

doi: <https://doi.org/10.15407/knit2018.04.051>

УДК 58.031:577.352.4:582.736.3

Є. Л. Кордюм¹, О. М. Клименко¹, І. В. Булавін¹, І. В. Жупанов¹, Т. В. Воробйова¹, Е. Рюланд²

¹ Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ, Україна

² Інститут екології та наук про навколишнє середовище, Університет Парижа Ест-Кретеї, Париж, Франція

ЛІПІДНІ РАФТИ РОСЛИННИХ КЛІТИН ЧУТЛИВІ ДО ВПЛИВУ МОДУЛЬОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ (КЛИНОСТАТУВАННЯ)

Рослини як джерело кисню та їжі для космонавтів визнані ключовим компонентом біорегенеративних систем життєзабезпечення. Біологічні мембрани, насамперед цитоплазматична мембрана (ЦМ), за своїми якостями та функціями можуть відігравати важливу роль в адаптації рослин до мікрогравітації. Доведено наявність в ЦМ функціональних доменів, які отримали назву «ліпідних рафтів». Припускається, що рафти модулюють білкові взаємодії і таким чином включаються у численні життєво важливі клітинні процеси. Дослідження ліпідних рафтів допомагають пояснити біохімічні процеси, що відбуваються в клітинних мембранах у нормі та відповідях на стрес. Наша стаття торкається проблеми пізнання ступеня гравічутливості основних клітинних процесів та адаптивного потенціалу рослин до умов мікрогравітації, що конче потрібно для розробки технологій космічного рослинництва у біорегенеративних системах життєзабезпечення. Мета полягає у з'ясуванні ступеня гравічутливості ліпідних рафтів рослинних клітин за такими ознаками, як склад і вміст насичених і ненасичених жирних кислот і стеринів. Матеріали й методи дослідження стосувалися проростків гороху *Pisum sativum* L. сорту Берсек, який вирощували протягом 6 діб у контролі та при дії повільного горизонтального клиностатування. На сьому добу від проростків відрізали корені, виділяли з них фракцію ЦМ, із якої отримували фракцію рафтів із використанням центрифуги «Optima L-90K». Фракцію рафтів досліджували методами електронної мікроскопії за допомогою електронного мікроскопа JEM 1230 (JEOL, Японія) і газової хроматографії на апараті HRGC 5300 («Carlo Erba Instruments», Італія). Показано, що рафти мають вигляд тонких стрічок довжиною від 80 до 100 нм та шириною від 6 до 13 нм. В умовах клиностатування якісний склад основних жирних кислот у фракції рафтів не змінювався, відмінності спостерігалися у їхньому відсотковому вмісті. В умовах модельованої мікрогравітації у фракції рафтів, як і у стаціонарному контролі, переважали насичені жирні кислоти, вміст яких збільшувався, особливо пальмітинової кислоти, відповідно зменшувався відсоток ненасичених жирних кислот, особливо арахідонової кислоти. Відмічено зменшення моноенових ненасичених жирних кислот порівняно із контролем, серед полієнових жирних кислот найбільший відсоток складали тетраєнові жирні кислоти. В умовах клиностатування відсоток холестерину у фракції рафтів збільшувався у сім разів порівняно із контролем. Вперше встановлено значне збільшення холестерину та підвищення вмісту насичених жирних кислот у ліпідних рафтах під впливом клиностатування, що може вказувати на підвищення жорсткості рафтів і, отже, на зміни проникності ЦМ, селективності та активності відповідних білків. Підвищення жорсткості рафтів відбувається на фоні підтримання мікрор'язкості самої мембрани на нормальному рівні. Пропонується посилити увагу до вивчення ролі ліпідних рафтів у гравічутливості рослинних клітин.

Ключові слова: *Pisum sativum*, цитоплазматична мембрана, рафти, жирні кислоти, стерини, клиностатування.

ВСТУП

Здатність однорічних рослин проходити весь життєвий цикл, від насіння до насіння, в умовах космічного польоту надає можливості досліджувати вплив мікрогравітації на ріст та розвиток

рослин на клітинному та молекулярному рівнях [19, 21]. Такі фундаментальні дослідження, метою яких є пізнання ступеня гравічутливості основних клітинних процесів та адаптивного потенціалу рослин до умов мікрогравітації, що конче потрібно для розробки технологій космічного рослинництва у біорегенеративних системах життєзабезпечення та прогнозу надійності

© Є. Л. КОРДЮМ, О. М. КЛИМЕНКО, І. В. БУЛАВІН,
І. В. ЖУПАНОВ, Т. В. ВОРОБЙОВА, Е. РЮЛАНД, 2018

їхнього функціонування. Рослини як джерело кисню та їжі для космонавтів визнано ключовим компонентом біорегеративних систем життєзабезпечення [12, 37].

Завдяки удосконаленню методик досліджень генної експресії та складу білків сьогодні велика увага приділяється саме з'ясуванню реакції рослин на дію мікрогравітації на транскрипційному та трансляційному рівнях. Вагомим результатом цих досліджень стало відкриття органо- та тканинспецифічності змін генної експресії у відповідь на дію мікрогравітації [29]. Менше уваги приділяється дослідженням фізико-хімічних властивостей біологічних мембран, зокрема цитоплазматичної мембрани (ЦМ), хоча за своїми якостями та функціями вони можуть відігравати важливу роль в адаптації рослин до мікрогравітації. Так, ЦМ розглядається як одна із найбільш динамічних надмолекулярних структур у клітині, яка є проміжною ланкою між цитоплазмою та позаклітинним середовищем і залучається у численні процеси, такі як транспорт метаболітів та іонів, ендоцитоз, проліферація та диференціювання клітин, захист від патогенів [10, 11, 34].

Експериментально показано гравічутливість ЦМ: зміни вмісту фосfolіпідів, жирних кислот і стеаринів [1, 2], доведено безпосередній вплив гравітації на іонні канали, текучість (мікрор'язкість) як штучних ліпідних мембран, так і клітинних мембран [15, 32], що, як припускається, може пояснити деякі біологічні ефекти гравітації. Запропоновано гіпотезу гравітаційної декомпенсації, згідно із якою зміни поверхневого натягу мембрани в умовах мікрогравітації можуть грати роль індуктора, вплив якого посилюється завдяки гетерогенності мембрани по її довжині [20].

В останні десятиріччя ЦМ вже не розглядається як гомогенний бішар, що складається із ліпідів і білків, занурених у ліпідний бішар, або менш щільно, зворотно або незворотно зв'язаних з поверхнею мембрани. Доведено наявність у клітинах функціональних мембранних доменів із специфічною локалізацією та складом ліпідів і білків, особливо в ЦМ, які отримали назву «ліпідних рафтів». Припускається, що рафти, збагачені на холестерин та сфінголіпіди, модулюють біл-

кові взаємодії і таким чином включаються в численні життєво важливі клітинні процеси, такі як передача сигналів, мембранний транспорт, стан стосунків хазяїн — патоген [5—7, 14, 22]. Дослідження ліпідних рафтів допомагають пояснити біохімічні процеси, що відбуваються у клітинних мембранах у нормі та відповідях на стрес, відносно їхньої специфічності, селективності та швидкості, які не можна пояснити за допомогою інших моделей [14].

Тому мета наших досліджень — з'ясувати ступінь гравічутливості ліпідних рафтів рослинних клітин за такими ознаками, як склад і вміст насичених і ненасичених жирних кислот і стеринів.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Проростки гороху *Pisum sativum* L. сорту Берсек вирощували протягом шести діб у контролі та в умовах кліноостатування. На сьому добу від проростків відрізали кореневу частину та виділяли з неї фракцію плазматичної мембрани за методом Ларсона [23]. Фракцію плазмалеми отримували методом двофазної водно-полімерної системи із використанням центрифуги «Optima L-90K». Фракцію рафтів отримували із фракції плазматичної мембрани. Для цього використовували ізопікнічне центрифугування, в основі якого лежить розділення часток в залежності від їхньої плавучої щільності. Фракцію плазматичної мембрани ресуспендували, додавали 1 % «Тритон X-100» та витримували 30 хв при температурі 4 °C. В пробірці для центрифугування заливали градієнт сахарози 5-30-35-52 %. Суміш плазматичної мембрани та «Тритону X-100» наносили в градієнт сахарози в шар з 52 % сахарози. Отриману систему центрифугували при 110 000g протягом 16 год. Після центрифугування піпеткою Пастера відбирали фракцію рафтів, яка у вигляді слабко опалесцюючого кільця перебувала в 35 % шарі градієнта. Отриману фракцію знов центрифугували зі швидкістю 28 000 обертів протягом 1 год [1].

Контроль отриманої фракції проводили за допомогою електронної мікроскопії. Фракцію рафтів фіксували в 2.5 % глютаровому альдегіді на 0.1 М кокодилатному буфері (pH 7.2), по-

стфіксували 1 % OsO_4 та заливали в агарові блоки. Агарові блоки зневоднювали в серії спиртів висхідної концентрації та заливали у суміш епоксидних смол [8]. Ультратонкі зрізи, отримані за допомогою ультрамикротому MT-XL («RMR Instruments», США), контрастували ураніл ацетатом та цитратом свинцю та вивчали за допомогою електронного мікроскопа JEM 1230 («Jeol», Японія).

Для визначення складу ліпідів у рафтах ліпідний екстракт готували методом Bligh та Dyer [4]. Для екстракції ліпіди розводили бензолом, переносили в ампулу, додавали 1.5 мл 3М HCl у метанолі (110 мл охолодженого метанолу та 21.5 мл ацетохлориду). Ампулу запаювали та кип'ятили на водяній бані 1 год. Вміст ампули розріджували водою, екстрагували гексаном. Гексан випаровували та отримували метильовані ефіри жирних кислот (МЕЖК), які наносили на пластинки «Sorbfil» для очищення. Як розчинник використовували бензол. Очищені МЕЖК розчиняли у 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» при програмованій температурі 140...250 °C зі зростанням на 2°/хв. Ідентифікацію окремих жирних кислот провадили за допомогою стандартів фірми «Sigma». Вміст індивідуальних жирних кислот виражали у відсотках від загальної суми жирних кислот. Усі жирні кислоти в залежності від ступеня їхньої насиченості розділяли на групи: насичені (Н) — подвійні зв'язки відсутні, ненасичені: моноєнові (М) — один подвійний зв'язок, дієнові (Д) — два подвійних зв'язки, триєнові (Тр) — три подвійних зв'язки. Коефіцієнт ненасиченості K жирних кислот визначали як відношення суми Σ ненасичених ЖК / до суми Σ насичених ЖК. Індекс подвійного зв'язку (ІПЗ), що характеризує ступінь ненасиченості ліпідів, розраховували за формулою

$$\text{ІПЗ} = (\text{М} + 2 \times \text{Д} + 3 \times \text{Тр} + 4 \times \text{Тетр}) / 100,$$

де М — моноєнові, Д — дієнові, Тр — триєнові, Тетр — тетраєнові кислоти, % від суми жирних кислот.

Якісний склад стеринів фракції рафтів визначали після отримання ліпідів методом [4] на скляній колонці 0.5 м, яку було заповнено «Chromosorb W/HP» з нанесеною фазою 3 % OV-1 при програмованій постійній температурі 250 °C з використанням стандартів до холестерину, ергостеролу, стигмастерину та β -сітостерину фірми Sigma методом газової хроматографії на апараті HRGC 5300 («Carlo Erba Instruments», Італія).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Методом електронної трансмісійної мікроскопії показано, що рафти, виділені з мікросомальної фракції, збагаченої везикулами цитоплазматичної мембрани, отриманої з коренів шести добових проростків гороху, мають вигляд відносно тонких стрічок довжиною від 80 до 100 нм та шириною від 6 до 13 нм (рис. 1).

Аналіз хроматограм рафтів дозволив розділити жирні кислоти на групи, в залежності від ступеня їхньої ненасиченості: насичені, моноєнові, дієнові, триєнові, тетраєнові, та розрахувати індекс подвійного зв'язку (ІПЗ), який характеризує ступінь ненасиченості ліпідів і коефіцієнт ненасиченості K . Вміст основних жирних кислот фосfolіпідів представлено на рис. 2.

В контролі, у фракції рафтів, серед основних жирних кислот, вміст яких становив більше ніж 1 %, виявлено насичені: пальмітинову, стеаринову та арахінову; моноєнові — олеїнову; дієнові — лінолеву; триєнові — ліноленову; тетраєнові — арахідонову. Серед інших жирних кислот кількість насичених — 3.85 %, моноєнових — 3.77 %; дієнових — 0.25 %, триєнових — 0.21 %, тетраєнових — 1.74 %. Вміст не ідентифікованих жирних кислот дорівнював 0.34 %.

За умов кліноостаткування якісний склад основних жирних кислот у фракції рафтів не змінювався, відмінності спостерігалися у їхньому відсотковому вмісті. Встановлено зменшення вмісту лінолевої кислоти в 2.12 раза та збільшення арахідонової в 3.97 раза порівняно з контролем. Серед інших — встановлено незначне збільшення вмісту насичених — 4.03 % і дієнових — 0.28 % жирних кислот, та зменшення моноєнових — 2.61 %, триєнових — 0.18 % і тетраєнових — 0.54 %

жирних кислот. Вміст не ідентифікованих жирних кислот дорівнював 0.19 %.

Загалом встановлено, що в стаціонарних умовах у фракції рафтів переважали насичені жирні кислоти, відсоток яких становив 64.5 % з переважанням пальмітинової кислоти, відсоток ненасичених жирних кислот становив 35.5 % з переважанням лінолевої кислоти (табл. 1). Відсоток моноєнових ненасичених жирних кислот становив 6.54 %. Серед полієнових жирних кислот переважали дієнові.

За дії модельованої мікрогравітації у фракції рафтів також переважали насичені жирні кислоти та дещо збільшувався їхній вміст — 66.67 % з переважанням пальмітинової кислоти, відповідно зменшувався відсоток ненасичених жирних кислот — 33.33 % з переважанням арахідонової кислоти (табл. 1). В умовах клиностакування відмічено зменшення моноєнових ненасичених жирних кислот — 5.16 % порівняно із контролем, тоді як серед полієнових жирних кислот найбільший відсоток складають тетраєнові жирні кислоти.

Серед стеролів за умов клиностакування відсоток холестерину у фракції рафтів збільшувався у сім разів порівняно із контролем. Вміст інших стеролів майже не змінювався (табл. 2).

Основні відомості щодо структури, складу та можливих функцій ліпідних рафтів ЦМ одержано в дослідженнях мембран клітин тварин і дріжджів. Пізніше опубліковано дані щодо наявності в ЦМ рослинних клітин мікродоменив, збагачених на сфінголіпіди та холестерол і нерозчинних у неіонних детергентах, подібно до ліпідних рафтів клітин савців [3, 5, 7, 14, 16, 22, 25, 28, 30, 33].

Так, було встановлено наявність ліпідних рафтів, збагачених на сфінголіпід, ідентифікований як глікозилцерамід, суміш стигмастеролу, сітостеролу, 2, 4-метилхолестеролу та холестеролу у ЦМ, виділений 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 мікродоменив ЦМ тютюну набирати специфічний набір мембранних білків та виключати інші [26]. Припуска-

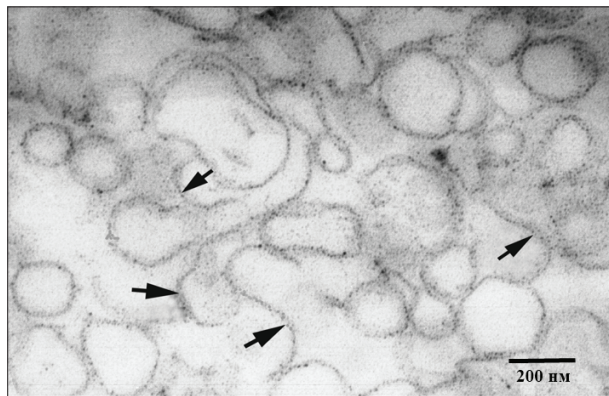


Рис. 1. Рафти, отримані з коренів 6-добових проростків гороху (електронна трансмісійна мікроскопія). Стрілочки вказують на рафти

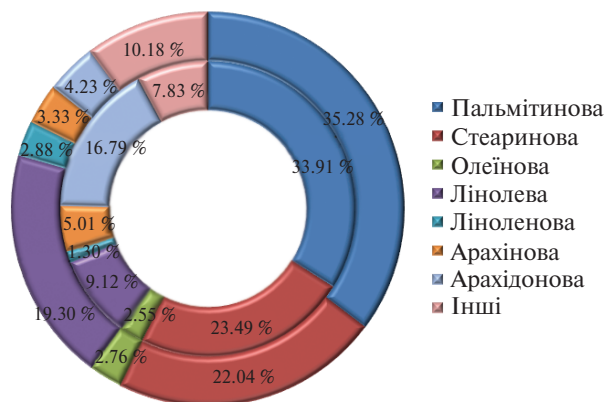


Рис. 2. Основні жирні кислоти фракції рафтів. Зовнішній шар — у контролі, внутрішній — після клиностакування

ється роль рослинних рафтів як платформи для передачі сигналів [27].

За допомогою протеомного аналізу виявлено 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* [14, 24].

Припускається можлива фізіологічна роль редокс системи у симбіотичній взаємодії бобових [14]. Структурно рафти ідентифіковано як маленькі (10...12 нм) гетерогенні, високо динамічні домени, 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 [14, 24].

Показано, що OsRac1, що є членом родини Rac/Rop ГТФаз і відіграє важливу роль як молекулярний перемикач у вродженому імунітеті *Oryza sativa*, може бути асоційований із рафтами ЦМ, виділених із клітин суспензійної культури рису [13].

Таблиця 1. Склад жирних кислот фракції рафтів, %

Жирні кислоти	Контроль, %	Клиноостатування, %
<i>Насичені</i>		
Лінолева	19.3	0.21
Бегенова	1.67	1.55
Міристинова	0.86	0.78
Маргарінова	0.48	0.3
Лауролейнова	0.28	0.12
Генейкозанова	0.14	0.24
Лаурінова	0.13	0.25
Ізопальмітинова	0.07	0.24
Пеларгонова	0.06	0.07
Пентадеканова	0.06	0.1
Ізостеаринова	0.06	0.07
Тридеканова	0.04	—
Ізолаурінова		0.8
<i>Ненасичені моноєнові</i>		
Пальмітинова	35.28	33.91
Нервонова	2.45	1.4
Пентадеценова	0.37	0.41
Гептадеценова	0.13	0.18
Міристоолеїнова	0.11	—
Ерукова	—	0.34
Пальмітолеїнова	—	0.29
<i>Ненасичені дієнові</i>		
Гексадекадієнова	0.24	0.24
Докозадієнова	—	0.04
<i>Ненасичені триєнові</i>		
Докозатриєнова	0.21	0.06
<i>Ненасичені тетраєнові</i>		
Докозатетраєнова	1.74	0.54
<i>Не ідентифіковані</i>		
	0.22	0.11
	0.08	0.07
	0.05	—
Індекс подвійного зв'язку	0.78	0.98
Коефіцієнт ненасиченості K	0.55	0.5

Ідентифіковано стеролзалежні білки, асоційовані з рафтами та належні до системи сигналіну мембранозв'язаної АБК, з клітин мезофілу *Arabidopsis thaliana*. Серед цих білків визначено протеїн фосфатазу (АБІ негативний регулятор сигналіну АБК) та кальційзалежну протеїн кінразу 21 [9]. Глікопротеїн At-FLA 4 (фасцикліно-подібний арабіногалактан білок 4), закорений 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 глікозилфосфатидилінозиту [31].

Дефіцит заліза (Fe) викликав зміну 68 білків ліпідних рафтів ЦМ *Beta vulgaris*, причому 50 % відмінності було знайдено по білках сигналіну та загального і везикулярного транспорту. Виявлено також зменшення похідних фосфатидної кислоти, що могло впливати на формування везикул у відповідності до внутрішньоклітинного транспорту та секреції [17].

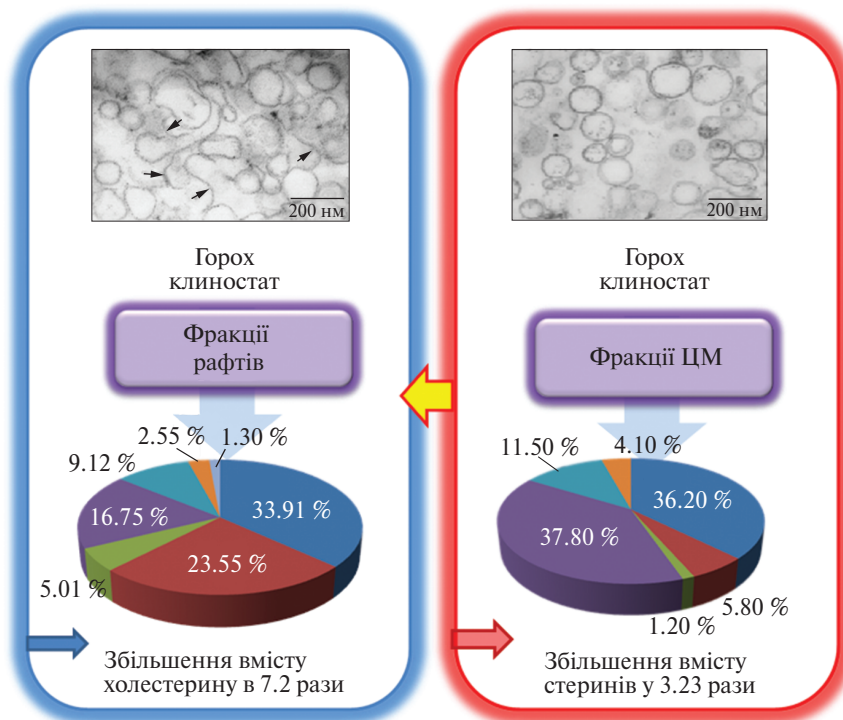
Ліпідні рафти ЦМ суспензійної культури *Rapulus trichocarpa* збагачені на білки, які є маркером передачі сигналів молекулярного транспорту, біосинтезу калози і залучаються у відповідь на абіотичний та біотичний стрес. Каскад подій веде до виходу іонів кальцію на цитоплазматичний бік ЦМ, це необхідно для активації калозо-синтази, як кінцевої відповіді на стрес [35].

Встановлено кореляцію між формуванням ліпідних рафтів і симпластним міжклітинним транспортом, який регулюється плазмодесмами. Динамічна проникненість плазмодесми контролюється калозою, що синтезується калозо-синтазами та деградується β -1,3 глюканазами. Припускається

Таблиця 2. Вміст стеринів у фракції рафтів коренів проростків гороху в контролі та при клиноостатуванні

Стерини	Контроль, %	Клиноостатування, %
Холестерин	0.30	2.16
Ергостерин	9.65	8.95
Стигмастерин	30.59	29.11
β -сітостерин	45.07	43.39
Інші (не ідентифіковані)	14.39	16.39

Рис. 3. Кількість основних жирних кислот з вмістом понад 1% для фракції рафтів та ЦМ за умов клиностатування. Для фракції рафтів насичені жирні кислоти: 33.91 % — пальмітинова, 23.49 % — стеаринова, 5.01 % — арахідова; ненасичені жирні кислоти: 16.79 % — арахідонова, 9.12 % — лінолева, 2.55 % — олеїнова, 1.3 % — ліноленова. Для фракції ЦМ вміст насичених жирних кислот: 32.6 % — пальмітинова, 5.8 % — стеаринова, 1.2 % — міристинова; ненасичені жирні кислоти: 37.80 % — лінолева, 11.50 % — олеїнова, 4.10 % — ліноленова



ся, що зміна складових ліпідних рафтів впливає на гомеостаз калози плазмодесм і, отже, впливає на функціонування плазмодесм [18].

Більшість білків ліпідних рафтів ЦМ однодольних рослин *Avena sativa* та *Secale cereale* були спільними із такими у дводольних рослин *A. thaliana* та *N. tabacum*, що припускає загальні функції білків, асоційованих із рафтами. В той же час рафти вівса та жита містили деякі різні білки. Розподіл певних білків у рафтах є унікальним, що разом із їхніми фізико-хімічними властивостями визначає функції цих специфічних доменів ЦМ в різноманітних фізіологічних процесах у рослинних клітинах [36]. Аналіз наведених літературних даних свідчить про важливу роль рафтів ЦМ у функціонуванні рослинних клітин.

Рафти, вперше виділені нами із коренів 6-добових проростків гороху, які росли у стаціонарних умовах і умовах клиностатування, за структурою та розмірами були подібні до таких ЦМ інших рослин, зокрема *M. trunculata*, і також збагачені на стерини, особливо холестерин, і насичені жирні кислоти. За умов клиностатування у

рафтах значно збільшувався вміст арахідонової кислоти та зменшувався вміст ліноленової. Порівняння вмісту жирних кислот і стеринів у ЦМ коренів 6-добових проростків гороху [1] та виділених з неї фракції рафтів в контролі показало, що фракція ЦМ та фракція рафтів відрізняються між собою як за якісним, так і кількісним складом жирних кислот і стеринів. На відміну від ЦМ у фракції рафтів, як ми вже відмічали, переважали насичені жирні кислоти, та збільшувався вміст стеринів, що є характерним для ліпід-білкових доменів ЦМ і тонопласта рослинних клітин.

Раніше повідомлялося про певні зміни жирнокислотного складу фракції ЦМ, виділеної також із коренів 6-добових проростків гороху, під впливом клиностатування [1, 2]. На шосту добу клиностатування мікрів'язкість ЦМ перебувала на стаціонарному рівні, що, як припускається, обумовлюється новим балансом, який встановлюється між збільшенням або зменшенням ненасичених і насичених жирних кислот в цих умовах і підтримує текучість (мікрів'язкість) ЦМ. Порівняння даних щодо жирнокислотного

складу біліпідного шару ЦМ та виділеної із неї фракції рафтів в умовах клиностатування показало значне підвищення у мікродоменах вмісту насичених жирних кислот порівняно із ЦМ (рис. 3) та холестерину, що свідчить про посилення їхньої щільності. Цікаво, що підвищення жорсткості рафтів в умовах клиностатування відбувається на фоні підтримання мікрров'язкості самої мембрани на нормальному рівні. Оскільки рафти також містять білкові комплекси, необхідні для сприйняття та передачі зовнішніх сигналів, захисту від стресів, везикулярного транспорту [25], значне збільшення стеринів під впливом клиностатування може вказувати на зміни проникності мембрани та селективності та активності відповідних білків.

З огляду на отримані дані пропонується посилити увагу до вивчення ролі рослинних ліпідних рафтів у гравічутливості клітини, оскільки рафти контролюють численні важливі клітинні процеси.

ЛІТЕРАТУРА

1. Кордюм Є. Л., Недуха О. М., Грахов В. П., Мельник А. К., 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.
2. Полулях Ю. А. Содержание фосфолипидов и жирных кислот в плазматической мембране клеток корней гороха при клиностатировании // Докл. АН УССР. Сер. Биол. — 1988. — 10. — С. 67—69.
3. Bhat R., Panstruga R. A. Lipid rafts in plants // *Planta*. — 2005. — 223. — P. 5—1.
4. Bligh E. Y., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification // *Can. J. Biochem. Physiol.* — 1959. — 37. — P. 911—917.
5. Borner G. H. H., Sherrier D. J., Weimar T., Michaelson L. V., Hawkins N. D., Macaskill A., et al. Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts // *Plant Physiol.* — 2005. — 137. — P. 104—116.
6. Brown D. A., London E. Functions of lipid rafts in biological membranes // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* — 1998. — 14. — P. 111—136.
7. Cacas J.-L., Furt F., Le Guédard M., Schmitter J. M., Buré C., Gerbeau-Pissot P. Lipids of plant membrane rafts // *Progress in Lipid Res.* — 2012. — 51. — P. 272—299.
8. Carde J.-P. Electron microscopy of plant cell membranes // *Methods Enzymol.* / Eds L. Packer, R. Douce. — USA: Acad. Press Inc., 1987. — 148. — P. 599—622.
9. Demir F., Horntrich C., Blachutzik J. O., Scherzer S., Rein- ders Y., Kierszniowska S., et al. *Arabidopsis* nanodomain- delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 2013. — 110, N 20. — P. 8296—8301.
10. Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell- membrane bilayers // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2003. — 4. — P. 414—418.
11. Engelman D. M. Membranes are more mosaic than fluid // *Nature* — 2005. — 438. — P. 578—580.
12. Ferl E. J., Wheeler R. M., Levine H. G., Paul A. L. Plants in space // *Curr. Opin. Plant Biol.* — 2002. — 5. — P. 259—263.
13. Fujiwara M., Hamada S., Hiratsuka M., Fukao Y., Kawasa- ki T., Shimamoto K. Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice // *Plant Cell Physiol.* — 2009. — 50. — P. 1191—1200.
14. Furt F., Lefebvre B., Cullimore J., Bessoule J.-J., Mongrand S. Plant lipid rafts // *Plant Signal Behav.* — 2007. — 2, N 6. — P. 508—511.
15. Goldermann M., Hanke W. Ion channel are sensitive to gravity changes // *Microgravity Sci. Technol.* — 2001. — 13. — P. 35—38.
16. Grennan A. K. Lipid rafts in plants // *Plant Physiol.* — 2007. — 143, N 3. — P. 1083—1085.
17. Gutierrez-Carbonell E., Takahashi D., Lüthje S., González- Reyes J. A., Mongrand S., Contreras-Moreira B., 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, N 8. — P. 2510—2524.
18. Iswanto A. B., Kim J. Y. Lipid raft, regulator of plasmodes- mal callose homeostasis // *Plants (Basel)*. — 2017. — 6, N 2. — 15. — doi: 10.3390/plants6020015.
19. Kittang A.-I., Iversen T. H., Fossum K. R., Mazars C., Carnero- Diaz E., Boucheron-Dubuisson E., et al. Exploration of plant growth and development using the European Modular cultivation System facility on the International Space Station // *J. Plant Biology*. — 2014. — 16, N 3. — P. 528—538.
20. Kordyum E. L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // *Int. Rev. Cytol.* — 1997. — 171. — P. 1—78.
21. Kordyum E. L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity // *J. Plant Biology*. — 2014. — 16, Suppl. 1. — P. 79—90.
22. Kraft M. L. Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts // *Mol. Biol. Cell*. — 2013. — 24, N 18. — 2765—2768.
23. Larsson Ch., Sommarin M., Widell S. Isolated of highly purified plant plasma membranes and separation of in- side-out and right-side-out vesicles // *Methods in Enzy- mology*. — 1994. — 228. — P. 451—469.
24. Lefebvre B., Furt F., Hartmann M.-A., Michaelson L. V., Carde J.-P., Sargueil-Boiron F., et al. Characterization of

- lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system // *Plant Physiol.* — 2007. — **144**, N 1. — P. 402–418.
25. Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle // *Science.* — 2010. — **327**, N 5961. — P. 46–50.
 26. Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde, J. P. Hartmann M. A., et al. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane // *J. Biol. Chem.* — 2004. — **279**. — P. 36277–36286.
 27. Mongrand S., Stanislas T., Bayer E. M., Lherminier J., Simon-Plas F. Membrane rafts in plant cells // *Trends Plant Sci.* — 2010. — **15**, N 12. — P. 656–663.
 28. Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J.-J., et al. Proteomics of plant detergent-resistant membranes // *Mol. Cell. Proteomics.* — 2006. — **5**. — P. 1396–1411.
 29. Paul A. L., Zupanska A. K., Schultz E., Ferl R. J. Organ-specific remodeling of the *Arabidopsis* transcriptome in response to spaceflight BMC // *Plant Biol.* — 2013. — **13**. — P. 112–122.
 30. Peskan T., Westermann M., Oelmulle R. Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants // *Eur. J. Biochem.* — 2000. — **267**. — P. 6989–6995.
 31. Seifert G. J., Xue H., Acet T. The *Arabidopsis thaliana* fasciclin like arabinogalactan protein 4 gene acts synergistically with abscisic acid signalling to control root growth // *Ann. Bot.* — 2014. — **114**, N 6. — P. 1125–1133.
 32. Sieber M., Hanke W., Kohn F. P. M. Modification of membrane fluidity by gravity // *Open J. Biophysics.* — 2014. — **4**. — P. 105–111.
 33. Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes // *Nature.* — 1997. — **387**. — P. 569–572.
 34. Sprenger R. R., Jensen O. N. Proteomics and the dynamic plasma membrane: quo vadis? // *Proteomics.* — 2010. — **10**. — P. 3997–4011.
 35. Srivastava V., Malm E., Sundqvist G., Bulone V. 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**, N 12. — P. 3874–3885.
 36. Takahashi D., Kawamura Y., Yamashita T., Uemura M. Detergent-resistant plasma membrane proteome in oat and rye: similarities and dissimilarities between two monocotyledonous plants // *J. Proteome Res.* — 2012. — **11**, N 3. — P. 1654–1665.
 37. Wheeler R. M. Plants for human life support in space: from Myers to Mars // *Gravit. Space Biol.* — 2010. — **23**. — P. 25–35.
- ## REFERENCES
1. Kordyum T. L., Nedukha, O. M. Grakhov, V. P., Mel'nik A. K., Vorobyova T. M., Klimenko O. M., Zhupanov I. V. Doslidzhennya vplyvu modelovanoyi mikrogravitatsiyi na bilipidniy shar tsitoplazmatichnoyi membrani roslinnih klitin [Study of the influence of simulated microgravity on the cytoplasmic membrane lipid bilayer of plant cells]. Kosmichna nauka i tehnologiya — *Space Science and Technology*, **21** (3), 40–47 (2015) [in Ukrainian].
 2. Polulyakh Yu. A. Soderzhanie fosfolipidov i zhirnyih kislot v plazmaticheskoy membrane kletok korney goroha pri klinostatirovanii [Phospholipid and fatty acid content in the plasma membrane of pea root cells under clinorotation]. *Doklady AN USSR ser. Biol.— Reports of the Academy of Sciences of the USSR, Section Biol.*, **10**, 67–69 (1988).
 3. Bhat R. A., Panstruga R. Lipid rafts in plants. *Planta*, **223**, 5–1 (2005).
 4. Bligh E. Y., Dyer W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911–917 (1959).
 5. Borner G. H. H., Sherrier D. J., Weimar T., Michaelson L. V., Hawkins N. D., Macaskill A., et al. Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. *Plant Physiol.*, **137**, 104–116 (2005).
 6. Brown D. A., London E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**, 111–136 (1998).
 7. Cacas J.-L., Furt F., Le Gu dard M., Schmitter J.M., Buré C., Gerbeau-Pissot P. Lipids of plant membrane rafts. *Progress in Lipid Research*, **51**, 272–299 (2012).
 8. Carde J.-P. Electron microscopy of plant cell membranes. *Methods Enzymol.* L. Packer R. Douce (Ed.). — USA: Academic Press Inc., **148**, 599–622 (1987).
 9. Demir F., Horntrich C., Blachutzik J. O., Scherzer S., Reinders Y., Kierszniowska S., et al. *Arabidopsis* nano-domain-delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110** (20), 8296–8301 (2013).
 10. Edidin M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **4**, 414–418 (2003).
 11. Engelman D. M. Membranes are more mosaic than fluid. *Nature*, **438**, 578–580 (2005).
 12. Ferl E. J., Wheeler R. M., Levine H. G., Paul A. L. Plants in space. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 259–263 (2002).
 13. Fujiwara M., Hamada S., Hiratsuka M., Fukao Y., Kawasaki T., Shimamoto K. Proteome analysis of detergent-resistant membranes (DRMs) associated with OsRac1-mediated innate immunity in rice. *Plant Cell Physiol.*, **50**, 1191–1200 (2009).
 14. Furt F., Lefebvre B., Cullimore J., Bessoule J.-J., Mongrand S. Plant lipid rafts. *Plant Signal Behav.*, **2** (6), 508–511 (2007).

Стаття надійшла до редакції 04.01.18

15. Goldermann M., Hanke W. Ion channel are sensitive to gravity changes. *Microgravity Sci. Technol.*, **13**, 35–38 (2001).
16. Grennan A. K. Lipid rafts in plants. *Plant Physiol.*, **143** (3), 1083–1085 (2007).
17. Gutierrez-Carbonell E., Takahashi D., Lüthje S., González-Reyes J. A., Mongrand S., Contreras-Moreira B., 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.*, **15** (8), 2510–2524 (2016).
18. Iswanto A. B., Kim J. Y. Lipid raft, regulator of plasmodesmal callose homeostasis. *Plants (Basel)*, **6** (2), 15. (2017). doi: 10.3390/plants6020015
19. Kittang A. I., Iversen T. H., Fossum K. R., Mazars C., Carnero-Diaz E., Boucheron-Dubuisson E., et al. Exploration of plant growth and development using the European Modular cultivation System facility on the International Space Station. *J. Plant Biology*, **16** (3), 528–538 (2014).
20. Kordyum E. L. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating. *Int. Rev. Cytol.*, **171**, 1–78 (1997).
21. Kordyum E. L. Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity. *J. Plant Biology*, **16** (Suppl. 1), 79–90 (2014).
22. Kraft M. L. Plasma membrane organization and function: moving past lipid rafts. *Mol. Biol. Cell.*, **24** (18), 2765–2768 (2013).
23. 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*, **228**, 451–469 (1994).
24. Lefebvre B., Furt F., Hartmann M.-A., Michaelson L. V., Carde J.-P., Sargueil-Boiron, F., et al. Characterization of lipid rafts from *Medicago truncatula* root plasma membranes: a proteomic study reveals the presence of a raft-associated redox system. *Plant Physiol.*, **144** (1), 402–418 (2007).
25. Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*, **327** (5961), 46–50 (2010).
26. Mongrand S., Morel J., Laroche J., Claverol S., Carde J. P., Hartmann M. A., et al. Lipid rafts in higher plant cells: purification and characterization of Triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.*, **279**, 36277–36286 (2004).
27. Mongrand S., Stanislas T., Bayer E. M., Lherminier J., Simon-Plas F. Membrane rafts in plant cells. *Trends Plant Sci.*, **15** (12), 656–663 (2010).
28. Morel J., Claverol S., Mongrand S., Furt F., Fromentin J., Bessoule J.-J., et al. Proteomics of plant detergent-resistant membranes. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**, 1396–1411 (2006).
29. Paul A. L., Zupanska A. K., Schultz E., Ferl R. J. Organ-specific remodeling of the *Arabidopsis* transcriptome in response to spaceflight BMC. *Plant Biol.*, **13**, 112–122 (2013).
30. Peskan T., Westermann M., Oelmüller R. Identification of low-density Triton X-100-insoluble plasma membrane microdomains in higher plants. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 6989–6995 (2000).
31. Seifert G. J., Xue H., Acet T. The *Arabidopsis thaliana* fasciclin like arabinogalactan protein 4 gene acts synergistically with abscisic acid signalling to control root growth. *Ann. Bot.*, **114** (6), 1125–1133 (2014).
32. Sieber M., Hanke W., Kohn F. P. M. Modification of membrane fluidity by gravity. *Open J. Biophysics*, **4**, 105–111 (2014).
33. Simons K., Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569–572 (1997).
34. Sprenger R. R., Jensen, O. N. Proteomics and the dynamic plasma membrane: quo vadis? *Proteomics*, **10**, 3997–4011 (2010).
35. Srivastava V., Malm E., Sundqvist G., Bulone V. 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*, **12** (12), 3874–3885 (2013).
36. Takahashi D., Kawamura Y., Yamashita T., Uemura M. Detergent-resistant plasma membrane proteome in oat and rye: similarities and dissimilarities between two monocotyledonous plants. *J. Proteome Res.*, **11** (3), 1654–1665 (2012).
37. Wheeler R. M. Plants for human life support in space: from Myers to Mars. *Gravit. Space Biol.*, **23**, 25–35 (2010).

Received 04.01.18

Є. Л. Кордюм¹, Е. Н. Клименко¹, І. В. Булавін¹,
І. В. Жупанов¹, Т. В. Воробйова¹, Э. Рюланд²

¹ Інститут ботаніки ім. Н. Г. Холодного Національної академії наук України, Київ, Україна

² Інститут екології і наук об оточуючій середі, Університет Парижа Ест-Кретьє, Париж

ЛИПИДНЫЕ РАФТЫ КЛЕТОК РАСТЕНИЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫ К ВЛИЯНИЮ МОДЕЛИРОВАННОЙ МИКРОГРАВИТАЦИИ (КЛИНОСТАТИРОВАНИЕ)

Растения как источник кислорода и пищи для космонавтов признаны ключевым компонентом биорегенеративных систем жизнеобеспечения. Биологические мем-

браны, в первую очередь цитоплазматическая мембрана (ЦМ), по своим свойствам и функциям могут играть важнейшую роль в адаптации растений к микрогравитации. Доказано наличие в ЦМ функциональных доменов, получивших название «липидных рафтов». Предполагается, что рафты модулируют белковые взаимодействия и таким образом включаются в многочисленные жизненно важные клеточные процессы. Исследования липидных рафтов способствуют выяснению биохимических процессов, происходящих в клеточных мембранах в норме и в ответах на стресс. Наша статья затрагивает проблему изучения степени гравичувствительности основных клеточных процессов и адаптивного потенциала растений в условиях микрогравитации, что крайне необходимо для разработки технологий космического растениеводства в биорегенеративных системах жизнеобеспечения. Цель работы — выяснить степень гравичувствительности липидных рафтов растительных клеток по таким показателям, как состав и содержание насыщенных и ненасыщенных жирных кислот и стероидов. Материалы и методы исследования применены к проросткам гороха *Pisum sativum* L. сорта Берсек, который выращивали в течение 6 суток в контроле и в условиях медленного горизонтального клиностаტიрования. На седьмые сутки у проростков отрезали корни, выделяли из них фракцию ЦМ, из которой получали фракцию рафтов с использованием центрифуги «Optima L-90K». Фракцию рафтов исследовали методами электронной микроскопии с помощью электронного микроскопа JEM 1230 (JEOL, Япония) и газовой хроматографии на аппарате HRGC 5300 («Carlo Erba Instruments», Италия). Показано, что рафты имеют вид тонких ленточек длиной от 80 до 100 нм и шириной от 6 до 13 нм. В условиях клиностаტიрования качественный состав основных жирных кислот во фракции рафтов не изменялся, различия отмечены в их процентном содержании. Под влиянием моделируемой микрогравитации во фракции рафтов, как и в стационарном контроле, содержание насыщенных кислот было больше содержания ненасыщенных и увеличивалось, особенно пальмитиновой кислоты, соответственно уменьшался процент ненасыщенных жирных кислот, особенно арахидоновой кислоты. Отмечено уменьшение содержания моеновых ненасыщенных жирных кислот по сравнению с контролем, среди полиеновых жирных кислот наибольший процент составляли тетраеновые жирные кислоты. В условиях клиностаტიрования процент холестерина во фракции рафтов увеличивался в семь раз по сравнению с контролем. Впервые установлено значительное повышение содержания холестерина и насыщенных жирных кислот в липидных рафтах в условиях клиностаტიрования, что может быть свидетельством усиления жесткости рафтов и, соответственно, изменений проницаемости ЦМ, селективности и активности соответствующих белков. Повышение жесткости рафтов происходит на

фоне поддержания микровязкости самой мембраны на нормальном уровне. Предлагается уделить значительное внимание изучению роли липидных рафтов в гравичувствительности растительных клеток.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, цитоплазматическая мембрана, рафты, жирные кислоты, стероиды, клиностаტიрование.

*E. L. Kordyum*¹, *O. Klymenko*¹, *I. V. Bulavin*¹,
*I. V. Zhupanov*¹, *T. M. Vorobyova*¹, *E. Ruelland*²

¹ М. G. Kholodny Institute of Botany of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

² Institute of Ecology and Environmental Sciences, University Paris-Est Creteil, Paris

LIPID RAFTS IN PLANT CELLS ARE SENSITIVE TO THE INFLUENCE OF SIMULATED MICROGRAVITY (CLINOROTATION)

Plants as the sources of oxygen and food for astronauts have been recognized as a key component of Bioregenerative Life Support System. Biological membranes, first of all, the plasmalemma, can play a crucial role in the adaptation of plants to microgravity due to their properties and functions. The presence of functional domains called as the “lipid rafts” was proved in the plasmalemma. It is assumed that rafts modulate protein interactions and, thus, they are involved in numerous essential cell processes. The investigations of lipid rafts promote to understand the biochemical processes occurring in cell membranes in the norm and in response to stress. Problematics of our study is the understanding a degree of gravisensitivity of basic cell processes and an adaptive potential of plants in the microgravity conditions that is extremely important for working out the technologies of plant cultivation in the Bioregenerative Life Support System. Objective of our study is to find out a degree of gravisensitivity of lipid rafts in plant cells on such indices as the composition and content of saturated and unsaturated fatty acids and sterols. Materials and methods are concerning with the pea seedlings, kind Bersek, which were growing during 6 days in the stationary conditions and under slow horizontal clinorotation. On the 7th day, the seedlings were cut off from the roots. A raft fraction was obtained from the plasmalemma fraction isolated from roots using a centrifuge “Optima L-90K”. The raft fraction was investigated by the methods of electron microscopy with an electron microscope JEM 1230 (JEOL, Japan) and gas chromatography using an apparatus HRGC 5300 (“Carlo Erba Instruments”, Italy). It was shown that rafts look like thin ribbons 80–100 nm long and 6–13 nm wide. Under clinorotation, the qualitative composition of main fatty acids in the raft fraction did not change; the differences were found in their percentage. Under the influence of simulated microgravity, the content of saturated fatty acids was greater than the content of unsaturated fatty acids as well as it has been increased, especially a palmitic acid, both in the raft fraction

and in the stationary control. Thereafter, a percent of unsaturated fatty acids decreased, especially arachidonic acid. A decrease in the content of monoenic unsaturated fatty acids in comparison with control was noted too. Content of a tetraenoic fatty acids has a highest percentage among polyene fatty acids. Under clinorotation, a percent of the cholesterol in the raft fraction has been increased 7 times in comparison with control. For the first time, the essential increase in the content of cholesterol and some saturated fatty acids in lipid rafts under clinorotation has been shown. This may indicate a

raft rigidity strengthening under simulated microgravity that can lead to changes in plasmalemma permeability, selectivity and activity of corresponding proteins. A higher raft rigidity occurs against the backdrop of maintaining microviscosity of the membrane itself at the normal level. It is proposed to emphasize attention on the research of the role of lipid rafts in plant cell gravisensitivity.

Keywords: *Pisum sativum*, plasmalemma, rafts, fatty acids, sterols, clinorotation.