

ДИСКУССИИ

ЕЩЕ РАЗ ОБ ИЗМЕНЕНИЯХ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА
В РАСТУЩЕЙ ПЫЛЬЦЕВОЙ ТРУБКЕ¹

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

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

Проведен критический анализ суждений Андреева (2011) о распределении потенциала вдоль плазмалеммы растущей пыльцевой трубки, согласно которым существует латеральный градиент дипольного потенциала, но невозможен латеральный градиент трансмембранного потенциала. На конкретных примерах показано, что аргументация инициатора дискуссии основывается на неточном цитировании наших экспериментальных данных (Брейгина и др., 2009б) и неполном анализе литературы. Говоря о трансмембранном потенциале, И. М. Андреев не учитывает многочисленные факты, доказывающие неравномерность распределения трансмембранных ионных потоков и ионтранспортирующих белков в плазмалемме пыльцевой трубки, а также расчетные данные, полученные при моделировании распределения мембранного потенциала в объектах разной формы. Вместе с тем предположение о неоднородном распределении дипольного потенциала не имеет экспериментального обоснования ни в исследованиях пыльцевой трубки, ни в практике использования флуоресцентных потенциал-зависимых красителей DiBAC₄(3) и Di-4-ANEPPS. Остается ожидать, что автор получит экспериментальные данные в подтверждение своей позиции.

Ключевые слова: пыльцевая трубка, мембранный потенциал.

В третьем номере журнала представлен критический разбор Андреева (2011) наших экспериментальных данных об изменениях мембранного потенциала в процессе прорастания пыльцевого зерна и роста пыльцевой трубки (Брейгина и др., 2009б). Приведем некоторые соображения, которые не позволяют нам согласиться с замечаниями И. М. Андреева и признать обоснованной предложенную им интерпретацию наших результатов.

Мы изучали изменения мембранного потенциала в пыльцевом зерне и трубке методами, общепринятыми и хорошо обоснованными в исследованиях клеток животных (Loew et al., 1992; Emri et al., 1998), с использованием двух потенциалзависимых красителей: DiBAC₄(3) (Bis(1,3-dibutylbarbituric acid(5)) trimethine oxonol) и Di-4-ANEPPS (3-(4-(2-(6-(dibutylamino)-2-naphthyl)-trans-ethenyl)pyridinium)propanesulfonate). Учитывая наличие стенки у клеток растений, мы провели дополнительную методическую работу и определили границы применимости указанных методов к нашим объектам.

В результате исследования было обнаружено, что активация пыльцевого зерна табака сопровождается гиперполяризацией плазматической мембраны вегетативной клетки. Наряду с этим были выявлены изменения мембранного потенциала вдоль пыльцевой трубки. Модулирование активности H⁺-АТФазы плазмалеммы трубки оргованадатом и фузикококцином достоверно влияло на распре-

деление потенциала, но градиент не исчезал. Однако его полностью снимал ингибитор анионных каналов NPPB. Мы связали формирование градиента потенциала с активностью H⁺-АТФазы и анионных каналов.

Предложенная оппонентом альтернативная интерпретация состоит в том, что мы регистрировали изменения дипольного, а не трансмембранного потенциала.

Наши экспериментальные данные хорошо согласуются с результатами, полученными в других лабораториях и другими методами. Особенно убедительно видно соответствие, когда коллеги используют тот же объект (пыльцу табака). В частности, наши данные по картированию мембранного потенциала на удивление точно (по микрометрам) накладываются на результаты картирования плотности распределения вдоль трубки флуоресцентно меченной H⁺-АТФазы и на данные по локализации трансмембранных протонных потоков (Cortal et al., 2008). Замечания И. М. Андреева о несоответствии наших результатов данным литературы объясняются его недостаточным вниманием к деталям, приведенным в описании методики и при изложении результатов. Приведем всего два примера, относящихся к действию на градиент потенциала модуляторов активности H⁺-АТФазы. 1. И. М. Андреев утверждает, что эффекты отсутствуют, однако эффекты оргованадата, фузикококцина и NPPB ((5-nitro-2-(3-phenylpropylamino) benzoic acid) статистически достоверны, усредненные кривые, иллюстрирующие обсуждаемые эффекты, получены по результатам обмера больших массивов данных (о чем сообщается в статье). 2. И. М. Андреев также ошибочно решил, что мы говорим о действии фузи-

¹ Редколлегия считает, что вопрос обсужден всесторонне, и предлагает закончить дискуссию (по крайней мере на страницах журнала «Цитология»).

кокцина в апексе, однако апекс пыльцевой трубки — совершенно особый компартмент, который отличается от остальной части трубки и по состоянию мембраны, и по свойствам цитоплазмы (Cheung, Wu, 2008). В статье четко указано, что мы не измеряли величину потенциала в зоне апекса, где действительно отсутствует H^+ -АТФаза (Cortal et al., 2008). Мы говорим об эффектах в области, близкой к апексу трубки, и в более удаленных зонах.

Замечание методического характера об отсутствии калибровочных кривых для DiBAC₄(3) обусловлено тем, что И. М. Андреев не принял во внимание ссылку на нашу более раннюю работу (Матвеева и др., 2004), в которой было проведено методическое обоснование использования данного красителя для изучения пыльцевого зерна, включая построение калибровочных кривых.

Исследования ионных токов в трубке продолжают с 70-х годов XX в. (Weisenseel et al., 1975). Именно тогда стали говорить о трубке как электрическом диполе. Современные представления об ионной регуляции апикального роста пыльцевой трубки основываются на большом числе экспериментальных работ. Выявлено более 700 генов транспортных белков плазмалеммы, экспрессируемых в пыльцевом зерне и трубке (Rafinska et al., 2010). Проведено картирование ионных потоков, пересекающих плазмалемму трубки, и локализации в ней ионотранспортирующих белков (Holdaway-Clarke, Hepler, 2003; Hepler et al., 2006; Michard et al., 2009). При этом была выявлена неоднородность распределения тех и других по длине трубки. Сегодня трубку рассматривают как динамическую систему, в которой электрический ток, ориентированный вдоль нее, и пересекающие плазмалемму ионные потоки интегрированы в комплексную систему регуляции ростовых процессов (Liu et al., 2010). Важную роль в этой системе отводят анионным каналам плазмалеммы (Tavares et al., 2011b). Методом пэтч-кламп в плазмалемме вегетативной клетки пыльцевого зерна были обнаружены и охарактеризованы анионные каналы с разной чувствительностью к NPPB (Tavares et al., 2011a). В разных лабораториях, включая нашу, было установлено, что этот ингибитор полностью блокирует выход анионов из пыльцевого зерна, нарушает компартиментализацию органелл в трубке и останавливает ее рост (см. обзор: Tavares et al., 2011b).

Предложенная нами интерпретация результатов соответствует современным представлениям об ионных механизмах регуляции роста трубки. В обзорах разных лет (Sze et al., 2006; Zonia et al., 2010; Tavares et al., 2011b) наши данные по изучению трансмембранного транспорта анионов и мембранного потенциала на плазмалемме и мембранах митохондрий (Матвеева и др., 2003; Брейгина и др., 2009а, 2009б, 2010) были интегрированы в общую картину ионной регуляции прорастания пыльцы покрытосеменных растений.

Вопрос о том, эквипотенциальна ли плазмалемма в интактной клетке, обсуждался теоретиками, которые разрабатывали модели неравномерного распределения мембранного потенциала в объектах разной формы (Pelce, 1993; Limozin et al., 1997; Савченко, 2000; Плюснина и др., 2005). Так, Савченко (2000) следующим образом сформулировал условия, при которых мембрана эквипотенциальна: проводимость мембраны одинакова во всех точках, а изменения потенциала происходят мгновенно. Это означает равномерное распределение открытых ионных каналов в мембране и нулевое сопротивление внутриклеточной среды, а для пыльцевой трубки — еще и периплазма-

тического пространства, которое отделяет плазмалемму от стенки. Ни одно из этих условий для трубки не выполняется, поскольку плазмалемма выступает как «сайт глобальной координации и контроля за ростом трубки» (Holdaway-Clarke, Hepler, 2003). Через систему киназ и арабиногалактановые белки, заполняющие периплазматическое пространство, плазматическая мембрана связана с клеточной стенкой (Holdaway-Clarke, Hepler, 2003), а со стороны цитоплазмы белки плазмалеммы взаимодействуют с актином, связывая ее с густой сетью цитоскелета (Pleskot et al., 2010); к тому же кортекс пыльцевой трубки плотно заполнен органеллами (Cheung, Wu, 2008). Все это исключает возможность нулевого сопротивления среды. О неоднородном распределении ион-транспортирующих белков вдоль плазмалеммы мы уже упоминали (Michard et al., 2009).

Остается главный вопрос — о поведении красителя Di-4-ANEPPS в плазмалемме пыльцевой трубки. L. M. Loew, который первым в начале 1980-х годов предложил использовать Di-4-ANEPPS для измерения мембранного потенциала, в недавнем обзоре пишет, что этот потенциалзависимый краситель остается наиболее популярным (Loew, 2010). Его адекватность для измерения трансмембранного потенциала установлена как на искусственных мембранах, так и в клетках в экспериментах с одновременным использованием оптического и микроэлектродного методов (Loew et al., 1992; Kao et al., 2001; Loew, 2010). Наиболее активно этот краситель используют в нейробиологии, в частности для быстрого картирования электрической активности нейронов. Вместе с тем Loew отмечает, что красители группы ANEP реагируют также на изменения дипольного и поверхностного потенциалов (Loew, 2010). И это необходимо учитывать в определенных условиях. Например, в ситуациях, когда может изменяться липидный состав мембраны, следует принимать во внимание вклад дипольного потенциала. В других ситуациях необходимо учитывать вклад поверхностного потенциала. Пыльцевая трубка — объект хорошо изученный, включая ее липидный метаболизм (Zarsky et al., 2006). Однако отсутствуют данные о каких-либо различиях в липидном составе плазмалеммы вдоль трубки. Нельзя полностью исключить, что в апикальной зоне трубки, где идет интенсивный эндоцитоз (Cheung, Wu, 2008), плазмалемма имеет особый состав. Но потенциал в этой зоне, как уже было указано ранее, мы не измеряли.

Вопрос о дипольном потенциале, безусловно, интересен, но до последнего времени он остается экспериментально мало изученным. Совсем недавно проведено первое прямое измерение этого показателя (Hu, Webb, 2011). В этом исследовании, как и во всех предыдущих измерениях, которые были проведены косвенными методами, объектом служили искусственные мембраны (Clarke, 2010). Отмечаются большие расхождения в данных, полученных разными методами (Przybylo et al., 2010). В отдельных работах клетки обрабатывали веществами (холестерином, 6-кетохолестанолом и др.), которые способны модулировать дипольный потенциал в искусственных мембранах. При этом регистрировали изменения флуоресценции красителей типа ANEP (Gross et al., 1994; Shynkar et al., 2005). На этой основе авторы предполагают возможность их использования для изучения дипольного потенциала в клетках. Однако практического применения эти идеи пока не нашли.

Таким образом, анализ литературы о красителях типа ANEP, с одной стороны, и об ионной регуляции роста пы-

льцевой трубки — с другой — с неизбежностью приводит к выводу о том, что в настоящее время нет экспериментальных оснований для предположения о ведущей роли латерального градиента дипольного потенциала в трубке. Возможно, когда инициатор дискуссии И. М. Андреев получит экспериментальные данные, подтверждающие его версию, возникнет необходимость пересмотра интерпретации наших результатов и сложившейся картины ионной регуляции роста трубки.

Список литературы

- Андреев И. М. 2011. Существует ли латеральный градиент мембранного потенциала на плазмалемме растущей пыльцевой трубки прорастающего пыльцевого зерна? Цитология. 53 (3) : 82—84.
- Брейгина М. А., Матвеева Н. П., Ермаков И. П. 2009а. Роль СГ в прорастании пыльцевого зерна и росте пыльцевой трубки. Онтогенез. 40 (3) : 199—207.
- Брейгина М. А., Смирнова А. В., Масленников М. В., Матвеева Н. П., Ермаков И. П. 2010. Влияние ингибиторов анионных каналов NPPV и DIDS на состояние митохондрий и рост пыльцевой трубки табака. Цитология. 52 (4) : 334—341.
- 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., Андреюк Д. С., Ермаков И. П. 2003. Трансмембранный перенос С1⁻ при прорастании пыльцевого зерна табака. Биохимия. 68 (11) : 1550—1555.
- Матвеева Н. П., Андреюк Д. С., Лазарева Е. А., Ермаков И. П. 2004. Влияние конканавалина А на величину мембранного потенциала и внутриклеточный рН в процессе активации пыльцевого зерна табака *in vitro*. Физиол. раст. 51 (4) : 549—554.
- Плюснина Т. Ю., Лаврова А. И., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. 2005. Моделирование неоднородного распределения и колебаний трансмембранного потенциала и рН вблизи внешней стороны мембраны клетки водоросли *Chara corallina*. Биофизика. 50 (3) : 492—499.
- Савченко Л. П. 2000. Пространственное распределение потенциала на цилиндрической поверхности, имитирующей соматическую мембрану: модельные исследования. Нейрофизиология. 32 (3) : 333—341.
- Certal A. C., Almeida R. B., Carvalho L. M., Wong E., Moreno K, Michard E., Carneiro J., Rodriguez-Leon J., Wu H.-M., Cheung A. Y., Feijo J. A. 2008. Exclusion of a proton ATPase from the apical membrane is associated with cell polarity and tip growth in *Nicotiana tabacum*-pollen tubes. Plant Cell. 20 : 614—634.
- 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.
- Clarke R. J. 2010. Electric field sensitive dyes. In: Advanced fluorescence reporters in chemistry and biology. I. Fundamentals and molecular design. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, Springer Ser. Fluoresc. 8 : 331—344.
- 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.
- 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 Phytol. 159 : 539—556.
- Hu W., Webb L. J. 2011. Direct measurement of the membrane dipole field in bicelles using vibrational Stark effect spectroscopy. J. Phys. Chem. Lett. 2 : 1925—1930.
- Kao W. Y., Davis C. E., Kim Y. I., Beach J. M. 2001. Fluorescence emission spectral shift measurements of membrane potential in single cells. Biophys. J. 81 : 1163—1170.
- Limozin L., Denet B., Pelce P. 1997. Ionic currents generated by tip growing cells. Phys. Rev. Lett. 78 : 4881—4884.
- Liu J., Piette B. M. A. G., Deeks M. J., Franklin-Tong V. E., Hussey P. J. 2010. A compartmental model analysis of integrative and self-regulatory ion dynamics in pollen tube growth. PLoS ONE. 5 : e13157. doi:10.1371/journal.pone.0013157.
- Loew L. M. 2010. Design and use of organic voltage sensitive dyes. In: Membrane potential imaging in the nervous system: methods and applications. New York: Springer Science + Business Media. 13—23.
- Loew L. M., Cohen L. B., Dix J., Fluhler E. N., Montana V., Salama G., Wu G. 1992. A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations. J. Membr. Biol. 130 : 1—10.
- 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.
- Pelce P. 1993. Origin of cellular ionic currents. Phys. Rev. Lett. 71 : 1107—1110.
- Pleskot R., Potocky M., Pejchar P., Linek J., Bezvoda R., Martinec J., Valentova O., Novotna Z., Zarsky V. 2010. Mutual regulation of plant phospholipase D and the actin cytoskeleton. Plant J. 62 : 494—507.
- Przybylo M., Borowik T., Langner M. 2010. Fluorescence techniques for determination of the membrane potentials in high throughput screening. J. Fluoresc. 20 : 1139—1157.
- Rafinska K., Zienkiewicz K., Bednarska E. 2010. Pollen transcriptome and proteome: molecular and functional analysis. Adv. Cell Biol. 2 : 29—57.
- Shynkar V. V., Klymchenko A. S., Duportail G., Demchenko A. P., Mely Y. 2005. Two-color fluorescent probes for imaging the dipole potential of cell plasma membranes. Biochim. biophys. acta. 1712 : 128—136.
- Sze H., Frietsch S., Li X., Bock, Harper J. F. 2006. Genomic and molecular analyses of transporters in the male gametophyte. In: The pollen tube. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 71—93.
- Tavares B., Dias P. N., Domingos P., Moura T. F., Feijo J. A., Bicho A. 2011a. Calcium-regulated anion channels in the plasma membrane of *Lilium longiflorum* pollen protoplasts. New Phytol. doi: 10.1111/j. 1469-8137.2011.03780.
- Tavares B., Domingos P., Dias P. N., Feijo J. A., Bicho A. 2011b. The essential role of anionic transport in plant cells: the pollen tube as a case study. J. Exp. Bot. 62 : 2273—2298.
- Weisenseel M. H., Nuccilelli R., Jaffe L. F. 1975. Large electrical currents traverse growing pollen tubes. J. Cell Biol. 9 : 556—567.
- Zarsky V., Polocky M., Baluska F., Cvrckova F. 2006. Lipid metabolism, compartmentalization and signalling in the regulation of pollen tube growth. In: The pollen tube. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag. 117—138.
- Zonia L. 2010. Spatial and temporal integration of signalling networks regulating pollen tube growth. J. Exp. Bot. 61 : 1939—1957.

ANOTHER DISCUSSION OF MEMBRANE VOLTAGE ALTERATIONS
IN GROWING POLLEN TUBE*M. A. Breigina,¹ A. V. Smirnova, N. P. Matveyeva, I. P. Yermakov*

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

Here we give a critical analysis of the opinion of Andreev (2011) on membrane potential distribution along the pollen tube plasmalemma. He assumes that a lateral gradient of dipole potential exists, but suggests a lateral gradient of transmembrane potential impossible. We demonstrate by concrete examples that the argumentation of the initiator of discussion is based on inaccurate citation of our experimental data (Breigina et al., 2009) and incomplete analysis of previously published articles. Speaking about transmembrane potential, he doesn't consider numerous facts demonstrating the uneven distribution of transmembrane ion fluxes and ion-transport proteins in the pollen tube plasmalemma, as well as data obtained by modeling of transmembrane potential distribution in objects of different shape. In addition, the assumption on the uneven distribution of dipole potential doesn't have an experimental basis neither in studies of the pollen tube, nor in the practice of using fluorescent voltage-sensitive dyes DiBAC₄(3) and Di-4-ANEPPS. We are expecting the author to obtain experimental data in support of his position.

Key words: pollen tube, membrane potential.
