поскольку недавно показано, что в этой зоне ее плазмалеммы H^+ -АТФаза полностью отсутствует. С другой стороны, наблюдаемый авторами гораздо более сильный эффект блокатора анионных каналов, NPPB, на характер распределения величины R вдоль пыльцевой трубки может объясняться тем обстоятельством, что это соединение в отличие от фузикоцина и ортованадата, возможно, способно глубоко проникать внутрь мембраны и благодаря этому оказывать сильное влияние на внутримембранный дипольный потенциал. В-третьих, в работе отсутствуют какие-либо данные, свидетельствующие о чувствительности параметра R к агентам, способным легко проникать через биомембраны и снимать на них мембранный потенциал. Следует отметить здесь, что агенты такого рода, к сожалению, не были использованы авторами для получения контрольного, полностью деполяризованного, состояния клеток ни в случае микроскопической визуализации мембранного потенциала прорастающих пыльцевых зерен, ни с помощью потенциал-чувствительного анионного красителя DiBAC₄(3). Все это также подтверждает мысль о том, что наблюдаемые вариации в величине R , скорее всего, отражают изменения в электрическом потенциале мембраны другого типа, а не в мембранном потенциале как таковом — $\Delta\psi$.

Общий важный вывод, который следует из критического рассмотрения материалов работы Брейгиной с коллегами, состоит в том, что как результаты собственных исследований этих авторов, так и цитируемые ими данные других исследователей нельзя рассматривать как свидетельства в пользу существования латерального градиента мембранного потенциала на плазматической мембране прорастающего мужского гаметофита. Данные, представленные в этой работе, скорее всего, говорят лишь о наличии на плазмалемме растущей пыльцевой трубки не только мембранного потенциала, $\Delta\psi$, но и латерального градиента внутримембранного дипольного потенциала. Ранее внутримембранный электрический потенциал такого рода регистрировали с использованием потенциал-чувствительных красителей типа ANEPPS и другие исследователи (Vitha, Clarke, 2007; Matos et al., 2008), в том числе и цитируемые авторами рассматриваемой работы, на мембранах животных клеток, а также на искусственных фосфолипидных мембранах или липосомах.

В заключение следует упомянуть в краткой форме и другой важный аспект обсуждаемой здесь проблемы выявления мембранного потенциала на плазмалемме растущих пыльцевых трубок с помощью флуоресцентных потенциал-чувствительных красителей. Он касается определения абсолютной величины этого параметра на основе использования анионного красителя DiBAC₄(3) и методологии, разработанной Emri et al. (1998) применительно к животным клеткам. Из-за отсутствия в рассматриваемой работе какой-либо калибровки флуоресцентных ответов DiBAC₄(3) остается неясным, соблюдается ли в случае исследуемых растительных объектов целый ряд условий, сформулированных Emri et al. (1998) и требуемых для адекватной количественной оценки величины $\Delta\psi$ из на-

блюдаемых изменений флуоресценции выбранного анионного красителя. Иначе говоря, здесь отсутствуют какие-либо доказательства того, что распределение данного красителя между средой и клетками, отражаемое в микроскопически наблюдаемых изменениях интенсивностей его флуоресценции, подчиняется уравнению Нернста, которое используется авторами для расчета величины $\Delta\psi$.

Недавно рассмотренные методологические аспекты измерения $\Delta\psi$ в клетках человека с помощью анионных потенциал-чувствительных флуоресцентных красителей, в частности связанные с калибровкой их флуоресцентных ответов (Klapperstuck et al., 2009), имеют, на наш взгляд, непосредственное отношение к затронутой выше проблеме.

Все сказанное выше дает веские основания полагать, что, вероятнее всего, речь пока может идти только о временной вариации мембранного потенциала на плазмалемме пыльцевого зерна или пыльцевой трубки в ходе их роста и сохранения при этом его однородного распределения по всей поверхности апикально растущих растяжением растительных клеток данного типа.

Список литературы

- Брейгина М. А., Смирнова А. В., Матвеева Н. П., Ермаков И. П. 2009. Изменения мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки. Цитология. 51 (10) : 815—822.
- Cevc G. 1990. Membrane electrostatics. Biochim. biophys. acta. 1031 : 311—382.
- Clarke R. J. 2001. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection. Adv. Coll. Int. Sci. 89—90 : 263—281.
- Clarke R. J. 2010. Electric field sensitive dyes. In: Advanced fluorescence reporters in chemistry and biology I: fundamentals and molecular design. Springer Ser. Fluoresc. 8 : 331—344.
- Clarke R. J., Lupfert C. 1999. Influence of anions and cations on the dipole potential of phosphatidylcholine vesicles: a basis for the Hofmeister effect. Biophys. J. 76 : 2614—2624.
- Demchenko A. P., Mely Y., Duportail G., Klymchenko A. S. 2009. Monitoring biophysical properties of lipid membranes by environment-sensitive fluorescent probes. Biophys. J. 96 : 3461—3470.
- Emri M., Balkay L., Krasznai Z., Tron L., Marian T. 1998. Wide applicability of a flow cytometric assay to measure absolute membrane potentials on the millivolt scale. Eur. Biophys. J. 28 : 78—83.
- Gross E., Bedlack R. S., Loew L. M. 1994. Dual-wavelength ratiometric fluorescence measurement of the membrane dipole potential. Biophys. J. 67 : 208—216.
- Klapperstuck T., Glanz D., Klapperstuck M., Wohlrab J. 2009. Methodological aspects of measuring absolute values of membrane potential in human cells by flow cytometry. Cytometry. 75A : 593—608.
- Kropf D. L. 1986. Electrophysiological properties of *Achlya hyphae*: ionic currents studied by intracellular potential recording. J. Cell Biol. 102 : 1209—1216.
- Matos P. M., Goncalves S., Santos N. C. 2008. Interaction of peptides with biomembranes assessed by potential-sensitive fluorescent probes. J. Pept. Sci. 14 : 407—415.
- 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. 53 : 1609—1622.
- Robinson K. R., Messerli M. A. 2003. Left/right, up/down: the role of endogenous electric fields as directional signals in development, repair and invasion. BioEssay. 25 : 759—766.
- Vitha M. F., Clarke R. J. 2007. Comparison of excitation and emission ratiometric fluorescence methods for quantifying the membrane dipole potential. Biochim. biophys. acta. 1768 : 107—114.
- Zhang J., Davidson R. M., Wei M.-d., Loew L. M. 1998. Membrane electric properties by combined patch clamp and fluorescence ratio imaging in single neurons. Biophys. J. 74 : 48—53.

Поступила 19 X 2010

DOES A LATERAL GRADIENT OF MEMBRANE POTENTIAL ON THE PLASMA MEMBRANE OF GROWING POLLEN TUBE OF GERMINATING POLLEN GRAIN EXIST?

I. M. Andreev

K. A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow;
e-mail: pmembrane@ippras.ru

The data presented in the article by Breigina et al. (2009) «Changes in the membrane potential during pollen grain germination and pollen tube growth» (Tsitologiya. 51 (10) : 815—823) and concerning the measurement of electric membrane potential ($\Delta\psi$) on the plasma membrane of growing pollen tube of germinating pollen grain with the use of fluorescent potential-sensitive dye, di-4-ANEPPS, were critically analyzed in order to clarify whether a lateral gradient of $\Delta\psi$ on this membrane indeed exists. This analysis showed that the main conclusion of the authors of the above article on the existence of polar distribution of $\Delta\psi$ along the pollen tube plasma membrane is not in accordance with a number of known peculiarities of di-4-ANEPPS behavior in biological membranes and requires a significant revision. The findings in question reported by the authors, in my opinion, might be interpreted as evidence for the presence on the plasma membrane of growing pollen tube not only the membrane potential $\Delta\psi$ but also lateral gradient of so called intra-membrane dipole potential. Based on the comments made, another interpretation of the experimental results described by Breigina et al. has been offered. In addition, some drawbacks in the methodology used by the authors for measurement of $\Delta\psi$ with other fluorescent potential-sensitive dye, DiBAC₃(3), are also shortly considered.

Key words: plasma membrane, membrane potential, pollen tube, potential-sensitive dye.