

О возможной роли электрической гетерогенности между клетками в организации взаимодействий внутриклеточных структур

Потапова Т.В., Бойцова Л.Ю., Голышев С.А.

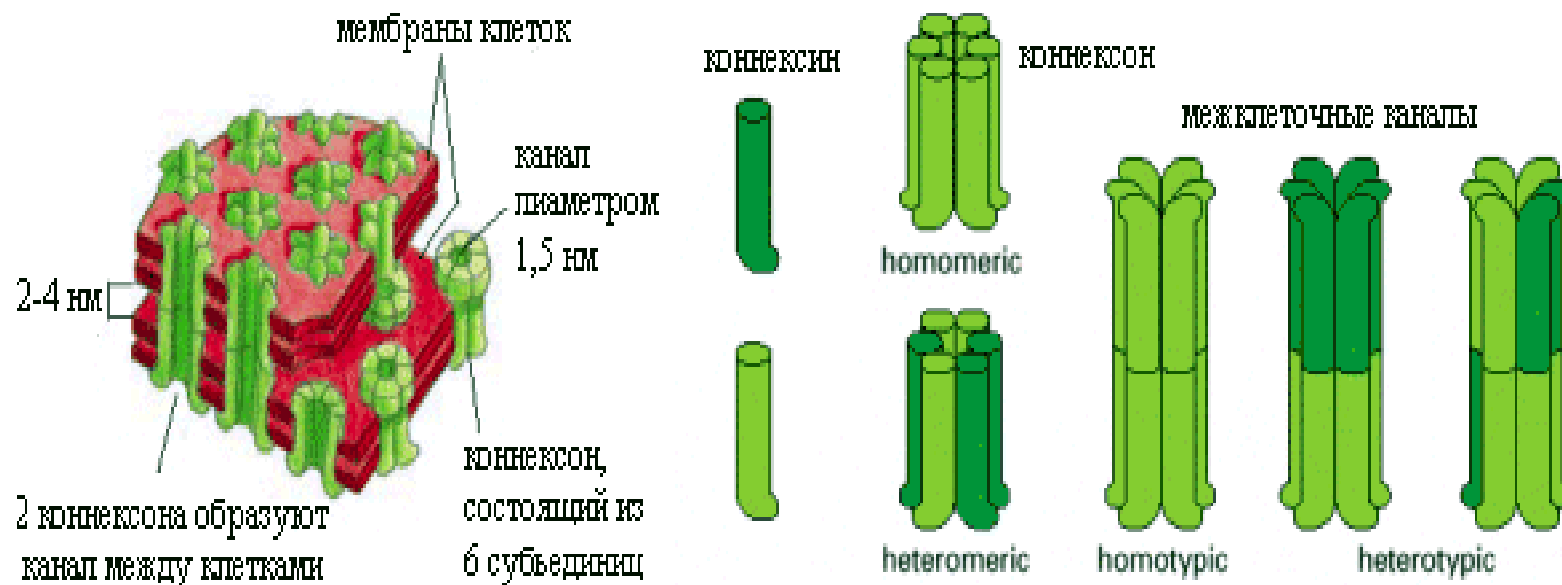
Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова,

Научно-исследовательский институт физико-
химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Москва

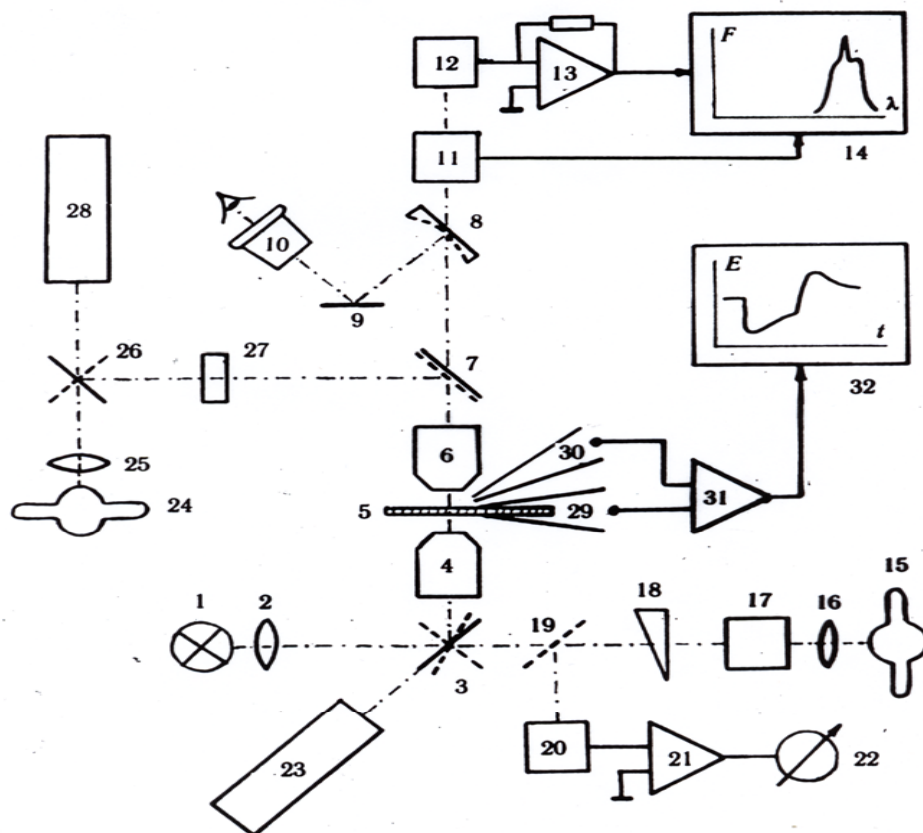
- Выяснение закономерностей организации взаимодействий внутриклеточных структур в функционально активных живых системах – одна из актуальных проблем современной биологии. С позиций представлений академика А.М. Уголева о естественных технологиях биологических систем для решения такой проблемы необходимо описать:
 - структуры, осуществляющие процесс;
 - управляющую систему, которая реализует контроль и регулирование;
 - энергообеспечение процесса и
 - его конечный эффект (продукт).

И. М. Гельфанд и А.М. Уголев среди участников
Всесоюзного Съезда физиологов (Ереван 1964 г.)



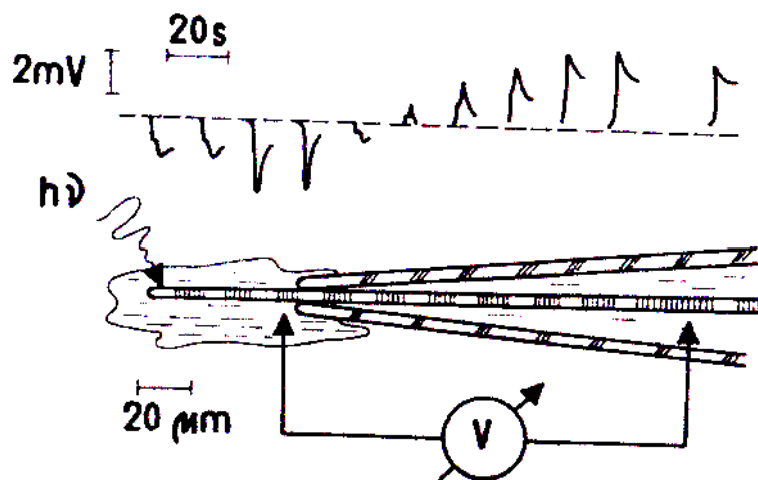


В 1963 г. при изучении животных клеток была открыта электрическая связь между клетками. Дальнейшие исследования показали, что в самых разных многоклеточных системах соседние клетки способны обмениваться друг с другом мелкими ионами и молекулами через специальные каналы, хорошо изолированные от внешней среды. У животных клеток электрическая связь осуществляется через *щелевые контакты*, у растений – через *плазмодесмы*, в гифах грибов – через *септальные поры*.

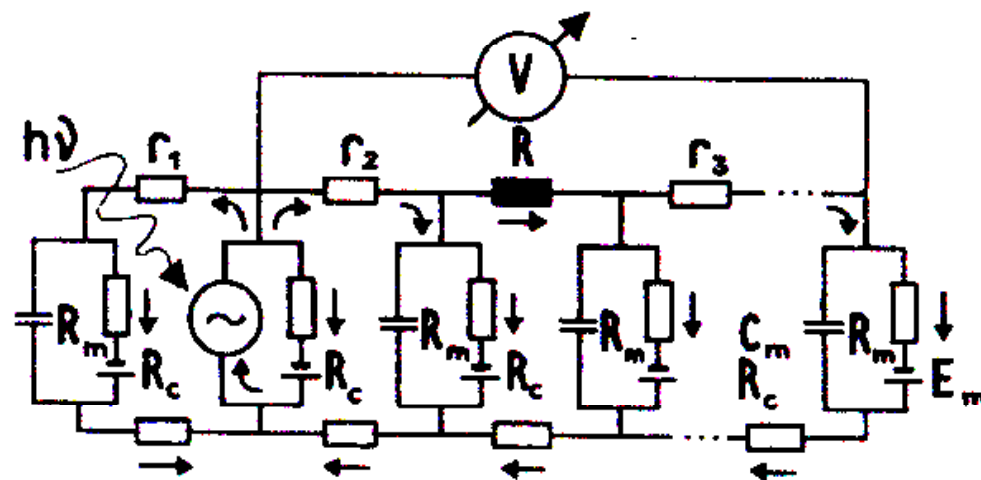


Блок-схема установки, созданной **К.Б. Асланиди** для одновременной регистрации спектральных характеристик и фото-электрических ответов цианобактерии *Phormidium uncunatum*

Еще в 80-х г.г. прошлого века **В.П. Скулачев** привлек внимание специалистов по взаимодействиям между клетками к идее *передачи мощности с помощью электрической связи*. Впервые мы попробовали проверить эту идею напрямую в опытах с трихомами нитчатой сине-зеленой водоросли *Phormidium uncunatum*.

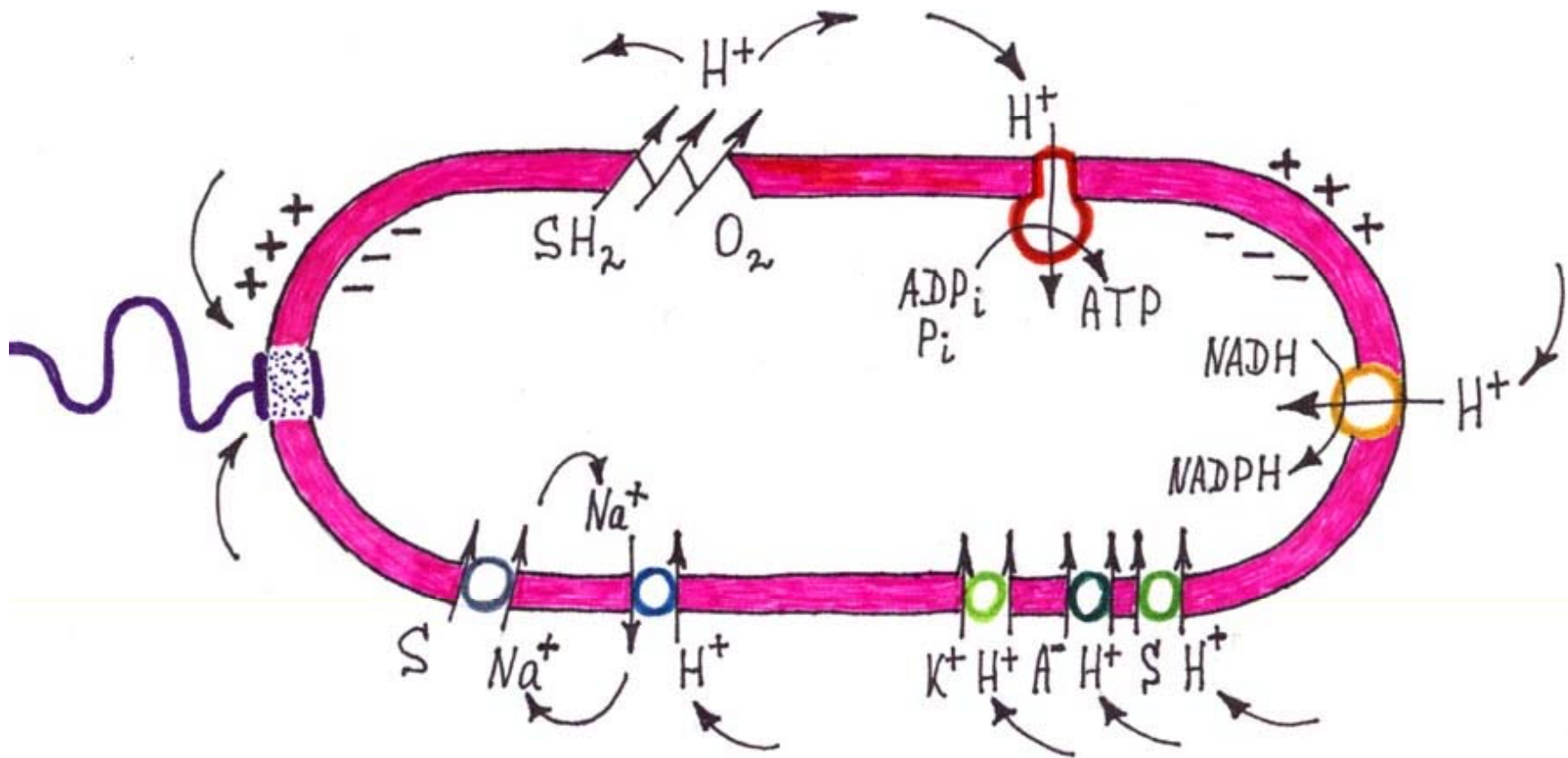


ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ
ТРИХОМА СИНЕ-ЗЕЛЁНОЙ
ВОДОРΟΣЛИ



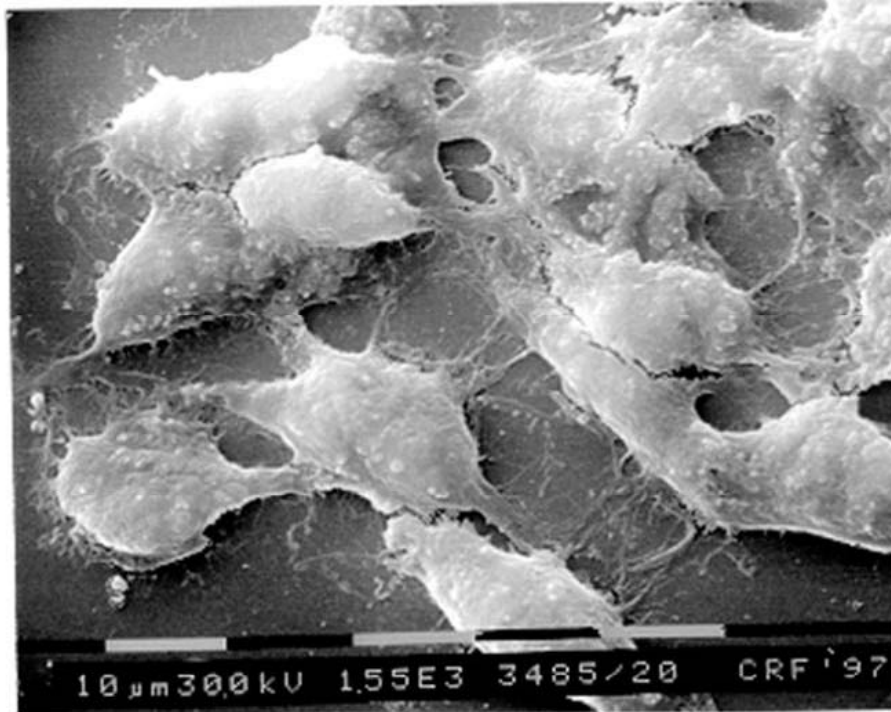
ЭЛЕКТРИЧЕСКАЯ
ЭКВИВАЛЕНТНАЯ СХЕМА
ТРИХОМА

Сине-зеленые водоросли - одни из самых древних земных организмов: следы их пребывания на Земле находят в отложениях возрастом до 3 миллиардов лет. Возможно, именно они «изобрели» энергетическую кооперацию как способ избежать взаимного торможения друг друга молекулярными системами фотосинтеза и фиксации азота. Во всяком случае, изобретение оказалось востребованным на всех ступенях эволюции.



Энергия, аккумулированная в форме трансмембранной разности потенциалов, может при посредстве специализированных мембранных белков обеспечивать множество видов работы: накопление питательных веществ и ионов, удаление продуктов обмена веществ, вращение жгутиков и др. Электрическая связь через высокопроницаемые контакты между клетками позволяет отдельным клеткам для решения своих задач использовать **энергетические ресурсы соседей**.

Культивируемые человеческие фибробласты

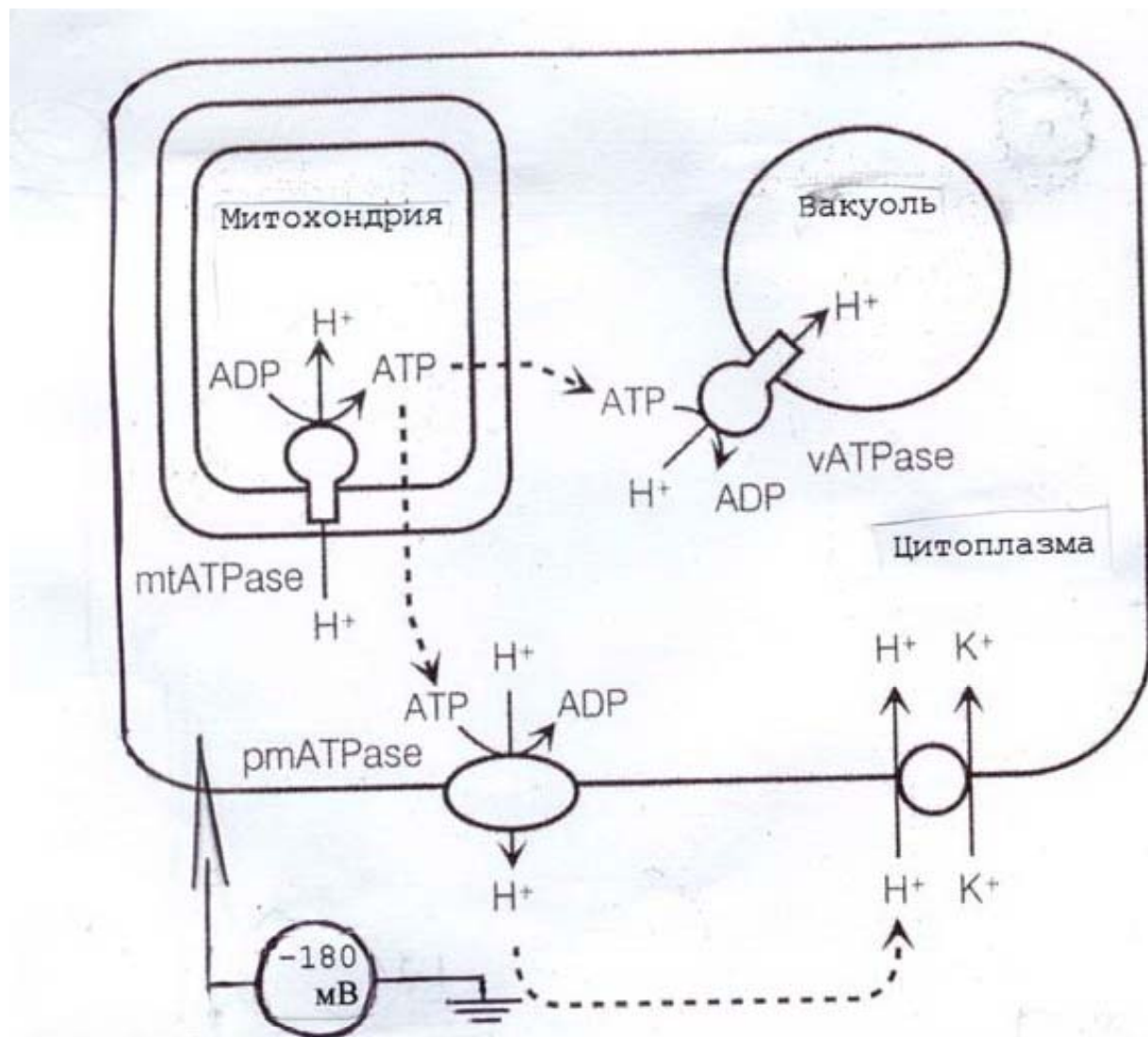


Для животных клеток с помощью математической модели, связывающая ионный гомеостаз и клеточную энергетику (*Асланиди и Панфилов*), был предсказан «эффект лидера», при котором в системе электрически связанных клеток клетки с самыми активными ионными насосами должны, расходуя энергию собственного АТФ, подтягивать мембранные потенциалы соседних клеток до своего уровня.

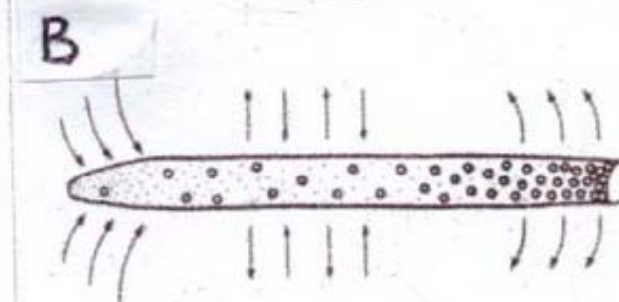
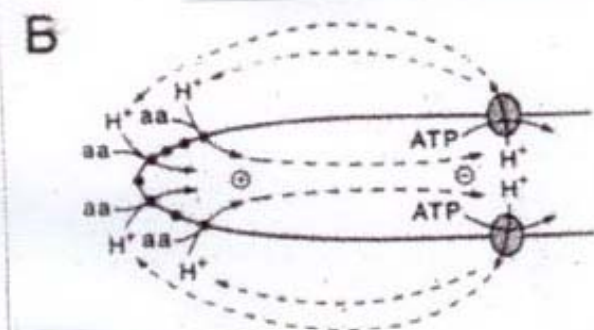
Этот эффект мы наблюдали в эксперименте при действии специфического блокатора ионных насосов - убаина на смешанную культуру фибробластов мыши и фибробластов человека. Действительно, менее чувствительные к убаину клетки мыши поддерживали с помощью щелевых контактов ионный гомеостаз и высокий уровень мембранного потенциала клеток человека.

Интересной экспериментальной моделью оказался вершущечный рост гиф *Neurospora crassa* – типичная системная функция, в которой объединены согласованные межклеточные взаимодействия и взаимодействия различных внутриклеточных структур



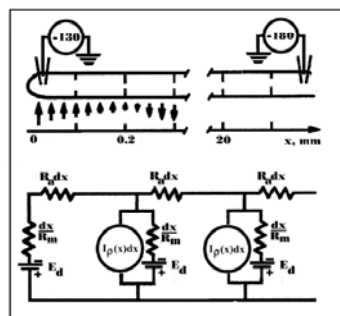
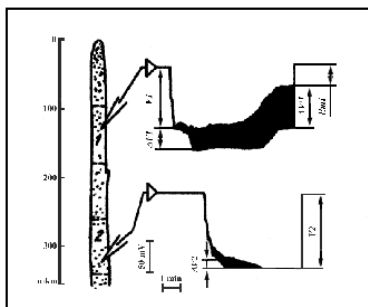


В митохондриях клеток нейроспоры образуется АТФ, который переходит в цитоплазму и используется протонными насосами вакуолей и клеточных мембран. Работа насосов создает сильные электрические токи и трансмембранные разности потенциалов, которые можно измерить с помощью внутриклеточных микроэлектродов.



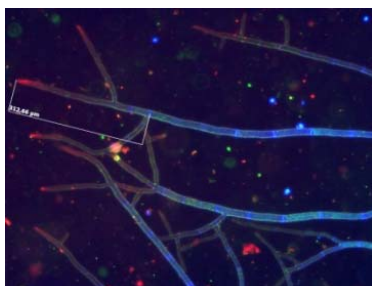
Около вершечек гиф нейроспоры регистрируются продольные электрические токи, которые можно объяснить разделением в пространстве молекул-насосов и молекул-транспортёров.

Технологии, которые мы использовали для экспериментального и теоретического анализа кооперативных взаимодействий между клетками на модели верхушечного роста вегетативных гиф плесневого гриба *N. crassa*

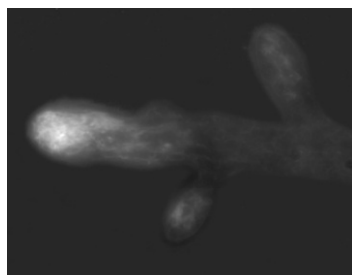


Микроэлектродные оценки и математическое моделирование электрических взаимодействий, обеспечивающих «энергетическую кооперацию» между клетками верхушки гифы

Микрохирургическая изоляция электрически самодостаточного фрагмента верхушки (800-1000 мкм) и изучение динамики роста и развития экспериментального «мини-дерева».

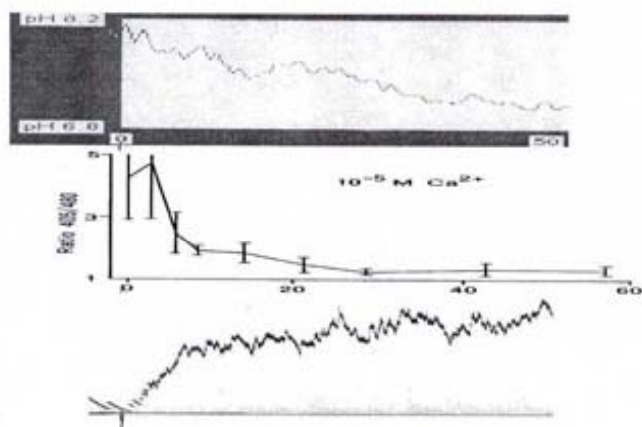
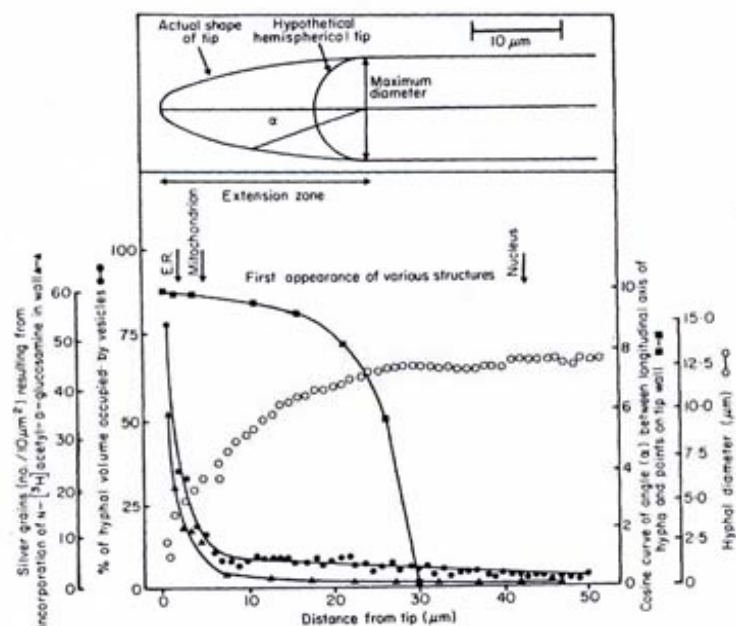


(10X) метка *Calcofluor white* (голубая) и *Mitotracker red* (красная).

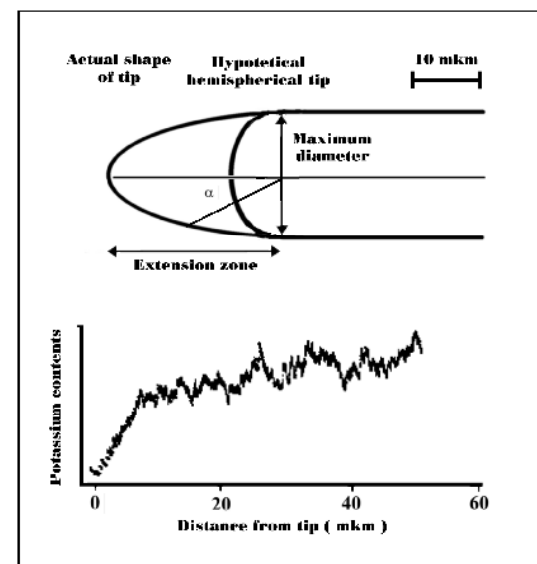


(100X) локализация метки MTR через 2 ч после отмыывания

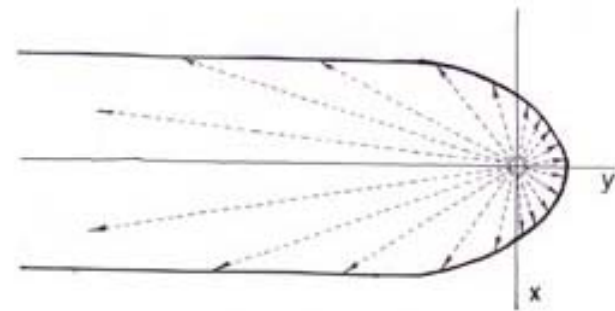
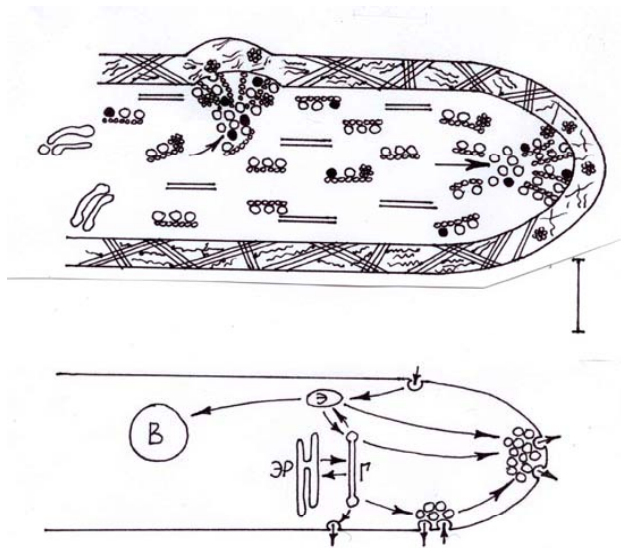
Окрашивание прижизненными флуоресцентными маркерами и изучение динамики внутриклеточных структур в ходе верхушечного роста «мини-дереьев» различных штаммов *N. crassa*, в т.ч. при изменении состава культуральной среды и под действием внешних физических и химических агентов.



Для гифальной верхушки известны градиенты различных структур и концентраций: в частности, специалисты ИТЭБ РАН описали неоднородное распределение ионов калия, как вдоль, так и поперек гифы.



При вершечном росте образуются новая плазматическая мембрана и хитиновая клеточная стенка из веществ, поступающих в везикулах через септальные поры от взрослых клеток, удаленных на расстояние до 6000 мкм от вершечек. Вдоль гифы перемещаются микровезикулы, содержащие необходимые для роста вещества; они сливаются с плазматической мембраной на ее переднем конце (600 микровезикул/с). В организации транспорта везикул участвуют микротрубочки. Удлинение гиф идет со скоростью 20-30 мкм/мин.

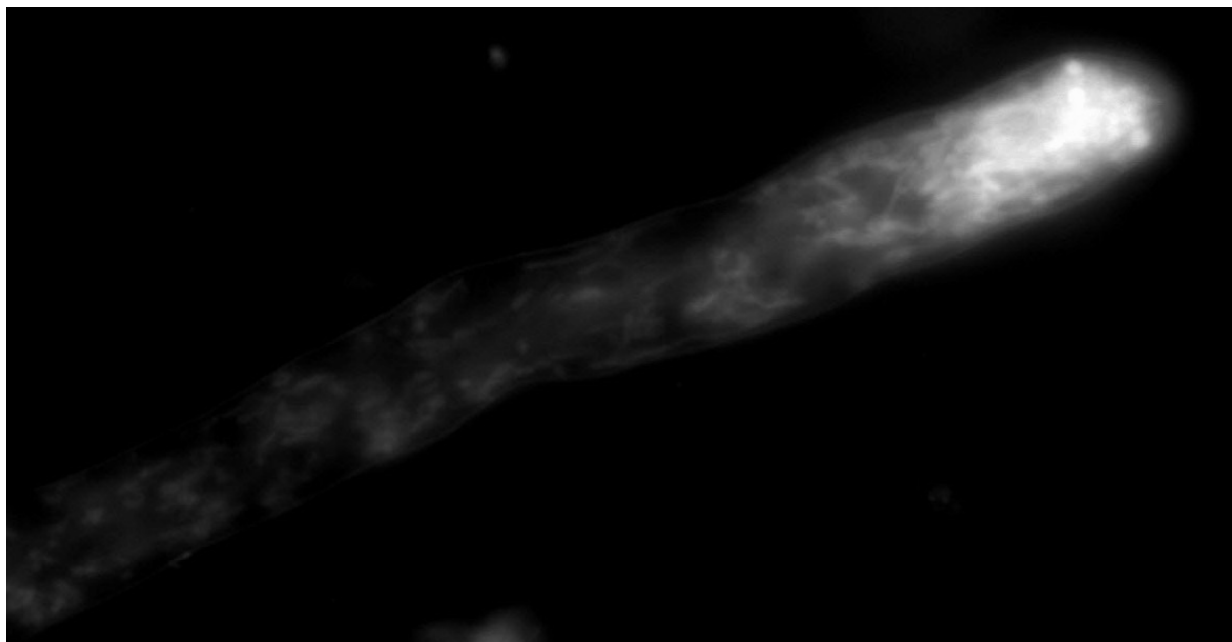


На переднем конце растущей гифы происходит целый ряд событий, требующих расхода энергии: трансмембранный перенос ионов и метаболитов, экзоцитоз содержимого везикул и эндоцитоз, цитоскелетные перестройки, синтез хитина и формирование клеточной стенки. Поэтому неудивительно, что различными методами в апикальной зоне обнаруживаются скопления митохондрий.

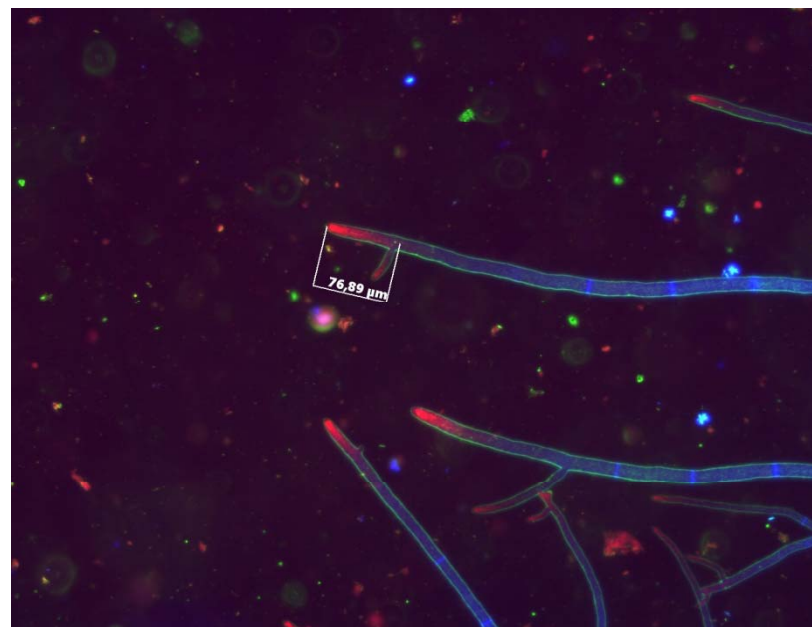
Митохондрии *N. crassa* существуют в виде нитей или сетей, которые концентрируются в местах высокого энергопотребления и фрагментируются на отдельные зерна при стрессовых воздействиях.

Митохондрии *N. crassa* легко перемещаются вдоль гиф благодаря взаимодействиям с микротрубочками при участии специфических белков.

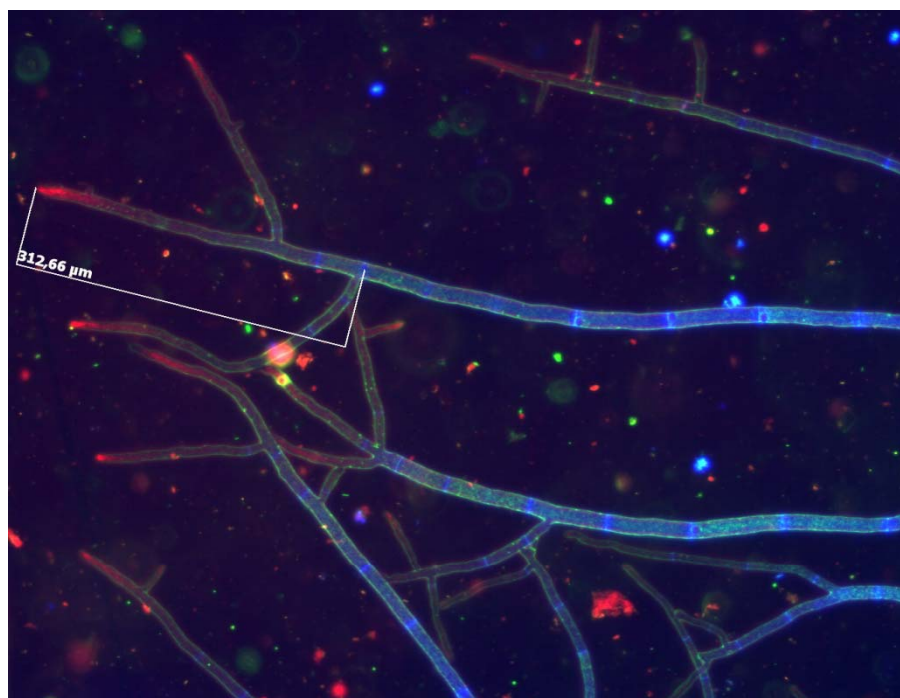
- Мы исследовали динамику митохондрий в растущих гифах *N.crassa* с помощью прижизненного флуоресцентного маркера *MitoTracker Red* – **MTR** (CMX Rose, M7512, Molecular Probes, США), который хорошо проникает в клетки, избирательно накапливается в активных митохондриях и прочно связывается с тиольными группами митохондриальных белков.

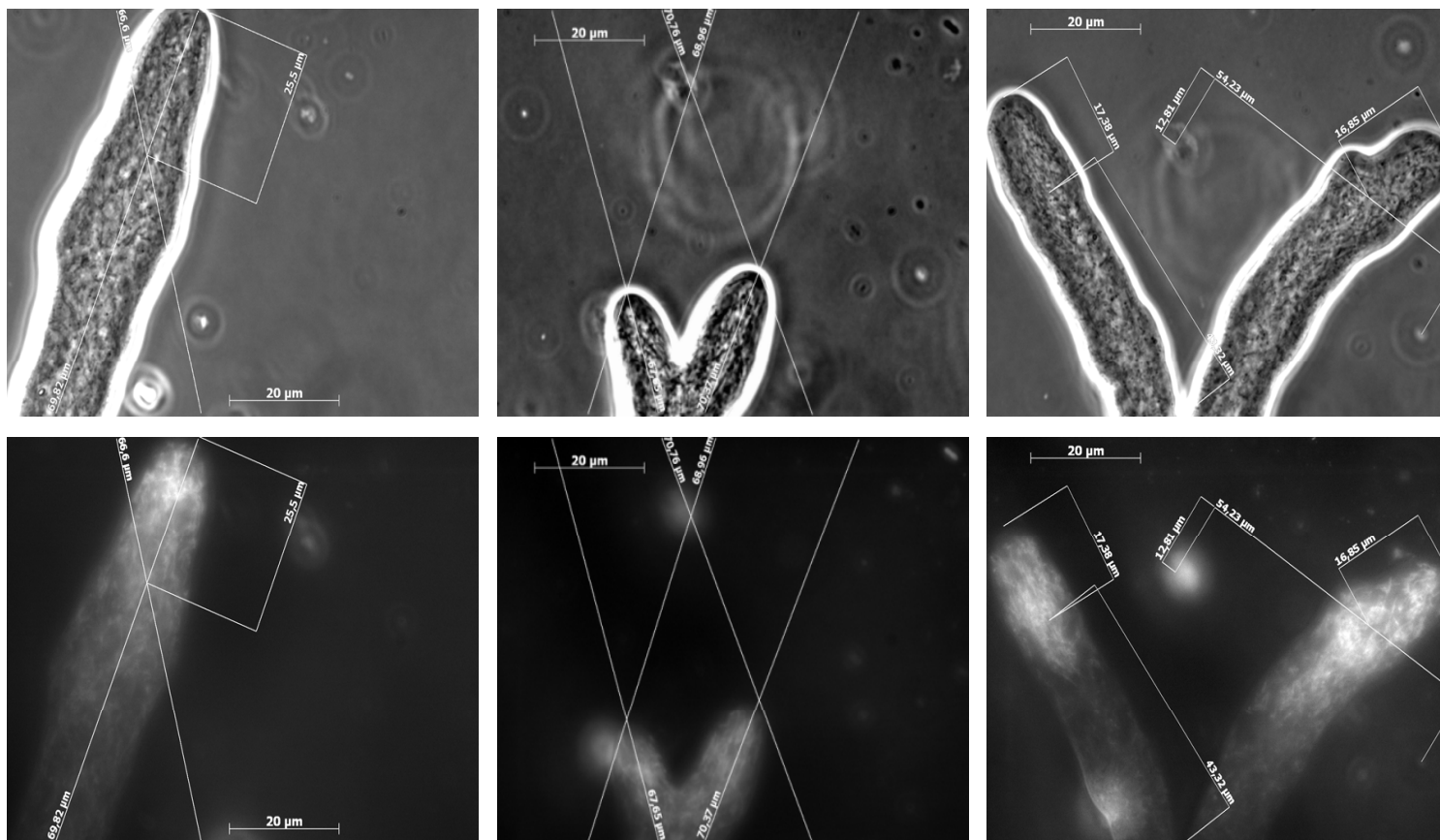


Участок
мицелия через
1 ч после
обработки **MTR**.



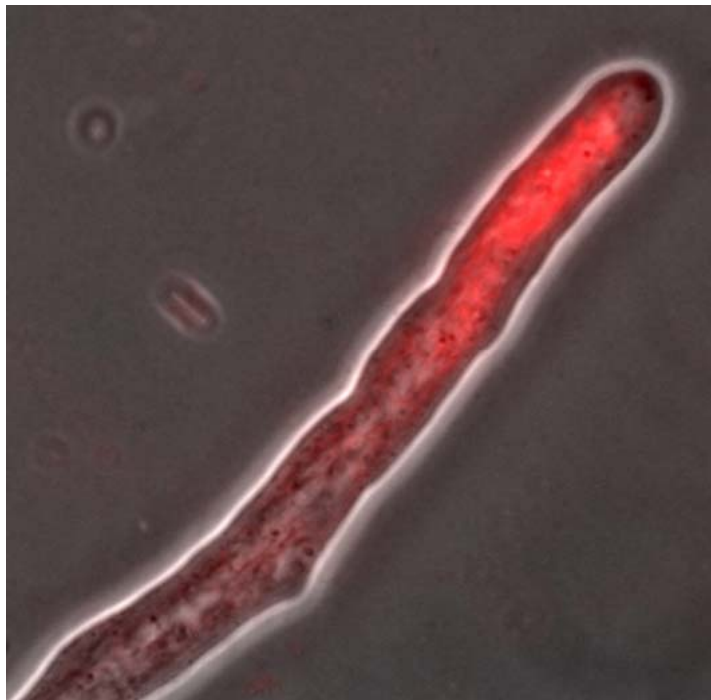
Тот же участок
еще через
0,5 ч.



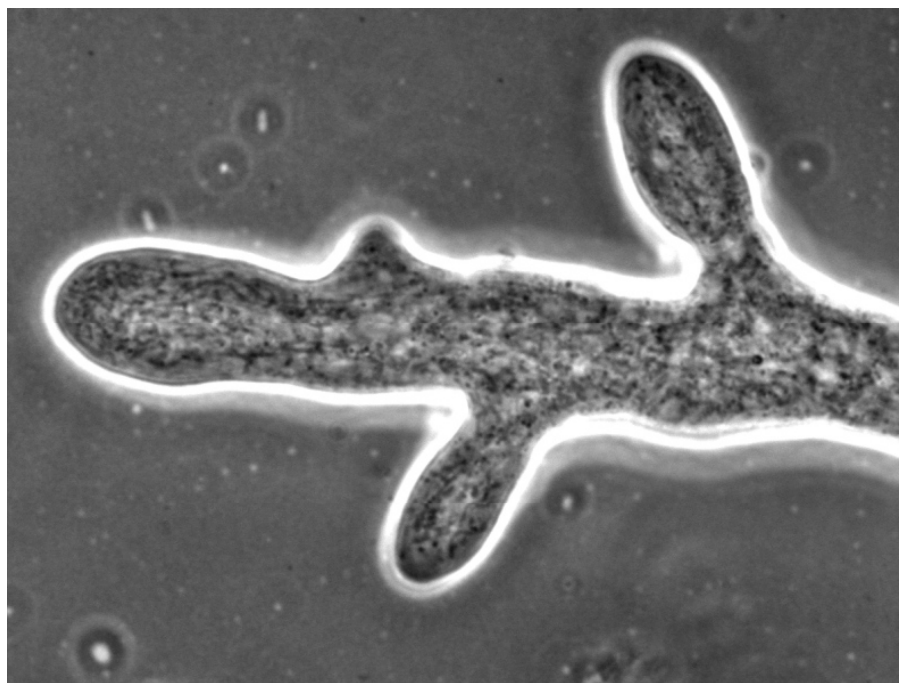
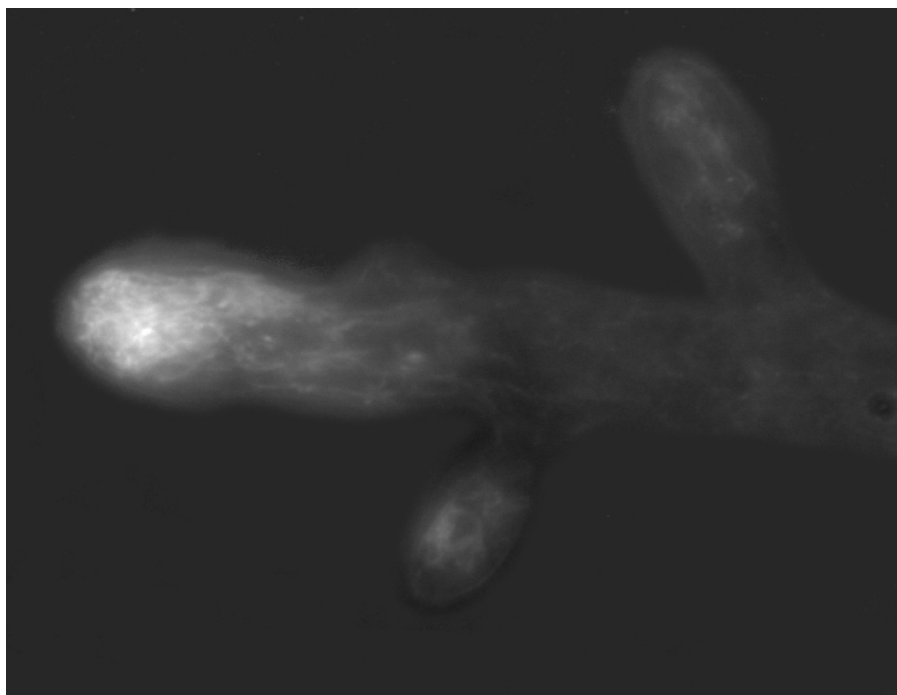


Верхушечные скопления митохондрий делились при делении вершук и затем перемещались по ходу роста вместе с новыми вершукми .
 Объектив – 100 X. Масшт. отрезок — 20мкм.

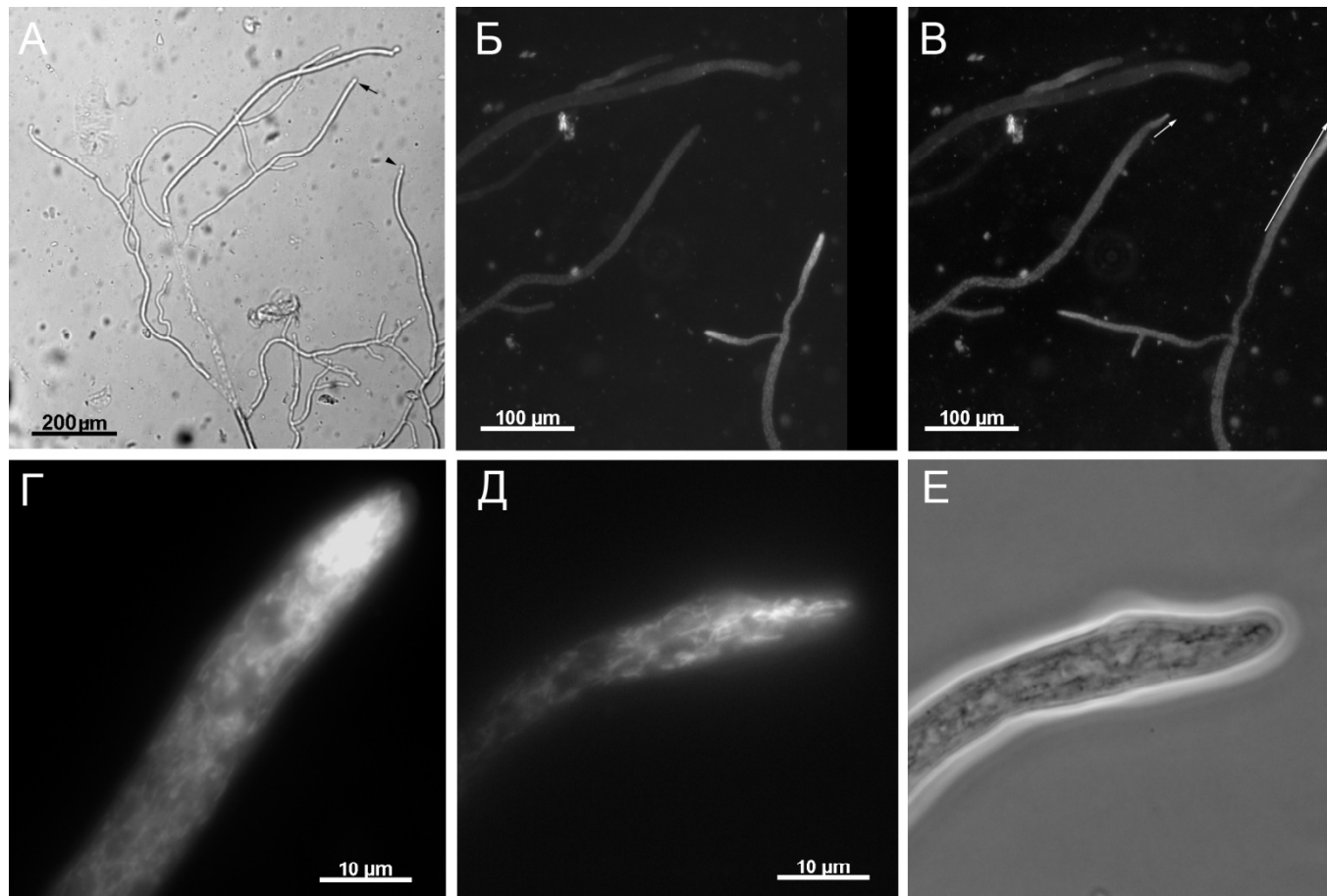
В ряде случаев в процессе возбуждения флуоресценции маркеров наблюдалась фрагментация флуоресцирующих нитей с одновременной вакуолизацией исследуемого участка гифы. В большинстве таких случаев сигнал *MTR* быстро угасал.

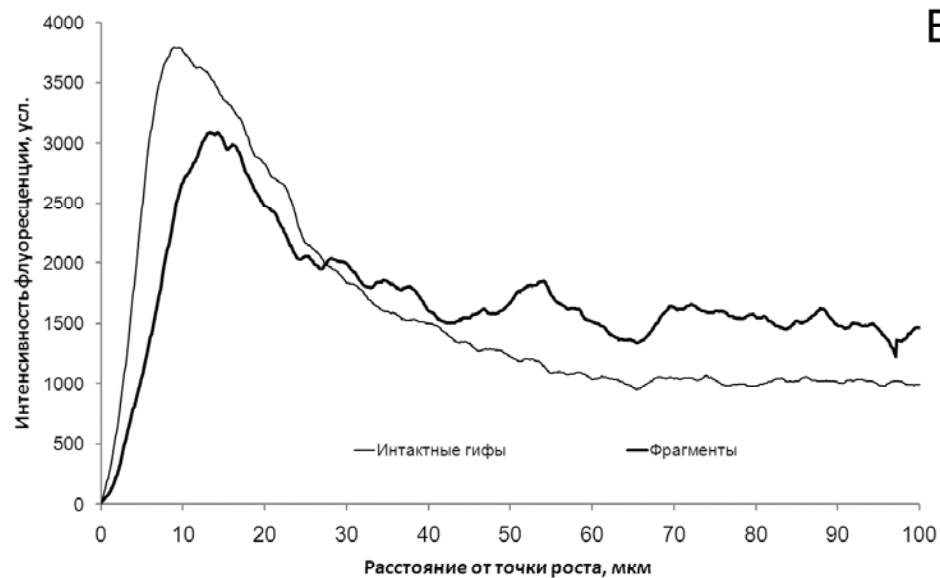
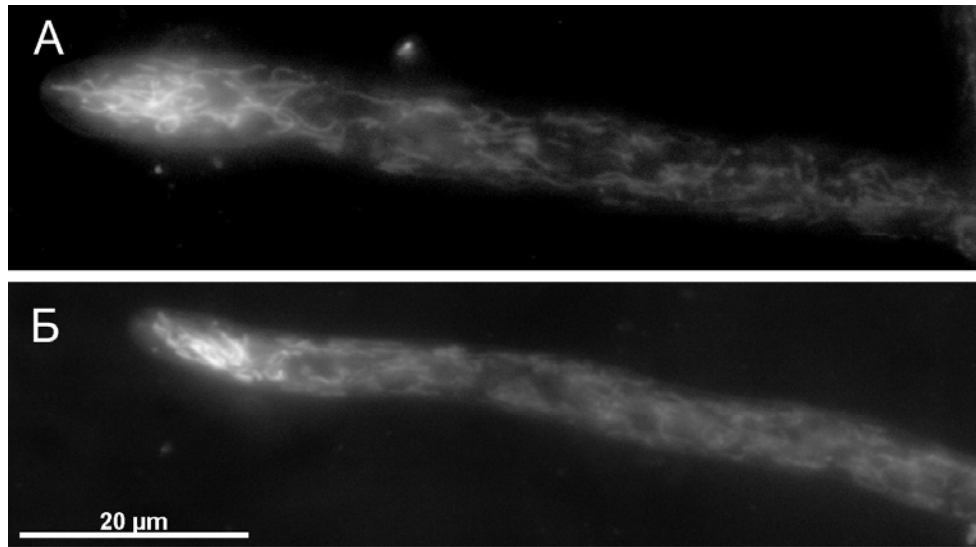


При наблюдении флуоресценции гиф, меченых *MTR* вместе с *Calcofluor*, часто обнаруживались искажения формы гифы и аномальные ветвления: возможно, вследствие фотоповреждения.



При локальной изоляции вершечных фрагментов можно с помощью метки *Mitotracker Red* наблюдать одновременно за движением митохондрий в растущих верхушках *фрагментов* и *целых гиф*.

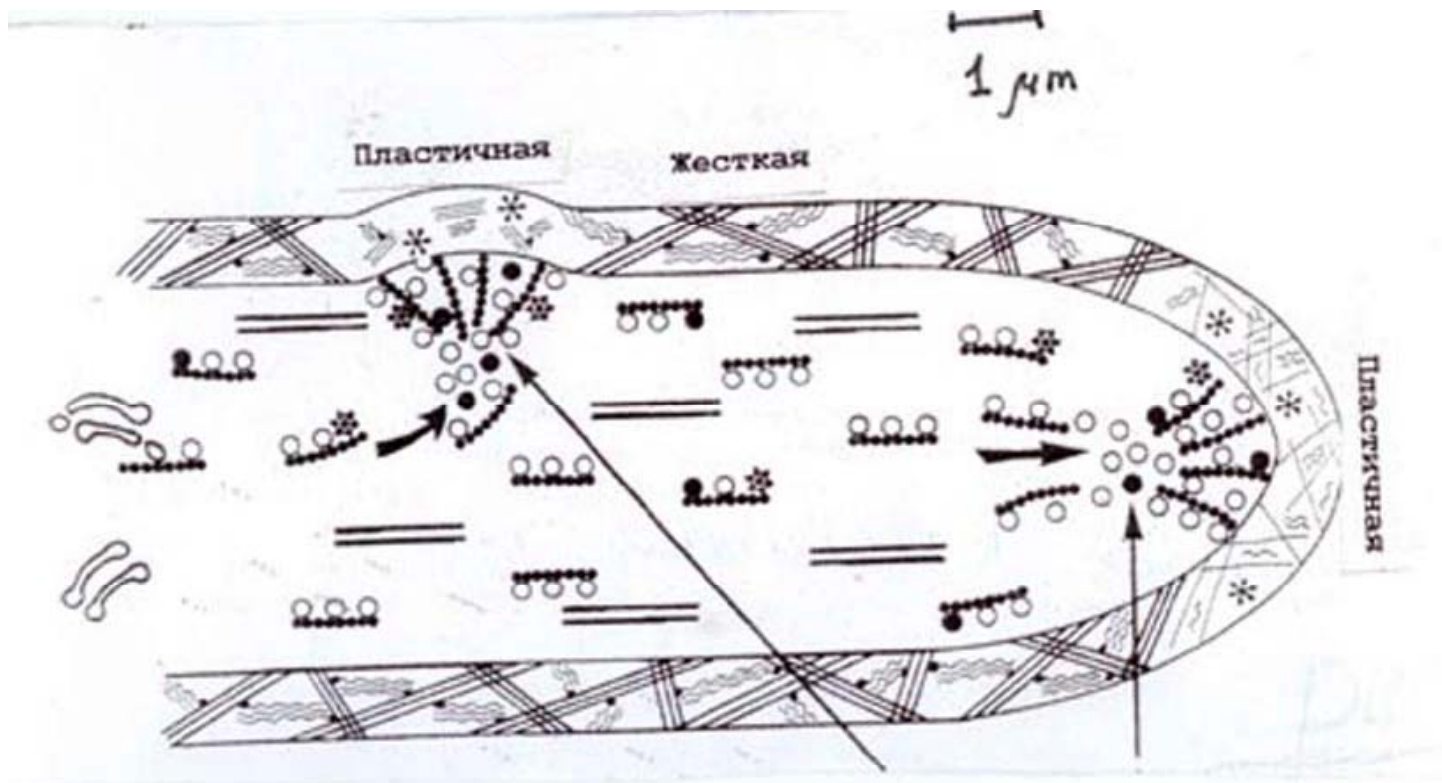




При сохранении максимальной концентрации митохондрий в вершечной зоне около 20 мкм, в интактных гифах (А; тонкая линия на графике) концентрация митохондрий на участке 100 мкм вершечек *целых гиф* происходит в отношении **4:1**, в то время, как у **700-800 мкм фрагментов** (Б; жирная линия на графике) это отношение составляет **2:1**.

Из предыдущих опытов мы знаем, что скорость роста 700-800 мкм фрагментов вдвое ниже, чем у целых гиф.

Таким образом очевидно, что эффективность работы механизма, обеспечивающего концентрацию митохондрий на вершинах гиф, согласуется со скоростью роста.



Вдоль гиф *N. crassa* митохондрии перемещаются с помощью микротрубочек . Известно, что микротрубочки *N. crassa* в виде палочек хаотично распределены вдоль гифы, но ориентируются строго параллельно оси гифы на переднем конце длиной 100-150 μ . При этом, как показано с помощью математического моделирования, чтобы обеспечить организованное поступление микровезикул к месту их слияния с плазматической мембраной необходимо и достаточно ≈ 10 микротрубочек .

По нашим данным, полученным с помощью внутриклеточных микроэлектродов, в гифах *N. crassa* на расстоянии $\approx 100 \mu$ от апикуса МП ≈ -130 мВ, а на расстоянии $\approx 400 \mu$ – МП ≈ -160 мВ. Исходя из этих цифр, можно оценить напряженность электрического поля вдоль верхушечной части гифы:

$$E = (V_2 - V_1) / L_2 - L_1 = (30 \text{ мВ}) / (300 \mu) = 100 \text{ В/м}$$

Показано, что изолированные микротрубочки в растворе ориентируются и меняют скорость движения под влиянием электрического поля напряженностью 2×10^3 В/м.

В связи с этим можно предположить, что электрические градиенты на передних концах гиф могут быть, по крайней мере, частью управляющей системы, которая осуществляет контроль и регулирование ВР, включая его энергообеспечение.

Благодарности:

- Авторы выражают искреннюю признательность *Елене Николаевне Моховой* за идею использовать *Mito Tracker Red*,
- *Татьяне Андреевне Белозерской* за предоставление культуры *N. crassa*,
- *Анастасии Горячевой* и *Анне Попинако* за техническую помощь,
- *Федору Федоровичу Северину* за полезное обсуждение результатов