

УДК 577.21

КРЕМНИЙСОДЕРЖАЩИЕ ВКЛЮЧЕНИЯ В ЦИТОПЛАЗМЕ ДИАТОМЕИ *Synedra acus*

© 2017 г. Академик РАН М. А. Грачёв¹, Е. Д. Бедошвили^{1,*}, Е. Ю. Герасимов²,
В. И. Зайковский², К. В. Гнеушева¹, Е. В. Лихошвай¹

Поступило 26.09.2016 г.

С помощью просвечивающей электронной микроскопии и рентгеноспектрального анализа ультратонких срезов было показано, что крупные включения (1–15 мкм) в клетках бесшовной пеннатной диатомеи *Synedra acus* subsp. *radians* содержат кремнезем. Размер включений увеличивается со временем культивирования. Приблизительная концентрация SiO₂ во включениях составляет 1–4%. По-видимому, кремнезем находится в этих включениях в виде желатинизированного геля, студня. Полученные результаты объясняют возможный механизм транспорта кремниевой кислоты внутрь клетки против градиента концентрации.

DOI: 10.7868/S0869565217040247

Диатомеи – одноклеточные фотосинтетические водные организмы, принадлежащие к царству Chromista и отличающиеся наличием двустворчатой, богато орнаментированной отверстиями и шипами клеточной стенки, состоящей из твердого аморфного кремнезема. Форма клетки и расположенные на створке орнаменты наноструктур видоспецифичны. Диатомеи захватывают из окружающей водной среды растворенную мономерную кремниевую кислоту – SiOH₄, иногда присутствующую в очень низких концентрациях (10 мкМ, [1]), которая полимеризуется внутри клетки и, в конце концов, откладывается в специализированной везикуле биогенного кремнезема (silica deposition vesicle, SDV) в виде кремнистой створки. Химические механизмы процесса захвата и отложения кремнезема диатомеями, формально протекающими против градиента концентрации кремниевой кислоты, пока изучены в недостаточной степени. Известно, что в цитоплазме диатомеи вещество, которое формально называется кремниевой кислотой, поскольку в виде таковой оно экстрагируется кипящей водой [2], может накапливаться в очень больших концентрациях, достигающих 340 мМ (2%, [1]), что значительно выше той концентрации, при которой SiOH₄ самопроизвольно полимеризуется и

дает плотный желатинизированный гель. Характерной особенностью этого геля SiOH₄ является его поведение при покачивании того сосуда, в который он налит: до желатинизации при наклоне сосуда мениск геля остается в горизонтальном положении, после застывания мениск наклоняется относительно горизонта [3]. Если бы желатинизированный гель, представляющий собой олигомер или полимер SiOH₄, был равномерно распределен по цитоплазме диатомеи, то внутриклеточные частицы не могли бы в ней передвигаться, и клетка должна была бы погибнуть. Отсюда напрашивается предположение о том, что желатинизированный гель находится в цитоплазме в неких специальных компартментах или частицах.

В рамках настоящей работы с использованием методов просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и энергодисперсионного рентгеноспектрального анализа (РСА) нам удалось обнаружить в цитоплазме диатомеи *Synedra acus* subsp. *radians* (Kütz.) Skabitsch содержащие кремний включения. В одной из работ Лимнологического института [4] с помощью световой эпифлуоресцентной микроскопии в цитоплазме *S. acus* были обнаружены крупные включения, окрашиваемые специфичным к кремнезему прижизненным красителем, но прямым методом наличие кремния в этих включениях показано не было.

В настоящей работе использовали аксеничную моноклональную культуру *S. acus*, видовое определение которой при отборе пробы из природной популяции проводили с помощью световой и сканирующей электронной микроскопии (рис. 1а–д).

¹Лимнологический институт Сибирского отделения Российской Академии наук, Иркутск

²Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской Академии наук, Новосибирск

*E-mail: bedoshvilied@list.ru

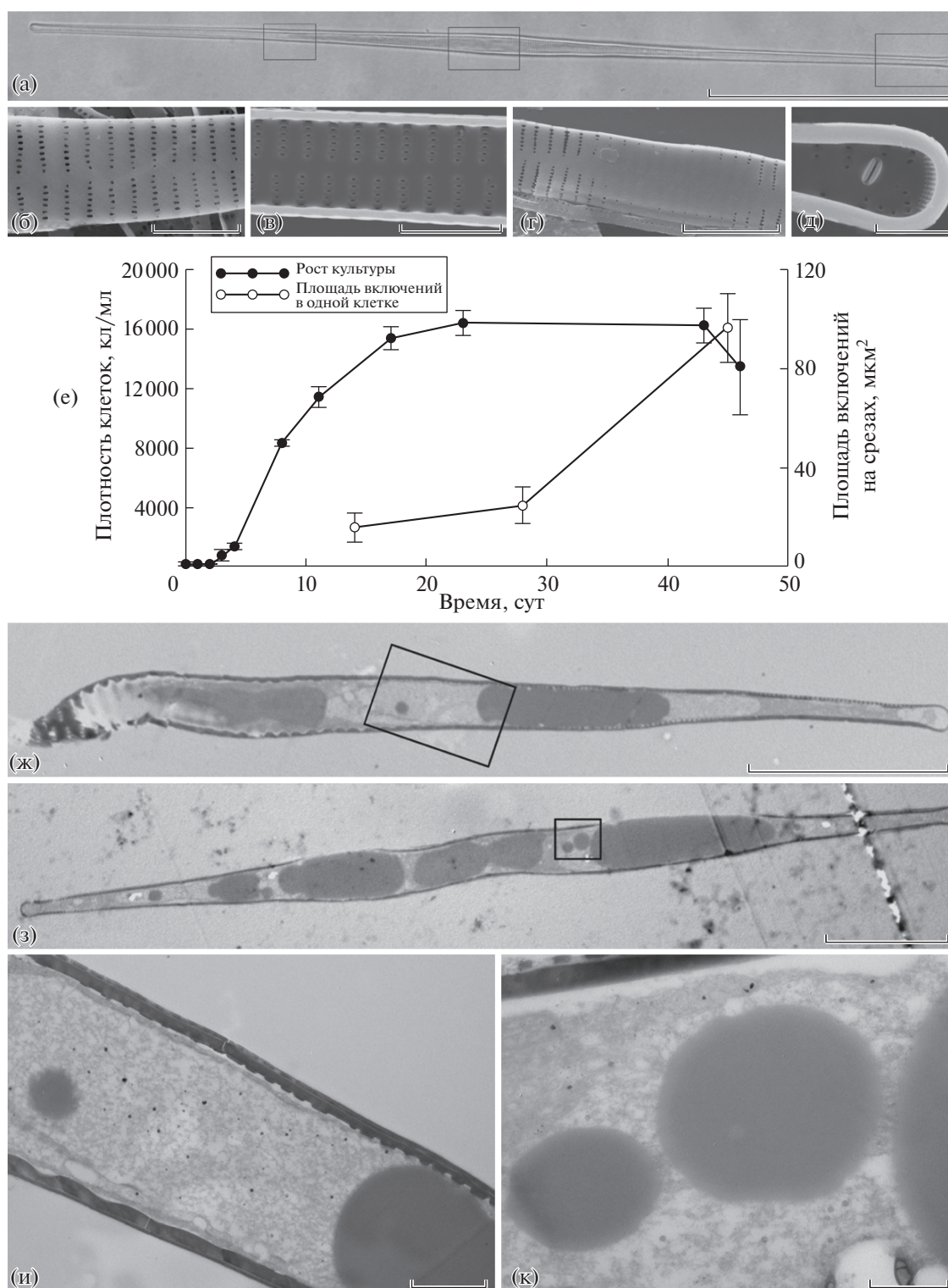


Рис. 1. Клетки *Synedra acus* subsp. *radians* по данным микроскопии и графики роста клеток в культуре. (а) – живая клетка из культуры *S. acus* subsp. *radians* (данные СМ). (б–д) – фрагменты очищенных панцирей (СЭМ). (е) – график роста культуры и график изменения площади электронно-плотных включений на срезах клеток в течение 8 нед., $M \pm m$, $n = 9$ (рост культуры), $n = 40$ (площадь включений). (ж–к) – продольные срезы клеток *S. acus* subsp. *radians* из 4-недельной (ж) и 8-недельной (з) культур. (и) – увеличенный фрагмент (ж). (к) – увеличенный фрагмент (з). Масштаб: (а, ж, з) – 10, (б) – 3, (в) – 4, (г) – 5, (д) – 2, (и, к) – 1 мкм.

Таблица 1. Оценочные концентрации кремния во включениях клеток *S. acus*

SiK* во включении	SiK* на пустом срезе	SiK* на створке	Концентрация кремния во включениях, %
1.53	0.45	58.88	1.7
2.55	0.77	47.52	3.7
1.04	0.44	39.59	1.7
0.89	0.38	34.29	1.3

*Весовое отношение кремния и углерода в районе зонда.

Рост клеток и наработку материала для микроскопических и физических исследований осуществляли на среде ДМ [5] в колбах при температуре 10°C. Кривая роста численности диатомей показана на рис. 1е. Здесь же показана динамика роста проективного покрытия среза кремнистыми включениями, о которых речь пойдет ниже.

Для ПЭМ клетки фиксировали глутаровым альдегидом и четырехокисью осмия, промывали фосфатным буфером, заключали в агар, проводили через спирты и ацетон и заливали в эпоксидную смолу (SPI-Chem Araldite 502 Kit, “Structure Probe, Inc.”, США). Далее с помощью алмазного ножа готовили ультратонкие срезы толщиной 40 нм, наносили срезы на сетки, покрытые формваровой пленкой. Для ПЭМ использовали трансмиссионный электронный микроскоп TEM LEO 906 E (“Carl Zeiss”, Германия). Эти же срезы исследовали в элементном анализе на дисперсионном спектрометре Phoenix energy (“EDAX”, США) после напыления углерода.

Как видно из рис. 1ж–к, в клетках диатомей присутствуют крупные, микрометровых размеров включения, величина и число которых увеличиваются по мере роста и старения культуры. Можно видеть, что по сравнению с цитоплазмой обнаруженные включения являются более электронно-плотными (серыми), а по сравнению со зрелыми створками существенно менее электронно-плотными. На большом увеличении видно, что эти включения не окружены липидным бислоем (рис. 1к).

Были сняты РСА-спектры образцов в нескольких точках: за пределами клетки, в цитоплазме, на створке и в цитоплазматических включениях. За пределами клетки мы обнаружили только один элемент С (рис. 2в). В пределах цитоплазмы зарегистрировали большой пик С. Кроме того, обнаружили небольшие пики О, Si и малый пик Os (рис. 2г). В зрелой створке присутствовали пики С, О, Si и небольшой пик Os (рис. 2д). В пределах серого включения обнаружили пики С и более высокие, чем в цитоплазме, пики О и Si (рис. 2е).

Метод РСА позволяет полуколичественно определять содержание элементов относительно содержания С в процентах. По данным 116 изме-

рений на срезах 40 клеток содержание Si в районе включений в 2 раза превышало его содержание в цитоплазме. Некоторые данные показаны в табл. 1. Содержание Si в створке, как и следовало ожидать, было высоким. Для того чтобы оценить концентрацию Si во включениях, мы вычитали из сигнала Si, полученного в районе включения, сигнал, полученный в районе цитоплазмы. Так же поступали с сигналом, полученным в районе зрелой створки. Поскольку зрелая створка состоит практически из чистого SiO₂, мы принимали положение, что концентрация Si в ней составляет 28/32, т.е. около 50%. Сравнивая полученную после вычитания фона интенсивность сигнала Si в процентах от содержания С с аналогичной величиной для зрелой створки, мы определили приблизительную концентрацию SiO₂ во включениях по формуле 0.5 × Si включения/Si зрелой створки. В разных включениях полученные значения концентрации кремнезема варьировались в пределах 1.1–3.7% (табл. 1). Раствор силиката натрия при концентрации входящего в его состав SiO₂, равной 3 мкМ (2%), при подкислении HCl до нейтрального pH через короткое время дает прозрачный желатинизированный гель. Проведя экстракцию желатинизированного геля в кипящей воде [2], мы получили прозрачный невязкий раствор, очевидно, раствор SiOH₄, который и проявил цветную реакцию с молибденовым реактивом [2]. Таким образом, можно предположить, что обнаруженные нами включения состояли именно из желатинизированного геля.

Поиск внутриклеточных частиц, содержащих кремнезем (помимо везикул отложения кремнезема, silica deposition vesicles, SDV) предпринимался давно. Schmid и Schultz [6] исследовали цитоплазму диатомей методом электронной микроскопии и обнаружили чрезвычайно мелкие (до 40 нм) электронно-плотные частицы. Цитируемые авторы предположили, что эти частицы являются везикулами, осуществляющими транспорт Si внутри цитоплазмы (silicon transport vesicles, STV). В составе STV кремний мог бы перемещаться по цитоплазме к месту назначения – к SDV, транспортироваться через мембрану SDV (силикалемму) и откладываться в нужном месте внутри SDV

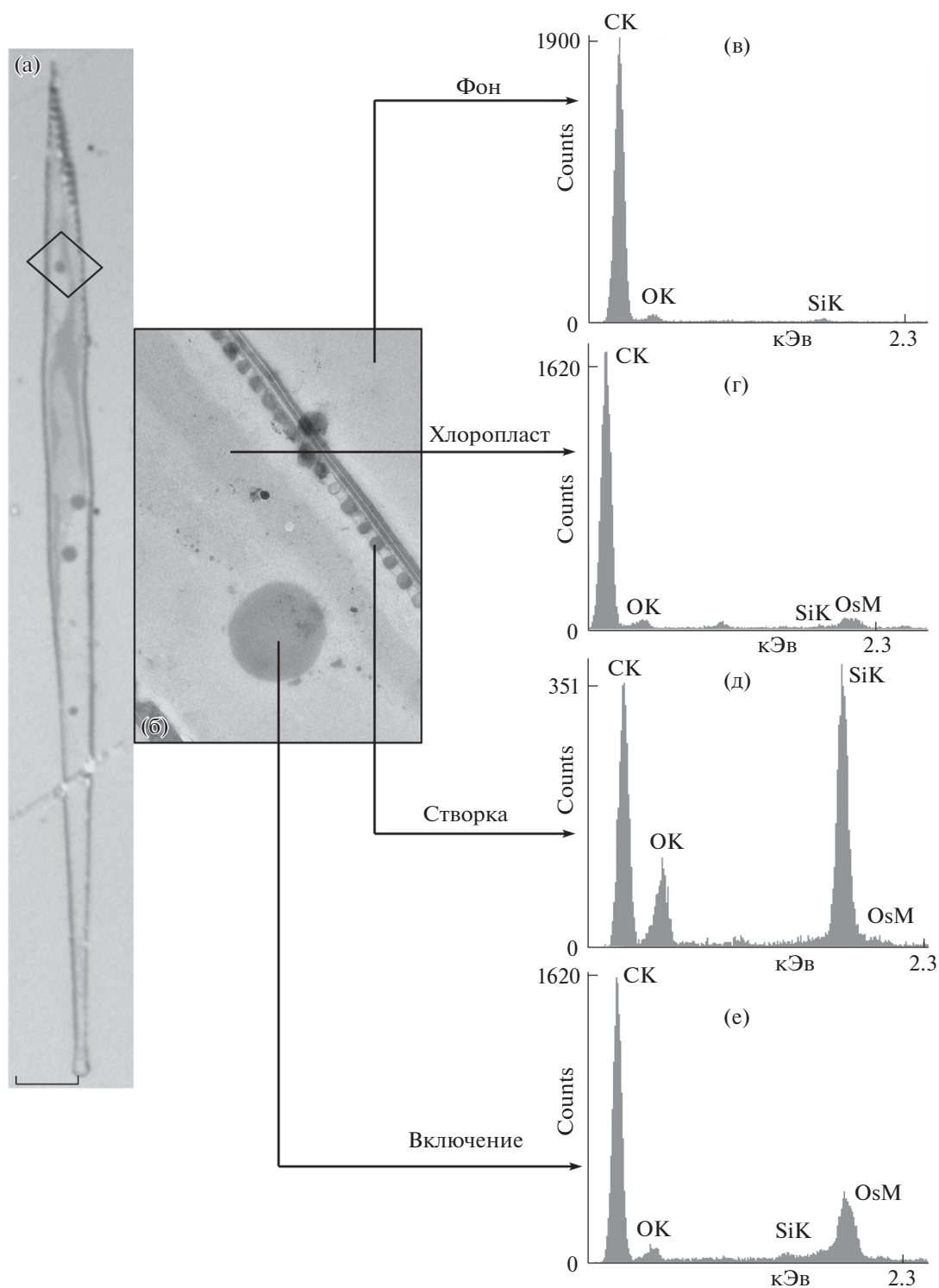


Рис. 2. Рентгеноспектральный анализ разных участков продольного среза *S. acus*. (а, б) – ПЭМ. Масштаб – 10 мкм.

при синтезе створки. Предположение Schmid и Schultz [6] было впоследствии оспорено. Авторы работы [7] обратили внимание на то, что общее количество содержащегося в везикулах кремнезе-

ма недостаточно для синтеза зрелой створки. В 1989 г. Rogerson и соавт. [8] предприняли поиск мелких Si-содержащих частиц в цитоплазме одной из диатомей. В местах высокой concentra-

ции рибосом они обнаружили мелкие электронно-плотные частицы, содержащие Si и P. Крупных частиц, содержащих включения Si, авторы работы [8] не искали и потому не обнаружили.

Хорошо известно, что в захвате SiOH_4 из окружающей водной среды и в ее транспорте через клеточную мембрану участвует белок SIT — транспортер кремниевой кислоты [9]. Это мембранный белок обычно состоит из десятка трансмембранных доменов. Считается, что он представляет собой пору, сквозь которую SiOH_4 проникает внутрь клетки. При этом остается не вполне понятно, каким образом SiOH_4 передвигается против градиента ее концентрации. Ранее мы предположили [10], что белок SIT в действительности является ферментом, который не только захватывает SiOH_4 из окружающей среды, но и выполняет функцию полимеразы SiOH_4 , которая синтезирует ее олигомеры и направляет их сквозь пору внутрь клетки. Эта гипотеза о ферментативной природе белка SIT недавно нашла косвенное подтверждение в результате исследования зависимости от концентрации SiOH_4 в питательной среде начальной скорости поглощения SiOH_4 живыми диатомеями [11]. Эта зависимость имеет сигмоидную форму и позволяет предположить, что при работе SIT в составе активного центра оказывается не одна, а две молекулы SiOH_4 : так называемый коэффициент Хилла равен приблизительно 2, что не противоречит этому предположению.

Имея достаточно высокую концентрацию, покидающий SIT полимерный кремнезем продолжает накапливаться в цитоплазме. Это предположение может объяснять возможность транспорта SiOH_4 против градиента концентрации. Ведь внутри клетки накапливается не SiOH_4 , а совершенно другое вещество, ее сравнительно устойчивый полимер, поэтому никакого транспорта навстречу градиенту концентрации SiOH_4 в дей-

ствительности нет. При попадании в клетку поликремниевая кислота вполне могла бы укладываться в спираль или в другую вторичную структуру и благодаря этому в конечном итоге придать образовавшемуся желатинизированному включению определенную, например, цилиндрическую, устойчивую форму. Для поддержания этой формы не требовалось бы наличия упругой оболочки в виде липидного бислоя. Эти предположения вполне соответствуют полученным в настоящей работе данным о Si-содержащих включениях в клетках *S. acus*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Martin-Jezequiel V., Hildebrand M., Brzezinski M.A.* // J. Phycol. 2000. V. 36. P. 821–840.
2. *Herve V., Derr J., Douady S., Quinet M., Moisan L., Lopez P.J.* // PLoS ONE. 2012. V. 7. e46722.
3. *Iler R.K.* The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry. N.Y.: Wiley, 1979. 896 p.
4. *Annenkov V.V., Basharina T.N., Danilovtseva E.N., Grachev M.A.* // Protoplasma. 2013. V. 250. P. 1147–1155
5. *Thompson A.S., Rhodes J.C., Pettman I.* Culture Collection of Algae and Protozoa, Catalogue of Strains. Ambleside: Freshwater Biological Association, 1988. 163 p.
6. *Schmid A.-M., Schultz D.* // Protoplasma. 1979. V. 100. P. 267–288.
7. *Thamtracoln K., Kustka A.B.* // BioEssays. 2009. V. 31. P. 322–327.
8. *Rogerson A., DeFreitas A.S.W., McInnes A.G.* // Canad. J. Microbiol. 1989. V. 33. P. 128–131.
9. *Hildebrand M., Volcani B.E., Gassmann W., Schroeder J.I.* // Nature. 1997. V. 385. P. 688–689.
10. *Grachev M.A., Annenkov V.V., Likhoshway Ye.V.* // BioEssays. 2008. V. 30. P. 328–337.
11. *Curnow P., Senior L., Knight M.J., Thamtracoln K., Hildebrand M., Booth P.J.* // Biochemistry. 2012. V. 51. P. 3776–3785.