

## ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ВАКУОЛИ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ, ВЫЯВЛЕННЫЕ С ПОМОЩЬЮ КОНФОКАЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ

© В. Н. Нурминский,<sup>1,\*</sup> А. Л. Ракевич,<sup>2</sup> Е. Ф. Мартынович,<sup>2</sup> Н. В. Озолина,<sup>1</sup>  
И. С. Нестеркина,<sup>1</sup> Е. В. Колесникова,<sup>1</sup> А. А. Пилипченко,<sup>3</sup>  
Р. К. Саляев,<sup>1</sup> М. Ю. Чернышов<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, 664033,

<sup>2</sup>Иркутский филиал Института лазерной физики СО РАН, 664033,

<sup>3</sup>Иркутский государственный университет 664003, и

<sup>4</sup>Президиум Иркутского научного центра СО РАН, 664033;

\* электронный адрес: cell@sifibr.irk.ru

Обсуждаются результаты исследования особенностей строения вакуолярных мембран растительных клеток. Исследование проводили с использованием конфокальной микроскопии, что позволило при сканировании выявлять на препаратах изолированных вакуолей мембранные трубки и везикулы. Мембранные трубки наблюдали внутри и снаружи вакуоли, а при сканировании через равные промежутки времени выявляли перемещение везикул вместе с мембранными трубками. При сканировании на различных расстояниях от подложки в верхней области изолированной вакуоли наблюдали участки флуоресценции высокой интенсивности. Получены распределения значений обобщенной поляризации (GP) флуоресценции лаурдана для различных участков вакуолярной мембраны. Установлено, что микровязкость этих областей высокой интенсивности флуоресценции существенно отличается от микровязкости остальной части мембраны.

Ключевые слова: вакуоли растительных клеток, строение вакуолярной мембраны, конфокальная микроскопия, флуоресцентные зонды, мембранные трубки, микровязкость мембран.

Принятые сокращения: АНС — 8-анилино-1-нафталинсульфоновая кислота, ГУВ — гигантские унламельлярные (однослойные) везикулы, ИФ — интенсивность флуоресценции, МТС — мембранные трубчатые структуры, GP — обобщенная поляризация.

Одной из принципиальных особенностей растительной клетки является наличие в ней центральной вакуоли, которая в зрелом состоянии может занимать большую часть объема клетки. Основные функции вакуоли заключаются в участии в процессах ионного гомеостаза цитозоля, запасания первичных и вторичных метаболитов, осмотической регуляции, детоксикации ксенобиотиков, формирования защитных ответных реакций клеток, например метаболических реакций на токсины, и в процессах запрограммированной клеточной смерти (Андреев, 2001, 2012).

Вакуоль растительной клетки представляет собой активно функционирующую органеллу, способную к динамичным морфологическим перестройкам. Вакуолярная система растительной клетки отличается сложной архитектурой. Известно, например, что мембраны вакуолей опосредуют процессы трансмембранного транспорта (Нурминский и др., 2011, 2012). Некоторые специалисты регистрировали инвагинации вакуолярной мембраны, сопровождающиеся отделением везикул (Sheahan et al., 2007; Assani et al., 2009). Установлено, что через вакуоль проходят многочисленные цитоплазматические тяжи, соединенные с вакуолярной мембраной и ограниченные мембраной (Нурминский и др., 2012). Прослеживается

связь вакуоли с элементами цитоскелета (Sheahan et al., 2007; Gao et al., 2009), а именно с актиновыми микрофиламентами (Sheahan et al., 2007). Установлено, что при подготовке клетки к делению происходят преобразования в строении вакуолярной мембраны (Sheahan et al., 2007). Вакуоль наиболее активна при поглощении клеткой различных соединений путем пиноцитоза (Etcheberria et al., 2013). Она активно реагирует на различные виды осмотического стресса (Assani et al., 2009).

Ранее было показано, что вакуолярная мембрана характеризуется высокой упорядоченностью липидов, присутствующих в ней в виде участков свободного жидкого липидного бислоя и участков, связанных с мембранными белками. Известно, что в вакуолярной мембране преобладают полярные липиды с высоким содержанием ненасыщенных жирнокислотных остатков. Преобладание таких липидов придает мембране высокую эластичность и пониженную микровязкость (Макаренко, Саляев, 1998). Сравнительно недавно в вакуолярной мембране были обнаружены липидные домены (рафты), обладающие более плотной упаковкой липидов по сравнению с остальной частью мембраны (Ozolina et al., 2013). Однако детали ультраструктуры вакуолярной мембраны и ее роль в адаптации к стрессовым воздействиям остаются недоста-

точно исследованными. В настоящей работе было принято исследование морфологии вакуолярной мембраны и ее структурных особенностей в норме и при осмотическом стрессе с помощью конфокальной микроскопии.

### Материал и методика

Объектами исследования были изолированные вакуоли клеток корнеплода столовой свеклы *Beta vulgaris* L. сорта Бордо, выращенной на опытном участке СИФИБР СО РАН. Для экспериментов были использованы корнеплоды, находящиеся в стадии покоя, которые хранили в овощехранилище при 4—5 °С. Получение изолированных вакуолей осуществляли с помощью модифицированной микрообъемной методики (Саляев и др., 1981) в растворе, содержащем 300 мМ КСl, 10 мМ ЭДТА, 25 мМ Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 8,0, β-аланин (650 мосм/кг<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O).

Исследовали влияние осмотического стресса на морфологические особенности вакуолярной мембраны. Изолированные вакуоли помещали в растворы с различным осмотическим давлением, в случае гипертонического и гипотонического стрессов — 760 и 530 мосм/кг<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O соответственно. При помещении изолированных вакуолей в изотонический (по отношению к раствору выделения) раствор считали, что мембраны не подвергаются осмотическому стрессу. Величину осмотического давления оценивали на осмометре ОМКА 1Ц-01 (Россия).

Для визуализации мембраны и ее элементов, для оценки фазового состояния мембран изолированных вакуолей, а также для оценки микровязкости бислоя применяли конфокальную микроскопию (конфокальный люминесцентный сканирующий лазерный микроскоп MicroTime 200; PicoQuant GmbH, Германия) и флуоресцентные зонды. Были использованы следующие флуоресцентные зонды: лаурдан (2-(диметиламино)-6-додеканоилнафталин), АНС (8-анилино-1-нафталинсульфоновая кислота), бис-АНС и дифенилгексатриен (ДФГ). Анализ действия осмотического стресса на вакуолярную мембрану проводили как на отдельных оптических срезах, так и в динамике, в каждом случае на одном конкретном препарате.

Один из наиболее доступных методов оценки микровязкости липидной составляющей мембраны предполагает измерение обобщенной поляризации (GP) флуоресценции зонда, вносимого в липидную составляющую мембраны. Некоторые зонды, например лаурдан (Gaus et al., 2006), флуоресцируют в различных областях спектра в зависимости от оводненности системы, а именно в зависимости от наличия свободных молекул воды в липидной составляющей мембраны.

Активное использование липофильного зонда лаурдан было обусловлено тем, что положение максимумов его эмиссии определяется соотношением жидко- и твердофазных областей в мембране. Это соотношение оценивалось по величине GP флуоресценции зонда. Для связывания зонда с вакуолярной мембраной к суспензии изолированных вакуолей добавляли лаурдан, растворенный в метаноле, до конечной концентрации 10 мкМ. Суспензию инкубировали при 20 ± 2 °С в течение 10 мин и анализировали на конфокальном микроскопе. Величину GP для каждого пикселя полученного изображения вакуолярной мембраны рассчитывали автоматически с помощью оригинальной программы (Баранов и др., 2014). Все величины GP суммировали и рассчитывали среднюю величину и стандартное отклонение. Кроме того, с помощью про-

граммы строили гистограмму распределения величин GP для пикселей, характеризующихся интенсивностью флуоресценции (ИФ), превышающей определенный предел. Важность введения такого предела обусловлена необходимостью при расчете величин GP учитывать только ярко флуоресцирующие пиксели, соответствующие мембране, и не учитывать фон. Методика расчета GP флуоресценции мембранных зондов при технологии конфокальной микроскопии подробно описана нами ранее (Ozolina et al., 2013).

В экспериментах с использованием флуоресцентных зондов АНС (или бис-АНС) и ДФГ зонд добавляли к суспензии изолированных вакуолей в концентрации 10 мкМ в 10%-ном диметилсульфоксиде или тетрагидрофуране соответственно. После 30 мин инкубации суспензию анализировали на конфокальном микроскопе, количественно оценивая ИФ зонда. ИФ определяли по количеству фотонов, регистрируемых от данного сегмента исследуемого образца. При этом использовали метод регистрации времени затухания флуоресценции (fluorescence lifetime imaging microscopy — FLIM), а также лавинный фотодиод для регистрации единичных фотонов (single-photon avalanche diode — SPAD), встроенный в конфокальный микроскоп.

Использованные реактивы: лаурдан, АНС и бис-АНС ДФГ (Sigma-Aldrich, США). Остальные реактивы (КСl, ЭДТА, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, β-аланин и др.) — отечественного производства (ЗАО «Химреактивснаб»), с квалификацией х. ч.

Для расчета микровязкости использовали методику, основанную на вычислении значений GP флуоресценции лаурдана в каждом пикселе, соответствующем светящейся области изображения. Такая методика предполагала построение гистограммы распределения значений GP флуоресценции лаурдана. На гистограмме представляли средние арифметические значения величин и их стандартные отклонения. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Excel.

### Результаты и обсуждение

Визуализацию структур вакуолярной мембраны мы осуществляли с помощью флуоресцентных зондов (АНС, лаурдан). Установлено, что мембраны вакуолей, изолированные в изотоническом по отношению к клеточному соку корнеплодов растворе, окрашиваются гетерогенно. При этом ИФ зондов неодинакова не только на различных участках мембраны, но и для различных вакуолей. По нашим данным, для различных вакуолей ИФ различается в 2—3 раза.

При исследовании препаратов изолированных вакуолей во всех случаях отчетливо регистрировались элементы тонопласта (рис. 1), везикулы и объекты, которые внешне имеют вид нитей, являющиеся, по-видимому, трубчатыми трансвакуолярными нитями (tubular-like transvacuolar strands) (Reisen et al., 2005). Возможно, каждая из этих нитей представляет собой мембранную трубчатую структуру (МТС). Такие структуры, идентифицированные в клеточных экстрактах, как полагают некоторые авторы (Dabora, Sheetz, 1988), ответственны за формирование тубуловезикулярной сети (tubulovesicular network) клетки. Везикулярные структуры, отпочковывающиеся от вакуолярной мембраны, и нитеобразные структуры внутри вакуолей ранее были обнаружены на мембранах

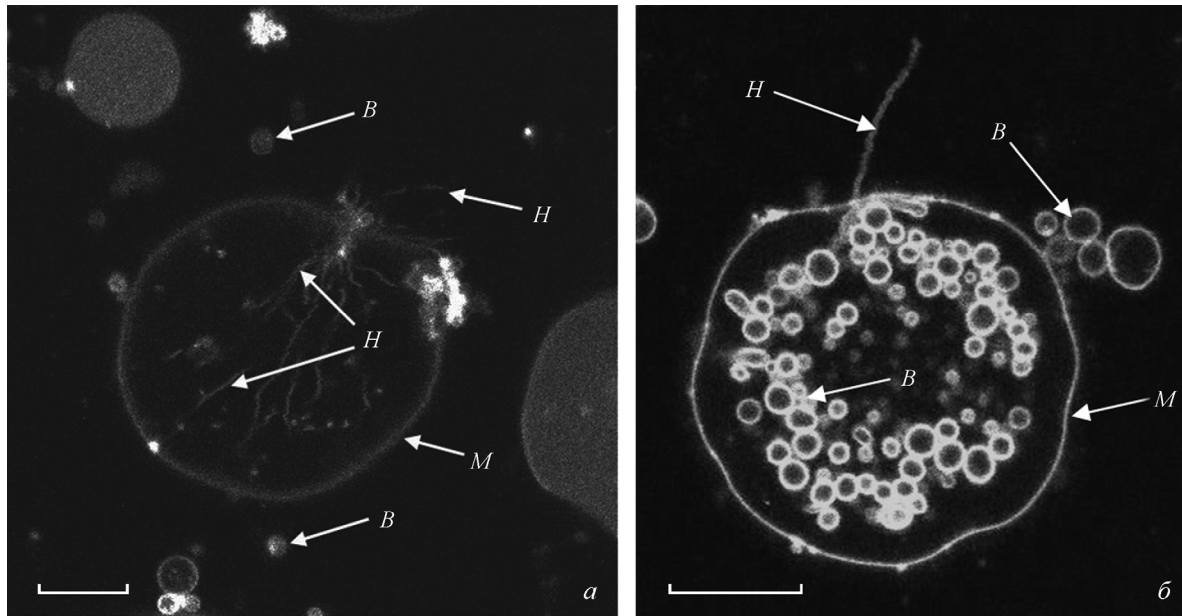


Рис. 1. Конфокальные изображения изолированных вакуолей, меченных флуоресцентными зондами — АНС (а) и лаурданом (б). Оптические срезы на расстоянии 5 мкм от поверхности подложки. В — везикулы, М — мембрана, Н — «трансвакуолярные нити». Об. 60×, масштабные отрезки — 10 мкм.

других растительных клеток (Assani et al., 2009; Oda et al., 2009).

Известно, что вакуоль представляет собой активную органеллу растительной клетки. Есть данные о том, что она приобретает сложную архитектуру в процессе подготовки к клеточному делению. Было обнаружено, что вакуоли клеток в культуре протопластов *Arabidopsis thaliana* имеют весьма сложное строение, при этом образуются так называемые трансвакуолярные нити. Полагают, что такие преобразования связаны с актиновыми филаментами (Sheahan et al., 2007).

С нашей точки зрения, интерес представляют эффекты влияния осмотического стресса на состояние мембраны и формирование везикул. Известно, например, что формирование везикул описано в клетках эпидермиса лука при осмотическом стрессе (Assani et al., 2009). Характерно, что при этом экзоцитозные везикулы полностью не отделялись от плазматической мембраны, а оставались соединенными с нею тонкой нитью, исходящей из мембраны. Такая связь везикулы с мембраной, как предполагают, важна для успешного прохождения последующего деплазмолиза (Assani et al., 2009). Отпочковывание везикул от мембраны изолированной вакуоли, наблюдавшееся в нашем исследовании, происходило, скорее всего, по типу либо эндоцитоза, либо экзоцитоза, и в этих случаях везикулы наблюдались как внутри, так и снаружи вакуолей.

Наиболее интересными, с нашей точки зрения, были неоднократные наблюдения в динамике полного распада мембран вакуолей с образованием множества везикул. Общеизвестно, что подобный распад является естественным при осмотических воздействиях. В нашем случае он происходил в условиях как гипер-, так и гипосмотического воздействия. Наглядный пример конечного результата распада мембраны вакуоли на множество везикул при гиперосмотическом воздействии представлен на рис. 2. Здесь представлено изображение, полученное в момент, когда верхняя часть вакуоли уже полностью от-

сутствует (лопнула), а фокусная плоскость конфокального микроскопа находится на расстоянии 5 мкм от подложки, где и наблюдается кольцо из везикул, лежащих на дне. Как показали наблюдения, проведенные в динамике на одних и тех же препаратах, нарушение целостности мембраны не всегда приводило к распаду вакуоли. При возникновении локального дефекта мембраны вакуоль теряла часть внутреннего содержимого, т. е. часть

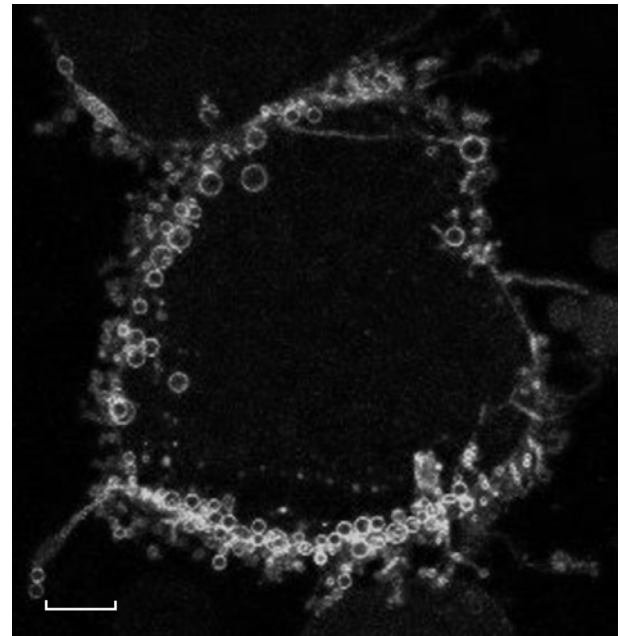


Рис. 2. Результат распада мембраны изолированной вакуоли на множество везикул при воздействии гиперосмотического стресса.

Зонд — лаурдан; оптический срез на расстоянии 5 мкм от предметного стекла. Об. 60×, масштабный отрезок — 10 мкм.



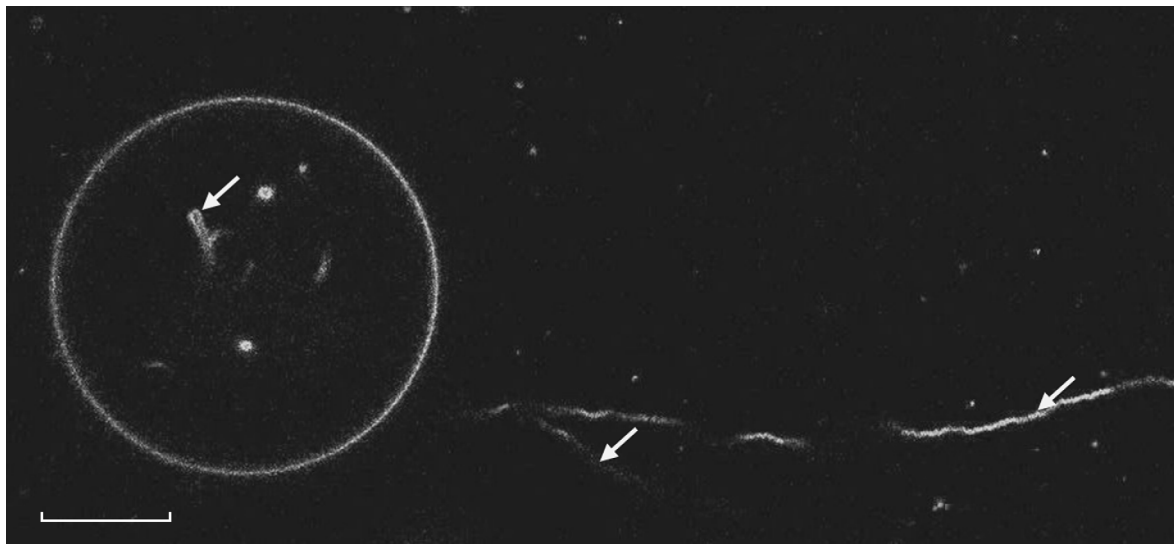


Рис. 3. Мембранные трубки (стрелки) внутри и снаружи вакуоли.  
Мембранный зонд — лаурдан. Об. 60×, масштабный отрезок — 10 мкм.

мембранных трубок могла выходить наружу, а затем место дефекта «залечивалось» и целостность мембраны восстанавливалась.

В последнее время в исследованиях биологических мембран большое внимание уделяется структурам цилиндрической формы, так называемым мембранным трубкам, с диаметром от нескольких десятков до нескольких сотен нанометров (Roux, 2013). Это связано с тем, что многие клеточные процессы, например эндоцитоз и слияние клеток, сопряжены с формированием таких мембранных структур. Существует гипотеза, объясняющая формирование таких МТС в процессе эндоцитоза (Lollike, Lindau, 1999). Позже было установлено, что в некоторых случаях в процессе эндоцитоза везикула не претерпевает полного отделения от цитоплазматической мембраны, а остается связанной с ней тонкой (~20 нм) мембранной трубкой (Duman et al., 2002). Функции МТС пока неясны. Есть лишь предположения о том, что они участвуют в процессах внутриклеточного и межклеточного транспорта (Dautry-Vasart, Luini, 2003; Rustom et al., 2004). Необходимо получить объяснение механизмов формирования и закономерностей поведения МТ в клетке.

В экспериментах, проведенных с гигантскими униламеллярными (однослойными) везикулами (ГУВ, соответствует англ. giant unilamellar vesicles — GUVs), было продемонстрировано, что формирование МТС зависит от температуры и состава липидов (Sakuma et al., 2013). Было предположено, что образование этих структур связано с балансом натяжения мембраны везикулы (спонтанное натяжение) и с асимметричным распределением липидов с формой молекулы в виде обратного конуса во внутреннем и наружном слоях мембраны везикулы (Sakuma et al., 2013).

В итоге исследования некоторых природных и искусственных мембранных систем было показано, что МТС образуют разветвленную транспортную сеть, в формировании которой участвуют сократительные белки цитоскелета (Dabora, Sheetz, 1988; Farsad, de Camilli, 2003). Например, в экспериментах с ГУВ было показано, что при формировании МТ происходит динамическая кластеризация сократительного белка кинезина (Koster et al., 2003).

В литературе есть также данные о влиянии элементов цитоскелета на строение мембраны. Эти данные были получены как на искусственных, так и на природных мембранах. При исследовании ГУВ показано, например, что актиновые сети, связанные с мембраной, сами по себе могут детерминировать время и место формирования микродоменов мембран (Liu, Fletcher, 2006). Показано также, что в клетках животных трансмембранные белки совместно с белками цитоскелета способны при определенных условиях объединять липиды мембран в крупные микродомены (Neumann et al., 2010).

В нашем исследовании было обнаружено, что длина МТС варьирует в широких пределах и может достигать более 300 мкм, что в несколько раз превышает средний диаметр вакуоли — 60 мкм (рис. 3). Посредством метода цейтраферного сканирования было установлено, что везикулы, связанные с МТС, могут перемещаться в пространстве относительно закрепленных к подложке изолированных вакуолей (рис. 4). Это перемещение может быть объяснено либо движением везикул по МТС, либо смещением целиком МТС с закрепленными к ней везикулами. В последнем случае, возможно, происходит изменение длины МТС.

Логично предположить, что обнаруженные нами такие элементы мембранной структуры, как везикулы (рис. 1, 4) и МТС (рис. 3), участвуют в реализации некоторых функций клетки (например, транспортной функции). Можно предположить, что обнаруженные нами трубчатые структуры имеют липид-белковую природу, поскольку они хорошо окрашиваются используемыми нами мембранными зондами и обладают такой же микровязкостью, как и сама вакуолярная мембрана (микровязкость оценивали по значениям обобщенной поляризации — GP — флуоресценции лаурдана; данные не приводятся). Кроме того, учитывая данные о наличии динамической взаимосвязи цитоскелета как с вакуолью (Sheahan et al., 2007; Gao et al., 2009), так и с МТС (Dabora, Sheetz, 1988; Farsad, de Camilli, 2003), мы предполагаем, что обнаруженные нами структуры вакуолярной мембраны определенным образом связаны с элементами цитоскелета.

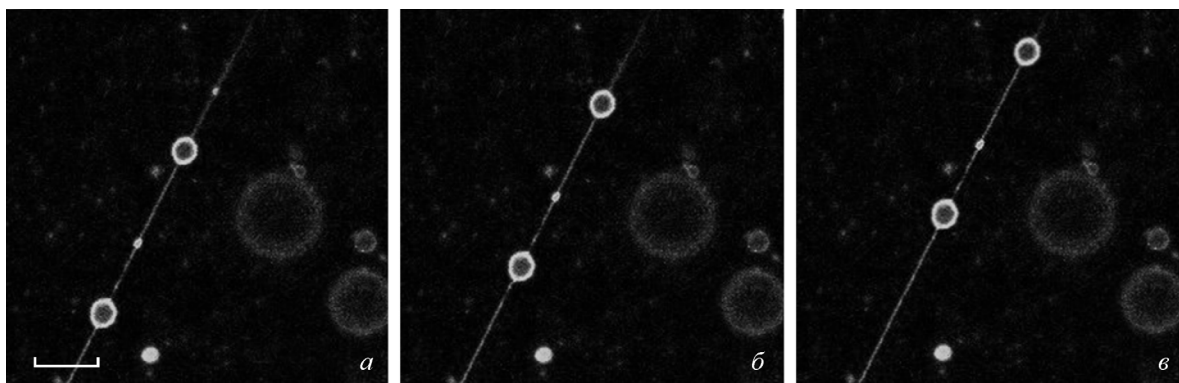


Рис. 4. Изменение положения везикул, связанных с мембранной трубкой, в результате их перемещения. *a–в* — конфокальные изображения, полученные при сканировании одного участка препарата через равные промежутки времени (*a* — 0, *б* — 30, *в* — 60 с). Мембранный зонд — лаурдан. Об. 60×, масштабный отрезок — 5 мкм.

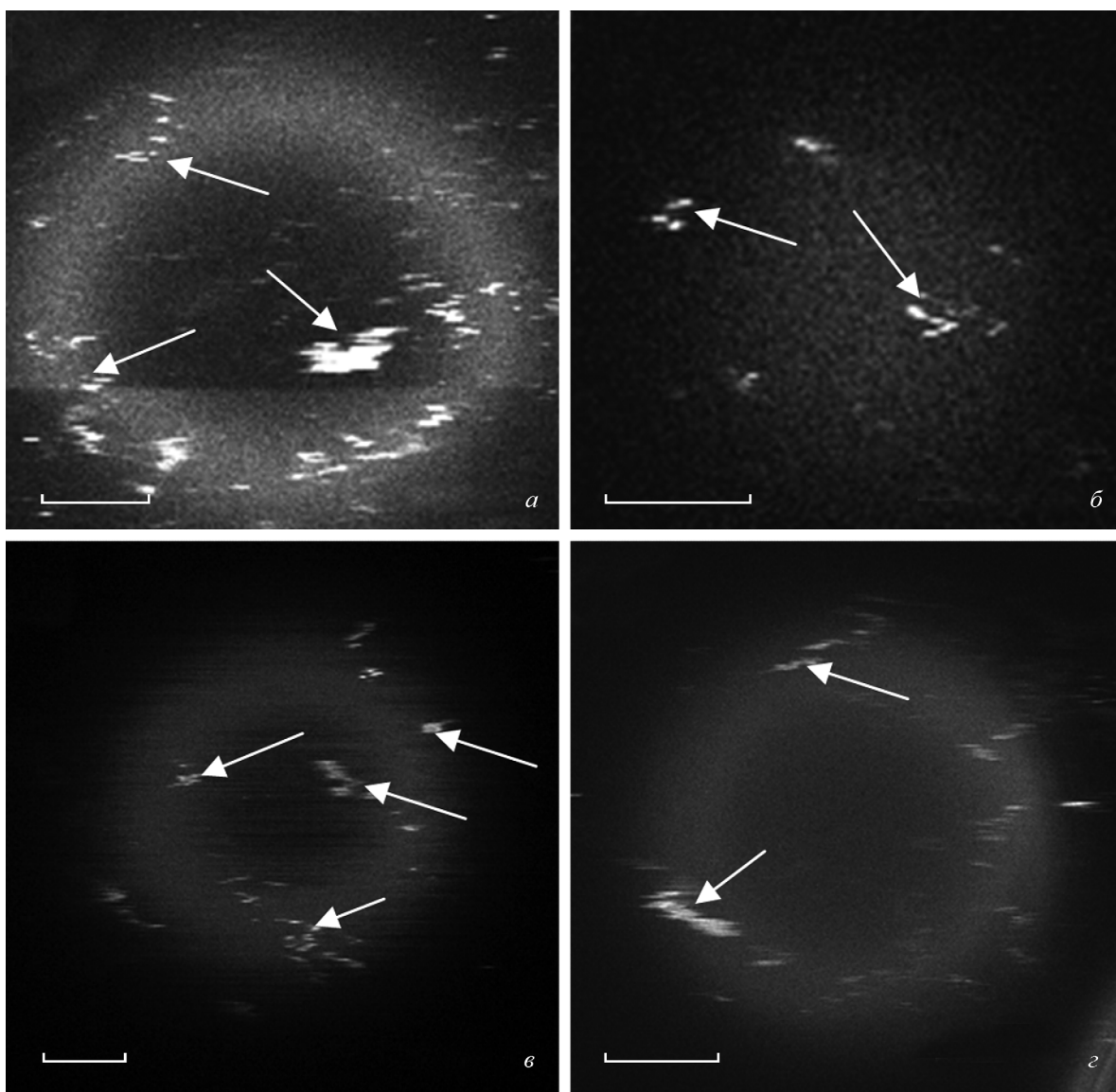


Рис. 5. Зоны интенсивной флуоресценции (*стрелки*) в верхней области изолированной вакуоли. *a* — лаурдан, *б* — ДФГ, *в* — АНС, *г* — бис-АНС. Интенсивность флуоресценции (ИФ) отмеченных *стрелками* областей и треков превышает ИФ остальных участков мембраны приблизительно в 10 раз. Об. 60×, масштабные отрезки — 5 мкм.

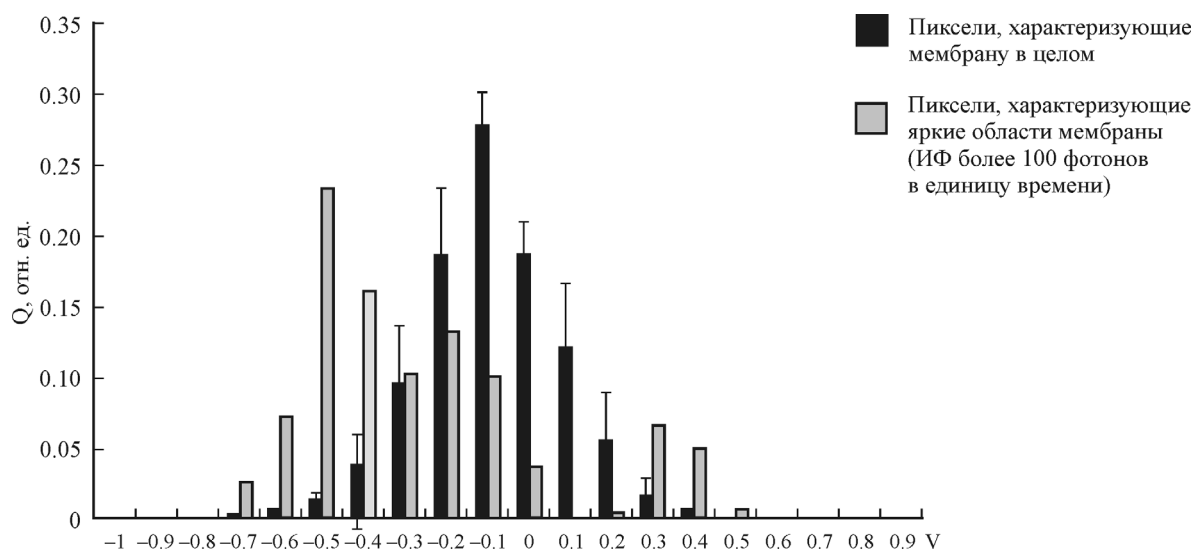


Рис. 6. Распределение значений GP флуоресценции лаурдана, связанного с липидной составляющей вакуолярной мембраны.

По горизонтали (V) — значения GP; по вертикали (Q) — количество пикселей на видеоизображении, характеризующихся определенной интенсивностью флуоресценции (ИФ). Под относительными единицами имеется в виду отношение количества пикселей, для которых рассчитанные величины GP лежат в некотором определенном интервале, к общему числу пикселей изображения, характеризующихся ИФ, превышающей определенный предел (подробнее методика анализа GP описана в разделе «Материал и методика»).

Примечательно, что, судя по интенсивности флуоресценции таких мембранных зондов, как лаурдан, ДФГ, АНС и бис-АНС, мембрана изолированной вакуоли окрашивается неоднородно. Особенно это заметно при сканировании верхней (по отношению к подложке) поверхности вакуоли (рис. 5), при этом значительная площадь мембраны оказывается в фокальной плоскости микроскопа. При использовании различных зондов на конфокальных изображениях (рис. 5) отчетливо видны ярко флуоресцирующие участки и треки внутри вакуолярной мембраны. Они характеризуются повышенной интенсивностью флуоресценции, которая примерно в 10 раз выше интенсивности флуоресценции рядом расположенных участков мембраны. Заметим, что в тех местах препарата, где вакуоли отсутствуют, ярко флуоресцирующих участков не было.

Зная, что зонды АНС (рис. 5, в) и бис-АНС (рис. 5, з) имеют большее сродство к белкам (Владимиров, Добрецов, 1980), мы предполагаем, что эти треки являются участками мембраны с повышенным содержанием белковых структур, попавшими в зону сканирования микроскопа. Такие участки обладают высокой подвижностью: при повторных сканированиях их регистрировали в иных (различных) местах. Логично предположить, что участки вакуолярной мембраны, имеющие более высокую интенсивность флуоресцентного мечения мембранными зондами, отличаются более плотной укладкой белков в мембране.

Анализ данных о флуоресценции мембранных зондов позволяет судить о фазовом состоянии (и плотности) вещества мембраны (Schneckenburger et al., 2004).

Средние значения GP флуоресценции областей, характеризующихся повышенной интенсивностью флуоресценции, и целой мембраны достоверно различаются ( $-0.22$  и  $-0.04$  соответственно,  $P < 0.05$ , критерий Манна—Уитни). Однако характер распределения значений GP в случае ярких областей был иным по сравнению с распределением значений GP для целой мембраны (рис. 6). Можно выявить по крайней мере три отдельных

пика на гистограмме распределения значений GP флуоресценции лаурдана в областях с повышенной интенсивностью флуоресценции (рис. 6, *серые столбцы*). Среди трех вышеупомянутых пиков есть области спектра значений GP, соответствующие более жидкому, среднему по плотности и более плотному состояниям вещества (максимумы значений GP  $-0.5$ ,  $-0.2$  и  $0.35$  соответственно). Как видно из гистограммы на рис. 6, значения GP флуоресценции лаурдана в вакуолярной мембране в норме имеют близкое к нормальному распределение и варьируют в диапазоне от  $-0.6$  до  $0.4$  с максимумом  $-0.1$ , что соответствует жидкокристаллическому состоянию липидов мембраны (Gaus et al., 2006).

Анализ данных о флуоресценции мембранных зондов позволяет судить также о микровязкости липидного матрикса мембраны (Schneckenburger et al., 2004; Gaus et al., 2006; Ozolina et al., 2013). Например, микровязкость мембраны можно оценить по изменениям спектров флуоресценции (Антонов и др., 1999). Получены распределения значений GP флуоресценции лаурдана для вакуолярной мембраны в целом, а также для интенсивно флуоресцирующих областей мембраны. Микровязкость в таких областях может существенно отличаться (как в большую, так и в меньшую сторону) от остальной части мембраны. Установлено, что вакуолярная мембрана окрашивается неравномерно, при этом выявляются области с повышенным сродством к мембранным зондам (Ozolina et al., 2013). Такие области предположительно являются участками скопления липид-белковых образований с доминированием белков (Yoshida et al., 2013; Guillier, 2014). Установлено, что такие участки обладают высокой подвижностью (Bagnat et al., 2000; Brown, 2002).

Можно также предположить, что нормальное функционирование мембраны, т. е. нормальное выполнение ею своих физиологических функций, возможно лишь при достаточной подвижности ее структурных составляющих. Такой биофизический параметр, как микровязкость мембраны, прежде всего определяется ее липидными компонентами. В свою очередь от микровязкости зависит



скорость поступательного и вращательного движения молекул (в том числе белковых молекул мембраны) (Владимиров и др., 1983). Возможно, именно поэтому колебания микровязкости рассматривают как важную физиологическую реакцию клетки и ее мембраны, обусловленную процессами адаптации организмов к внешним воздействиям (Болдырев и др., 2006). Полагают, что колебания микровязкости мембран влекут за собой изменения в проницаемости мембран и изменения в активности белков (ферментов, ионных каналов и рецепторов), встроенных в мембрану (Los, Murata, 2004). Это в свою очередь приводит к развитию и (или) интенсификации регуляторных реакций, направленных на адаптацию организма к неблагоприятным условиям окружающей среды (Los, Murata, 2004).

Согласно представлениям некоторых авторов, клеточная мембрана характеризуется подвижной латеральной неоднородностью липидного состава (Simons, Ikonen, 1997). В частности, в бислое мембраны могут образовываться структурные элементы, обладающие особыми свойствами и квалифицируемые как рафты. Факт существования рафтов в вакуолярных мембранах растений был строго доказан (Ozolina et al., 2013). Установлено, что рафты образуются вокруг определенных белков и обогащены гликофинголипидами, стеринами и липидами с насыщенными жирными кислотами (Lingwood et al., 2009). Богатые липидами кластеры мембраны характеризуются повышенной плотностью упаковки белковых и липидных молекул, большей упорядоченностью и микровязкостью, которая выше, чем таковая у остальной, более жидкой части мембраны, окружающей их. Есть основания полагать, что неоднородности биологических мембран, квалифицируемые как рафты и отличающиеся вышеуказанными свойствами, играют существенную роль в таких важных процессах, как транспорт белков через мембрану, пролиферация клеток, апоптоз и т. д. (Simons, Ikonen, 1997; Lingwood, Simons, 2010). Есть также данные о взаимодействиях между рафтами и цитоскелетом (Chichili, Rodgers, 2009).

Таким образом, исследование особенностей морфологии, фазового состояния, а также микровязкости элементов мембран изолированных вакуолей растительных клеток средствами конфокальной микроскопии позволило подтвердить факт образования таких структурных компонент системы мембран изолированных вакуолей, как везикулы и мембранные трубчатые структуры (МТС или «трансвакуолярные нити»). МТС обнаруживались как внутри, так и снаружи вакуоли, а при сканировании через равные промежутки времени можно было наблюдать перемещение везикул вместе с МТС. При сканировании верхней области изолированной вакуоли наблюдали отдельные участки флуоресценции высокой интенсивности. Такие участки могут являться скоплениями липид-белковых образований с преобладанием в их составе белков. Характер распределения значений GP флуоресценции лаурдана в данных областях интенсивной флуоресценции отличался от распределения значений GP для целой мембраны. Полученные данные позволяют предположить существенные отличия микровязкости интенсивно флуоресцирующих областей от остальной части мембраны.

В дальнейшем представляется перспективным исследовать связь вакуолярной мембраны с элементами цитоскелета, что может оказаться полезным для уточнения функциональной роли этих структур в клетке.

В работе использовалось оборудование Байкальского аналитического центра (ЦКП) Иркутского научного центра СО РАН. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 14-04-31103 мол\_а и 14-04-31080 мол\_а).

## Список литературы

- Андреев И. М. 2001. Функции вакуоли в клетках высших растений. Физиол. раст. 48 (5): 777—787. (Andreyev I. M. 2001. Vacuole functions in higher plant cells. Phiziologiya rastenyi. 48 (5): 777—787.)
- Андреев И. М. 2012. Роль вакуоли в редокс-гомеостазе растительных клеток. Физиол. раст. 59 (5): 660—667. (Andreyev I. M. 2012. The role of vacuole in redox homeostasis of plant cells. Phiziologiya rastenyi. 59 (5): 660—667.)
- Антонов В. Ф., Черныш А. М., Пасечник В. И., Вознесенский С. А., Козлова Е. К. 1999. Биофизика. М.: Владос. 288 с. (Antonov V. F., Chernysh A. M., Pasechnik V. I., Voznesensky S. A., Kozlova E. K. 1999. Biophysics. M.: Vlados. 288 p.)
- Баранов С. И., Нурминский Г. Н., Нурминский В. Н. 2014. Автоматизация обработки данных флуоресцентной микроскопии при измерении микровязкости мембран. В кн.: Матер. XXVII Междунар. науч. конф. «Математические методы в технике и технологиях». Тамбов. 175—178. (Baranov S. I., Nurminsky G. N., Nurminsky V. N. 2014. Automation of fluorescent microscopy data processing in course of measurement of membrane microviscosity. In: Proc. XXVII Intern. Sci. Conf. «Mathematical methods in engineering and technology». Tambov. 175—178.)
- Болдырев А. А., Кяйвяряйнен Е. И., Илюха В. А. 2006. Биомембранология. Петрозаводск: Изд-во Карельского НЦ РАН. 226 с. (Boldyrev A. A., Kyaivyaryainen E. I., Ilyuha V. A. 2006. Biomembranology. Petrozavodsk: Karelia Sci. Center of RAS Publ. 226 p.)
- Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. 1980. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука. 320 с. (Vladimirov Yu. A., Dobretsov G. E. 1980. Fluorescent probes in investigations bound up with biological membranes. M.: Nauka. 320 p.)
- Владимиров Ю. А., Рошупкин Д. И., Потепенко А. Я., Деев А. И. 1983. Биофизика. М.: Медицина. 272 с. (Vladimirov Yu. A., Roshupkin D. I., Potapenko A. Ya., Deyev A. I. 1983. Biophysics. M., Medicine. 272 p.)
- Макаренко С. П., Саляев Р. К. 1998. Структура вакуолярных мембран растений по данным ИК-спектроскопии. Биол. мембраны. 15 (3): 309—321. (Makarenko S. P., Salyaev R. K. 1998. The structure of plant vacuolar membranes by data of IR-spectroscopy. Biol. membrany. 15 (3): 309—321.)
- Нурминский В. Н., Озолина Н. В., Нестеркина И. С., Колесникова Е. В., Корзун А. М., Тихонов Н. В., Тарков М. С., Чернышов М. Ю., Саляев Р. К. 2011. Стабильность вакуолярных мембран растений при осмотическом стрессе и воздействии редокс-агентов. Биол. мембраны. 28 (3): 224—229. (Nurminsky V. N., Ozolina N. V., Nesterkina I. S., Kolesnikova E. V., Korzun A. M., Tikhonov N. V., Tarkov M. S., Chernyshov M. Yu., Salyaev R. K. 2011. Stability of plant vacuolar membranes under the conditions of osmotic stress and influence of redox agents. Suppl. Ser. A. Membrane Cell Biol. 5 (2): 185—190.)
- Нурминский В. Н., Чернышов М. Ю., Озолина Н. В., Нестеркина И. С., Колесникова Е. В., Ракевич А. Л., Мартынович Е. Ф., Саляев Р. К. 2012. Детергент-нерастворимые микродомены (рафты) в тонопласте. В кн.: Докл. IV съезда биофизиков России. Сессия 4. Новые тенденции и методы в биофизике. Нижний Новгород. Изд-во Нижегород. гос. ун-та. С. 74. (Nurminsky V. N., Chernyshov M. Yu., Ozolina N. V., Nesterkina I. S., Kolesnikova E. V., Rakevich A. L., Martynovich E. F., Salyaev R. K. 2012. Detergent-resistant microdomains (rafts) in tonoplast. Proc. IV Symposium of Russian Biophysicists. Session 4. New tendencies and methods in biophysics. Nizhnii Novgorod: Univ. Publ. P. 74.)

- Салыев Р. К., Кузеванов В. Я., Хантагаев В. Я., Копытчук В. Н. 1981. Выделение и очистка вакуолей и вакуолярных мембран из клеток растений. Физиол. раст. 28 : 1295—1305. (Salyaev R. K., Kuzevanov V. Ya., Khaptagaev V. Ya., Kopytchuk V. N. 1981. Isolation and purification of vacuoles and vacuolar membranes from plant cells. Phiziologiya rastenyi. 28 : 1295—1305.)
- Assani A., Moundanga S., Beney L., Gervais P. 2009. Vesicle formation in the membrane of onion cells (*Allium cepa*) during rapid osmotic dehydration. Ann. Bot. 104 : 1389—1395.
- Bagnat M., Keranen S., Shevchenko A., Shevchenko A., Simons K. 2000. Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 3254—3259.
- Brown D. 2002. Structure and function of membrane rafts. Int. J. Med. Microbiol. 291 : 433—437.
- Chichili G. R., Rodgers W. 2009. Cytoskeleton-membrane interactions in membrane raft structure. Cell Mol. Life Sci. 66 : 2319—2328.
- Dabora S. L., Sheetz M. P. 1988. The microtubule-dependent formation of a tubulovesicular network with characteristics of the ER from cultured cell extracts. Cell. 54 : 27—35.
- Dautry-Vasart A., Luini A. 2003. Membranes and organelles. Curr. Opin. Cell Biol. 15 : 369—371.
- Duman J. G., Pathak N. J., Ladinsky M. S., Mc Donald K. L., Forte J. G. 2002. Three-dimensional reconstruction of cytoplasmic membrane networks in parietal cells. J. Cell Sci. 115 : 1251—1258.
- Etxeberría E., Gonzalez P., Pozueta-Romero J. 2013. Architectural remodeling of the tonoplast during fluid-phase endocytosis. Plant Signal Behav. 8 (7) : e24793.
- Farsad K., De Camilli P. 2003. Mechanisms of membrane deformation. Curr. Opin. Cell Biol. 15 : 372—381.
- Gao X. Q., Wang X. L., Ren F., Chen J., Wang X. C. 2009. Dynamics of vacuoles and actin filaments in guard cells and their roles in stomatal movement. Plant Cell Environ. 32 : 1108—1116.
- Gaus K., Zech T., Harder T. 2006. Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. Mol. Membr. Biol. 23 : 41—48.
- Guillier C., Cacas J.-L., Recorbet G., Depretre N., Mounier A., Mongrand S., Simon-Plas F., Wipf D., Dumas-Gaudot E. 2014. Direct purification of detergent-insoluble membranes from *Medicago truncatula* root microsomes: comparison between flotation and sedimentation. BMC Plant Biol. 14 : 255.
- Koster G., VanDuijn M., Hofs B., Dogterom M. 2003. Membrane tube formation from giant vesicles by dynamic association of motor proteins. PNAS. 100 : 15 583—15 588.
- Lingwood D., Kaiser H. J., Levental I., Simons K. 2009. Lipid rafts as functional heterogeneity in cell membranes. Biochem. Soc. Trans. 37 : 955—960.
- Lingwood D., Simons K. 2010. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. Science. 327 : 46—50.
- Liu A. P., Fletcher D. A. 2006. Actin polymerization serves as a membrane domain switch in model lipid bilayers. Biophys. J. 91 : 4064—4070.
- Lollike K., Lindau M. 1999. Membrane capacitance techniques to monitor granule exocytosis in neutrophils. J. Immunol. Methods. 232 : 111—120.
- Los D. A., Murata N. 2004. Membrane fluidity and its role in the perception of environmental signals. Biochim. biophys. acta. 1666 : 142—157.
- Neumann A. K., Itano M. S., Jacobson K. 2010. Understanding lipid rafts and other related membrane domains. F1000 Biol. Rep. 2 : 31.
- Oda Y., Higaki T., Hasezawa S., Kutsuna N. 2009. New insights into plant vacuolar structure and dynamics. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 277 : 103—135.
- Ozolina N. V., Nesterkina I. S., Kolesnikova E. V., Salyaev R. K., Nurminsky V. N., Rakevich A. L., Martynovich E. F., Chernyshov M. Yu. 2013. Tonoplast of *Beta vulgaris* L. contains detergent-resistant membrane microdomains. Planta. 237 : 859—871.
- Reisen D., Marty F., Leborgne-Castel N. 2005. New insights into the tonoplast architecture of plant vacuoles and vacuolar dynamics during osmotic stress. BMC Plant Biol. 5 : 13.
- Roux A. 2013. The physics of membrane tubes: soft templates for studying cellular membranes. Soft Matter. 9 : 6726—6736.
- Rustom A., Saffrich R., Markovic I., Walther P., Gerdes H. H. 2004. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. Science. 303 : 1007—1010.
- Sakuma Y., Taniguchi T., Kawakatsu T., Imai M. 2013. Tubular membrane formation of binary giant unilamellar vesicles composed of cylinder and inverse-cone-shaped lipids. Biophys. J. 105 : 2074—2081.
- Schneckenburger H., Wagner M., Kretschmar M., Strauss W. S. L., Sailer R. 2004. Laser-assisted fluorescence microscopy for measuring cell membrane dynamics. Photochem. Photobiol. Sci. 3 : 817—822.
- Sheahan M. B., Rose R. J., McCurdy D. W. 2007. Actin-filament-dependent remodeling of the vacuole in cultured mesophyll protoplasts. Protoplasma. 230 : 141—152.
- Simons K., Ikonen E. 1997. Functional rafts in cell membranes. Nature. 387 : 569—572.
- Yoshida S., Uemura M. 1986. Lipid composition of plasma membranes and tonoplast isolated from etiolated seedlings of Mung bean (*Vigna radiate* L.). Plant Physiol. 82 : 807—812.

Поступила 16 II 2015

#### PECULIAR PROPERTIES OF SOME COMPONENTS OF MORPHOLOGICAL STRUCTURE IN A PLANT CELL VACUOLE REVEALED BY CONFOCAL MICROSCOPY

V. N. Nurminsky,<sup>1,\*</sup> A. L. Rakevich,<sup>2</sup> E. F. Martynovich,<sup>2</sup> N. V. Ozolina,<sup>1</sup> I. S. Nesterkina,<sup>1</sup> E. V. Kolesnikova,<sup>1</sup>  
A. A. Pilipchenko,<sup>3</sup> R. K. Salyaev,<sup>1</sup> M. Yu. Chernyshov<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of RAS, Irkutsk, 664033,

<sup>2</sup> Institute of Laser Physics (Irkutsk Department), Siberian Branch of RAS, 664003,

<sup>3</sup> Irkutsk State University, 664033, and

<sup>4</sup> Presidium of Irkutsk Scientific Center, Siberian Branch of RAS, 664033;

\* e-mail: cell@sifibr.irk.ru

Results of investigations of peculiar properties related to the structure of plant cell vacuolar membranes are discussed. The study was carried out using confocal microscopy, which allowed us in the process of scanning to identify membrane tubes and vesicles in the preparations of isolated vacuoles. Such membrane tubes were found both inside and outside the vacuoles, and, in the case of scanning intermittently at equal time intervals, transition of vesicles with the membrane tube was observed. Furthermore, scanning of isolated vacuoles was conducted at various distances from the glass substrate. Each time, in the upper area of the isolated vacuole ly-



ing on the substrate, we observed a large segment of vacuolar membrane and registered the effect of highly intensive fluorescing of some of membrane segments. The distributions of laurdan fluorescence generalized polarization (GP) values for the vacuolar membrane on the whole and for the intensively fluorescing membrane segments have been obtained. We have found that the microviscosity of the intensively fluorescing membrane segments essentially differs from that of the rest part of the membrane.

**Key words:** plant cell vacuoles, structure of vacuolar membrane, confocal microscopy, fluorescent probes, membrane tubes, microviscosity of membrane.

---