

## ЗВІТ

по темі “Дослідження функціональних сайтів цитоплазматичної мембрани рослинних клітин в умовах реальної та модельованої мікрогравітації” за 2018 р. (керівник Є.Л. Кордюм)

### Вступ

Рослини, як джерело кисню та їжі, визнані незамінними компонентами біорегенеративних систем життєзабезпечення космонавтів у тривалих подорожах в далекому космосі, експедиції на Марс, побудови місячних баз. У зв'язку із цими планами людства освоєння космосу значно активізувалися дослідження впливу мікрогравітації на рослини з метою пізнання механізмів їхньої адаптації до цього чинника та з'ясування гравічутливості/гравізалежності базових клітинних процесів. Здатність однорічних рослин проходити весь життєвий цикл, від насіння до насіння, в умовах космічного польоту надає можливість досліджувати вплив мікрогравітації на ріст та розвиток рослин на клітинному та молекулярному рівнях (Wheeler, 2010; Kittang et al., 2014; Kordyum, 2014). Фундаментальні дослідження можливостей адаптації рослин до умов космічного польоту, що мають безпосереднє прикладне значення для розробки технологій космічного рослинництва у біорегенеративних системах життєзабезпечення в тривалих космічних польотах, в останні роки піднялися на новий щабель завдяки удосконаленню техніки мікрочипів і двомірного електрофорезу, що дозволило виявляти вплив мікрогравітації на експресію генів, склад та вміст білків. Показано, що під впливом цих чинників змінюється експресія значного числа генів, задіяних у широкому колі клітинних процесів, зокрема у відповідях на стрес, передачі сигналів, в тому числі за участю іонів кальцію, синтезі білків, загальному метаболізмі, білків, зв'язаних з хлорофілом *a/b* тощо. Цікаво відмітити, що спрямованість змін експресії генів, які кодують білки клітинної стінки та ліпідного сигналіngu, узгоджується з раніш одержаними даними за допомогою біохімічних методів щодо змін у ліпідному та вуглеводному метаболізмі та активності ферментів клітинної стінки. Загалом взяті результати цитологічних, біохімічних і молекулярно-біологічних досліджень яскраво демонструють суттєвий вплив мікрогравітації на ключові процеси розвитку

рослин, розкриваючи в той же час механізми, які лежать в основі реакцій рослин на дію мікрогравітації та забезпечують пристосування рослин до дії цього чинника. Сучасна методологія молекулярно-біологічних досліджень відкриває нові горизонти у розумінні гравічутливості та гравізалежності структурно-функціональної організації та адаптивних стратегій рослин до мікрогравітації.

Ми запропонували новий напрям для пізнання гравічутливості рослин – дослідження впливу реальної та модельованої мікрогравітації на біологічні мембрани, в першу чергу цитоплазматичної мембрани, оскільки їхні властивості й функції можуть розглядатися як найбільш чутливі індикатори впливу гравітації або зміненої гравітації на клітину. Незважаючи на ключову роль цитоплазматичної мембрани у функціонуванні клітини, літературні дані щодо впливу зміненої гравітації на її фізико-хімічні властивості обмежені. Експериментально показано гравічутливість ЦМ: зміни у вмісті фосфоліпідів, жирних кислот і стеринів (Полулях, 1988; Кордюм та ін., 2015), доведено безпосередній вплив гравітації на іонні канали, текучість (мікрров'язкість) як штучних ліпідних мембран, так і клітинних (Goldmann, Hanke, 2001; Sieber et al., 2004), що, як припускається, може пояснити деякі біологічні ефекти гравітації. Запропоновано гіпотезу гравітаційної декомпенсації, відповідно якої зміни у поверхневому натягу мембрани в умовах мікрогравітації можуть грати роль індуктора, вплив якого посилюється завдяки гетерогенності мембрани по її довжині (Kordyum, 1997). В останні десятиріччя цитоплазматична мембрана вже не розглядається як гомогенний бішар, що складаються із ліпідів і білків, занурених у ліпідний бішар або менш щільно, зворотно або незворотно, зв'язаних з поверхнею мембрани. Було встановлено, що клітинні мембрани дуже неоднорідні, що призвело до загальноприйнятого уявлення щодо наявності в мембранах функціональних мікродоменів ліпідного бішару із специфічною локалізацією та вмістом ліпідів і білків, які дістали назву “ліпідних рафтів. Рафти збагачені на холестерин, сфінголіпіди, насичені фосфоліпіди та вважаються необхідними для здійснення численних життєво важливих процесів.

Припускається, що ліпідні рафти, плаваючи по поверхні мембрани, взаємодіють один з одним, регулюючи передачу зовнішнього сигналу в середину клітини, відповіді при цьому мають різноманітні. Асоціація з рафтами може бути вирішальним фактором, що визначає активність інтегральних мембранних білків, в тому числі іонних каналів (Edidin, 2003; Casas et al., 2012, Kraft, 2013). Дослідами щодо дії на рослини холодним стресом, посухою, засоленням доведено важливу роль ліпідних рафтів у захисних механізмах клітини при різних стресових впливах. Нашими попередніми дослідженнями вперше було встановлено наявність рафтів у цитоплазматичній мембрані коренів проростків *P. sativum* та на підставі одержаних експериментальних даних щодо характеру зміни вмісту насичених і ненасичених жирних кислот і холестерину під впливом кліностакування в цитоплазматичній мембрані та рафтах обґрунтовано уявлення, що щільно упаковані домени цитоплазматичної мембрани – рафти, відповідають за зміни активності асоційованих з ними ферментів та проникність цитоплазматичної мембрани в умовах модельованої мікрогравітації.

У завдання 2018 р. входили аналіз новітньої літератури відповідно до поставлених завдань і проведення кліностаатних експериментів з метою дослідження складу і вмісту сфінголіпідів і стеринів у рафтах клітин коренів проростків гороху, оскільки основною функцією сфінголіпідів є участь у передачі сигналів зі зовнішньої поверхні клітини у її внутрішній простір. Структура цих молекул та їхня локалізація відповідає цій функції. Сфінголіпіди складаються із ліпофільної (церамід) і гідрофільної (вуглеводної) частин. Різноманітність вуглеводної частини обумовлює функції сфінголіпідів як носіїв специфічності та інформації.

За звітний період проаналізовано сучасну літературу з відповідних питань та окреслено підходи до подальших досліджень впливу модельованої мікрогравітації на ліпідні рафти рослинних клітин. Проведено три експерименти з проростками гороху, які росли 6 діб на горизонтальному повільному кліностааті.

## Матеріал і методи

Експерименти поводили з проростками гороху (*Pisum sativum* L.) сорту Берсек, що зростали в умовах етіоляції при температурі 21 °С. Сухе насіння стерилізували у водному розчині  $\text{KMnO}_4$ , ретельно промивали проточною водою й викладали на мокрий фільтровальний папір на 12-14 годин. Потім насіння, що проклюнулось, завертали в трубочки з фільтрувального паперу, орієнтуючи зародковим коренем донизу. Трубочки з таким насінням розташовували в стаканах, 6 стаканів ставили на горизонтальний кліностант (2 об/хв.) та 6 стаканів – поряд з кліностантом (стаціонарний контроль).

На сьому добу кліностантування від проростків відрізали кореневу частину та виділяли з неї фракцію цитоплазматичної мембрани за методом двофазної водно-полімерної системи (Larsson et al., 1994) із використанням центрифуги Optima L-90K. В хімічні стакани об'ємом 0,5 л, розташовані на льоду, вносили розчин, який містив: 50 мМ MOPS-KOH (3-[N-морфоліно]пропансульфонову кислоту); 0,25 М сахарозу; 5 мМ EDTA- $\text{Na}_2$  (динатрієву сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти); 5 мМ DTT (дитіотреїтол); 0,5 мМ PMSF (фенілметилсульфоніл фторид); 0,2% BSA (бичачий сироватковий альбумін); 0,6% PVP-40 (полівінілпіролідон); 5 мМ аскорбат; 0,2% казеїн (рН=7,65). Наважку коренів (45–75 г) поміщали в розчин та гомогенізували безпосередньо в хімічних стаканах за допомогою блендера. Гомогенат фільтрували через нейлонову сітку в чистий стакан, розміщений на льоду. Отриманий фільтрат переносили у пластикові центрифужні пробірки та центрифугували при 10 000 g протягом 10 хв (4°C) на центрифусі Optima L-90 (Beckman Coulter, Німеччина). Супернатант переносили в чисті пробірки та центрифугували при 100 000 g протягом 1 год (4°C). Після центрифугування до утвореного осаду додавали розчин (рН= 7,8), який містив: 5 мМ фосфат калію; 2 мМ KCl; 0,25 М сахарозу; 1 мМ DTT; 0,1 мМ EDTA та центрифугували при 100 000 g протягом 1 год (4°C). Для виділення фракції цитоплазматичної мембрани отриману мікросомальну фракцію переносили у пробірки з двофазними системами, кожна з яких містила: 20% декстран; 40% ПЕГ (поліетиленгліколь); 0,25 М сахарозу; 0,2 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 М KCl; 0,5 мМ DTT в 50 мМ EDTA, перемішували кожную

систему 40 разів, перевертаючи пробірки вгору/вниз. Розділення двофазних систем проводили шляхом центрифугування з використанням бакет-ротора з підвісними стаканами при 1500 g протягом 5 хв та температурі 4°C. Після процедуру розділення проводили двічі, промиваючи верхню фазу, збагачену плазматичними мембранами, шляхом заміни нижньої фази на нову. Додатково проводили перерозподіл мембран, шляхом внесення нової верхньої фази до використаної нижньої фази (перевертання пробірок, центрифугування з використанням бакет-ротора при 1500 g протягом 5 хв, 4°C).

Ліпідні рафти отримували із фракції цитоплазматичної мембрани за методом ізопікнічного центрифугування фракції мембрани, в основі якого лежить розділення часток в залежності від їх плавучої щільності. При проведенні розподілу цим методом зразок ресуспендують в розчині з більшою щільністю, вміщують його на дно пробірки, потім нашаровують розчин з меншою щільністю, причому ізопікнічна точка повинна розташовуватись в середній частині пробірки. Центрифугування проводять до тих пір, поки компонент, що вивчається, не вплине у зону рівноважної щільності (рис.1).

Отримані фракції цитоплазматичної мембрани об'єднували, перемішували, додавали 5 mM Tris-Mes буфер (pH=7,0), якій містив додатково 0,25 M сахарозу, 2mM DTT, 1 mM PMSF, 5 mM EDTA-Na<sub>2</sub> та центрифугували при 100 000 g протягом 1 год (4°C). Отриманий осад (цитоплазматичні мембрани) ресуспендували, додавали Тритон X-100 до кінцевої концентрації 1% та витримували 30 хвилин при 4°C. В пробірки для центрифугування вносили градієнти сахароз 52–35–30–5%. Суміш плазматичної мембрани та Тритону X-100 наносили в градієнт сахарози в шар з 52% сахарози. Отриману систему центрифугували при 110 000 g протягом 16 годин. Після центрифугування піпеткою Пастера відбирали фракцію рафтів, яка у вигляді слабо опалесцюючого кільця знаходилась в 35% шарі градієнту. Отриману фракцію знов центрифугували при 100 000 g на протязі 1 години та отриманий осад заливали 1 мл Tris-Mes буфера з pH 7,0 та заморожували.



Рис. 1. Схема виділення рафтів із фракції цитоплазматичної мембрани, виділеної з коренів 6-ти добових проростків гороху.

Фракцію рафтів фіксували глютаральдегідом, постфіксували  $\text{OsO}_4$ , та заливали в агарові блоки. Агарові блоки зневоднювали в серії спиртів та заливали в суміш епоксидних смол. Отримані ультра тонкі зрізи контрастували ураніл ацетатом та цитратом свинцю та вивчали за допомогою трансмісійного електронного мікроскопу JEM 1230 (JEOL, Japan).

Для виділення ліпідних складових препарати цитоплазматичної мембрани екстрагували ізопропанолом із розрахунку 2 мл спирту на 80-100 мг сирової маси препарату, потім матеріал зневоднювали безводним сульфатом натрію (Табл. 1).

Таблиця 1. Маса чистих ліпідних екстрактів

Проба	Маса колбочки, г	Маса колбочки з екстрактом, г	Маса сухого залишку, г
Контроль	28,8878	28,9000	0,0122
Дослід	32,1550	32,1676	0,0126

Для отримання ліпідних профілів, що включають гліколіпіди, стерини та їх ефіри із ЖК, фосфоліпіди, тригліцериди, тощо, застосовували 3-х елюентну схему (елюент А – 0,01 М водний розчин ортофосфорної кислоти, елюент С – ацетонітріл, елюент D – ізопропанол) на колонці Thermo Scientific Hypersil™ BDS C<sub>18</sub>, 3 мкм, Angilent 1100, 2.1x100 мм. Профіль елюювання проводили відповідно до програми на вискоєфективному рідинному хроматографі Angilent 1100. Окремі класи ліпідів ідентифікували, використовуючи стандартні речовини та реагенти на окремі функціональні групи. Базове детектування проводилось при 206 нм.

Для визначення складу ліпідів у рафтах, ліпідний екстракт готували згідно з методом Bligh та Dyer [10]. Для екстракції, ліпіди розводили бензолом, переносили в ампулу, додавали 1,5 мл 3М HCl в метанолі (110 мл охолодженого метанолу та 21,5 мл ацетохлориду). Ампулу запаювали та кип'ятили на водяній бані 1 годину. Вміст ампули розріджували водою, екстрагували гексаном. Гексан випаровували та отримували метильовані ефіри жирних кислот (МЕЖК), які наносили на пластинки Sorbfil для очищення. В якості розчинника використовували бензол. Очищені МЕЖК розчиняли в гексані та досліджували методом газової хроматографії на апараті HRGC 5300 (Carlo Erba Instruments, Італія) на скляній набивній колонці 3,5 м, яку було заповнено Chromosorb W/HP з нанесеною 10 % рідкою фазою Sibar 5CP за програмованої температури 140-250 °C зі зростанням на 2<sup>0</sup>/хв. Ідентифікацію окремих жирних кислот проводили за допомогою стандартів фірми Sigma. Вміст індивідуальних жирних кислот виражали у відсотках від загальної суми жирних кислот.

В рафтах, ідентифікацію окремих жирних кислот проводили за допомогою стандартів фірми Sigma. Вміст індивідуальних жирних кислот виражали у відсотках від загальної суми жирних кислот. Усі жирні кислоти в залежності від ступеню їх насиченості розділяли на групи: насичені (Н) – подвійні зв'язки відсутні, моноєнові (М) – один подвійний зв'язок, диєнові (Д) – два подвійних зв'язки, триєнові (Тр) – три подвійних зв'язки. Коефіцієнт ненасиченості (К) жирних кислот визначали як відношення  $\sum$  ненасичених ЖК /  $\sum$  насичених ЖК. Якісний склад стеринів фракції рафтів визначали після отримання ліпідів вищезазначеним методом Bligh та Dyer [10] на скляній колонці 0.5 м, яку було

заповнено Chromosorb W/HP з нанесеною фазою 3 % OV-1 за програмованої постійної температури 250 °С з використанням стандартів до холестерину, ергостеролу, стигмастерину та  $\beta$ -ситостерину фірми Sigma методом газової хроматографії на апараті HRGC 5300 (Carlo Erba Instruments, Італія).

Якісний склад стеринів фракції рафтів визначали після отримання ліпідів вищезазначеним методом Bligh та Dyer [10] на скляній колонці 0,5 м, яку було заповнено Chromosorb W/HP з нанесеною фазою 3 % OV-1 за програмованої постійної температури 250 °С з використанням стандартів до холестерину, ергостеролу, стигмастерину та  $\beta$ -ситостерину фірми Sigma методом газової хроматографії на апараті HRGC 5300 («Carlo Erba Instruments», Італія).

### Результати та обговорення досліджень.

Методом електронної трансмісійної мікроскопії із використанням мікроскопа JEM 1230 (Jeol, Japan) показано, що рафти, ЦМ гороху, мають вигляд відносно тонких стрічок довжиною від 80 до 100 нм на ширину від 80 до 100 нм (рис.2).

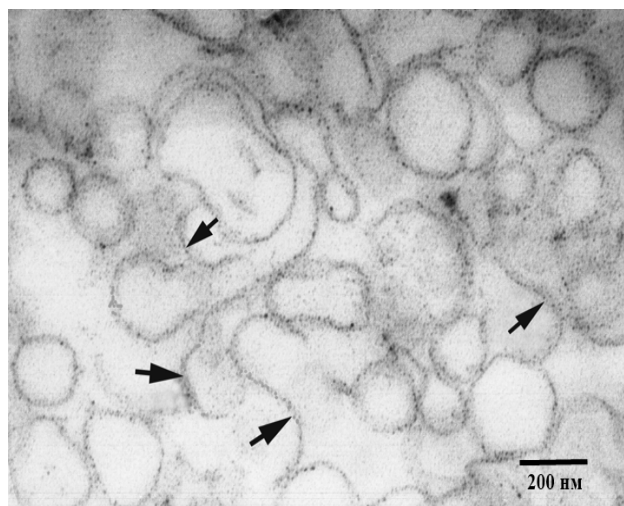


Рис. 2. Мікрофотографія рафтів, отриманих з коренів 6-ти добових проростків гороху (електронна трансмісійна мікроскопія). Стрілки вказують на рафти.

Рафти, вперше виділені нами із цитоплазматичної мембрани коренів 6-ти добових проростків гороху, які росли в стаціонарних умовах і умовах кліноостатування (модельованої мікрогравітації), за структурою та розмірами були подібні до таких цитоплазматичної мембрани інших рослин. Встановлено,



що основними компонентами отриманих нами ліпідних рафтів є фосфоліпіди та стерини. Як в контролі, так і за умов кліноостатування до складу рафтів входили: PC – фосфатидилхолін, PE – фосфатидилетаноламін, LPC – лізо-фосфатидилхолін, SM – сфінгомієлін, PI – фосфатидилінозитол, PS – фосфатидилсерин, DPG – дифосфатидилгліцерол PA – фосфатидна кислота. Серед фосфоліпідів переважали фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін та фосфатидна кислота. Вміст фосфатидилінозиту та фосфатидилсерину був меншим, порівняно з іншими компонентами. Особливо важливо визначення у складі рафтів сфінгомієліну, що належить до сфінголіпідів, які є характерною ознакою складу ліпідів рафтів (рис. 3).

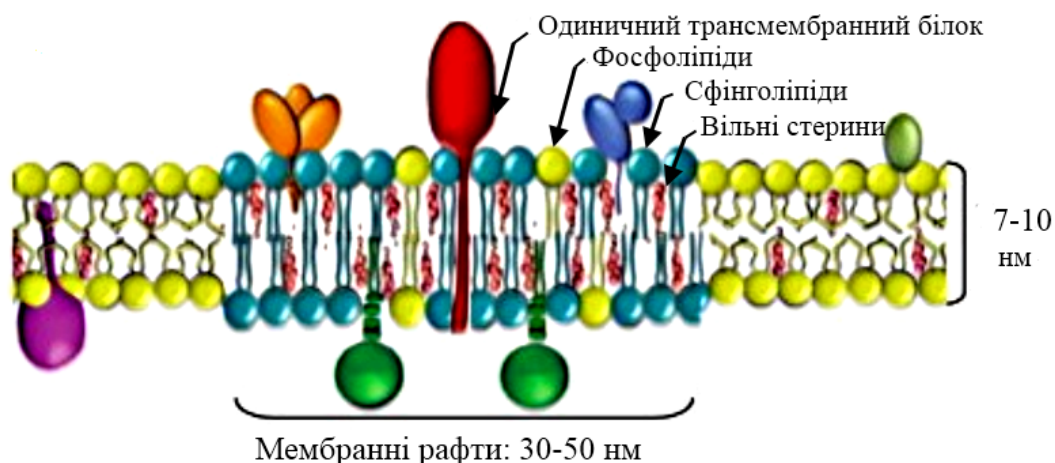


Рис.3. Ліпідні рафти (Mongrand et al., 2010)

Доведено, що основною функцією сфінголіпідів є їхня участь у передачі сигналів зовнішніх сигналів у внутрішній простір клітини. Цій функції відповідають структура та локалізація сфінголіпідів, які складаються із ліпофільної (церамід) і гідрофільної (вуглеводної) частин. За допомогою цераміду вони щільно закріплюються у ліпідному бішарі мембрани і разом з тим взаємодіють із оточуючим полярним середовищем. Молекули сфінголіпідів орієнтовані виключно назовні, а за різноманітністю вуглеводних складових сфінголіпідів є носіями специфічності. Сфінгомієлін складається із цераміду та фосфорилхоліну, локалізований на зовнішній поверхні мембрани, найбільш

поширений серед сфінголіпідів. При ферментативному гідролізі сфінгомієліну утворюються одна молекула жирної кислоти, одна молекула двохатомного ненаситного спирту сфінгозину, одну молекулу холіну та одну молекулу фосфорної кислоти (рис. 4)



Рис. 4. Загальна формула сфінгомієліну (Вікіпедія)

Продукти гідролізу сфінгомієліну відіграють важливу роль в сигнальній трансдукції та впливають як на проліферацію та диференціацію клітин, так і на процеси реплікації та транскрипції, також задіяні в запрограмованій загибелі клітин.

Як ми вже зазначали, рафти збагачені на холестерин і насичені жирні кислоти. За умов кліностування у рафтах значно збільшувався вміст арвхідонової кислоти та зменшувався вміст ліноленової. Порівняння вмісту жирних кислот і стеринів у цитоплазматичній мембрані коренів 6-ти добових проростків гороху (Кордюм та ін., 2018) та виділених з неї фракції рафтів показало, що фракція цитоплазматичної мемрани та фракція рафтів відрізняються між собою як за якісним, так і кількісним складом жирних кислот і стеринів.

Дані цього року підтвердили попередні дані щодо збільшення вмісту холестерину у рафтах в умовах кліноостатування в 7 разів порівняно із контролем, в той час як вміст інших стеринів майже не змінювався (табл. 2, рис. 5–7).

Таблиця 2. Відносний вміст стеринів у фракції рафтів коренів проростків гороху в контролі та при кліноостатуванні, %

Стерини	Контроль	Кліноостатування
Холестерин	0,30	2,16
Ергостерин	9,65	8,95
Стигмастерин	30,59	29,11
$\beta$ -сітостерин	45,07	43,39
Інші (не ідентифіковані)	14,39	16,39

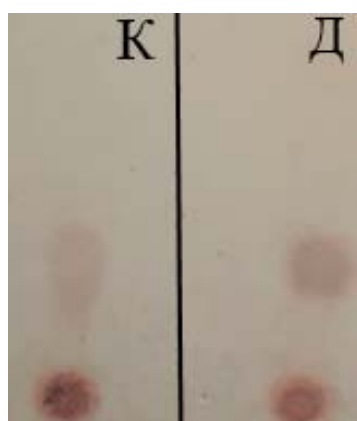


Рис. 5. Хроматограма стеринів і ліпідів у фракції рафтів цитоплазматичної мембрани, ізольованої зі коренів проростків гороху, які росли в контролі – К та умовах кліноостатування – Д (ТШХ).

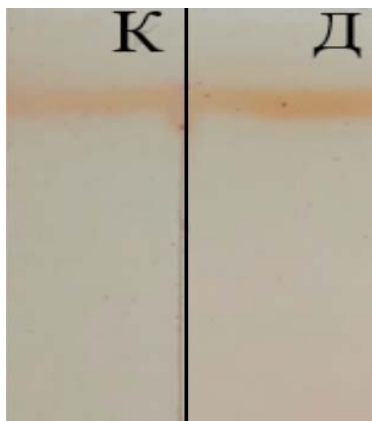


Рис. 6. Хроматограма ефірів холестерину у фракції рафтів цитоплазматичної мембрани, ізольованої зі коренів проростків гороху, які росли в контролі – К та умовах кліноостатування – Д (ТШХ).



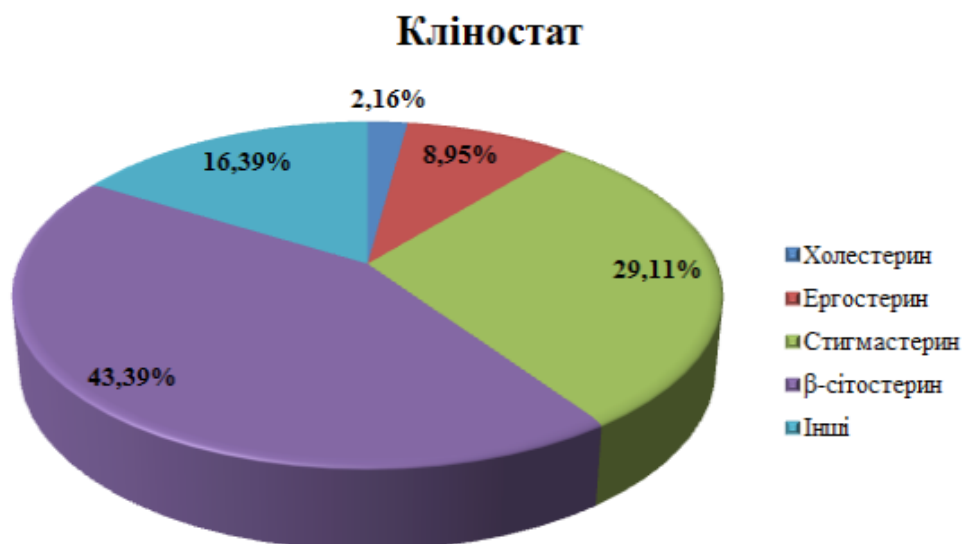


Рис. 7. Схема розподілу стеринів у фракції рафтів цитоплазматичної мембрани, ізольованої зі коренів проростків гороху, які росли в контролі та умовах кліностагування.

Основні відомості щодо структури, складу та можливих функцій ліпідних рафтів цитоплазматичної мембрани одержано в дослідженнях мембран клітин тварин і дріжджів. Пізніше опубліковано дані щодо наявності в цитоплазматичній мембрані рослинних клітин мікродоменів, збагачених на сфінголіпиди та холестерол і нерозчинних у неіонних детергентах подібно до ліпідних рафтів клітин савців (Simons, Ikonen, 1997; Peskan et al., 2000; Bhat, Panstruga, 2005; Morel et al., 2006; Grennan, 2007; Cullimore et al., 2007; Lingwood, Simons, 2010; Casas et al., 2012; Kraft, 2013).

Так, було встановлено наявність ліпідних рафтів, збагачених на сфінголіпід, ідентифікований як глікозилцерамід, суміш стигмастеролу, ситостеролу, 2, 4-метилхолестеролу та холестеролу, у цитоплазматичній мембрані, ізольованій із листків *Nicotiana tabacum* і культури клітин BY2. Фосфо- та глікогліцероліпіди виявлялися в ліпідних рафтах у невеликій кількості. Дані одно- та двомірного гель-електрофорезу, мас-спектрометрії та імуноблотингу чітко вказують на здатність мікродоменів цитоплазматичної мембрани табаку набирати специфічний набір мембранних білків та виключати інші.

Припускається роль рослинних рафтів як платформи для передачі сигналів (Mongrand et al., 2010).

За допомогою протеомного аналізу показано наявність специфічного набору білків, знайдених в інших ліпідних рафтах, а також наявність редокс системи навколо цитохрому  $B_{561}$  у рафтах, ізольованих із ЦМ коренів *Medicago truncatula* (Lefebvre et al., 2007).

Припускається можлива фізіологічна роль редокс системи у симбіотичній взаємодії бобових (Furt et al., 2007). Структурно рафти ідентифіковано як маленькі (10-12 нм) гетерогенні, високо динамічні домени, що збагачені на стероли та сфінголіпіди, полегшують передачу сигналів, контролюючи сегрегацію сигнальних молекул і транспорт мембранних білків. Невеличкі рафти можуть іноді формувати більші платформи через білок-білок та білок ліпід взаємодії ([Lefebvre et al., 2007](#); Furt et al., 2007).

Ідентифіковано стерол-залежні білки, асоційовані з рафтами та належні до системи сигналіngu мембранозв'язаної АБК, з клітин мезофілу *Arabidopsis thaliana*. Серед цих білків визначено протеїн фосфатазу (АБІ негативний регулятор сигналіngu АБК) та кальцій-залежну протеїн кінразу 21 (Demir et al., 2013). Показано, що глікопротеїн At-FLA 4 (фасцикліноподібний арабіногалактан білок 4), заякорений на мембранних ліпідах позитивно регулює біосинтез компонентів клітинної стінки та нормальний ріст кореня через АБК-залежний сигнальний шлях. Фасцикліни звичайно асоціюються із зовнішньою поверхнею ліпідних рафтів у ЦМ за допомогою глікозилфосфатидилінозитулу (Seifert et al., 2014).

Встановлено кореляцію між формуванням ліпідних рафтів і симпластним міжклітинним транспортом, який регулюється плазмодесмами. Динамічна проникненість плазмодесми контролюється калозою, що синтезується калозо-синтазами та деградується  $\beta$ -1,3 глюканазами. Припускається, що зміна складових ліпідних рафтів впливає на гомеостаз калози плазмодесм і, отже, впливає на функціонування плазмодесм (Iswanto, Kim, 2017).

Показано, що ліпідні рафти цитоплазматичної мембрани суспензійної культури *Rapulus trichocarpa* збагачені на білки, які є маркером передачі

сигналів молекулярного транспорту, біосинтезу калози і залучаються у відповідь на абіотичний та біотичний стрес. Каскад подій веде до виходу іонів кальцію на цитоплазматичний бік ЦМ, це необхідно для активації калозо-синтази, як кінцевої відповіді на стрес (Srivastava et al., , 2017). Дефіцит заліза (Fe) викликав зміну 68 білків ліпідних рафтів ЦМ *Beta vulgaris*, причому 50% відмінності було знайдено по білках сигналінгу та загального і везикулярного транспорту. Виявлено також зменшення похідних фосфатидної кислоти, що могло впливати на формування везикул у відповідності до внутрішньоклітинного транспорту та секреції (Gutierrez-Carbonell et al., 2016).

Результати біохімічного аналізу дають змогу краще зрозуміти спосіб взаємодії специфічних білків із стеролами та сфінголіпідами та глибше проникнути у склад і біологічну активність рафтів цитоплазматичної мембрани. Відповідно сучасним уявленням щодо латеральної гетерогенності ліпідного бішару, рафти мають важливе значення для зв'язку цитоплазматичної мембрани та цитоскелету (Nebl et al., 2002; Brown, 2006), залежність функціонування мембранних білків від ліпідного складу мембран, тобто асоціація із рафтами може бути вирішальним фактором, що визначає активність інтегральних мембранних білків, в тому числі іонних каналів (Edidin, 2003; Brown, 2006). Дуже цікавими є дані щодо ролі холестерину та ліпідних мікродоменів в регуляції механочутливих  $\text{Ca}^{2+}$  каналів, організації цитоскелету та сигнальних процесах. Виявлено, що ступінь впливу холестерину та рафтів на актиновий цитоскелет залежить від вихідного стану сітки мікрофіламентів. Холестирин-залежні перебудови цитоскелету визначаються балансом глобулярного та фібрилярного актину в клітині, що демонструє нову роль мембранного холестерину в регуляції іонних каналів і клітинної механотрансдукції. Сучасні дані щодо ролі холестерину та ліпідних мікродоменів у регуляції механочутливих іонних каналів і організації цитоскелету відкривають нові підходи до з'ясування біологічних ефектів мікрогравітації мікрогравітації, оскільки встановлено гравічутливість цитоплазматичної мембрани та зміни цитоскелету, проникності  $\text{Ca}^{2+}$  механочутливих каналів і балансу іонів кальцію в рослинних клітинах під впливом реальної та модельованої мікрогравітації.

Нагадаємо, що відповідно до гіпотези гравітаційної декомпенсації послідовність подій в клітинах, не спеціалізованих до сприйняття гравітаційного стимулу, в умовах мікрогравітації відбувається наступним чином: зміни у поверхневому натягу цитоплазматичної мембрани → зміни фізико-хімічних властивостей мембрани → зміни у проникненості мембрани, іонному транспорті, активності мембранозв'язаних ферментів → перебудови метаболізму → фізіологічні відповіді. Обговорюються можливі зміни у надходженні іонів кальцію в клітини та виходу з них в умовах мікрогравітації, а також участь  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнальної системи у дії мікрогравітації на цитоскелету, вуглеводного та ліпідного метаболізму, біогенезу клітинної оболонки через зміни активності ферментів та генної експресії. Припускається, що збільшення концентрації внутрішньоклітинного кальцію, зокрема, в корневих волосках *Lepidium sativum* та *Beta vulgaris* (Klymchuk et al., 2001) в умовах кліноостатування може відбуватися внаслідок активації механочутливих кальцієвих каналів, активність яких регулюється змінами фізичних властивостей мембран, зокрема поверхневого натягу. Активація механочутливих кальцієвих каналів під впливом кліноостатування безпосередньо була показана із застосуванням гадолінію, який блокує цей тип каналів. Додавання  $\text{Gd}^{3+}$  у зовнішнє середовище запобігало збільшенню концентрації кальцію в клітині.

В пошуках механізмів гравічутливості клітин значна увага приділяється цитоскелету, оскільки припускається, що цитоскелет виконує роль індикатора клітинних функцій, які визначають гравічутливість організмів (Kordyum, 2002, 2003; Kordyum et al., 2005; Kordyum, Shevchenko, 2007). Дослідження організації ендоплазматичних та кортикальних мікротрубочок за допомогою конфокальної мікроскопії в клітинах епідермісу і кори різних ростових зон коренів проростків *Brassica rapa* та *Arabidopsis thaliana* в стаціонарних умовах та при кліноостатуванні виявило зміни в організації кортикальних мікротрубочок в дистальній зоні розтягання коренів. На відміну від контролю, де кортикальні мікротрубочки розташовані паралельними рядами поперечно до довгої вісі кореня, при кліноостатуванні спостерігається поява коротки та



дезорієнтованих кортикальних мікротрубочок. Одночасно відбувається збільшення кортикальних актинових мікрофіламентів, що може відбуватися внаслідок трансформації G-актину в F-актин, що узгоджується із збільшенням відносного вмісту іонів кальцію в цих клітинах у порівнянні з контролем, оскільки добре відома роль іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у полімеризації актину. Припускається, що в умовах кліноштатування взаємна залежність функціонування актинових та тубулінових елементів цитоскелету більш чітко виявляється та забезпечує стабільність клітинного росту в несприятливих умовах (Калініна, 2006; Кордюм, Шевченко, 2003).

Підтверджено особливе значення для клітин з верхівковим типом росту кальцію: апікально-базальний градієнт іонів  $\text{Ca}^{2+}$  є основою біоелектричної полярності клітин (Хоркавців та ін., 2002) та може регулювати ріст клітин розтяганням, а кальцієвий баланс є посередником у передачі сигналу у статоцитах. Блокування роботи  $\text{Ca}^{2+}$ -каналів і  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз інгібувало полярний потік  $\text{Ca}^{2+}$  і гравітропний ріст, а для гравітропізму важливим є його активний полярний транспорт, що досягається роботою  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазної помпи. Показано базипетальне зростання активності  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази, що підтверджує, функціонування в апікальній клітині активного базипетального транспорту  $\text{Ca}^{2+}$ . Градієнт  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФази встановлювався не лише у довгих апікальних клітинах, а й у коротких клітинах бокових відгалужень. Це означає, що направлений потік кальцію відбувається постійно незалежно від довжини клітини чи органу, тобто кальцій не лише тригер, а і постійний регулятор функціональної активності клітини. Верапаміл і ортованадат натрію інгібували гравітропну реакцію і порушували зональний розподіл пластид.

Вважається, що іони  $\text{Ca}^{2+}$  необхідні для полярного росту клітин насамперед тому, що підтримують їх поляризацію, контролюючи активність цитоскелету. Показано, що актинові і тубулінові білки, а також іони  $\text{Ca}^{2+}$  спільно локалізуються у ростових зонах і місцях формування ростків. Імуноцитохімічним методом за допомогою конфокальної мікроскопії показано, що мікротрубочки орієнтувалися паралельно до осі росту довгих клітинних стінок, але не доходили до верхівки, локалізувалися в перинуклеарній зоні і

навколо пластид, мікрофіламентів концентрувалися в апексі клітини (Kalinina, Kordyum, 2006). Деполямеризація мікрофіламентів цитохалазином В повністю руйнувала верхівковий ріст (Demkiv et al., 2003).

## **Висновок**

Аналіз літературних і одержаних нами даних відкриває нові підходи до рішення фундаментальної проблеми біології, особливо космічної та гравітаційної біології – гравічутливості життєво важливих процесів функціонування клітин. Одержано нові докази, що асоціація із рафтами може бути вирішальним фактором у визначенні активності інтегральних білків, регуляції іонних каналів, в першу чергу механочутливих, зв'язку мембрани із цитоскелетом. Вперше проведене нами вивчення складу ліпідів і стеринів рафтів цитоплазматичної мембрани коренів проростків гороху показало, що вони за своєю структурою та складом відповідають характерним особливостям ліпід-білкових мікродоменів інших рослин і чутливі до дії модельованої мікрогравітації. Вперше встановлено підвищення рівня холестерину в рафтах гороху в умовах кліностакування, що відбувається на фоні нормальної мікров'язкості самої мембрани та призводить до збільшення жорсткості рафтів. Припускається, що встановлені нами раніше флуктуації у внутрішньоклітинному вмісті іонів кальцію та перебудови організації цитоскелету в умовах реальної та модельованої мікрогравітації обумовлені змінами рівня холестерину та вмісту сфінгомієліну у рафтах цитоплазматичної мембрани. Для вирішення поставлених питань плануються подальші дослідження рафтів із застосуванням методів флуоресцентної та конфокальної мікроскопії та хроматографії.

## **Література**

Bligh E.Y., Dyer W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* – 1959. – 37. – P. 911-917.

Cacas J.-L., Furt F., Le Guédard M. et al. Lipids of plant membrane rafts // *Progress in Lipid Research* – 2012. – 51. – P. 272–299.

- Demir F., Horntrich C., Blachutzik J.O. et al. Arabidopsis nanodomain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3 8296–8301// PNAS.–| 2013.–110.–P. 8297–8301.
- Demkiv O.T., Khorkavtsiv Ya.D., Pundiak O.I. Changes of protonemal cell growth related to cytoskeleton organization // Cell Biol. Intern. – 2003. – 27. –P. 187–189.
- Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers // Nat.Rev.Mol.Cell Biol. – 2003. – 4. – P. 414–418.
- Furt F., Lefebvre B., Cullimore J., Bessoule J.-J., Mongrand S. Plant lipid rafts. *Plant Signal Behav.*, 2 (6), 508–511(2007).
- Goldermann M., Hanke W. Ion channel are sensitive to gravity changes // Microgravity Sci. Technol. –2001.–13.– P. 35–38.
- Gutierrez-Carbonell E., Takahashi D., Lüthje S. et al. Shotgun proteomic approach reveals that Fe deficiency causes marked changes in the protein profiles of plasma membrane and detergent-resistant microdomain preparations from *Beta vulgaris* roots//J. Proteome Res.–2016.– 15.–P. 2510–2524.
- Iswanto A.B., Kim J.Y. Lipid raft, regulator of plasmodesmal callose homeostasis// Plants (Basel).–2017.– 6, 2. doi: 10.3390/plants6020015
- Калініна Я.М. Мікротрубочки в клітинах епідермісу та кори коренів *Brassica rapa* за умов кліностаування // Цитология и генетика. – 2006. – 40, № 5. – С.21 27.
- Kalinina Ia., Kordyum E. Clinorotation affects the microtubule organization in root epidermis and cortex cells in *Brassica rapa* seedlings // J. Gravit. Physiol. –2006. 13. – P. 109–110.
- Kittang A. -I., Iversen T. -H., Fossum K. R. et al. Exploration of plant growth and development using the European Modular ultivation System facility on the International Space Station // J. Plant Biology.– doi:10.1111/plb.12132.
- Klymchuk D.O., Brown C.S., Cytochemical localization of calcium in soybean root cap cells in microgravity // Adv. Space Res. – 2001. – 27. – P. 967–972.
- Kordyum E.L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytol.– 1997. – 171. –P. 1-78.
- Kordyum E.L. Gravisensitivity of plant cells: Experimental data and hypotheses //J. Gravit. Physiol. – 2002. – 9. – P. 219–220.
- Kordyum E.L., Calcium signaling in plant cells in altered gravity, *Adv. Space Res.*, Vol. 32, 621-630, 2003.
- Kordyum E.L. A role of the cytoskeleton in plant cell gravisensitivity and Ca<sup>2+</sup> signaling in microgravity // Cell. Biol. Intern. – 2003. – 27. – P. 219–221.
- Kordyum E.L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity// J. Plant Biology.–2014.–16, Suppl.1.–P. 79–90.

- Кордюм Е.Л., Шевченко Г.В. Роль цитоскелета в гравичувствительности растительной клетки: экспериментальные данные и гипотезы // Цитология и генетика. – 2003. – 37, № 2. – С. 56–68.
- Kordyum E.L., Shevchenko G.V. Plant cell gravisensitivity: results and prospects // Botany and mycology: modern horizons. – 2007, Kyiv. – P. 123-135.
- Kordyum E.L., Shevchenko G.V., Yemets A., Nyporko A., Blume Ya. Application of GFP-technology for cytoskeleton visualization on board the International Space Station // Acta Astronautica. – 2005. – 56. – P. 613-621.
- Kordyum E.L., Shevchenko G.V., Kalinina J.M., Demkiv O.T., Khorkavtsiv Y.D. The role of cytoskeleton in plant cell gravisensitivity. // The Plant Cytoskeleton: a Key Tool for Agro-Biotechnology / Eds.: Ya Blume, W.V. Baird, A.I. Yemets, D. Breviario. – Dordrech: Springer, 2008. – P. 173-198.
- Кордюм Є.Л., Недуха О.М., Грахов В.П., Воробйова Т.В., Клименко О.М., Жупанов І.В. Дослідження впливу модельованої мікрогравітації на біліпідний шар цитоплазматичної мембрани рослинних клітин // Космічна наука і технологія.–2015. – 21, № 3. — С. 40–47.
- Кордюм Є.Л., Клименко О.М., Булавін І.В., Жупанов І.В., Воробйова Т.В., Рюланд Е. Чутливість ліпідних рафтів рослинних клітин до впливу модульованої мікрогравітації (кліностатування). Косм. наука технол. 2018, 24 ;(4):51-60.
- Kraft M. L. Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts // Mol. Biol. Cell. – 2013. – 24. – P. 2765-2768.
- Larsson Ch., Sommarin M., Widell S. Isolated of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles // Methods in Enzymology. – 1994. – 228. – P. 451-469.
- Lefebvre B. Characterization of lipid fafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system / B. Lefebvre, F. Furt, M.-A. Hartmann, L. V. Michaelson, J.-P. Carde, F. Sargueil-Boiron et al. // Plant Physiol. – 2007. – 144, N 1. – P. 402–418.
- Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle // Science. – 2010. – 327. – P. 46–50.
- Mongrand S. Membrane rafts in plant cells // Trends Plant Sci. – 2010. – 15, N 12. – P. 656–663.
- Полулях Ю.А. Содержание фосфолипидов и жирных кислот в плазматической мембране клеток корней гороха при клиностаировании// Доклады АН УССР, сер. Биол.–1988.–10.–P. 67–69.
- Polulyakh Yu. A., Zhadko S.I., Klimchuk D.A. Plant cell plasma membrane structure and properties under clinostating // Adv. Space Res. – 1989. – 9. – P. 71-74.
- Seifert, G.J., Xue, H., and Acet, T. The Arabidopsis thaliana FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN PROTEIN 4 gene acts synergistically with abscisic acid signalling to control root growth// Ann Bot.–2014.–14.–P. 1125–1133.

Sieber, M., Hanke, W., Kohn F. P. M. Modification of membrane fluidity by gravity. Sieber M. Modification of membrane fluidity by gravity // Open J. Biophysics. – 2014.– 4.–P. 105–111.

Srivastava V., Malm E., Sundqvist G. et al. Quantitative proteomics reveals that plasma membrane microdomains from poplar cell suspension cultures are enriched in markers of signal transduction, molecular transport, and callose biosynthesis // Mol. Cell Proteomics.–2013.– 12.–P. 3874–3885 (2013).

Хоркавців О.Я., Демків О.Т., Хоркавців Я.Д. Участь кальцію у гравітропізмі протонеми моху *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. // Космічна наука і технологія. – 2002. – 8, № 1. – С. 17.

Wheeler R. M. Plants for human life support in space: from Myers to Mars // Gravit. Space Biol. – 2010. – 23. – P. 25–35.

## Статті

По матеріалах звіту опублікована стаття Кордюм Є.Л., Клименко О.М., Булавін І.В., Жупанов І.В., Воробйова Т.В., Рюланд Е. “Чутливість ліпідних рафтів рослинних клітин до впливу модульованої мікрогравітації (кліностатування)”. Косм. наука технол. 2018, 24 ;(4):51-60.

Прийнята до друку в журналі *Frontiers in Science* стаття “Clinorotation impacts the plasmalemma lipid bilayer and its functional domains – rafts in plant cells” Kordyum E., Bulavin I., Nedukha O., Vorobyova T.

## Тези

І.В. Булавін, Т.В. Воробйова, Є.Л. Кордюм. Ліпідні рафти рослинних клітин чутливі до впливу модельованої мікрогравітації (кліностатування). Тези доп. 18 Української конференції з космічних досліджень, 17–20 вересня, 2018, Київ, Україна. – С. 69.

Кордюм Є.Л., Чепмен Д.К. Рослини та мікрогравітація: нові знахідки та перспективи // 18-а українська конференція з космічних досліджень, 17-20 вересня 2018 р., Київ, с.74.

Nedukha O., Kordyum E., Vorobyova T., Grakhov V. Effect of simulated microgravity on plasma membrane of epicotyls and roots in plants // The International Society for Gravitational Physiology (ISGP) and the European Space Agency (ESA) Life Sciences Meeting, 18-22 June 2018, Noordwijk, the Netherlands, P. 305-306.

Nedukha O., Kordyum E., Vorobyova T. Lipid bilayer of the plasmalemma in pea seedling epicotyl cells is sensitive to simulated microgravity // 42nd COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July 2018, Pasadena, California, USA, Abstract id F1.1-0013-18, P. 1892.

Kordyum E., Bulavin I., Nedukha O., Vorobyova T. Clinorotation impacts the plasmalemma lipid bilayer and its functional domains – rafts in plant cells // The International Society for Gravitational Physiology (ISGP) and the European

Space Agency (ESA) Life Sciences Meeting, 18-22 June 2018, Noordwijk, the Netherlands, P. 254-255.

Kordyum E.L., Bulavin I., Vorobyova T. Simulated microgravity impacts the lipid rafts in plant cells// 42nd COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July 2018, Pasadena, California, USA, Abstract id, F2.4-0025-18, P. 1977.

**Виступили на конференціях:**

The International Society for Gravitational Physiology (ISGP) and the European Space Agency (ESA) Life Sciences Meeting, 18-22 June 2018, Noordwijk, the Netherlands

42nd COSPAR Scientific Assembly, 14-22 July, 2018, Pasadena, California, USA (42 наукова асамблея КОСПАР, 14-22 липня 2018 р., Пассадена, Каліфорнія США)

18-а Українська конференція з космічних досліджень, 17 – 20 вересня 2018, Київ, Україна.