

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Лобрева Ольга Викторовна

**ВЕЗИКУЛЯРНЫЙ ТРАНСПОРТ H^+ -АТФАЗЫ Р-ТИПА И ИОНОВ
 Na^+ ПРИ СОЛЕВОМ СТРЕССЕ У *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.**

Специальность 1.5.21. Физиология и биохимия растений

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискании ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители: д.б.н., профессор БАЛНОКИН Ю. В.

к.б.н., КАРПЫЧЕВ И. В.

Москва – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	11
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	18
1.1. Везикулярный транспорт: общая характеристика	18
1.2. Типы эндосом и их роль в транспорте веществ	21
1.3. Белки и белковые комплексы, участвующие в регуляции везикулярного транспорта.....	22
1.4. Клатрин - и флотиллин-зависимые типы эндоцитоза у растений.....	27
1.5. Детергент-устойчивая фракция мембран, флотиллины	29
1.6. Регуляция содержания белков в мембранах посредством везикулярного транспорта.....	31
1.7. H^+ АТФаза Р- типа	35
1.7.1. Общие сведения	35
1.7.2. Структура H^+ -АТФаза Р-типа.....	36
1.7.3. Каталитический цикл H^+ -АТФазы Р-типа.....	37
1.7.4. Регуляция H^+ -АТФазы Р-типа	40
1.7.5. Вторично-активные $\Delta\mu H^+$ - транспортеры	43
1.7.6. Физиологическая роль H^+ -АТФазы Р-типа и ее участие в адаптации растений к абиотическим стресс-факторам	45
1.8. Локализация Na^+ в цитоплазматических везикулах и косвенные свидетельства транспорта Na^+ везикулами.....	48
1.9. Сведения об индикаторах и ингибиторах, использовавшихся в работе.....	50
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	54
2.1. Объекты исследования	54

2.2. Выращивание растений <i>A. thaliana</i>	54
2.2.1. Протравливание семян и их проращивание	54
2.2.2. Выращивание растений в условиях водной культуры.....	54
2.2.3. Выращивание растений <i>A. thaliana</i> на почвенном субстрате.....	55
2.2.4. Выращивание проростков <i>A. thaliana</i> на агаризованной питательной среде	56
2.2.5. Получение суспензионной культуры клеток <i>A. thaliana</i>	56
2.3. Выявление гомозиготных растений <i>A. thaliana</i>	57
2.3.1. Выделение геномной ДНК из тканей <i>A. thaliana</i>	57
2.3.2. Постановка ПЦР для выявления гомозиготных форм мутантов <i>Atflot1oe</i> и <i>Atflot1ko</i>	58
2.4. Анализ экспрессии генов <i>A. thaliana</i>	59
2.4.1. Выделение суммарной РНК из тканей <i>A. thaliana</i>	59
2.4.2. Определение содержания нуклеиновых кислот в образцах	60
2.4.3. Обработка суммарной РНК ДНКазой I	61
2.4.4. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле	61
2.4.5. Подбор праймеров	61
2.4.6. ОТ-ПЦР на матрице суммарной РНК.....	62
2.4.7. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР) в реальном времени на матрице кДНК.....	62
2.4.8. Определение содержания мембранных белков	63
2.4.9. Выделение мембранных фракций, обогащенных плазмалеммой, из органов <i>A. thaliana</i> методом разделения мембран в водной двухфазной полимерной системе	63
2.4.10. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	66
2.4.11. Вестерн-блоттинг и его визуализация	66
2.5. Определение содержания ионов K^+ , Na^+ в растениях	68
2.6. Микроскопия	68

2.6.1. Исследование ультраструктуры клеток корней интактных проростков и суспензионной культуры <i>A. thaliana</i>	68
2.6.2. Поглощение эндоцитозного зонда FM4-64 корнями проростков.....	69
2.6.3. Обнаружение Na ⁺ в везикулах суспензионной культуры клеток <i>A. thaliana</i> путем ко-локализации FM 4-64 и ANG-2 TMA	69
2.6.4. Эпифлуоресцентная и конфокальная лазерно-сканирующая микроскопия	70
2.6.5. Влияние ингибиторов везикулярного транспорта на содержание Na ⁺ в клетках суспензионной культуры <i>A. thaliana</i>	71
2.7. Статистический анализ.....	72
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	73
3.1. Участие белка мембранных нанодоменов AtFlot1 в везикулярном транспорте H ⁺ -АТФазы Р-типа у <i>A. thaliana</i> в условиях солевого стресса	73
3.1.1. Характеристика инсерционных мутантов <i>Atflot1oe</i> и <i>Atflot1ko</i>	73
3.1.1.1. Координаты вставок и проверка гомозиготности мутантных линий	73
3.1.1.2. Анализ экспрессии гена <i>AtFlot1</i> у растений <i>A. thaliana</i> ДТ и мутантов <i>Atflot1oe</i> и <i>Atflot1ko</i>	75
3.1.1.3. Фенотип мутантов <i>Atflot1oe</i> и <i>Atflot1ko</i> : ростовые характеристики, содержание воды, ионов Na ⁺ и K ⁺ в органах	76
3.1.1.4. Влияние мутаций <i>Atflot1oe</i> , <i>Atflot1ko</i> и солевого шока на содержание H ⁺ -АТФазы Р-типа в плазматической мембране клеток органов <i>A. thaliana</i>	80
3.1.1.5. Влияние мутаций <i>Atflot1oe</i> , <i>Atflot1ko</i> и солевого стресса на содержание транскриптов генов H ⁺ -АТФазы Р-типа, <i>ANA1</i> и <i>ANA2</i> , в растениях <i>A. thaliana</i>	83
3.1.1.6. Влияние мутаций <i>Atflot1oe</i> , <i>Atflot1ko</i> и солевого стресса на поглощение эндоцитозного зонда FM4-64 корнями проростков <i>A. thaliana</i>	84
3.1.1.7. Влияние мутаций <i>Atflot1oe</i> , <i>Atflot1ko</i> и солевого стресса на ультраструктуру клеток корней <i>A. thaliana</i>	85

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В РАЗДЕЛЕ 3.1.	93
3.2. Перенос ионов натрия эндоцитозными везикулами клеток суспензионной культуры <i>A. thaliana</i>	100
3.2.1. Визуализация ионов Na ⁺ в эндоцитозных структурах клеток суспензионной культуры <i>A. thaliana</i>	100
3.2.2. Количественная оценка ко-локализованных везикул в клетках суспензионной культуры <i>A. thaliana</i>	102
3.2.3 Ультраструктура клеток суспензионной культуры <i>A. thaliana</i> в динамике их ответа на солевой стресс.....	106
3.2.4. Влияние ингибиторов везикулярного транспорта на содержание ионов Na ⁺ в клетках суспензионной культуры <i>A. thaliana</i> при солевом шоке.....	109
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В РАЗДЕЛЕ 3.2.	110
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	117
БЛАГОДАРНОСТИ	118
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток

АБК – абсцизовая кислота

АГ/ КГ– Аппарат Гольджи / Комплекс Гольджи

АДФ – аденозиндифосфат

АМ – амилопласт

АТФ – аденозинтрифосфат

АФ – автофагосома

АФК – активные формы кислорода

БФА – брэфелдин А

В – вакуоль

ВТ – везикулярный транспорт

ВТ – вортманнин

ГДФ – гуанозиндифосфат

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТ – дикий тип

ДТТ – дитиотреитол

ЖФЭ – жидкофазный эндоцитоз

ИКА – икаругамицин

К – крахмал

КС – клеточная стенка

M1 и M2 – коэффициенты ко-локализации Мандерса

МВ – микровакуоль

МВТ/ ПЭ – мультивезикулярное тело / поздняя эндосома

МС – среда Мурасиге-Скуга

НТО – нетранслируемая область

ОТ-кПЦР – количественная полимеразная цепная реакция после обратной транскрипции

п. н. – пара нуклеотидов

ПВК – предвакуолярный компартмент

ПДС – протон-движущая сила

ПМ – плазматическая мембрана / плазмалемма

ПМТ – парамуральное тело

ППМТ – производное парамурального тела

ПС – питательная среда

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ / PEG – полиэтиленгликоль

ПЭМ / ТЭМ – просвечивающая / трансмиссионная электронная микроскопия

РОЭ – рецептор-опосредованный эндоцитоз

РС – реакционная среда

РЦЭ – рециркулирующие эндосомы

СМЕ – клатрин-опосредованный эндоцитоз

T – тонопласт

ТАЕ – трис-ацетатный буфер

ТГС / TGN / РЭ – *транс*-Гольджи сеть / ранние эндосомы

ТМ – тяжелые металлы

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭК – экзосомы

ЭПР / ЭР / ER – эндоплазматический ретикулум

АМТ – ammonium transporter

ANG-2 TMA – Asante Natrium Green tetramethyl ammonium

AP – adaptor protein

APS – ammonium persulfate

ARF – adenosine ribosilation factor

BOR – borate transporter

ВТР – Bis-tris propane / 1,3-bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propane

СТАВ – cetiltrimethylammonium bromide

CCV – clathrin-coated vesicle

CDF – cation diffusion facilitator

CHC – clathrin heavy chain

CLC – clathrin light chain

CLC – chloride channel

COP – coat protein

DRP – dynamin related proteins

EDTA- Na_2 – disodium salt of ethylenediaminetetraacetic acid

ESCRT – endosomal sorting complex required for transport

EtBr – ethidium bromide

FM4-64 – (N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide)

GAP – GTPase-activating protein

GEF – guanine nucleotide exchange factor

GFP – green fluorescent protein

GGA – Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain

GPI – glycosylphosphatidylinositol

IRT – iron-regulated transporter

KAT – potassium channel

LB – left border sequence

LY – lucifer yellow

MES – 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

MMLV-транскриптаза – murine leukemia virus reverse transcriptase

MS – Murashige and Skoog medium

MQ – Milli-Q

MTP – metal tolerance protein

NPF – peptide transporter

NRT – nitrate transporter

PI4,5P – phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIN – PIN-FORMED

PIP – plasma membrane intrinsic protein

PM – plasma membrane

pmf – proton motive force

PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride

PVP – polyvinylpyrrolidone

RAB – rat brain

RALF / RE rapid alkalization factor

RE – recycling endosomes

SDS – sodium dodecyl sulfate

SH – Schenk and Hildebrandt

SNAP – synaptosomal associated protein

SNARE – Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor

SNX – sorting nexin

SOS1 – salt overly sensitive 1

SPFH – stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C

TEMED – tetramethylethylenediamine

Tris – trihydroxymethylaminomethane

VAMP – vesicle associated membrane protein

Vps – Vacuolar protein sorting

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Ряд исследований указывают на вовлечение везикулярного транспорта (ВТ) в механизмы ионного гомеостатирования и солеустойчивости растений. В частности, нокаут мутация по генам регуляторных белков ВТ или сверхэкспрессия этих генов приводили к изменениям в содержании ионов Na^+ в клетках, вызывали изменения в чувствительности растений к засолению и в их солеустойчивости (Mimura et al., 2003; Mazel et al., 2004; Leshem et al., 2006; Hamaji et al., 2009; Ebine et al., 2011; Baral et al., 2015a; Sergienko et al., 2022; Rodriguez-Furlan et al., 2023). Однако, механизмы сопряжения везикулярного транспорта с процессами, лежащими в основе солеустойчивости растений, в целом остаются малопонятными. Солеустойчивые растения обладают способностью эффективно регулировать цитоплазматические концентрации Na^+ и Cl^- , поддерживая их в условиях солевого стресса на нетоксическом уровне. Концентрация Na^+ в цитоплазме растительных клеток, контролируются Na^+/H^+ антипортером плазматической мембраны (ПМ), экспортирующим ионы Na^+ из цитоплазмы в наружную среду (Bassil et al., 2012; Bassil et al., 2019), и вакуолярными Na^+/H^+ антипортерами, депонирующими Na^+ в вакуолях (Qiu et al., 2003). Протон-движущая сила, необходимая для переноса Na^+ -антипортерами, генерируется H^+ -АТФазами ПМ и тонопласта, а также H^+ -транслоцирующей пирофосфатазой тонопласта (Apse et al., 2007; Li et al., 2022). Потоки Na^+ через мембраны, а следовательно, и внутриклеточные концентрации Na^+ могут регулироваться через изменения содержания ион-транспортирующих белков в мембране, осуществляемые посредством ВТ. Мембранные везикулы, содержащие ион-транспортирующие белки, перемещаются между различными компартментами клетки (Wu et al., 2014; Fan et al., 2015; Valencia et al., 2016; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2019; Hu et al., 2020). Перенос мембранных белков может отвечать за изменения их содержания в ПМ. Такого рода регуляция известна для K^+ -канала KAT1 (Sutter et al., 2007; Nieves-Cordones et al., 2022), переносчиков

индолил-3 уксусной кислоты (ауксина) PIN1 и PIN2 (Narasimhan et al., 2021; Agneessens, Julien 2024), переносчика бората BOR1 (Takano et al., 2010; Yoshinari et al., 2019), аквапорина PIP2 (Li et al., 2011; Kurowska et al., 2021), транспортера железа IRT1 (Barberon et al., 2011; Ivanov et al., 2021), белка-гомолога оксидазы D RbohD (Hao et al., 2014) и ряда других. Изменения содержания белков в мембранах (ремоделирование белкового состава мембран) происходят в ответ на разные внешние и внутренние стимулы и осуществляются при участии двух главных путей везикулярного транспорта, эндоцитоза и экзоцитоза (секреторного пути) (Otegui & Spitzer 2008; Peer et al., 2011; Dragwidge, Van Damme, 2020; Zhu et al., 2022). Можно предположить, что изменения в соотношении скоростей эндоцитоза и экзоцитоза обеспечивают также регуляцию ион-транспортирующих белков, ответственных за Na^+ - и Cl^- -гомеостаз растительных клеток при их ответе на повышение наружной концентрации соли (засоление). Однако, в литературе имеется мало данных о регуляции посредством ВТ белков ПМ, непосредственно участвующих в Na^+ -гомеостатировании цитоплазмы, таких, например, как Na^+/H^+ антипортер или H^+ -АТФаза Р-типа. В ВТ мембранных белков могут участвовать белки мембранных нанодоменов флотиллины (Otto & Nichols, 2011; Yu et al., 2017; Li et al., 2023). В клетках млекопитающих и дрожжей флотиллины вовлечены в организацию мембранных нанодоменов, передачу сигналов, регуляцию ионного и водного обмена, эндоцитоз, поглощение холестерина и межклеточные коммуникации, в ответ клеток на атаку патогенов и канцерогенез (Zhao et al., 2011, Gauthier-Rouvière et al., 2020; Kwiatkowska et al., 2020; Li et al., 2023). Однако, у растений флотиллины изучены в значительно меньшей степени, их функциональная роль и механизмы, ответственные за ионный гомеостаз и солеустойчивость до настоящего времени не выяснены. Практически, отсутствуют сведения об участии флотиллинов в регуляции ион-транспортирующих белков посредством ВТ.

Физиологическая роль везикулярного транспорта у растений в условиях солевого стресса, по-видимому, не ограничивается регуляцией белков, вовлеченных в Na^+ - и Cl^- -гомеостаз. Результаты некоторых исследований

свидетельствуют в пользу участия везикулярного транспорта непосредственно в переносе ионов, хотя эти данные являются косвенными. (Mimura et al., 2003; Balnokin et al., 2007; Hamaji et al., 2009; Baral et al., 2015a; Garcia de la Garma et al., 2015; Olmos et al., 2017; Flowers et al., 2018). Были проанализированы данные, указывающие на возможность вовлечения везикулярного транспорта непосредственно в перенос ионов Na^+ и Cl^- . Сравнивая потоки ионов у галофитов со скоростями движения везикул в растении, их размером, и с частотой их слияния с ПМ, авторы пришли к заключению, что везикулярный транспорт ионов может вносить существенный вклад в ионные потоки у растений (Flowers et al., 2018).

В контексте возможного участия везикул непосредственно в переносе ионов важно отметить наличие в клетках растений эндосомальных форм Na^+ - и Cl^- -транспортеров, в частности Na^+/H^+ -антипортеров семейства NHX (Bassil et al., 2011) и Cl^-/H^+ -антипортеров семейства CLC (von der Fecht-Bartenbach et al., 2007; Marmagne et al., 2007). Можно предположить, что загрузка токсичных ионов Na^+ и Cl^- этими белками в эндосомы с последующим слиянием эндосом с ПМ и тонопластом приводит к экспорту этих ионов из цитоплазмы.

Следует заключить, что демонстрация участия везикулярного транспорта в регуляции содержания ион-транспортирующих белков в ПМ при солевом стрессе, вовлечение в эти процессы флотиллинов, а также возможность переноса натрия или хлорида, непосредственно везикулами, представляют собой важные задачи в исследовании механизмов, лежащих в основе солеустойчивости растений.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей работы состояла в выявлении участия везикулярного транспорта и белка мембранных нанодоменов Flot1 в NaCl -индуцированных изменениях содержания H^+ -АТФазы Р-типа в плазмалемме *A. thaliana*, а также в вовлечении эндоцитозных везикул в транспорт Na^+ в условиях солевого стресса.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Определить относительное содержание транскриптов *AtFlot1* у растений *A. thaliana* дикого типа, нокаут-мутанта *Atflot1ko* (SALK_205125C) и мутанта с повышенной экспрессией *AtFlot1* – *Atflot1oe* (CS444812GK), выращенных в условиях солевого стресса и в контрольных условиях.
2. Исследовать фенотипы мутантов *Atflot1ko* и *Atflot1oe*, выращенных в условиях солевого стресса (ростовые характеристики, содержание воды, ионов Na^+ и K^+ в органах,) и в контрольных условиях.
3. Оценить влияние мутаций *Atflot1ko* и *Atflot1oe* и NaCl на содержание H^+ -АТФазы Р-типа в плазматических мембранах с помощью вестерн-блот анализа, а также на экспрессию главных изоформ H^+ -АТФазы (*AHA1* и *AHA2*) в органах растений *A. thaliana*.
4. Исследовать влияние мутаций *Atflot1ko* и *Atflot1oe* и NaCl на эндоцитоз в клетках корней *A. thaliana* с помощью флуоресцентного зонда FM4-64.
5. Выявить участие эндоцитозных везикул в поглощении ионов Na^+ клетками суспензионной культуры *A. thaliana* в условиях солевого шока с помощью эндоцитозного зонда FM4-64 и зонда на ионы Na^+ ANG-2 TMA.
6. Исследовать ультраструктуру клеток корня растений *A. thaliana* дикого типа и мутантов *Atflot1ko* и *Atflot1oe*, выращенных в условиях засоления и в контрольных условиях, а также клеток суспензионной культуры *A. thaliana* в динамике ответа на солевой шок.
7. Исследовать влияние ингибиторов везикулярного транспорта: брефелдина А, вортманнина и икаругамицина на содержание ионов Na^+ в клетках суспензионной культуры *A. thaliana*.

Объекты исследования: *Arabidopsis thaliana* (экотип Col-0) и инсерционные мутанты по гену белка мембранных нанодоменов Flot1: (1) мутант с повышенной экспрессией гена со вставкой в промоторе – *Atflot1oe* (CS444812GK), (2) нокаут-

мутант *Atflot1ko* (SALK_205125C); суспензионная культура клеток *A. thaliana* (Col-0).

Научная новизна. Впервые показано, что белок мембранных нанодоменов флотиллин1 (Flot1) у *A. thaliana* вовлечен в везикулярный транспорт H^+ -АТФазы Р-типа, который влияет на содержание этого фермента в плазмалемме в условиях солевого стресса. Впервые показано, что хлористый натрий стимулирует доставку H^+ -АТФазы Р-типа к плазмалемме, активируя экзоцитозный путь, связанный с образованием поздних эндосом (ПМ) / мультивезикулярных тел (МВТ). Впервые показано, что в Na^+ -гомеостатирование клеток *A. thaliana* в условиях солевого стресса вовлечен транспорт Na^+ непосредственно эндоцитозными везикулами. Содержащие Na^+ эндоцитозные везикулы сливаются с вакуолями, что способствует поддержанию концентраций Na^+ в цитоплазме на нетоксическом уровне.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в работе данные имеют фундаментальный характер и расширяют представления о роли белков мембранных нанодоменов флотиллинов в везикулярном транспорте белков и ионов Na^+ , ремоделировании белкового состава мембран и поддержании ионного гомеостаза у высших растений в условиях солевого стресса. Полученные в работе данные могут быть использованы при разработке и чтении курсов по клеточной физиологии для студентов биологических и сельскохозяйственных специальностей. Полученные результаты о повышенной солеустойчивости и продуктивности мутанта *A. thaliana* со сверхэкспрессией *Flot1* могут быть использованы в генной инженерии для улучшения соответствующих характеристик культурных растений.

Методология диссертационного исследования. Диссертационная работа выполнена с использованием физиолого-биохимических, молекулярно-биологических, физико-химических и статистических методов. Были использованы растения, выращенные в условиях гидропоники, и суспензионная культура клеток растений. Осуществлялся сравнительный анализ мутантов и растений дикого типа.

Использовались: флуоресцентная и трансмиссионная электронная микроскопия, выделение и очистка мембран, электрофорез и вестерн-блот анализ белков.

Положения, выносимые на защиту

1. В поддержание цитоплазматических концентраций Na^+ на нетоксическом уровне в условиях солевого стресса вносят вклад как NaCl -индуцированные изменения содержания ион-транспортирующих белков в плазмалемме, так и транспорт Na^+ непосредственно эндоцитозными везикулами.
2. Соотношение скоростей экзоцитозного и эндоцитозного путей переноса H^+ -АТФазы Р-типа у *A. thaliana* является одним из факторов, определяющих содержание этого фермента в плазматической мембране.
3. Хлористый натрий в среде выращивания растений активирует экзоцитозный путь переноса H^+ -АТФазы Р-типа, связанный с образованием поздних эндосом/мультивезикулярных тел, смещая баланс экзоцитоз/эндоцитоз в пользу экзоцитоза и приводя этим к возрастанию содержания H^+ -АТФазы в плазмалемме клеток растений ДТ.
4. В эндоцитозные и экзоцитозные пути переноса H^+ -АТФазы Р-типа у *A. thaliana* вовлечен белок мембранных нанодоменов Flot1.
5. В Na^+ -гомеостатирование клеток *A. thaliana* в условиях солевого стресса вовлечен «захват» ионов Na^+ эндоцитозными везикулами с последующим их слиянием с вакуолями, что способствует поддержанию цитоплазматических концентраций Na^+ на нетоксическом уровне.

Апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования представлены на: (1) Всероссийской научной конференции с международным участием «Экспериментальная биология растений и биотехнология: история и взгляд в будущее» (Москва, 2021); (2) Всероссийской научная конференция с международным участием «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 2019); (3) Всероссийской научной конференции с международным участием «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов

к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 2018); (4) XIV Съезде Русского Ботанического Общества и конференции «Ботаника в современном мире» (Махачкала, 2018); (5) Всероссийской научной конференции с международным участием «Современные аспекты структурно-функциональной биологии растений: от молекул до экосистем» (Орел, 2017); (6) Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2017); (7) 21-ой Международной школе-конференции молодых ученых «Биология – Наука XXI века» (Пушино, 2017); (8) Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных, Ломоносов «Новые возможности эндосомального транспорта в условиях засоления» (Москва, 2016); (9) Конференции «Advanced Microscopy – Super-resolution in different dimensions» (Moscow, 2015); (10) Научной конференции «Фундаментальные и прикладные проблемы современной экспериментальной биологии растений» (Москва, 2015); (11) VIII Съезде ОФРР и конференции «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 статей в научных журналах, рекомендованных для защиты в МГУ, а также 11 тезисов в сборниках материалов конференций.

Личный вклад соискателя. Автор принимал активное участие в постановке задач, планировании и проведении экспериментов, используя физиологические и молекулярно-биологические методы, обработке и анализе полученных результатов с помощью математических методов статистики и современных компьютерных программ, в анализе данных, написании статей и подготовке материалов к публикациям. Результаты исследований получены самим автором или при его непосредственном участии. Фамилии и имена соавторов указаны в соответствующих публикациях. Вклад автора в каждую из статей указан в списке публикаций.

Структура и объем диссертации. Материалы диссертации изложены на 148 страницах машинописного текста и включают 30 рисунков и 10 таблиц.

Диссертационная работа состоит из разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты исследований и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список литературы», включающий 267 источников.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Везикулярный транспорт: общая характеристика

Везикулярный транспорт эукариот осуществляет перенос веществ в клетках по разным направлениям (Bandmann et al., 2011). Для него характерно отпочковывание везикул от одной мембраны, перенос везикулы к другой мембране и слияние с ней. Таким образом происходит перенос не только содержимого люмена везикулы, но и мембранного материала – прежде всего белков и липидов от одной органеллы к другой. Для поддержания баланса веществ между органеллами их транспорт осуществляется как в прямом (антероградном), так и в обратном (ретроградном) направлениях (Hanton, Brandizzi 2006; Aniento et al., 2022). Вновь синтезированные белки начинают свой путь от эндоплазматического ретикулума (ЭР) и достигают аппарата Гольджи (АГ) и *транс*-Гольджи сети (ТГС). Последняя у растений носит также название ранних эндосом (РЭ). В ТГС / РЭ происходит распределение (sorting) веществ по пост-Гольджи компартментам. Мембраны ТГС созревают в поздние эндосомы (ПЭ) / мультивезикулярные тела (МВТ), которые называют также предвакуолярными компартментами (ПВК) (Aniento et al., 2022) (рис. 1.). МВТ / ПВК / ПЭ состоят из мембранных везикул, нагруженных транспортируемым материалом (cargo) и окруженных одной общей мембраной. Последняя может сливаться с тонопластом, доставляя внутренние (интралюменальные) везикулы с транспортируемым карго в вакуоль для деградации с помощью различных гидролаз и повторного использования продуктов деградации в обмене веществ. Наружная мембрана МВТ при этом может доставлять необходимые вещества (белки, липиды) непосредственно тонопласту, размеры которого при этом увеличиваются. Перенос веществ МВТ / ПЭ к вакуоли

называют вакуолярным путем. Другой мембраной, с которой может сливаться наружная мембрана МВТ, является плазмалемма / плазматическая мембрана (ПМ). В этом случае, происходит доставка веществ, необходимых для построения ПМ. Внутрилюменальные везикулы при этом оказываются в переплазматическом пространстве, доставляя в него различные синтезируемые клеткой вещества, например, компоненты клеточной стенки (Sinclair et al., 2018; Gu, Rasmussen, 2022). Оказавшиеся в периплазматическом пространстве внутренние везикулы МВТ называют экзосомами. Перенос веществ везикулами к ПМ называется экзоцитозом или секреторным путем. Белки и липиды ПМ, а также вещества, предназначенные для секреции, в частности для построения клеточной стенки, транспортируются к клеточной поверхности поэтапно через ЭР, АГ, ТГС, МВТ и ПМ (Bandmann et al., 2011, рис. 1; Pereira & Di Sansebastiano, 2021; Nielsen., 2024)

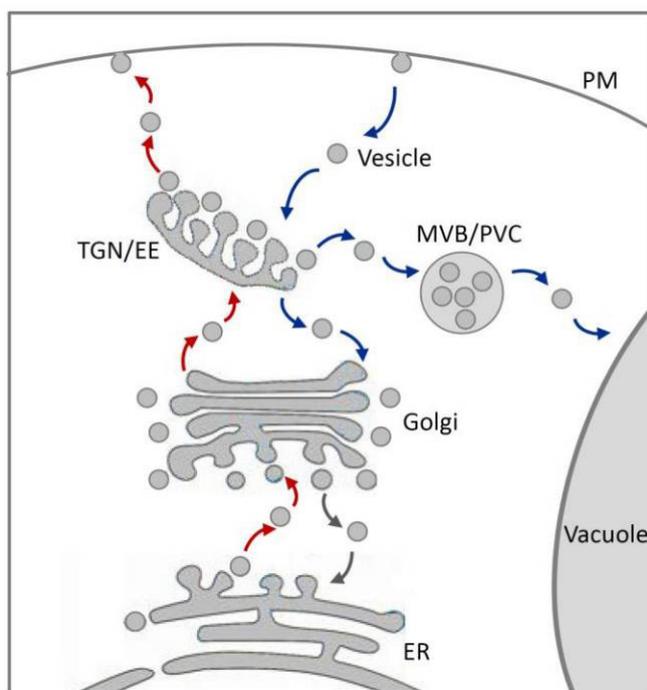


Рис. 1. Везикулярный транспорт. ER – эндоплазматический ретикулум; Golgi – аппарат / комплекс Гольджи; TGN / EE – *транс*-Гольджи сеть / ранние эндосомы; MVT / PVC – мультивезикулярные тела / предвакуолярные компартменты; PM – плазмалемма; Vacuole – вакуоль; эндоцитоз – синие стрелки; экзоцитоз – красные стрелки; ретроградный путь от АГ к эндоплазматическому ретикулуму – серые стрелки. Взято из (Bandmann et al., 2011).

Одним из важных направлений везикулярного транспорта является эндоцитозный путь. За счет эндоцитоза осуществляется интернализация белков и фосфолипидов ПМ, а также веществ, находящихся в экстрацеллюлярном пространстве. Вещества переносятся от ПМ к ТГС или МВТ. Перенос веществ внутрь от клеточной поверхности осуществляется эндоцитозными везикулами, которые образуются путем инвагинаций ПМ в сторону цитоплазмы. Интернализация белков ПМ с помощью эндоцитоза необходима, во-первых, для удаления поврежденных или неправильно свернутых (misfolded) белков и, во-вторых, для изменений в составе белков мембраны (реконструкция / remodelling) в ответ на действие внутренних и внешних факторов (Mulet et al., 2013; Dragwidge, Van Damme, 2020). Судьба подвергшихся эндоцитозу и находящихся в ранних эндосомах белков ПМ может быть различной. Они могут быть возвращены к ПМ (рециркуляция) или доставлены в вакуоль для деградации. При участии эндоцитоза осуществляется поглощение питательных веществ, регуляция белково-липидного состава ПМ, передача сигналов, доставка белков ПМ в другие органеллы, отправление белков, липидов и других веществ на деградацию, межклеточные коммуникации, реакции на биотические и абиотические стрессы, органогенез и тропизмы (Murphy et al., 2005; Chen et al., 2011; John et al., 2022). Различают рецептор-опосредованный (РОЭ) и жидко-фазный (ЖФЭ) типы эндоцитоза. РОЭ зависит от наличия рецептора на мембране и осуществляется при взаимодействии сигнальной последовательности транспортируемого белка с рецептором. ЖФЭ не зависит от рецептора. РОЭ может быть как клатрин-зависимым, так и флотиллин-зависимым (см. ниже) (Li et al., 2012; Yu et al., 2017). Следует отметить, что РОЭ включает и жидкофазную компоненту (Etcheberria et al., 2012). Жидкая фаза эндоцитозной везикулы содержит экстрацеллюлярный раствор, захваченный при образовании везикулы. Это позволяет вовлекать разные наружные вещества, в том числе и ионы во внутриклеточный везикулярный транспорт и различные превращения в клетке. Эндоцитоз и экзоцитоз играют важную роль у растений в таких процессах, как дифференцировка эмбриональной ткани, регуляция

транспорта ауксина (Jaillais et al., 2007), гравитропизм (Zhou et al., 2022), движения замыкающих клеток устьиц (Gkolemis et al., 2023), реконструкция клеточной стенки (Zhu et al., 2022), защитные реакции при действии патогенов (Ruano et al., 2020), а также абиотических факторов среды – засухи и засоления (Tripathy et al., 2021).

1.2. Типы эндосом и их роль в транспорте веществ

Ранние эндосомы (*транс*-Гольджи сеть) – являются компартментом, в котором пересекаются разные пути везикулярного транспорта (Aniento et al., 2022). Судьба белков, находящихся в РЭ, может быть различной. Они могут быть отсортированы для транспорта в ПМ, либо непосредственно, либо через образование МВТ / ПЭ, как это происходит при транспорте веществ в вакуоль. Механизм сортировки белков у растений недостаточно изучен. Больше всего известно о созревании РЭ и превращении их в МВТ. Образование МВТ происходит через инвагинации эндосомальной мембраны и отпочковывание внутрь этой эндосомы везикул (Liu et al., 2021; Aniento et al., 2022). В этом процессе участвуют эндосомальные белковые комплексы ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) (Otegui 2018; Liu et al., 2021) (см. ниже). Важным эндосомальным типом являются рециркулирующие эндосомы (РЦЭ). Такие эндосомы участвуют во внутриклеточном транспорте различных молекул (Hsu, Prekeris, 2010; Qi et al., 2024). Они принимают интернализированный материал от РЭ и направляют его обратно к ПМ (Dettmer et al., 2006). Эндосомы растений осуществляют не только сортировку, но и поддержание структуры и функций вакуоли, а также участвуют в росте клеток, в том числе специализированных, таких, например, как пыльцевые трубки (Wang et al., 2010; Richter et al., 2012; Hao et al., 2022). Поздние и ранние эндосомы можно различить по специфическим белкам-маркерам. Например, РЭ содержат RAB ГТФазы RAB4 и RAB5, а ПЭ – RAB7. Функции эндосом в растительных и животных клетках сходны, но эндосомальные пути у растений имеют некоторые отличительные особенности (Contento & Bassham, 2012, рис. 2.).

1.3. Белки и белковые комплексы, участвующие в регуляции везикулярного транспорта

Клетки воспринимают различные внешние и внутренние сигналы, активирующие эндосомальную систему, которая осуществляет внутриклеточный транспорт белков, липидов и других макромолекул (Dettmer et al., 2006; Lam et al., 2007; Aniento et al., 2022). Эндосомы и образующиеся из них везикулы захватывают макромолекулы и переносят их к месту назначения, т.е. к какой-то другой мембране. Различные белковые комплексы участвуют в распознавании белкового карго, осуществляют деформацию мембран при формировании везикул.

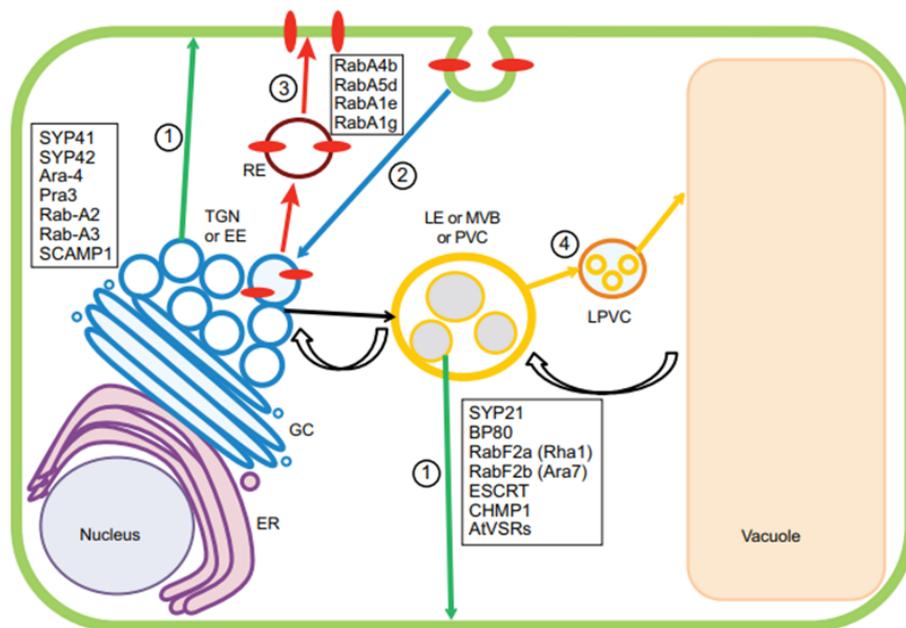


Рис. 2. Эндосомальные пути у растений. 1 – биосинтетический путь переноса веществ от ТГС к ПМ (зеленая стрелка), 2 – эндоцитоз, с помощью которого компоненты ПМ интернализируются везикулой и доставляются в ТГС (синяя стрелка), 3 – рециркуляционный путь, по которому компоненты ПМ могут быть возвращены в нее через РЭ (красная стрелка), 4 – вакуолярный путь для вновь синтезированных компонентов тонопласта и клеточного материала, предназначенного для деградации в вакуоли (желтые стрелки), транспорт от ТГС к МВТ (черная стрелка), ретроградный транспорт от вакуоли к МВТ и из МВТ к ТГС (изогнутые стрелки). Взято из (Contento & Bassham, 2012).

У эукариот, известно 5 комплексов адаптерных белков (adaptor protein complexes – AP-1 – AP-5), каждый из которых состоит из четырех субъединиц

(адаптинов), узнающих и отсортировывающих карго в везикулы (Hirst et al., 2011; Hirst et al., 2018; Robinson et al., 2015; Wang et al., 2023). Каждый из AP-комплексов имеет четкую локализацию и функцию (Hirst et al., 2011, рис. 3.). В растениях AP-1 и AP-4 локализованы на ТГС, AP-1 рекрутирует карго белки и вспомогательные белки, необходимые для образования везикул. AP-2 участвует в эндоцитозе плазматической мембраны и способствует клатрин-опосредованному эндоцитозу, комплексы AP-1 и AP-2 отсортировывают белки в ССV, AP-3 опосредует перенос некоторых вакуолярных белков путем, независимым от эндосом (Jackson et al., 2010; Robinson et al., 2010; Wang et al., 2023). Комплексы AP-3 и AP-4 участвуют в вакуолярном транспорте белков, так же, как и AP-5, который, по-видимому, может функционировать без участия клатрина (Boehm et al., 2001; Robinson et al., 2001; Wang et al., 2023; Zhang et al., 2024). В клетках млекопитающих AP-5 образует ассоциации с ПЭ / МВТ и обеспечивает ретроградный транспорт белков к ТГС. При идентификации субъединиц AP-5 комплекса у *A. thaliana* хоть и было выявлено сходство последовательностей трех предполагаемых генов с гомологичными генами млекопитающих, но до настоящего времени не ясно, функционирует ли данный комплекс в растениях. Однако, есть косвенные данные, полученные на растениях табака *Nicotiana benthamiana*, указывающие на функционирование субъединиц AP-5 комплекса. (Dahhan et al., 2022; Wang et al., 2023). Белками, которые упаковывают карго в везикулы, являются COPII и COPI (coat proteins), первый – для anterograde транспорта из ЭП в АГ, а второй – для ретроградного транспорта из РЭ в АГ. Известны также белки GGA (Golgi-localizing, gamma-adaptin ear homology domain, ARF-binding) (Hirst et al., 2011, рис. 3.), которые являются мономерными адаптерами для опосредованного клатрином внутриклеточного переноса карго, они имеют С-концевой домен, связанный с доменом придатка с-субъединицы AP-1 (Boehm et al., 2001). Все AP-комплексы, COP-комплексы и белки GGA включены в пост-Гольджи транспорт (Hirst et al., 2011, рис. 3.). К регуляторным белкам везикулярного транспорта относят белки семейства RAB ГТФаз, насчитывающего у *A. thaliana* 57 членов (Nielsen., 2020,

рис. 4.). Семейство делят на 8 подсемейств (RABA – RABH) (Vernoud et al., 2003; Nielsen., 2020; Shi et al., 2023). У растений, некоторые члены подсемейств RABA / RAB11 и RABF / RAB5 локализируются в ТГС и МВТ. RABF1 / ARA6 ассоциируется с МВТ (Ueda et al., 2001; Minamino et al., 2019). Геном *Arabidopsis* кодирует три Rab5-подобных белка RHA1 / AtRabF2a, ARA7 / AtRabF2b и специфический для растений белок ARA6 / AtRabF1. Показано, что RHA1 / AtRabF2a и ARA7 / AtRabF2b отвечают за транспорт белков от АГ к вакуоли (Nielsen., 2020, рис. 4.). (Ebine et al., 2011; Nielsen., 2020; Lu et al., 2024).

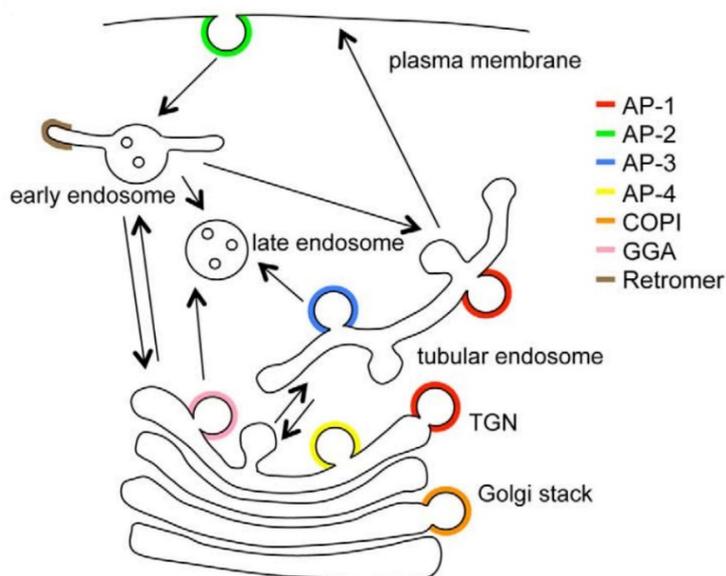


Рис. 3. Пути движения эндосом и участвующие в них комплексы и белки: адаптерные комплексы белков AP-1 – AP-4, гетеромерные комплексы COPI, мономерный адаптер GGA, Retromer – белковый комплекс, направляющий везикулы, несущие карго, по ретроградному пути в АГ. Взято из (Hirst et al., 2011).

Другое семейство малых ГТФаз, вовлеченное в регуляцию везикулярного транспорта, носит название ARF (adenosine ribosilation factor). Как RAB, так и ARF ГТФазы рекрутируют эффекторные белки, которые опосредуют везикуляцию и перенос карго везикулами (Arrazola et al., 2021). Геном *A. thaliana* кодирует 12 ARF ГТФаз. Они выполняют разнообразные транспортные функции, в том числе, рециркуляцию эндосом и вакуолярный транспорт (Singh et al., 2018). В растениях

ГТФазы RAB и ARF могут находиться в неактивной цитозольной форме, связанной с ГДФ и в активной форме, связанной с мембраной и ассоциированной с ГТФ. Активация как RAB, так и ARF ГТФаз зависит от их ассоциации со специфическими GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) белками, которые стимулируют обмен ГТФ / ГДФ. Гидролиз ГТФ способствует активации GAP (GTPase-activating protein).

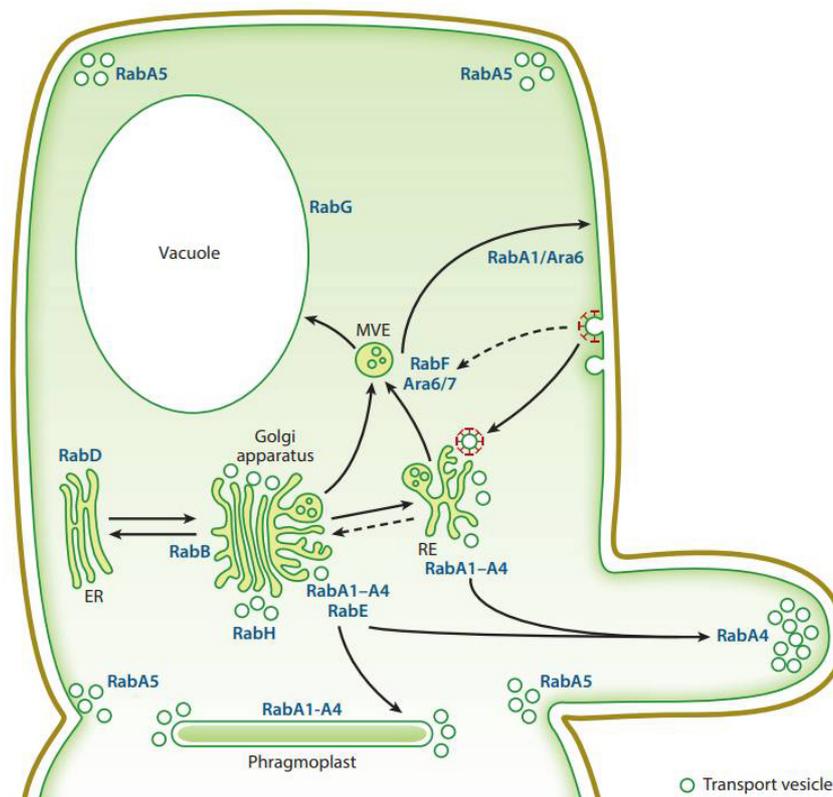


Рис. 4. Пути, регулируемые Rab ГТФазами в растительных клетках. Показаны фрагмопласт и поляризованный вырост клетки. ER – эндоплазматический ретикулум, MVE – мультивезикулярные эндосомы, RE – ретеркулирующие эндосомы. Взято из (Nielsen., 2020).

Важную регуляторную функцию выполняют белковые комплексы ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). Известно 4 таких комплекса, ESCRT-1 – ESCRT-4. Они необходимы для формирования внутренних везикул MBT и загрузки в них белков в клетках дрожжей, млекопитающих, растений и является посредниками в биогенезе MBT (Mulet et al., 2013; Hu et al., 2020).

Мутации по данным генам приводили к образованию дефектных эндосом и к подавлению эндосомального транспорта (Mulet et al., 2013). Важную роль в сортировке карго играют некоторые белки на поверхности эндосом, такие как ретромеры (Hirst et al., 2011, рис. 3.), участвующие в ретроградном переносе везикул от РЭ к ТГС (Chen et al., 2019; Norris et al., 2020). В частности, в дрожжах ретромеры необходимы для извлечения рецептора карбоксипептидазы Y Vps10p (vacuolar protein sorting) – белка, связывающего вакуолярные гидролазы и транспортируемого от эндосом к АГ. Ретромер включает пять различных белков: Vps35p, Vps29p, Vps26p, Vps17p и Vps5p. У млекопитающих эти белки консервативны (Seaman, 2004). У *A. thaliana* также обнаруживаются некоторые ретромерные субъединицы семейства SNX (sorting nexin). К ним относятся три гомолога Vps35 (Vps35a, Vps35b и Vps35c), два гомолога Vps26 (Vps26a Vps26b) и один Vps29 (Jaillais et al., 2007; Heucken et al., 2018). В клетках дрожжей, животных и растений известны белковые комплексы SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor). Белки, входящие в этот комплекс, содержат домен рецептора адаптерного белка, чувствительного к N-этилмалеимиду. SNARE играют ключевую роль в связывании везикул (донор) с мембранами различных органелл (акцептор) и их слиянии при везикулярном транспорте, в том числе в экзоцитозе и эндоцитозе. Комплексы SNARE у растений участвуют в таких процессах как деление клеток, гравитропизм, защита от патогенов, симбиоз и реакции на абиотический стресс (Lipka et al., 2007; Gu et al., 2020). К белкам SNARE, в частности, относятся синаптобrevин 2, VAMP-2 (vesicle associated membrane protein-2) и белки плазматической мембраны синтаксин 1 и SNAP-25 (synaptosomal associated protein-25). SNARE подразделяют на везикулярные белки v-SNARE / R-SNARE, которые включаются в отпочковывающиеся везикулы, и белки мембраны-мишени (target) t-SNARE / Q-SNARE (Gu et al., 2020).

1.4. Клатрин - и флотиллин-зависимые типы эндоцитоза у растений

В растениях различают два типа эндоцитоза: клатрин-зависимый, или клатрин-опосредованный, (clathrin-mediated endocytosis – CME) и флотиллин-зависимый, или флотиллин-опосредованный (микродомен-ассоциированный). Кроме растений оба типа эндоцитоза встречаются и в других эукариотических организмах. CME лучше изучен, чем флотиллин-зависимый эндоцитоз (Fan et al., 2015, рис. 5.). В ходе CME мембранный и внеклеточный материал упаковывается в везикулы, покрытые клатрином, (clathrin-coated vesicles – CCV), которые затем интернализируются клеткой.

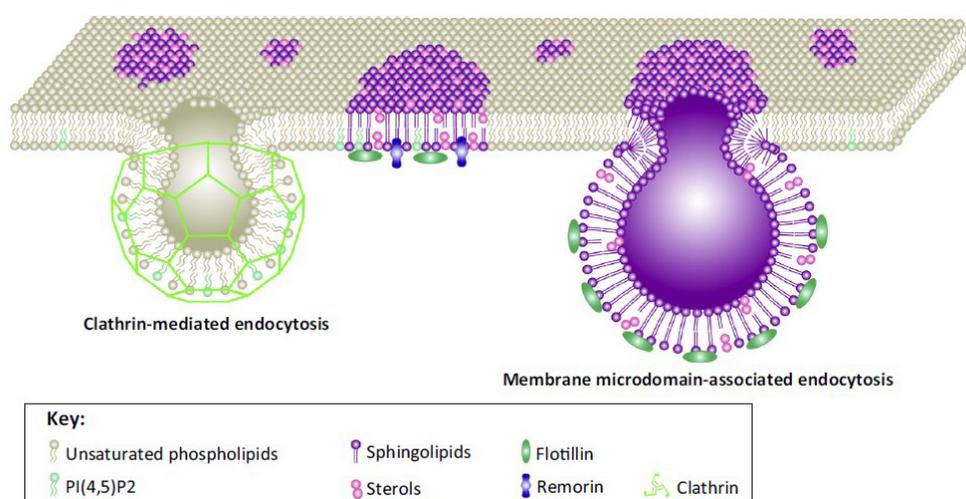


Рис. 5. Эндоцитозные пути у растений: клатрин-опосредованный эндоцитоз и микродомен-ассоциированный (флотиллин-зависимый) эндоцитоз. В ходе клатрин-опосредованного эндоцитоза образуются везикулы, покрытые клатрином. Флотиллин-зависимый эндоцитоз связан с мембранными микродоменами (нанодоменами) ПМ, которые содержат белки флотиллины (Flot). Взято из (Fan et al., 2015).

Клатриновый комплекс состоит из трех тяжелых цепей CHC (heavy chains) и трех легких цепей CLC (light chains). Геном *A. thaliana* содержит два гомологичных гена CHC (*CHC1* и *CHC2*) и три гена CLC (*CLC1*, *CLC2*, *CLC3*). В клатрин-зависимом эндоцитозе, помимо клатрина, участвуют адаптерные белки (AP), динамин-родственные белки – DRP (dynamin related proteins), и кофактор AP180. При инициации инвагинации мембраны, покрытой клатрином, адаптерный

белок, селективный к транспортируемым белкам, специфически связывается с клатрином и с карго. В результате карго собираются в CCV (Traub et al., 2009, Fan et al., 2015; Zhang et al., 2024). В растениях CCV образуются не только на ПМ, но и на мембранах ТГС (Robinson et al., 2014). После инициации клатриновых впячиваний и образования везикул, содержащих карго, происходит окончательная сборка клатринового покрытия с привлечением дополнительных вспомогательных белков (McMahon et al., 2011). Процесс формирования CCV условно разделяют на 5 этапов (Fan et al., 2015, рис. 6.): 1 – образование связи между AP2 с ПМ через PI4,5P (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate), 2 – взаимодействие мембрано-связанного AP2 с клатрином и другими неидентифицированными белками и формирование клатриновой оболочки, 3 – созревание везикулы, покрытой клатрином, при котором белок DRP связывается с шейкой везикулы, 4 – отделение везикулы от ПМ, 5 – высвобождение белков покрывающих везикулы.

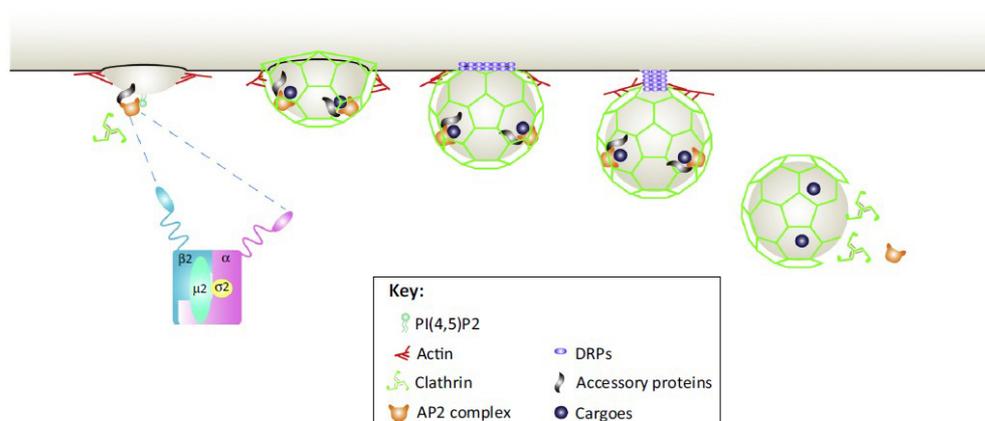


Рис. 6. Клатрин-опосредованный эндоцитоз у растений. Взято из (Fan et al., 2015).

Помимо, клатрин-опосредованного эндоцитоза известен альтернативный путь – флотиллин-зависимый эндоцитоз. Его особенностью является связь с мембранными нанодоменами (рафтами), которые содержат белки флотиллины (Haney et al., 2010; Li et al., 2012; Lu et al., 2024). Везикулы, образующиеся в ходе клатрин- и флотиллин-зависимого типов эндоцитоза различаются по размерам. В первом случае образуются везикулы размером 30 нМ – 85 нМ, во втором – 100 нМ и более. Показано также, что первые более подвижны, чем вторые (Li et al., 2012;

Narasimhan et al., 2020; Lu et al., 2024). СМЕ эндоцитоз играет важную роль во многих физиологических процессах у растений, таких как рост, полярность клеток, передача межклеточных сигналов, поглощение питательных веществ, реакция на стресс и защита от патогенов (Zwiewka et al., 2015; Yoshinari et al., 2016; Narasimhan et al., 2020).

1.5. Детергент-устойчивая фракция мембран, флотиллины

В мембранах клеток растений, животных, дрожжей и бактерий имеются области, которые отличаются от своего окружения по своим физическим свойствам и химическому составу. Они обогащены стеринами, сфинголипидами, насыщенными фосфолипидами и содержат гликозилфосфатидилинозитол (glycosylphosphatidylinositol -GPI)-заякоренные и интегральные белки. При обработке мембран холодными неионными детергентами, например тритоном X-100, указанные области образуют нерастворимую фракцию детергент-устойчивых мембран (Brown, et al., 1992; Yepes-Molina et al., 2020). Они связаны с формированием специфических мембранных микро / нанодоменов (10–200 нм), известных также как липидные рафты (Kwiatkowska et al., 2020; Cao et al., 2020; Ma et al., 2022; Li et al., 2023). Рафты служат «распределяющими платформами» для различных белков, они участвуют в распределении (sorting) белков и липидов и в активации путей передачи сигналов, изменяя содержание в мембране рецепторов. Такой механизм, в частности, важен для ответа клеток на атаки патогенов (Plociennikowska et al., 2015; Cao et al., 2020). Рафты включают белки суперсемейства SPFH (stomatin / prohibitin / flotillin / HflK / C), эти белки содержат консервативный домен SPFH (Browman et al., 2007; Yu et al., 2020). Члены этого суперсемейства участвуют в регуляции содержания ионных каналов в мембране, везикулярном транспорте белков и липидов и во взаимодействии мембран и цитоскелета (Langhorst et al., 2005). В суперсемейство белков, содержащих домен SPFH, входят и флотиллины. Они являются мембраносвязанными белками и могут локализоваться как на ПМ, так и на эндосомах. У *A. thaliana* известно три белка-

флотиллина: AtFlot1 / AtFlot1a, AtFlot2 / AtFlot1b, AtFlot3. Транскрипция *AtFlot1* и *AtFlot2* происходит преимущественно в побегах, тогда как *AtFlot3* транскрибируется главным образом в разных частях цветка и стручках. У растений флотиллины изучены в меньшей степени, чем у животных и дрожжей. Тем не менее показано, что у растений флотиллины необходимы для развития проростков, участвуют в сортировке и рециркуляции белков через эндосомальные компартменты, в передаче иммунных сигналов и в клатрин-независимом, или флотиллин-зависимом (опосредованном) эндоцитозе (Li et al., 2012; Yu et al., 2017). Флотиллины вовлечены в сборку нанобластей ПМ и эндосом (Kwiatkowska et al., 2020), участвуют во взаимодействии растений и патогенов (Cheng et al., 2021, в процессы, регулирующие водный статус растений и внутриклеточный транспорт веществ (Hao et al., 2014; Junková et al., 2018).

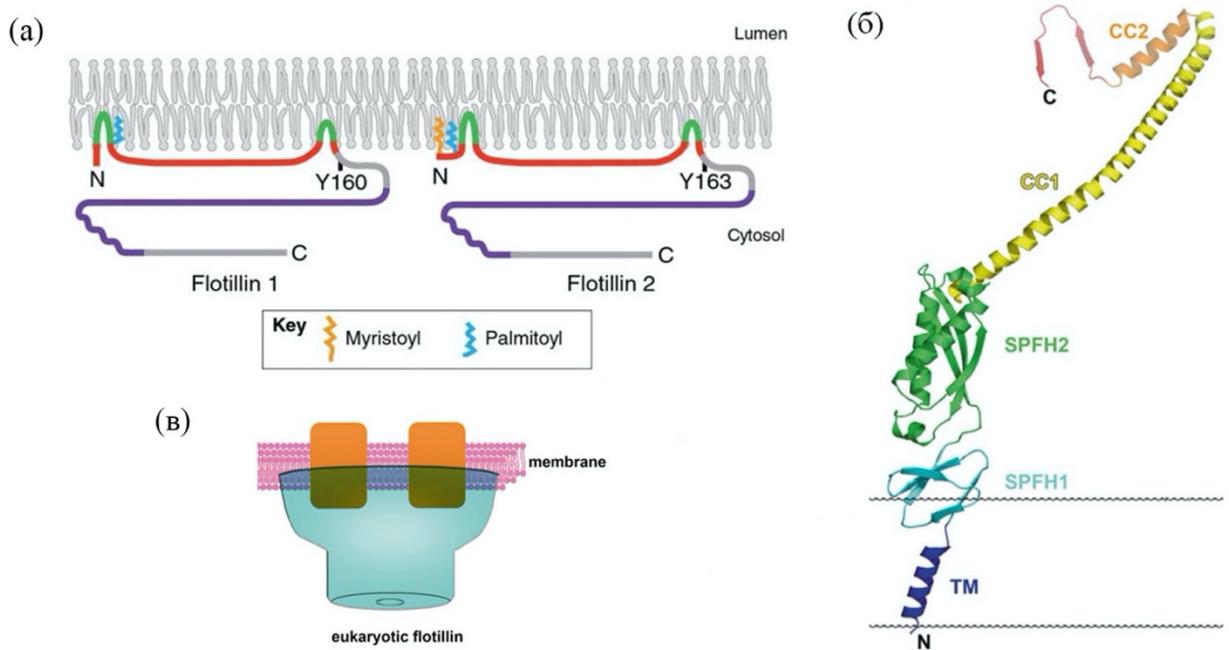


Рис. 7. Мембранная топология и структура белков суперсемейства SPFH: (а) мембранная топология флотиллинов клеток млекопитающих. Взято из (Otto et al., 2011), (б) наиболее вероятная структура и мембранная топология флотиллинов растений. Взято из (Ma et al., 2022), (в) представление о функциональных мембранных микродоменах / нанодоменах белков суперсемейства SPFH у эукариот, взято из (Ma et al., 2022), оранжевые прямоугольники – функциональный белок, встроенный в мембрану.

Поскольку флотиллины не обладают функциями, такими, как у ферментов или транспортеров, их роль, вероятно, состоит во влиянии на другие белки через белок-белковые взаимодействия (Ma et al., 2022). Мембранная топология и структура белков суперсемейства SPFH и, в частности флотиллинов (рис. 7.), лучше изучена у бактерий, дрожжей и млекопитающих и в меньшей степени у растений. На рис. 7а, показано, что N-концевые участки флотиллинов млекопитающих (выделено красным цветом) содержат 2 гидрофобные области (выделено зеленым цветом), образующие шпильки, которые включают ковалентно-связанные остатки жирных кислот (миристиновой и пальмитиновой), с помощью которых осуществляется взаимодействие белка с липидным бислоем. Как флотиллин 1, так и флотиллин 2 содержат ключевые остатки тирозина (Y-160 и Y-163). Далее располагается консервативный домен (выделено фиолетовым цветом), содержащий альфа-спиральную область (волнистые линии), которая может участвовать в олигомеризации. У флотиллинов растений (рис. 7 б.) не обнаружено сайтов пальмитоилирования и миристоилирования, поэтому механизм заякоревания у них отличается от такового у животных (Daněk et al., 2016). Наиболее вероятно, что заякоревание у растительных флотиллинов осуществляется с помощью гидрофобных аминокислот. На рис. 7 в, показано, что флотиллины участвуют в формировании мембранных микро / нанодоменов, создавая платформы для функциональных белков (Ma et al., 2022).

1.6. Регуляция содержания белков в мембранах посредством везикулярного транспорта

В данном разделе приведены примеры реконструкции (ремоделирования) белкового состава мембран через везикулярный транспорт, включая экзоцитоз и эндоцитоз. Такие изменения в составе мембран происходят с большой скоростью, что позволяет клеткам быстро и адекватно отвечать на различные внутренние и внешние стимулы (Surpin et al., 2004; Zhang et al., 2022; Law et al., 2022). Хорошо известным примером такой регуляции являются изменения содержания

аквапоринов PIP2;1 и PIP1;2 (plasma membrane intrinsic proteins) ПМ в ответ на засоление (100 мМ NaCl). Ряд авторов (Luu et al., 2012; Takano et al., 2017; Kurowska et al., 2021), используя методы флуоресцентной лазерной микроскопии и GFP, выявили два пула указанных аквапоринов в клетках эпидермы корней *A. thaliana*. Один пул был связан с ПМ, а другой – с эндосомами. В отсутствие засоления, перенос аквапоринов был высокочувствительным к тирфостину A23 – ингибитору клатрин-зависимого эндоцитоза. Циклический перенос этих белков между двумя указанными пулами ускорялся в условиях засоления и был менее чувствителен к тирфостину A23. Активность эндоцитоза возрастала за счет флотиллин-зависимого эндоцитоза. При этом значительная часть аквапоринов из ПМ перемещалась в эндосомы. Физиологическое значение такого перемещения состоит в снижении водной проницаемости ПМ и сбережении воды в клетках в условиях снижения водного потенциала среды.

Еще одним примером регуляции мембранного белка посредством везикулярного транспорта являются изменения содержания входного (inward rectifying) калиевого канала KAT1 в ПМ замыкающих клеток устьиц у *A. thaliana*. Содержание этого канала в ПМ возрастает при открывании устьиц и уменьшается при закрывании. Закрывание устьиц, может быть инициировано обработкой клеток эпидермы абсцизовой кислотой (АБК) (Blatt et al., 2000). В естественных условиях АБК контролирует транспорт ионов и транспирацию. АБК инициирует селективный эндоцитоз, при котором KAT1 транспортируется эндоцитозными везикулами от ПМ к эндосомам, где может сохраняться или направляться на деградацию в вакуоль. В результате снижения содержания KAT1 в ПМ происходит уменьшение потока K^+ в замыкающие клетки, поступление воды в клетки замедляется, клеточный тургор падает, приводя к замыканию устьиц (Peng et al., 1994; Nieves-Cordones et al., 2022). Для высших растений в ходе роста и развития необходим бор, который является важным биогенным элементом. Растения должны адаптироваться как к условиям ограниченного поступления бора, так и к избытку этого элемента в среде. При высокой концентрации бор токсичен,

например, в засушливых и полузасушливых районах (Nable et al., 1997). При исследовании кончика корня с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было показано, что боратный транспортер BOR1, слитый с флуоресцентным белком GFP, локализован в ПМ. Для того, чтобы избежать излишнего накопления бора в клетках, BOR1 переносится из ПМ эндоцитозными везикулами в эндосомы, откуда далее он может переноситься в вакуоль для деградации (Takano et al., 2005; Yoshinari et al., 2019). В условиях дефицита бора в почве, например, при обильных дождях, BOR1 доставляется к ПМ за счет активирования экзоцитоза (Lordkaew et al., 2011).

Регуляция содержания в ПМ показана также для белка, ответственного за поглощение железа клетками корня, высокоаффинного транспортера железа IRT1 (IRON-REGULATED TRANSPORTER 1). Этот белок локализован в ПМ и его содержание в мембране зависит от концентрации железа в среде. Поступление в клетку железа регулируется изменением содержания IRT1 в ПМ. При высоких концентрациях железо токсично для растений. Сверхэкспрессия IRT1 у *A. thaliana* приводила к его накоплению в ПМ, вызывая избыток железа в тканях и окислительный стресс. При визуализации IRT1 в корневых волосках с помощью GFP с использованием конфокальной микроскопии IRT1 обнаруживался в ТГС/РЭ, куда он доставлялся посредством эндоцитоза. Эндосомальная локализация данного белка зависела от его моноубиквитинирования. Позже IRT1 обнаруживался в вакуоли. У мутанта, в котором IRT1 не подвергался убиквитинированию, он обнаруживался в ПМ. В мутантных растениях, в которых железо поглощалось в избытке, развивался окислительный стресс, приводящий к некрозу листьев и снижению роста, что приводило к гибели растений (Barberon et al., 2011; Ivanov et al., 2021).

Еще одним примером регуляции содержания белка в мембранах с помощью везикулярного транспорта является перенос транспортеров гормона роста ауксина, относящихся к семейству PIN-FORMED (PIN1 и PIN2) (Estelle et al., 2001; Laxmi et al., 2008; Narasimhan et al., 2021). Через эти белки осуществляется выход ауксина из

клеток. Ауксин синтезируется преимущественно в клетках апикальной меристемы корня. Направленный рост органа достигается благодаря неравномерному (полярному) распределению ауксина в клетках, что, в свою очередь, достигается полярной локализацией белков PIN1 и PIN2. Белки PIN подвергаются конститутивной рециркуляции между ПМ и эндосомами, определяя направление потока ауксина (Geldner et al., 2003; Jaillais et al., 2006; Wisniewska et al., 2006; Agneessens & Julien 2024). Удаление этих белков из ПМ через активирование эндоцитоза (или ингибирование экзоцитоза) на растущем конце клетки приводит к накоплению в этом месте ауксина и росту клетки в данном направлении. Локализация белков PIN в клетках корня, зависит от действия ряда внешних и внутренних факторов. В частности, свет влияет на развитие корней и влияние света осуществляется через изменения содержания PIN и, соответственно, ауксина в ПМ. У проростков, выращенных в темноте, локализация PIN2 в ПМ была снижена и повышена в вакуолях, в то время как у проростков, выращенных на свету, PIN2 обнаруживался в ПМ. Если растения, выращенные на свету, переносили в темноту, на постоянный красный или дальний красный свет, PIN2 снова обнаруживался в вакуолярных компартментах (Laxmi et al., 2008).

Азот усваивается растениями в неорганической (нитрат и аммоний) и органической (мочевина, аминокислоты) формах (Miller et al., 2007; Hao et al., 2020). Аммоний является одним из основных источников неорганического азота. У *A. thaliana* известны аммониевые транспортеры, осуществляющие поглощение нитрата. Они относятся к одному семейству *AMMONIUM TRANSPORTER* (AMT), которые включают шесть изоформ (AMT1;1 – AMT1;6) (Yuan et al., 2007). AMT являются высоко-аффинными аммониевыми транспортерами, функционирующими при микромолярных концентрациях аммония. Однако, в миллимолярных концентрациях аммоний токсичен для растений, приводя к изменениям внутриклеточного pH, окислительному стрессу и в целом к ингибированию роста (Britto et al., 2002; Esteban et al., 2016; Araya et al., 2016; Hao et al., 2020). В этих условиях поглощение аммония клетками корня должно быть снижено. Одним из

известных способов регуляции активности АМТ1;1 является изменение статуса фосфорилирования ключевого остатка треонина (Т460) на С-конце белка. При низком уровне аммония Т460 дефосфорилируется, открывая транспортную пору для поглощения аммония. При высоких концентрациях аммония АМТ1;1 инактивируется путем фосфорилирования Т460 (Loqué et al., 2007; Lanquar et al., 2009). Помимо изменения статуса фосфорилирования ключевого треонина известна регуляция активности аммониевого транспортера посредством везикулярного транспорта. Повышенный уровень аммония в цитоплазме запускал удаление АМТ1;3 из плазматической мембраны посредством кластеризации этого белка и последующего эндоцитоза, таким образом блокируя поступление аммония в клетку. В интернализацию белка был вовлечен клатрин-зависимый, но не флотиллин-зависимый эндоцитоз. (Wang et al., 2013; Liu et al., 2017).

1.7. Н⁺АТФаза Р- типа

1.7.1. Общие сведения

Н⁺-АТФаза Р-типа обнаруживается в клетках всех эукариот. Этот фермент локализован в ПМ и является протонным насосом, осуществляющим активный транспорт Н⁺ из цитоплазмы в экстрацеллюлярное пространство за счет богатой энергией фосфатной связи АТФ. Благодаря функционированию Н⁺АТФазы на ПМ создается градиент электрохимического потенциала протонов ($\Delta\mu_{H^+}$).

$\Delta\mu_{H^+} = RT \ln c^o/c^{in} - FE_m$, где c^o и c^{in} – концентрации Н⁺ в среде и цитоплазме, соответственно; E_m – трансмембранный электрический потенциал; R , T , F – имеют обычные термодинамические значения.

$\Delta\mu_{H^+}$ является протондвижущей силой (ПДС) и может использоваться для вторичных активных транспортов различных веществ, например для поглощения нитрата, фосфата и других ионов, несущих биогенные элементы, или для выведения из клеток ионов Na⁺, которые в больших концентрациях токсичны для растений (Axelsen et al., 1998; Haruta et al., 2015; Li et al., 2022). Н⁺АТФаза Р-типа

вовлечена во множество биохимических процессов и физиологических функций, включая поддержание ионного гомеостаза и pH-статирование цитоплазмы (Zhou et al., 2021), рост растений и участие в ответах на стрессы (Siao et al., 2020; Li et al., 2021; Li et al., 2022) функционирование замыкающих клеток устьиц и многие другие (Inoue et al., 2017; Li et al., 2022).

1.7.2. Структура H⁺-АТФаза Р-типа

В растениях *A. thaliana* H⁺-АТФаза Р-типа представляет собой трансмембранный полипептид с N- и С-концевыми участками, расположенными на цитоплазматической стороне ПМ (рис. 8.). Ее молекулярный вес составляет приблизительно 100 кДа. Молекула АТФазы включает 10 трансмембранных спиралей и четыре гидрофильных домена: А – активаторный (activating), Р – фосфорилирующий (phosphorylating), N – связывающий нуклеотиды (nucleotide binding), и R – регуляторный (regulatory), которые обращены в цитоплазму (Palmgren et al., 2001; Michalak et al., 2022). Домен А включает N-концевую последовательность белка вместе с небольшой петлей, расположенной между второй и третьей спиралью. Между четвертой и пятой спиралью находится большая петля, которая образована Р- и N-доменами. В ходе каталитического цикла H⁺-АТФазы происходит фосфорилирование остатка аспартата в консервативной последовательности DKTGTLT, расположенной в домене Р. Нуклеотид-связывающий N-домен является сайтом связывания АТФ. На С-концевой последовательности АТФазы находится регуляторный R-домен, содержащий две области аутоингибирования и сайт связывания регуляторного белка 14-3-3 (рис. 8.) (Duby et al., 2009; Michalak et al., 2022). Кроме петель, обращенных в цитоплазму, имеются пять петель, связывающих между собой трансмембранные домены на апопластной стороне ПМ. У многих видов растений изоформы H⁺-помпы ПМ кодируются мультигенным семейством. У модельного растения *A. thaliana* идентифицировано 12 генов H⁺-АТФазы (*AHA1- AHA12*) (Gaxiola et al., 2007; Li et al., 2022). *AHA1* и *AHA2* являются наиболее интенсивно экспрессирующимися

генами. *ANA1* обнаруживается в побегах, тогда как *ANA2* преимущественно в корнях, особенно в корневых волосках (Axelsen et al., 2001). Экспрессия *ANA3*, *ANA4*, *ANA11* зависит от типа ткани. Например, высокий уровень экспрессии *ANA4* наблюдается в эндодерме корней (Vitart et al., 2001). Ген *ANA5* демонстрирует низкий уровень экспрессии во всем растении, *ANA6* и *ANA9* преимущественно экспрессируются в пыльниках, *ANA7* и *ANA8* в пыльце, тогда как *ANA10* – в стручках (Houlne et al., 1994; Baxter et al., 2005). Мультигенные семейства H^+ -АТФазы ПМ обнаруживаются также и у других растений, в частности 9 генов (*PMA1-PMA9*) у табака *Nicotiana plumbaginifolia*. Десять генов были идентифицированы у риса *Oryza sativa* (*OSA1- OSA10*) (Baxter et al., 2003; Li et al., 2022), 10 – у огурца *Cucumis sativus* (*CsHA1- CsHA10*) (Wdowikowska et al., 2016), 10 – у томата (*LHA1- LHA10*) *Lycopersicon esculentum* (Kalampanayil et al., 2001) и 4 гена у кукурузы (*MHA1- MHA4*) *Zea mays* (Santi et al., 2003).

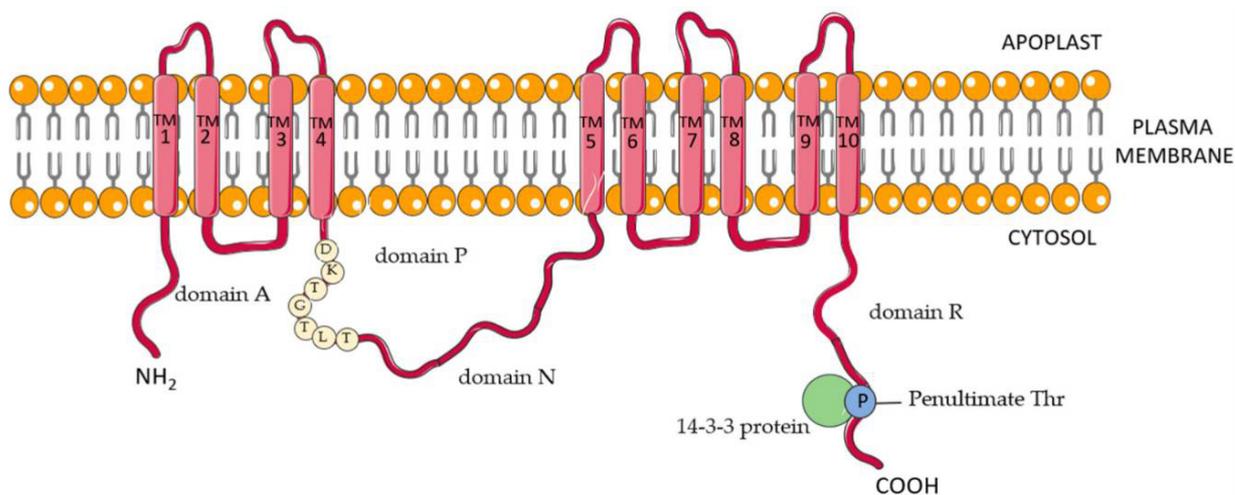


Рис. 8. Мембранная топология H^+ АТФазы Р-типа ПМ растений. Взято из (Michalak et al., 2022).

1.7.3. Каталитический цикл H^+ -АТФазы Р-типа

H^+ -АТФаза Р-типа осуществляет однонаправленный первичный активный транспорт протона. В этом процессе важную роль играют несколько консервативных аминокислотных остатков, входящих в состав фермента. В ходе

каталитического цикла H^+ -АТФаза Р-типа претерпевает конформационные изменения. Различают два конформационных состояния фермента: E_1 и E_2 (рис. 9.). В конформации E_1 трансмембранный сайт связывания имеет высокое сродство к H^+ и АТФ, а в конформации E_2 – низкое сродство к ним. Цикл начинается с присоединения протона и АТФ к ферменту в состоянии E_1 (1 этап), затем происходит фосфорилирование фермента с образованием макроэргической ацил-фосфатной связи и освобождение АДФ (2 этап) (рис. 9.). Фосфорилирование белка осуществляется γ -фосфатом АТФ. Далее фермент переходит из состояния E_1 в состояние E_2 (3 этап), после чего следует освобождение H^+ на наружной стороне мембраны (4 этап), освобождается P_i (5 этап) и фермент переходит в E_1 форму (6 этап) (рис. 9.). Указанные два состояния фермента формируются в результате образования и распада фосфофермента. Процесс сопровождается связыванием протонов на одной стороне мембраны, и их транслокацией и высвобождением на другой стороне мембраны (Morsomme et al., 2000; Buch-Pedersen et al., 2003; Niggli et al., 2008).

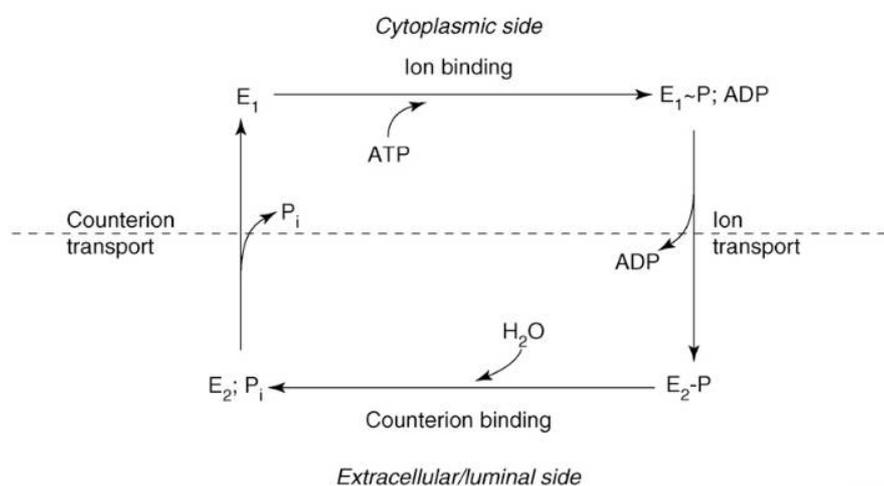


Рис. 9. Каталитический цикл H^+ -АТФазы Р-типа. E_1 и E_2 – конформационные состояния АТФазы. Взято из (Niggli et al., 2008).

В ходе каталитического цикла домены протонной помпы (N, P, A), расположенные в цитоплазме, функционируют вместе, приводя последовательно к аутофосфорилированию и дефосфорилированию фермента. Фосфорилированию

подвергается консервативный остаток Asp в домене P при связывании АТФ с доменом N. Последующее дефосфорилирование домена P катализируется остатком Glu в домене A. Переход в состояние E₁P связан с протонированием этого аминокислотного остатка. Конформационные изменения в трансмембранном домене (TM6), в котором располагается консервативный остаток Asp, в ходе каталитического цикла сопровождается перемещением белка и переносом протона на другую сторону мембраны. В фосфорилированном состоянии E₁ сайт связывания протона открыт на цитоплазматической стороне. АТФ-зависимое фосфорилирование приводит к промежуточной форме E₁P, которая далее спонтанно превращается в E₂P. Дефосфорилирование E₂P способствует образованию E₂, который спонтанно превращается в E₁ (Morsomme et al., 2000; Buch-Pedersen et al., 2006; Niggli et al., 2008). Консервативный остаток аминокислоты Asp в трансмембранном домене TM6 (Asp684 в изоформе *ANA2* у *A. thaliana*) представляет собой молекулярный фактор, участвующий в транслокации протонов, который действует как акцептор / донор протонов. Карбоксильная боковая цепь аминокислоты Asp684 способствует связыванию и транслокации протонов (Morsomme et al., 2000; Buch-Pedersen et al., 2003; Niggli et al., 2008). Аминокислотный остаток Asn106 в домене TM2 вместе с Asp684 играет важную роль в контроле транспорта протонов против электрохимического градиента. Остаток аргинина (Arg655) в домене TM5 из-за его расположения на стороне, противоположной Asp684, рассматривается как защита от обращения транспорта протона. Arg655 и Asp684 расположены близко друг к другу. Положительный заряд Arg655 обеспечивает отделение H⁺ от Asp684 и ингибирует присоединение наружных протонов к Asp684 (Buch-Pedersen et al., 2009). Предполагается, что H⁺-АТФаза P-типа переносит один протон за счет гидролиза одной молекулы АТФ (Palmgren et al., 2001). Однако в некоторых случаях стехиометрия (H⁺/АТФ) может нарушаться. Может быть частичное разобщение гидролиза АТФ и транспорта протонов. Ионы калия могут индуцировать быстрое дефосфорилирование

фермента E_1P . Таким образом K^+ может действовать как разобшиитель насоса (Morsomme et al., 2000; Niggli et al., 2008; Buch-Pedersen et al., 2009).

1.7.4. Регуляция H^+ -АТФазы Р-типа

H^+ АТФаза Р-типа вовлечена во многие биохимические процессы и физиологические функции, поэтому в процессе эволюции сформировалась сложная система регуляции этого фермента, позволяющая изменять его активность при действии различных внешних и внутренних факторов. Важнейшую роль в регуляции активности H^+ -АТФазы играет С-концевой участок, на котором имеются множественные сайты фосфорилирования, в частности в R-домене (приблизительно, 100 аминокислотных остатков (а.о.)) (Rudashevskaya et al., 2012; Haruta et al., 2015). R-домен называют также аутоингибиторным доменом, так как он блокирует ферментативную активность. У *ANA2* в R-домене имеются, по крайней мере, 8 а.о., которые могут подвергаться фосфорилированию. Соответственно, имеется набор протеинкиназ и фосфатаз, которые регулируют статус фосфорилирования белка и, соответственно, его активность. Фосфорилирование-дефосфорилирование сайтов в R-домене обеспечивает возможность сложной и гибкой регуляции активности этого фермента (Fuglsang et al., 2021). Имеются пептиды, влияющие на фосфорилирование и дефосфорилирование сайтов R-домена. Например, в *ANA2* проростков *A. thaliana* фосфорилирование Thr881 индуцируется рост-стимулирующим пептидом (PSY1), тогда как фосфорилирование Ser899 индуцируется рост-ингибирующим пептидом, фактором быстрого защелачивания, Rapid Alkalinization Factor (RALF) (Haruta et al., 2014; Fuglsang et al., 2014). Другим примером сложной регуляции активности H^+ -АТФазы Р-типа является действие элиситора защитной реакции, бактериального пептида flg22, который стимулирует фосфорилирование Ser899 и подавляет фосфорилирование Thr881 и Thr947 в клеточной культуре (Nuhse et al., 2007). Предпоследний С-концевой Thr947 в *ANA2* играет ключевую роль среди сайтов фосфорилирования фермента (Olsson et al., 1998). Являясь главным

регуляторным сайтом, подвергающимся фосфорилированию, он принимает сигнал от ауксина и синего света, активирующего фермент (Takahashi et al., 2012). Активация фермента ауксином связана с активацией роста этим гормоном. При изучении роста клеток растяжением было показано, что ауксин стимулирует H^+ -АТФазу Р-типа (Rayle et al., 1992). В отличие от ауксина, АБК подавляет активность протонной помпы, как это, например, происходит в замыкающих клетках устьиц при закрывании устьичной щели (Bobik et al., 2010). Активация фермента синим светом играет важную роль в функционировании замыкающих клеток устьиц и устьичной проводимости. Под действием синего света активируется сигнальный каскад, что приводит к образованию комплекса H^+ -АТФазы с белком 14-3-3 (Inoue et al., 2017). Фосфорилирование Thr947 соответствующими киназами делает возможным присоединение регуляторного белка 14-3-3 (Svennelid et al., 1999; Palmgren et al., 2019). Активация H^+ -АТФазы происходит в результате конформационного изменения С-концевого участка фермента при присоединении белка 14-3-3, что снимает аутоингибирование. Регуляторные белки 14-3-3 относятся к большой группе растворимых белков, участвующих в регуляции активности многих других белков. 14-3-3 связывается с H^+ -АТФазой Р-типа в виде димера, контактная область включает 28 С-концевых аминокислотных остатков помпы. Кроме предпоследнего треонина в этой области могут фосфорилироваться различные другие аминокислотные остатки. Фосфорилирование Ser931 в АНА2 предотвращает связывание белка 14-3-3 и снижает активность фермента (Fuglsang et al., 2007; Fuglsang et al., 2021). Подавление активности, по-видимому, происходит за счет блокирования конформационных изменений фермента в каталитическом цикле (Pedersen et al., 2007). У некоторых видов табака, например *Nicotiana plumbaginifolia*, кроме предпоследнего треонина Thr955, были идентифицированы еще два сайта фосфорилирования, Thr931 и Ser938. Их фосфорилирование препятствует связыванию белков 14-3-3 и, следовательно, активации протонной помпы. Замены Thr931 и Ser938, на другие аминокислотные остатки приводили к неспособности

домена H^+ -АТФазы к связыванию с белком 14-3-3 с С-концевой последовательностью (Duby et al., 2009). N-концевой домен, так же как и С-концевой домен, принимает участие в регуляции H^+ -АТФазы ПМ растений. Оба концевых домена участвуют в аутоингибировании. Конформационные изменения N-концевого домена сочетаются с изменениями, происходящими в С-концевом домене. Было показано, что у дрожжей мутация в N-концевой области активировала H^+ -АТФазу. При модификации N-концевого домена происходила демаскировка С-концевого домена, что позволяло протеинкиназам фосфорилировать предпоследний треонин. Это, в свою очередь, приводило к активации H^+ АТФазы ПМ (Ekberg et al., 2010). H^+ -АТФаза Р-типа, образуя комплекс с белком 14-3-3, переходит в активное (функциональное) состояние. Комплекс имеет гексамерную структуру, которая образована 6 молекулами H^+ -АТФазы и 6 молекулами белка 14-3-3. Такая структура, образует канал для протона (Kabała et al., 2023) (рис. 10.). Важную роль в транспорте протона играют стеринны, содержащиеся в нанодоменах. Их удаление, например обработкой растений метил- β -циклодекстрином, приводило к утечке протонов и к потере активности фермента (Nguyen et al., 2018). Следует также отметить, что абиотические стрессоры, такие как холод, активные формы кислорода (АФК) и кислая среда подавляют фосфорилирование Thr947.

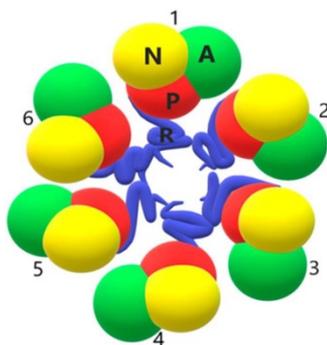


Рис. 10. Схематическая модель функционального гексамера ПМ H^+ -АТФазы. Взято из (Kabała et al., 2023).

1.7.5. Вторично-активные $\Delta\mu H^+$ -транспортеры

Большая часть ионов, несущих биогенные элементы, поглощается клетками растений за счет энергии $\Delta\mu H^+$, создаваемой H^+ -АТФазой ПМ. Рассмотрим в качестве примера поглощение нитрата, аммония, фосфата и калия. В поглощение нитрата вовлечены белки нескольких семейств. Важнейшими являются NRT1 (NITRATE TRANSPORTER 1)/NPF (PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY) и NRT2 (NITRATE TRANSPORTER 2). Первый относится к низко-аффинной транспортной системе, а второй – к высоко-аффинной транспортной системе. Следует отметить, что белки семейства NPF способны транспортировать как нитрат, так и многие другие вещества, в частности, глюкозинолаты, ауксин, пептиды, аминокислоты, нитрит, гиббереллины и АБК (Kanstrup et al., 2022) Несмотря на принадлежность к семейству низко-аффинных транспортеров, белок из *A. thaliana* NPF6.3, играющий существенную роль в поглощении нитрата корнем, может функционировать как в низко-аффинном, так и в высоко-аффинном режиме, в зависимости от концентрации нитрата в среде (Liu et al., 1999; Tsay et al., 2007; Kanstrup et al., 2022). Отличительной чертой белков высоко-аффинного семейства нитратных транспортеров NRT2 является их способность поглощать нитрат только в том случае, если они образуют комплекс с белком-партнером семейства NAR. В частности, для поглощения нитрата белок NRT2.1 должен образовать комплекс с NAR2.1. (Yong et al., 2010; Kotur et al., 2012) Последний вносит основной вклад в поглощении нитрата корнями при различных условиях, за исключением случаев сильного нитратного голодания (Cerezo et al. 2001; Filleur et al., 2001; Li et al., 2007; Tahir et al., 2021). Перенос нитрата в клетки нитратными транспортерами обоих семейств, происходит сопряжено с транспортом H^+ в том же направлении (симпорт) со стехиометрией $2H^+/1NO_3^-$ и стимулируется при смещении рН среды в кислую область.

Азот может поглощаться клетками растений также в виде аммония (аммиака). Важную роль в транспорте этих веществ играют аммонийные

транспортеры семейства АМТ (AMMONIUM TRANSPORTER). Рассматриваются различные варианты электрогенного транспорта аммония белками этого семейства, через ПМ: а) унипорт ионов аммония по градиенту электрохимического потенциала, б) депротонирование иона аммония в наружной среде с последующим поглощением клеткой образовавшегося аммиака в симпорте с протоном, в) симпорт содержащегося в среде аммония с протоном в клетку. В случае а) вклад в движущую силу поглощения аммиака клеткой вносит трансмембранный электрический потенциал, который генерируется H^+ -АТФазой. В случаях б) и в) движущей силой поглощения аммиака / аммония клеткой, является градиент электрохимического потенциала протонов (McDonald et al., 2016).

Фосфор поглощается из почвы и усваивается растениями в форме ортофосфата. Различают системы поглощения фосфата с низким и высоким сродством. Гены фосфатных транспортеров (PHOSPHATE TRANSPORTER) идентифицированы у *A. thaliana* и сгруппированы в 4 семейства РНТ1, РНТ2, РНТ3 и РНТ4. Перенос фосфата в клетку, так же, как и нитрата, происходит сопряженно с транспортом H^+ в том же направлении (симпорт) со стехиометрией $2H^+$ или $4H^+/P$ и зависит от рН (Versaw et al., 2002).

В отличие от транспорта нитрата и фосфата, который осуществляется транспортерами, K^+ переносится в клетку через катионные каналы. Хотя концентрация K^+ в среде намного ниже, чем в цитоплазме растительной клетки, K^+ транспортируется в клетку по градиенту электрохимического потенциала благодаря гиперполяризации мембраны, происходящей при включении H^+ -АТФаза ПМ. Важную роль в поглощении K^+ играют внутрь-выпрямляющие (inward rectifying) катионные каналы устьичных клеток, КАТ1 и КАТ2 *A. thaliana*. Входной калиевый канал клеток корней АКТ1 формирует комплекс с AtКС1. Последний представляет собой, также канал, но сам не участвует в переносе ионов, однако делает АКТ1 потенциал-зависимым при формировании с ним комплекса (Pandey et al., 2020).

1.7.6. Физиологическая роль H⁺-АТФазы Р-типа и ее участие в адаптации растений к абиотическим стресс-факторам

H⁺-АТФаза Р-типа играет важную роль в росте клеток (Oufattole et al., 2000; Li et al., 2022). Фитогормон ауксин, повышающий активность протонной помпы ПМ, и соответственно, приводящий к закислению апопласта, стимулирует процессы, ответственные за удлинение и рост клеток (Takahashi et al., 2012; Li et al., 2021). Снижение рН апопласта активирует белки, которые осуществляют разрыхление клеточной стенки путем воздействия на полисахаридную сеть (Marowa et al., 2016). Кроме того, активация H⁺-АТФазы приводит к гиперполяризации ПМ, что запускает приток ионов K⁺ в клетки, приводя, в свою очередь, к поглощению воды и повышению тургора (Hager et al., 2003; Philippar et al., 2004). Помимо роста, H⁺-АТФаза участвует в открывании устьиц. Устьица играют важную роль в газообмене листьев и обеспечении процесса фотосинтеза углекислым газом. Гиперполяризация ПМ, происходящая в ответ на активацию H⁺-АТФазы замыкающих клеток, приводит к массивному притоку в них ионов и их набуханию (Shimazaki et al., 2007). Активация протонной помпы ПМ замыкающих клетках устьиц индуцируется синим светом, который воспринимают рецепторы фитотропины (phot1 и phot2), являющиеся протеинкиназами (Kinoshita et al., 2002). Поглощение различных заряженных соединений осуществляется транспортерами или происходит через каналы (Sasaki et al., 2016) (см. раздел 1.7.5.).

Одним из основных абиотических стрессовых факторов является почвенное засоление, оказывающее как токсическое, так и осмотическое действие на растения (Строгонов, 1962; Alvarez et al., 2003; Zhao et al., 2020). Солеустойчивость растений включает в себя как осмотическую адаптацию на уровне клеток, органов и всего растения, так и внутриклеточный ионный гомеостаз (Niu et al., 1993; Zhao et al., 2020). В условиях повышенного содержания NaCl в среде ионы натрия пассивно поступают в клетки корня через неселективные катионные каналы. Высокоаффинный переносчик AtНКТ1, являющийся симпортером K⁺ и Na⁺,

извлекает Na^+ из ксилемного потока и тем самым защищает надземные органы от токсического действия Na^+ . Переносчики НКТ1 играют важную роль в поддержании баланса между ионами Na^+ и K^+ при солевом стрессе (Ali et al., 2019). Для предотвращения накопления токсичного Na^+ в цитоплазме, осуществляется активный экспорт этого иона в апопласт и компартментализация в вакуоли. Соответственно, у *A. thaliana* идентифицированы Na^+/H^+ антипортеры, в ПМ – SOS1 (Salt Overly Sensitive 1), а в тонопласте – NHX1 (Bassil et al., 2019). Активация этих белков зависит от содержания NaCl в среде (Shi et al., 2000; Shi et al., 2003). Следует отметить, что для экспорта ионов натрия Na^+/H^+ антипортер тонопласта использует $\Delta\mu\text{H}^+$, который генерируется вакуолярной H^+ -АТФазой, являющейся субъединичным комплексом. NaCl в среде стимулирует активность H^+ -АТФаз как ПМ, так и тонопласта. Активность этих АТФаз у галофитов и солеустойчивых сортов культурных растений, как правило, выше, чем у гликофитов и не солеустойчивых сортов (Sahu et al., 2009). Избыток Cl^- пассивно выводится через ПМ из цитоплазмы.

Другим абиотическим стрессором является засуха. Реакция растений на засуху состоит в закрывании устьиц в дневное время для минимизации потери воды из-за транспирации (Shimazaki et al., 2007). Сигнальный путь фитогормона абсцизовой кислоты (АБК), вовлеченной в ответ растений на засуху, регулирует активность H^+ -АТФазы ПМ в замыкающих клетках устьиц (Zhang et al., 2004). Механизм закрытия устьиц, опосредованный АБК, в условиях засухи основан на деполяризации ПМ за счет активации анионных каналов, через которые осуществляется отток анионов. Этот процесс сопровождается оттоком K^+ из замыкающих клеток через наружу-выпрямляющий (outward-rectifying) K^+ канал. Кроме того, АБК ингибирует активность внутрь-выпрямляющих K^+ каналов (Schroeder et al., 1987; Chen et al., 2020). В целом, снижение концентраций K^+ и Cl^- в замыкающих клетках приводит к потере их тургора и закрыванию устьиц (Schroeder, et al., 2001; Kashtoh et al., 2021). При засухе, выработка АБК в замыкающих клетках увеличивается и повышается концентрация кальция в

цитозоле, запуская каскад сигнальных событий, что приводит к оттоку ионов из замыкающих клеток, снижению тургорного давления и закрытию устьиц, что необходимо для поддержания водного баланса у растений (Yin et al., 2013 Kashtoh et al., 2021). H^+ -АТФаза ПМ важна также в защите растений от избытка тяжелых металлов (ТМ). Некоторые ТМ (Zn, Cu) в небольших концентрациях важны для роста растений, как микроэлементы. Тем не менее они токсичны для растений в высоких концентрациях, поскольку повреждают систему клеточных мембран. Нарушение целостности мембран происходит из-за сложных взаимодействий между ионами ТМ и функциональными группами мембран. Известно, что ионы ТМ легко связываются как с сульфгидрильными группами белков, так и с гидроксильными группами фосфолипидов. Они также могут заменять ионы кальция, взаимодействующие с отрицательно заряженными группами клеточных мембран. ТМ приводят к увеличению неспецифической проницаемости мембран и снижению транспортной активности белков, что нарушает ионный гомеостаз, и как следствие, активность ферментов, играющих важную роль в метаболизме (Devi et al., 1999; Asati et al., 2016). Влияние тяжелых металлов на активность H^+ -АТФазы ПМ зависит от времени их действия на растения, вида растения и концентрации ТМ. Одним из защитных механизмов от действия ТМ является их удаление из цитоплазмы. Этот процесс происходит с участием локализованных в ПМ и тонопласте белков семейства CDF (cation diffusion facilitator). Они представляют собой мембранные переносчики двухвалентных катионов, которые переносят ионы металлов из цитоплазмы во внеклеточное пространство или вакуоли и действуют как антипортеры металл²⁺/ H^+ (Talke et al., 2006; Ram et al., 2019). Эти белки известны также как белки устойчивости к ТМ (metal-tolerance protein – МТР). В частности, МТР8 может участвовать в поддержании оттока Cd и Cu из цитоплазмы. Механизм детоксикации Cd основан на активности антипортера Cd^{2+}/H^+ в ПМ растений (Burzyński et al., 2003). Активный экспорт из цитоплазмы ТМ требует также активации H^+ -АТФаз (Østerberg et al., 2018).

1.8. Локализация Na^+ в цитоплазматических везикулах и косвенные свидетельства транспорта Na^+ везикулами

В ряде исследований была выявлена связь между везикулярным транспортом и механизмами, отвечающими за солеустойчивость растений. В частности, было показано, что сверхэкспрессия гена *AtRabG3e* (*AtRab7*) приводит к накоплению ионов натрия в вакуолях и повышает их содержание в побегах. Трансгенные растения, сверхэкспрессирующие ген *AtRab7*, демонстрировали более высокую солеустойчивость, по сравнению с растениями ДТ (Mazel et al., 2004). Ген *AtRab7* относится к семейству малых ГТФаз и активирует эндоцитоз у *A. thaliana*, регулируя движение везикул (Rodriguez-Furlan et al., 2023). Другим примером связи везикулярного транспорта с ионным гомеостатированием служит нокаут-мутация гена *ARA6*, вызывающая гиперчувствительность растений *A. thaliana* к NaCl . Сверхэкспрессия этого гена с точечной мутацией, фиксирующей ГТФазу в ГТФ-связанной форме, усиливала толерантность растений к соли (Ebine et al., 2011). Снижение экспрессии гена *AtVAMP7C*, который кодирует белок регуляторного комплекса SNARE, участвующего в слиянии поздних эндосом с вакуолью, приводило к повышению солеустойчивости *A. thaliana* (Leshem et al., 2006). Нами ранее было показано, что инсерционный мутант *A. thaliana* по гену регуляторного белка *ARA7* со вставкой в промоторе отличался от растений ДТ повышенным содержанием этого белка и повышенной солеустойчивостью. Мутант характеризовался повышенным содержанием ионов K^+ и пониженным содержанием ионов Na^+ . В цитоплазме мутантных растений наблюдалось интенсивная везикуляция, что могло свидетельствовать об активировании ВТ (Sergienko et al., 2022). Упомянутые выше работы, таким образом, указывают на связь между ВТ и солеустойчивостью растений. В основе этой связи лежит участие везикулярного транспорта в ремоделировании белкового состава мембран, обеспечивающего динамическое поддержание клеточного гомеостаза при действии различных внутренних и внешних стимулов. Однако роль ВТ при солевом стрессе

не ограничивается ремоделированием белкового состава мембран.

Результаты, полученные в ряде исследований, позволяют предположить, что везикулы непосредственно участвуют в переносе ионов, хотя сведения о таком транспорте крайне ограничены. В клетках суспензионной культуры мангрового растения *Bruguiera sexangula* и в клетках кончиков корней *Hordeum vulgare* в ответ на повышение наружной концентрации NaCl в цитоплазме наблюдалось слияние мелких вакуолей в более крупные (Mimura et al., 2003). Аналогичная реакция на солевой стресс была показана на клетках суспензионной культуры *A. thaliana*. С помощью флуоресцентно-меченных антител, была продемонстрирована точечная флуоресценция в цитоплазме клеток, подвергнутых солевому стрессу, что указывало на наличие везикул, содержащих AtNHX1 (Hamaji et al., 2009). Также было показано, что солевой стресс индуцирует клатрин-независимый эндоцитоз. Индукция такого эндоцитоза сопровождалась образованием крупных вакуолеподобных структур, формирующихся из небольших кислых компартментов. У мутантов по генам белков Vacuolar Protein Sorting 9A (VPS9a), необходимых для везикулярного слияния, которые лишены функций вакуолярной сортировки белков, не наблюдалось образования крупных вакуолей в ответ на засоление (Baral et al., 2015a). Флауэрс с соавторами привели аргументы в пользу ВТ Na⁺ и Cl⁻, которые были основаны на сравнении потоков ионов у галофитов со скоростями образования везикул, их слияния с ПМ и их размерами (Flowers et al., 2018). У *A. thaliana* известны две эндосомальные формы Na⁺/H⁺ антипортера, NHX5 и NHX6 (Bassil et al., 2011) и две эндосомальные формы транспортеров Cl⁻, CLCd и CLCf (von der Fecht-Bartenbach et al., 2007; Marmagne et al., 2007). NHX5 и NHX6 локализованы в ранних эндосомах / ТГС и необходимы для солеустойчивости растений. Двойной мутант, у которого отсутствуют обе изоформы, чувствителен к NaCl (Bassil et al., 2011). Также в работе с мембранной фракцией, обогащенной АГ, которая была выделена из корней галофита *Suaeda altissima* идентифицирован Cl⁻/H⁺ обменник, что привело к предположению о везикулярном транспорте Cl⁻ с участием Cl⁻/H⁺ антипортера (Shuvalov et al., 2015). При исследовании

ультраструктуры клеток корней *S. altissima*, были обнаружены многочисленные везикулы на границе цитоплазмы и тонопласта (Balnokin et al., 2007). Точечная локализация ионов Cl^- в этой зоне, была показана электронно-цитохимическим методом. Полученный результат свидетельствует в пользу локализации хлорида внутри везикул. У мутанта *A. thaliana* с пониженным уровнем экспрессии эндосомальной V-АТФазы наблюдалась повышенная чувствительность к соли (Krebs et al., 2010). Вероятно, экспорт токсичных ионов Na^+ и Cl^- из цитоплазмы осуществляется за счет загрузки Na^+ и Cl^- в эндосомы через Na^+/H^+ и Cl^-/H^+ -антипортеры с последующим слиянием эндосом с тонопластом и/или ПМ. В ряде исследований было продемонстрировано слияние цитоплазматических кислых компартментов с вакуолью в ответ на повышение уровня наружной концентрации NaCl (Mimura et al., 2003; Namaji et al., 2009; Baral et al., 2015a). Было показано, что в клетках суспензионной культуры табака *Nicotiana tabacum* Bright Yellow 2 (BY-2), акклимированной к высоким концентрациям NaCl , ионы натрия накапливались в микровакуолях. Об этом свидетельствовала ко-локализация эндоцитозного индикатора FM 4-64 и Na^+ -индикаторов в гидрофобной форме (проникающих через мембраны) CoroNa-Green и Asante Natrium Green (Garcia de la Garma et al., 2015; Olmos et al., 2017).

1.9. Сведения об индикаторах и ингибиторах, использовавшихся в работе

В растительных клетках эндоцитоз обнаруживают с помощью флуоресцентного амфифильного стерильного красителя, индикатора на эндоцитоз FM4-64 – N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(diethylamino) phenyl) hexatrienyl) pyridinium dibromide. FM4-64 имеет центральную область, расположенную между гидрофобным хвостом и полярной головкой (рис. 11.) (Betz et al., 1996). Флуоресцентные свойства красителя определяет центральная область. Полярная головка предотвращает проникновение красителя через липидный бислой ПМ, а это означает, что краситель может попасть в клетки только благодаря эндоцитозу. При исследовании СМЕ с использованием флуоресцентных красителей FM (FM4-

64 и FM1-43) максимумы флуоресценции приходились на красный и желтый спектр соответственно (рис. 11б.) (Henkel et al., 1996; Johnson et al., 2020). При добавлении FM4-64 к интактным клеткам, происходит окрашивание ПМ в красный цвет. Образующиеся эндоцитозные везикулы интернализуются клетками, сливаются с эндосомами и в конечном счете оказываются в вакуоли (рис. 11в.) (Bolte et al., 2004).

Ионы Na^+ внутри везикул можно обнаружить с помощью индикатора на Na^+ ANG-2 TMA (Asante Natrium Green) в гидрофил форме (рис. 12.) (не проникающая через мембраны форма). ANG-2 TMA⁺ является флуорофор-несущим краун-эфиром, который специфически связывает ионы Na^+ . Этот краситель представляет собой водорастворимую соль тетраметиламмония (TMA⁺). Флуоресценция ANG-2 TMA⁺ возможна лишь при образовании комплекса Na^+ с краун-эфиром. Наличие у краун-эфира положительно заряженных групп тетраметиламмония делает этот Na^+ -индикатор не проникающим через мембраны (Roder et al., 2014), благодаря чему ANG-2 TMA⁺ может попасть в клетки только в результате эндоцитоза. На этих свойствах красителя был основан использовавшийся в работе экспериментальный подход. В работе (Mazel et al., 2004) использован проникающий в клетки Na^+ индикатор, ацетоксиметилловый эфир (AM) Sodium Green, который, будучи гидрофобным, легко проникает в клетки. После отщепления гидрофобной группы AM эндогенными эстеразами индикатор взаимодействует с уже находящимися в цитоплазме ионами натрия. Таким образом, авторы этой работы детектировали ионы Na^+ , предварительно поглощенные клетками и попавшие туда разными путями (через ионные каналы и транспортеры, а также путем эндоцитоза). На основании гетерогенного распределения светящегося комплекса Sodium Green с Na^+ авторы предположили, что Na^+ был локализован главным образом в вакуолях. Перенос Na^+ с помощью эндоцитоза в этой работе не был показан (Mazel et al., 2004).

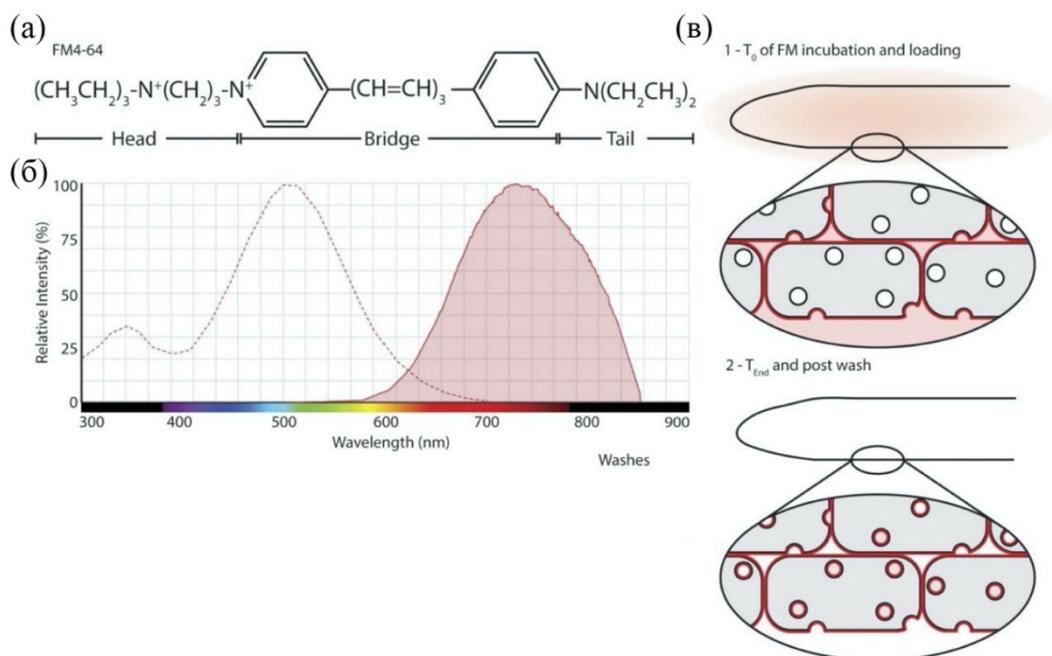


Рис. 11. Свойства флуоресцентного красителя FM4-64. (а) – Химическая структура; (б) – спектры возбуждения / испускания флуоресценции (Thermo Fisher Bioscience Fluorescent Spectra Viewer); (в) – схематическое изображение поглощения красителя FM4-64, 1- T_0 – инкубации с красителем и его загрузка; 2- T_{end} – отмывание от красителя (краситель интернализуется посредством эндоцитоза). Взято из (Johnson et al., 2020).

Важную информацию о ВТ веществ можно получить, используя ингибиторы, которые блокируют его отдельные пути. Ниже приводятся сведения о таких ингибиторах: брефелдин А (БФА), который блокирует движение эндосом к ПМ и распределение (sorting) белков на стадии ТГС, вызывая образование эндосомальных агрегатов (БФА-компарментов) (Nebenfuhr et al., 2002; Emans et al., 2002; Ritzenthaler et al., 2002); вортманнин, который ингибирует фосфатидилинозитол-3- и фосфатидилинозитол-4-киназы, что блокирует слияние ПВК / МВТ с вакуолями (Wang et al., 2009; Foissner et al., 2016); икаругомицин, ингибирующий клатрин-опосредованный эндоцитоз (Elkin et al., 2016).

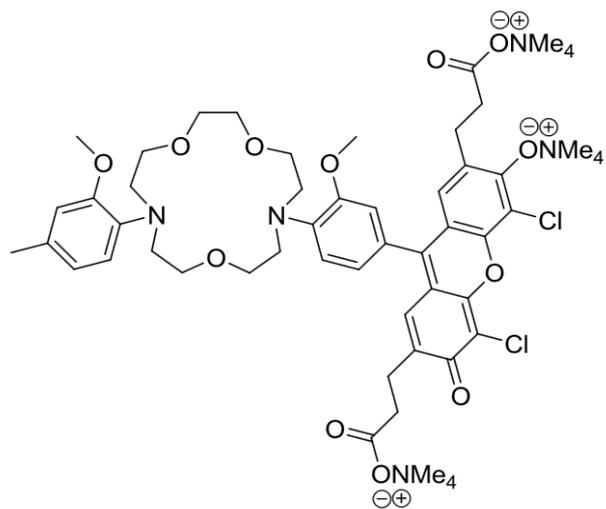


Рис. 12. Структура индикатора на Na^+ ANG-2 ТМА в гидрофильной форме. Взято из (Roder et al., 2014).

Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В качестве объекта данного исследования использовали модельное растение *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (экотип Columbia-0) дикого типа и созданные на его основе инсерционные мутанты: (1) мутант с повышенной экспрессией гена белка мембранных нанодоменов *Flot1* со вставкой в промоторе – *Atflot1oe* (CS444812GK) и (2) нокаут-мутант по этому гену – *Atflot1ko* (SALK_205125C). Семена растений получены из коллекции TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>). Использовали также суспензионную культуру клеток *A. thaliana* (Col-0), полученную из каллуса листьев растений ДТ.

2.2. Выращивание растений *A. thaliana*

2.2.1. Протравливание семян и их проращивание

Семена дезинфицировали погружением в раствор 15 % гипохлорита натрия на 5 мин, затем 3 раза промывали стерильной водой и высевали на агаризованные питательные среды (ПС) или в почву. Для синхронизации всхожести семян высеянные семена выдерживали при +4 °С в темноте в течение 2 суток. Проращивание семян осуществляли в факторостатной камере при температуре 23 ± 2 °С, относительной влажности воздуха 70 ± 5 %, фотопериоде 12 ч. или 8 ч. в сутки и интенсивности света 120 мкмоль квантов / (м²·с), полученного от люминесцентных ламп Phillips TL-D-58W/33-640 (Польша).

2.2.2. Выращивание растений в условиях водной культуры

Для выращивания растений в условиях водной культуры проращивание семян осуществляли на агаризованной ПС ½ Мурасиге-Скуга (Murashige and Skoog) (МС), залитой в крышки пробирок эппендорф, с проделанным отверстием для образующегося корня (рис. 13.). Через 7 дней крышки с проросшими семенами

переносили на аэрируемые жидкие ПС: $\frac{1}{2}$ Хогланда (<http://scienceinhydroponics.com/2009/02/the-hoaglands-solution-for-hydroponic-cultivation.html>) или на модифицированную ПС $\frac{1}{2}$ Гибо (Gebeaut et al., 1997), (табл. 1.), залитые в непрозрачные пластиковые емкости объемом 1 литр (4 растения на сосуд). Дальнейший рост растений осуществлялся в факторостатной камере при тех же условиях, что и проращивание семян. В экспериментах использовали растения 45-55-дневного возраста.

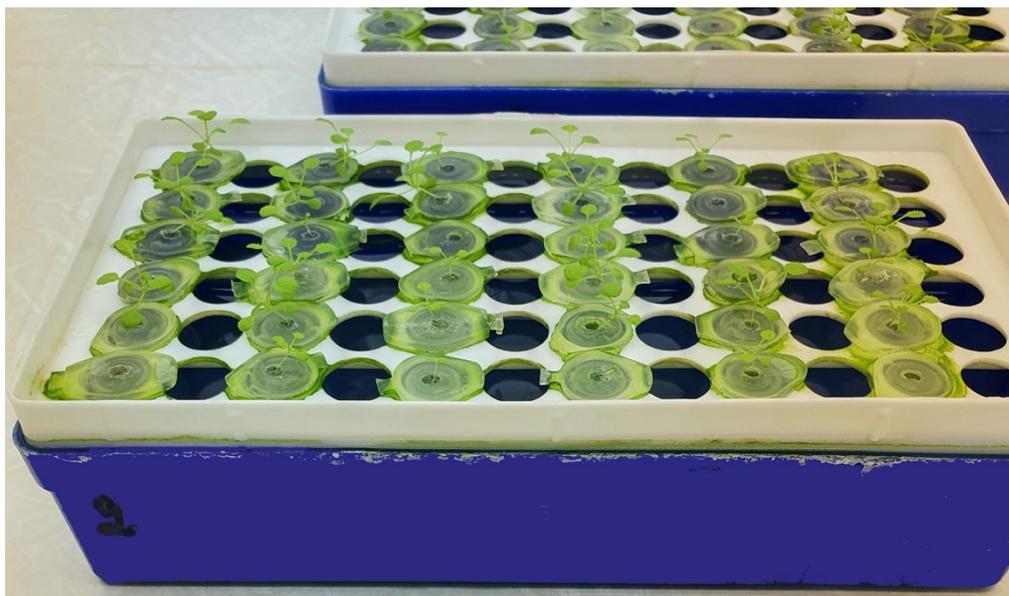


Рис. 13. Проращивание растений *A. thaliana* на 0.8% агаризованной питательной среде $\frac{1}{2}$ Мурасиге-Скуга в 1-л емкостях.

2.2.3. Выращивание растений *A. thaliana* на почвенном субстрате

Растения выращивали в факторостатной камере при тех же условиях, что и для проращивания семян (см. 2.2.1.), на субстрате (Агробалт-С, ЗАО РОСТОРФИНВЕСТ, Россия). Субстрат, приготовленный на основе верхового торфа и обогащённый минеральными удобрениями и доломитовой мукой, смешивали с перлитом в соотношении 5:1. Полученную смесь предварительно увлажняли в течении 14 дней.

2.2.4. Выращивание проростков *A. thaliana* на агаризованной питательной среде

Проростки 4-5-дневного возраста выращивали в стерильных условиях в чашках Петри на агаризованной ПС ½ МС, рН 5.8 с добавлением 0.5 % (масс / об.) сахарозы. Условия выращивания описаны в разделе 2.2.1.

2.2.5. Получение суспензионной культуры клеток *A. thaliana*

Суспензионная культура клеток *A. thaliana* (Col-0) была получена из каллуса листьев нашими коллегами из отдела Биологии клетки и Биотехнологии Института физиологии растений им. Тимирязева РАН, Фоменковым А. А. и Носовым А.В. (Фоменков и др., 2014). Суспензионную культуру клеток выращивали в 50 мл среды Шенка и Хильдебранда (Schenk и Hildebrandt – SH) с добавлением 3 % сахарозы (масс / об.), 1 мг / л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты и 0.1 мг / л кинетина в стеклянных колбах объемом 250 мл в стерильных условиях. Выращивание осуществляли в темноте при температуре 26 °С и относительной влажности воздуха 70 % при постоянном перемешивании (110 об / мин). Период субкультивирования составлял 10 дней.

Табл. 1. Состав питательной среды ½ Гибо

Макроэлементы	Концентрация в среде, мМ
KNO ₃	2
Ca (NO ₃) ₂	2
MgSO ₄ ×7H ₂ O	1
KH ₂ PO ₄	0.5
Микроэлементы	Концентрация в среде, мкМ
KCl	75
MnSO ₄	15
CuSO ₄ ×5H ₂ O	2.25
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	3
H ₃ BO ₃	75
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.1125
Na ₂ MoO ₄ ×2H ₂ O	0.1125
FeSO ₄ ×7H ₂ O	75
Na ₂ ЭДТА×2H ₂ O	75

2.3. Выявление гомозиготных растений *A. thaliana*

2.3.1. Выделение геномной ДНК из тканей *A. thaliana*

Для выделения ДНК использовали метод Муррея и Томпсона (Murray & Thompson, 1980) с некоторыми изменениями. Растительную ткань (200 мг) растирали с целлитом в 200 мл лизирующего буфера MicroPrepBuffer (табл. 2.), добавляли 550 мкл этого же буфера и перемешивали. Образцы прогревали при 65 °С в течение 60 мин, добавляли 700 мкл хлороформа, перемешивали и центрифугировали при комнатной температуре 5 мин при 12 000 g. Супернатант переносили в стерильные пробирки, добавляли изопропанол в равном объеме. Образцы инкубировали при покачивании (300 об / мин) в течение 20 мин, центрифугировали 5 мин при 10 000 g и удаляли супернатант. К осадку добавляли 500 мкл 96 % этанола, перемешивали и центрифугировали при тех же условиях. Супернатант удаляли, осадки ДНК подсушивали на воздухе 10 - 15 мин и растворяли в стерильной воде. Выделенную суммарную ДНК обрабатывали РНКазой. Для этого в препараты ДНК вносили по 1 мкл раствора РНКазы (10 мг / мл), свободной от ДНКазы, перемешивали, инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Полученные препараты ДНК хранили при – 20 °С.

Табл. 2. Буфер для выделения геномной ДНК (MicroPrepBuffer)

Для приготовления MicroPrepBuffer предварительно приготавливали DNA extraction buffer и Nuclei lysis buffer

Названия буферов	Компоненты
DNA extraction buffer (pH 7.5)	0.35 M Sorbitol 0.1 M Tris 5 mM EDTA-Na ₂
Nuclei lysis buffer (pH 7.5)	0.2 M Tris 0.05 M EDTA-Na ₂ 2 M NaCl 2 % CTAB
MicroPrepBuffer	2.5 мл DNA extraction buffer 2.5 мл Nuclei lysis buffer 1 мл Sarkosyl 5 % 0.01 г бисульфат натрия

2.3.2. Постановка ПЦР для выявления гомозиготных форм мутантов

Atflot1oe и Atflot1ko

Для проведения ПЦР в качестве матрицы использовали геномную ДНК. Реакцию проводили в ДНК-амплификаторе (Амплификатор «БИС», Россия). Для *Atflot1oe* были подобраны праймеры FLot1mut и LB-GK – для выявления мутантного аллеля, Flot1f и Flot1r – для выявления наличия аллеля дикого типа (табл. 3.). При наличии аллеля дикого типа амплифицировался фрагмент размером 1040 п. н., а при наличии вставки Т-ДНК – 1080 п. н., что позволяло одновременно определять присутствие как мутантного аллеля, так и аллеля дикого типа. Программа для проведения ПЦР включала следующие стадии: 94 °С – 2 мин; 33 цикла (92 °С – 30 с, 59 °С – 20 с, 70 °С – 3 мин); 70 °С – 10 мин. Для *Atflot1ko* были подобраны праймеры Flot1_9F18 и Flot1_761R18 для выявления мутантного аллеля и аллеля дикого типа, соответственно (табл. 3.). При наличии аллеля дикого типа амплифицировался фрагмент размером 1014 п. н., а при наличии вставки Т-ДНК – 5315 п.н., что позволяло одновременно определить присутствие как мутантного аллеля, так и аллеля дикого типа. Программа для проведения ПЦР включала следующие стадии: 94 °С – 2 мин; 33 цикла – (92 °С – 30 с, 61 °С – 20 с, 70 °С – 3 мин); 70 °С – 2 мин. Продукты амплификации разделяли в 1 % неденатурирующем агарозном геле, содержащем 0.5 мкг / мл бромистого этидия (EtBr). При необходимости амплифицированные фрагменты секвенировали в ЗАО «Евроген».

Табл. 3. Ген-специфичные праймеры для выявления гомозиготных мутантов

Название праймеров	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Цель эксперимента
FLot1mut	CTTAAACTCCTTTGTCCCTTCAAA	Выявление растений, гомозиготных по мутантному аллелю <i>Atflotoe</i>
LB-GK	CCCATTTGGACGTGAATGTAGAC AC	
Flot1f	GCAGCCACTTTGTAAAATAAATC A	Выявление растений, гомозиготных по аллелю дикого типа
Flot1r	TCAACCTAGCATACAAAATCAGC G	
Flot1_9F18	CTAAATCATTTGGGCGAA	Выявление растений, гомозиготных по аллелю дикого типа и по мутантному аллелю <i>Atflotko</i>
Flot1_761R18	TTAGCTACATCAGCCTCC	

2.4. Анализ экспрессии генов *A. thaliana*

2.4.1. Выделение суммарной РНК из тканей *A. thaliana*

Выделение суммарной РНК из растительных тканей проводили согласно (Yuorieva et al., 2018) с небольшими модификациями. Органы растений (листья и корни), выращенных в условиях водной культуры (см. 2.2.2.), накануне эксперимента замораживали в жидком азоте и хранили при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Замороженный материал помещали в охлажденную жидким азотом ступку и растирали в присутствии жидкого азота. Для экстракции РНК к 0.5 г растительного материала добавляли 1 мл горячего ($90\text{ }^{\circ}\text{C}$) экстракционного буфера (табл. 4.), смешанного с кислым фенолом (1:1). Кислый фенол был предварительно насыщен цитратным буфером, pH 4.5. После оттаивания, гомогенат перемешивали и переносили в 2-мл пробирки эппендорф. Образцы инкубировали при комнатной температуре 5 мин при покачивании, 300 об / мин (Heidolph Unimax 1010, Германия). В каждый образец вносили 0.5 мл хлороформа и перемешивали при тех же условиях в течении 30 мин. Смесь центрифугировали при комнатной температуре при 12 000 g 15 мин (Eppendorf, minispin, Германия). Супернатант переносили в стерильные

пробирки эппендорф, добавляли хлороформ в таком же объеме, перемешивали на вортексе 30 сек и оставляли при комнатной температуре еще на 15 мин при покачивании. Смесь еще раз центрифугировали при комнатной температуре при 12 000 g 15 мин. Супернатант переносили в стерильные пробирки эппендорф и вносили в каждую пробирку 10 М LiCl (¼ от объема супернатанта), инкубировали при температуре +4 °С 12-18 час. Образцы центрифугировали при 12 000 g 30 мин при +4 °С. Осадок РНК промывали 200 мкл 2 М LiCl, центрифугировали 1 мин и полностью удаляли супернатант. Для дополнительной очистки РНК растворяли в 90 мкл MQ стерильной воды, добавляли 10 мкл 3 М CH₃COONa (рН 5.9) и 300 мкл 96 % этилового спирта, перемешивали на вортексе 30 сек и инкубировали при – 20 °С 30 мин. Образцы центрифугировали при 12 000 g 10 мин. Полученные осадки РНК подсушили при комнатной температуре до исчезновения жидкости и запаха. Осадки растворяли в MQ воде и хранили при – 70 °С.

2.4.2. Определение содержания нуклеиновых кислот в образцах

Содержание нуклеиновых кислот в растительных препаратах и их чистоту определяли спектрофотометрическим методом с помощью анализатора нуклеиновых кислот NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, США), измеряя оптическую плотность препаратов при длинах волн 260, 280 и 230 нм согласно (Maniatis at al., 1982).

Табл. 4. Составы используемых буферов для выделения РНК

Название буфера	Компоненты
Экстракционный буфер	0.1 М LiCl 0.1 М Tris-HCl, рН 7.5 10 мМ EDTA, рН 8.0 1 % SDS
Кислый буфер	0.1 М лимонная кислота 0.1 М цитрат натрия x 5H ₂ O (рН 4.5)
Кислый фенол	Смесь кислого буфера и фенола (1:1)

2.4.3. Обработка суммарной РНК ДНКазой I

Примеси геномной ДНК в выделенных образцах суммарной РНК удаляли с помощью обработки ДНКазой I согласно методике производителя (Thermo Fisher Scientific, США). Реакционная смесь содержала 2 мкг РНК, 2 мкл 10X реакционного буфера и 2 мкл ДНКазы I (1 ед. активности). Объем доводили до 10 мкл. Реакционную смесь инкубировали в амплификаторе (Амплификатор «БИС», Россия) при 37 °С 30 мин, после чего добавляли 1 мкл 50 мМ EDTA и инкубировали при 65 °С 10 мин для остановки реакции.

2.4.4. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в 0.8 – 1 % неденатурирующем агарозном геле, приготовленном на 1xTAE-буфере, с напряженностью 7.1 В/см. Для оценки молекулярных масс нуклеиновых кислот использовали ДНК-маркеры (СибЭнзим, Россия). Для визуализации нуклеиновых кислот использовали трансиллюминатор с максимумом излучения при 254 нм. В качестве окрашивающего агента использовали интеркалирующий краситель EtBr в концентрации 0.5 мкг / мл, который добавляли в раствор агарозы в процессе приготовления агарозного геля. Перед нанесением на гель образцы РНК прогревали при 65 °С в течение 5 мин.

2.4.5. Подбор праймеров

Праймеры для количественной ОТ-ПЦР (ОТ-кПЦР) в реальном времени подбирали с помощью программы Light Cyler Probe Design Software 2.0 (Roche, Швейцария), убедившись в отсутствии их идентичности с последовательностями генов-гомологов *A. thaliana* (в случае их наличия). Праймеры для других экспериментов подбирали, используя программу Oligo 7, либо вручную.

2.4.6. ОТ-ПЦР на матрице суммарной РНК

Первую цепь кДНК на матрице суммарной РНК синтезировали с помощью MMLV-ревертазы по инструкции производителя (Евроген, Россия) с помощью ДНК-амплификатора (Амплификатор «БИС», Россия).

2.4.7. Количественная ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР) в реальном времени на матрице кДНК

Содержание транскриптов генов *AtFlot1*, *AtAHA1* и *AtAHA2*, в органах *A. thaliana* у растений ДТ и мутантов *AtFlot1oe*, *AtFlot1ko* определяли с помощью ОТ-кПЦР с праймерами, представленными в табл. 5., и интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green. В качестве референсного гена использовали ген актина *ACT2*. Реакционную смесь готовили в соответствии с рекомендациями производителя смеси SYBR Green (Евроген, Россия). В образец вносили 30–100 нг матрицы, исходя из количества суммарной РНК, взятой для синтеза первой цепи кДНК. Условия проведения реакций: 95 °С – 300 с, 40 циклов (95 °С – 20 с, 58 °С – 15 с, 72 °С – 15 с), 95 °С – 10 с, 65 °С – 60 с, 97 °С – 1 с. В работе использовали 96-луночный амплификатор LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Относительный уровень представленности транскриптов анализировали в программе LightCycler 96 SoftwareVersion 1.1 или рассчитывали по формуле $R = N_{0gene} / N_{0ref} = 2^{(C_{qref} - C_{qgene})}$, где N_{0gene} – начальная концентрация матриц исследуемого гена, N_{0ref} – начальная концентрация матриц референсного гена, C_{qref} – значение C_q референсного гена, а C_{qgene} – значение C_q исследуемого гена (Sergienko et al., 2022; Khalilova et al., 2023).

Табл. 5. Праймеры, используемые для определения содержания транскриптов *AtFlot1oe*, *AtFlot1ko*, *AtAHA1* и *AtAHA2*

Название праймеров	Нуклеотидная последовательность, 5'–3'	Гены
FlotRT_F	GGAACCGAAGCAAGTGACTC	<i>AtFlot1</i> (для мутанта <i>Atflot1oe</i>)
FlotRT_R	TTCGCATGGATGTTCAACCAC	
FlotRT_F	GGAACCGAAGCAAGTGACTC	<i>AtFlot1</i> (для мутанта <i>Atflot1ko</i>)
FlotRT_R2	TTC GCATGGATGTATCTTCAACCAC	
ACT2F	CTTGCACCAAGCAGCATGAA	<i>ACT2</i>
ACT2R	CCGATCCAGACACTGTACTIONCCTT	
At AHA1_F1	AGGTGTGATTTGGATTTACAGT	<i>AHA1</i>
At AHA1_R1	CTGTTGTCAAACAAGCTGG	
At AHA2_F1	CTCAACTTGTTTGAGAACAAGACGGC	<i>AHA2</i>
At AHA2_R1	GGCTGTAAACCGTGAAGTGTCC	

2.4.8. Определение содержания мембранных белков

Содержание белка определяли с помощью бицинхонинового метода, используя набор (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher, USA) согласно рекомендациям производителя. Оптическую плотность раствора измеряли с помощью 511 UV/Vis Spectrophotometer (Portlab, Великобритания) при $\lambda = 562$ нм. Калибровочную кривую строили, используя бычий сывороточный альбумин.

2.4.9. Выделение мембранных фракций, обогащенных плазмалеммой, из органов *A. thaliana* методом разделения мембран в водной двухфазной полимерной системе

Получение мембранных фракций из органов растений *A. thaliana* осуществляли в водной двухфазной системе полимеров, согласно методике (Larsson et al., 1987) с

небольшими модификациями. Розетки листьев и корней помещали в среду фиксации, охлажденную до +4 °С, на 15 мин с целью остановки везикулярного транспорта. Растительный материал просушивали фильтровальной бумагой при +4 °С, смешивали со средой гомогенизации в отношении 1:2 (объем среды гомогенизации к сырому весу растительного материала) с добавлением 1 мМ PMSF непосредственно перед началом работы. Ткани растений разрушали с помощью блендера SUPRA HBS-123 (Китай) в течение 40 сек при 12 000 об / мин. Гомогенат процеживали через 2 слоя ткани, центрифугировали при 10 000 g при +4 °С в течение 15 мин. Супернатант разбавляли фазовым буфером и центрифугировали при 186 000 g в течение 40 мин на центрифуге Beckman 70 Ti (Ротор TYPE 42.1). Супернатант удаляли, осадки микросомальных фракций ресуспендировали в фазовом буфере. Для разделения мембран на субфракции использовали водную двухфазную полимерную систему, смешивая ее с полученными микросомами в отношении 1:3 (о / о). Смесь двух полимеров готовилась предварительно, в отношении 1:1 путем их растворения в фазовом буфере (10 частей). Содержание каждого из полимеров в полученной смеси составляло 6.2 весовых процентов. Разделение смеси на две фазы осуществляли центрифугированием (центрифуга К-23, Janetzky, ГДР) 5 мин при 2 500 об / мин. Супернатант, обогащенный плазмалеммой, отбирали и разбавляли средой суспендирования не менее, чем в 4 раза, центрифугировали при 186 000 g 40 мин на центрифуге Beckman 70 Ti (Ротор TYPE 42.1). Полученные осадки ресуспендировали в среде суспендирования. Суспензии мембранных везикул разделяли на алиquotы, замораживали в жидком азоте и хранили при -70 °С. Состав сред приведен в табл. 6.

Табл. 6. Составы сред, использовавшихся для выделения мембранных фракций

Название сред	Компоненты
Среда фиксации	300 мМ сахароза 100 мМ Трис – HCl, pH 8.0
Среда гомогенизации	300 мМ сахароза 100 мМ Трис – HCl, pH 8.0 10 мМ ЭДТА-Na ₂ 0.6 % PVP K30 5 мМ K ₂ S ₂ O ₅ 5 мМ ДТТ 1 мМ PMSF
Фазовый буфер	300 мМ сахароза 5 мМ калий-фосфатный буфер pH 7.8 3 мМ KCl 1 мМ ДДТ 0.1 мМ ЭДТА
Среда суспендирования	300 мМ сахароза 5 мМ бис-трис-пропан – Mes pH (7.2) 0.5 мМ ЭДТА-Na ₂

Табл. 7. Состав растворов / буферов, использованных для проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле

Название раствора / буфера	Компоненты
5x Электродный буфер, pH 8.3	37.9 г Tris 180.2 г глицина 10 г SDS / 1 л H ₂ O
30 % раствор акриламида (mix)	29.2 г акриламида 0.8 г метилен-бис-акриламида / 100 мл H ₂ O
Буфер для концентрирующего геля	1.0 М Tris-HCl, pH 6.8 10 % SDS 30 % акриламид (mix) 10 % APS TEMED, 1 / 1000 (o / o)
Буфер для разделяющего геля	30 % акриламид (mix) 1.5 М Tris-HCl, pH 8.8 10 % SDS 10 % APS TEMED, 1 / 1000 (o / o)

2.4.10. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофорез белков мембранных фракций осуществляли по Лэммли (Laemmli et. al., 1970). Концентрации акриламида в разделяющем геле составляли 13.5 %, а в концентрирующем геле 5 %. На дорожку наносили по 1 мкг белка мембранных фракций. Разделение белков осуществляли при напряжении 100 В в концентрирующем геле и 135 В в разделяющем геле. Для приготовления геля и проведения электрофореза были использованы следующие растворы (табл. 7.).

2.4.11. Вестерн-блоттинг и его визуализация

После электрофореза, нитроцеллюлозную мембрану с диаметром пор 0.45 мкм и разделяющий гель предварительно инкубировали в буфере для переноса белков в течение 10 мин. Полусухой перенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли с помощью трансблоттера Semy-Dry (Хеликон, Москва, Россия) при токе 100 мА в течение 1 ч. согласно рекомендациям производителя прибора. После переноса белки на мембране визуализировали путем их окрашивания Ронсеау S. После этого мембрану отмывали в 1х буфере TBS / Tween (табл. 8.) и обрабатывали блокирующим раствором в течение 30 мин во избежание неспецифического связывания белков с мембраной. Мембрану отмывали 1х буфером TBS / Tween 3 раза по 5 мин и инкубировали 12 часов с покачиванием при +4 °С в растворе первичных поликлональных антител к Н⁺АТФазе (Agrisera), разбавленных в 1000-1500 раз раствором 1 % BSA, приготовленного на 1х буфере TBS / Tween. Мембрану отмывали от первичных антител в 1х буфере TBS / Tween 2 раза по 10 минут и инкубировали с покачиванием 2 часа в растворе вторичных антител при +4 °С. Раствор вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (антитела козы к иммуноглобулинам кролика, «ИМТЕК»), был разбавлен в 2500 раз 1х буфером TBS / Tween, содержащим обезжиренное сухое молоко (Nestle, США) (5 %). После этого мембрану промывали в течение 10 мин 2 раза 1х буфером TBS / Tween, затем 3 раза по 10 мин дистиллированной водой и проводили

хемилюминесцентную детекцию белков на мембране с использованием люминола, р-кумаровой кислоты и пероксида водорода (Litovchick, 2013). Мембрану инкубировали в растворе ECL 1 мин с покачиванием. Состав использованных растворов приведен в табл. 8. Мембрану подсушивали фильтровальной бумагой и детектировали люминесцентный сигнал на приборе «ChemiDoc™ XRS+ System» (Bio-Rad). Относительное количество H⁺-АТФазы Р-типа в мембранных фракциях, обогащенных ПМ, определяли по интенсивности иммунореактивных полос на Вестерн-блотах белков этих фракций, используя программное обеспечение ImageLab к указанному прибору. На дорожках выбирали область, содержащую две близко расположенные основные полосы, соответствующие изоформам H⁺-АТФазы с молекулярными массами 100 и 115 кДа, соответственно.

Табл. 8. Состав растворов, использовавшихся для проведения вестерн-блоттинга и визуализации белков

Название растворов / буферов	Компоненты
ЕСL буфер (раствор для визуализации хемилюминесцентным методом) 10 мл	К 10 мл 100 мМ Tris-HCl, pH 8.5 добавляли: 30 мкл 3 % H ₂ O ₂ 50 мкл 250 мМ люминола (в DMSO) 25 мкл 90 мМ р-кумаровой кислоты (в DMSO)
Буфер для переноса белков	48 мМ Tris 39 мМ глицин 0.037 % SDS 20 % этанол
Ронсеау S x 10 (раствор для окрашивания белков)	3 % уксусная кислота 0.2 % Ронсеау S Разбавляли до 1x
1x буфер TBS / Tween	20 мМ Tris-HCl, pH 7.4 70 мМ NaCl 0.1 % Tween-20
Блокирующий раствор	5% обезжиренное сухое молоко, приготовленное на 1x буфере TBS / Tween

2.5. Определение содержания ионов K^+ , Na^+ в растениях

Корни и листья взвешивали и высушивали при температуре 95 °С до постоянного веса. Высушенные органы взвешивали и растирали в ступке до порошкообразного состояния. Порошок суспендировали в воде (100 мг / 10 мл MQ H₂O), суспензию кипятили и охлаждали до комнатной температуры, циклы нагревания-охлаждения повторяли 3 раза. Суспензию фильтровали и в фильтрате определяли концентрации K^+ , и Na^+ с помощью пламенного фотометра ФПА-2-01 (ОАО ЗОМЗ, Россия).

2.6. Микроскопия

2.6.1. Исследование ультраструктуры клеток корней интактных проростков и суспензионной культуры *A. thaliana*

Ультраструктуру клеток изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ). В экспериментах на интактных проростках исследовали клетки эпидермы и коры корней. Сегменты корней 5-дневных проростков размером 2 – 3 мм, вырезанных на расстоянии 1 – 2 мм от кончика корня фиксировали в 2.5 – 3 % (о / о) глутаровом альдегиде в течение ночи при +4 °С и затем дофиксировали в 1 % (о / о) OsO₄ (3 ч. при +4 °С). Фиксирующие растворы готовили на 50 мМ кокадилатном буфере, рН 7.0 (OsO₄ и кокадилат натрия Sigma-Aldrich®). Зафиксированный растительный материал обезвоживали в растворах этанола возрастающей концентрации от 30 до 96 объемных процентов и далее в смеси 100 % этанола и 100 % ацетона в соотношении 1:1. Зафиксированный и обезвоженный материал последовательно проводили через ряд смесей эпоксидной смолы Ероху Embedding Medium, Fluka и 100 % ацетона с постепенно возрастающей долей смолы. Образцы заливали в эту смолу, полимеризовали при 37 °С в течение суток, а затем при 56 °С в течение двух суток. Фиксацию, обезвоживание и заливку в эпоксидную смолу клеток суспензионной культуры проводили таким же образом. Ультратонкие срезы получали с помощью

ультрамикротомом C. Reichert Om U3 (Австрия). Срезы помещали на сетки, обрабатывали уранилацетатом по стандартной методике и просматривали в трансмиссионных электронных микроскопах JEM-1400 (JEOL Ltd., Япония) или Libra 120 (Carl Zeiss, Германия). Для получения морфометрических показателей использовали программу ZEN-2012 AxioVision Rel. 4.8, инструмент «Outline» (Carl Zeiss, Германия).

2.6.2. Поглощение эндоцитозного зонда FM4-64 корнями проростков

Корни 5-дневных проростков *A. thaliana* ДТ и его мутантов *Atflot1ko* и *Atflot1oe* погружали в жидкую среду ½ МС (рН 5.8) и инкубировали при 21±2 °С. В нулевой момент времени в среду вносили эндоцитозный зонд FM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR) и NaCl в конечных концентрациях 2 мкМ и 100 мМ, соответственно, или только 2 мкМ FM4-64 в случае контроля. Через 2, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 мин инкубации измеряли интенсивность флуоресценции FM4-64 в клетках корней. Для этого корни отмывали от наружного FM4-64 погружением в ½ МС (рН 5.8) и определяли интенсивность поглощенного зонда с помощью эпифлуоресцентного микроскопа AxioImager Z2 (Carl Zeiss, Германия). Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Excel 2007.

2.6.3. Обнаружение Na⁺ в везикулах суспензионной культуры клеток *A.*

***thaliana* путем ко-локализации FM 4-64 и ANG-2 TMA**

Ионы Na⁺ в везикулах клеток суспензионной культуры *A. thaliana* идентифицировали путем определения ко-локализации двух флуоресцентных зондов FM 4-64 и ANG-2 TMA в непроникающей через мембраны форме (TEF Labs, Остин, Техас). Четырех дневную суспензионную культуру клеток объемом 50 мл центрифугировали при 1400 g в течение 5 мин, промывали один раз реакционной средой (1 % раствор сахарозы (м / о), приготовленный на МС и забуференный 50 мМ ВТР-MES, рН 8.0) и суспендировали в 2.5 мл реакционной

среды. Клетки охлаждали на льду в течение 15 мин и добавляли FM 4-64 в конечной концентрации 4 мкМ. Через 10 минут вносили NaCl и ANG-2 TMA до конечных концентрации 100 мМ и 4 мкМ, соответственно. Клеточную суспензию перенесли в тепло (22 °С). Через 0, 5, 30, 60, 90 и 120 минут отбирали аликвоты, центрифугировали при 1400 g в течение 5 мин, трижды промывали холодной реакционной средой и анализировали клетки с помощью эпифлуоресцентной или конфокальной микроскопии. Для исследования ультраструктуры клеток использовали просвечивающую электронную микроскопию.

2.6.4. Эпифлуоресцентная и конфокальная лазерно-сканирующая микроскопия

В случае эпифлуоресцентной микроскопии изображения получали с помощью микроскопа AxioImager Z2, снабженного объективом EC Plan-Neofluar $\times 40 / 0.75$ M27 и монохромной цифровой камерой AxioCamMRm, используя программное обеспечение AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Германия).

Красную флуоресценцию FM 4-64 детектировали с помощью набора фильтров 14 ($\lambda_{ex} = 510 - 560$ нм, $\lambda_{em} \geq 590$ нм), зеленую флуоресценцию ANG-2 TMA детектировали с помощью набора фильтров 44 ($\lambda_{ex} = 455 - 495$ нм, $\lambda_{em} = 505 - 555$ нм). Интенсивность флуоресценции зондов в отдельных клетках оценивали с помощью программного обеспечения ZEN Blue (CarlZeiss, Германия), используя инструмент Spline. Для расчетов средней интенсивности флуоресценции и стандартных отклонений были использованы от 30 до 50 изображений отдельных клеток в каждой повторности ($n = 3$). Изображения, полученные с помощью AxioImager Z2, также были проанализированы, используя программный модуль ко-локализации AxioVision 4.8, что позволяло получать графические изображения ко-локализации в виде графиков рассеяния. Количественная оценка ко-локализации была также проведена, анализируя коэффициенты Пирсона и Мандерса (Manders et al., 1993; Zinchuk et al., 2007). В случае конфокальной микроскопии был использован лазерно-сканирующий микроскоп LSM-710-NLO, оснащенный

масляным иммерсионным объективом Plan-Apochromat $\times 63/1.4$, и программным обеспечением ZEN 2010 (CarlZeiss, Германия). Для анализа клеток их переносили в стерильные чашки Петри с тонким стеклянным дном. Сигналы флуоресценции регистрировали в конфокальном режиме с двумя фотоумножителями и дихроичным светоделителем 488 / 561 и конфокальной диафрагмой диаметром 46 мкм. Размер изображений составлял 1024×1024 пикселей (132 нм на пиксель), скорость сканирования была 1.27 мкс на пиксель (1.33 с на изображение). Сигнал FM 4-64 визуализировали при $\lambda_{ex} = 561$ нм, $\lambda_{em} = 595 - 730$ нм, а сигнал ANG-2 TMA при $\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 490 - 555$ нм.

2.6.5. Влияние ингибиторов везикулярного транспорта на содержание Na^+ в клетках суспензионной культуры *A. thaliana*

Клетки 4-х дневной суспензионной культуры, выращенные в среде культивирования без добавления NaCl, осаждали центрифугированием при 1400 g в течение 5 мин, промывали один раз реакционной средой, (1 % раствор сахарозы (м / о), приготовленный на МС и забуференный 50 мМ ВТР-MES, pH 8.0). Суспензию клеток концентрировали до 20% объема уплотнения клеток (о / о). К аликвотам, объемом 10 мл, добавляли ингибиторы везикулярного транспорта брефелдин А, икаругамицин и вортманин (Sigma-Aldrich) в конечных концентрациях 178, 10 и 30 мкМ согласно (Shpetner et al., 1996; Emans et al., 2002; Ritzenthaler et al., 2002; Wandmann & Homann 2012). Исходные сток-растворы ингибиторов готовили в метаноле или диметилсульфоксиде. Растворители в соответствующих объемах добавляли к клеточным суспензиям контрольных вариантов. Суспензии клеточной культуры охлаждали на льду в течение 15 мин и вносили NaCl до конечной концентрации 100 мМ, переносили на шейкер и инкубировали при постоянном перемешивании 110 об / мин при 26 °C в течение 3 ч. 2.5 мл аликвоты фильтровали через стекловолоконные фильтры (Whatman, Maidstone, Великобритания) в 4 повторностях. Отфильтрованные клетки трижды промывали 2 мМ CaCl_2 и экстрагировали ионы натрия в воде при 100 °C в течение

30 мин. Концентрацию ионов натрия в экстрактах определяли, используя пламенный фотометр (ФПА-2-01, Сергиев Посад, Россия).

2.7. Статистический анализ

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа, используя программу Microsoft Excel 2010. Данные представлены как средние значения и их стандартные ошибки. Достоверность различий между мутантными растениями и растениями ДТ оценивали по t-критерию Стьюдента при разных значениях вероятности: $p \leq 0.05$ - (*), $p \leq 0.01$ - (**), $p \leq 0.001$ - (***)).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Участие белка мембранных нанодоменов AtFlot1 в везикулярном транспорте H⁺-АТФазы Р-типа у *A. thaliana* в условиях солевого стресса

Для достижения поставленной в работе цели ряд задач решался с использованием двух мутантов *A. thaliana* по гену *AtFlot1* (GK-467G04), полученных на основе экотипа Col-0 путем инсерционного мутагенеза. Предварительно эти мутанты *Atflot1oe* (CS444812GK) и *Atflot1ko* (SALK_205125C) были охарактеризованы нами (Khalilova et al., 2020; Khalilova et al., 2023). Ниже приводится их описание.

3.1.1. Характеристика инсерционных мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko*

3.1.1.1. Координаты вставок и проверка гомозиготности мутантных линий

Для проверки наличия вставок у обоих мутантов использовали метод ПЦР, а в качестве матрицы геномную ДНК. Согласно информации, содержащейся в базе данных TAIR, мутант *Atflot1oe* содержит вставку Т-ДНК в промоторе гена. В результате проведения ПЦР были получены ампликоны размером примерно 1080 п.н. для мутантного аллеля *Atflot1oe* и 1040 п.н. для аллеля ДТ. Обе хромосомы содержали вставку в гене *AtFlot1*, что указывает на гомозиготность данных растений *Atflot1oe* по мутантному аллелю (рис. 14а). Для более точного определения координат расположения вставки ПЦР-фрагмент секвенировали. Оказалось, что вставка Т-ДНК расположена в положении (– 91 п.н.) от старта транскрипции (рис. 14в).

У мутанта *Atflot1ko*, согласно данным, приведенным в базе данных TAIR, вставка Т-ДНК находится в положении (– 10 п.н.) по отношению к стартовому кодону гена *AtFlot1*, а левая бордерная последовательность (LB) у этого мутанта расположена в прямом направлении по отношению к нумерации нуклеотидов в хромосоме. В результате проведения ПЦР был получен ампликон размером примерно 5315 п.н. для мутантного аллеля *Atflot1ko* и 1040 для аллеля ДТ (рис.

14б). Для точного определения координат расположения вставки в гене начало полученного ПЦР-фрагмента секвенировали. Оказалось, что вставка Т-ДНК у мутанта *Atflot1ko* находится в конце первого экзона в положении 321 п.н. после (downstream) старт-кодона, а LB располагается в направлении, противоположном нумерации нуклеотидов в хромосоме (рис. 14в). У мутантных растений *Atflot1ko* также обе хромосомы содержали вставку Т-ДНК, свидетельствуя о гомозиготности данных растений.

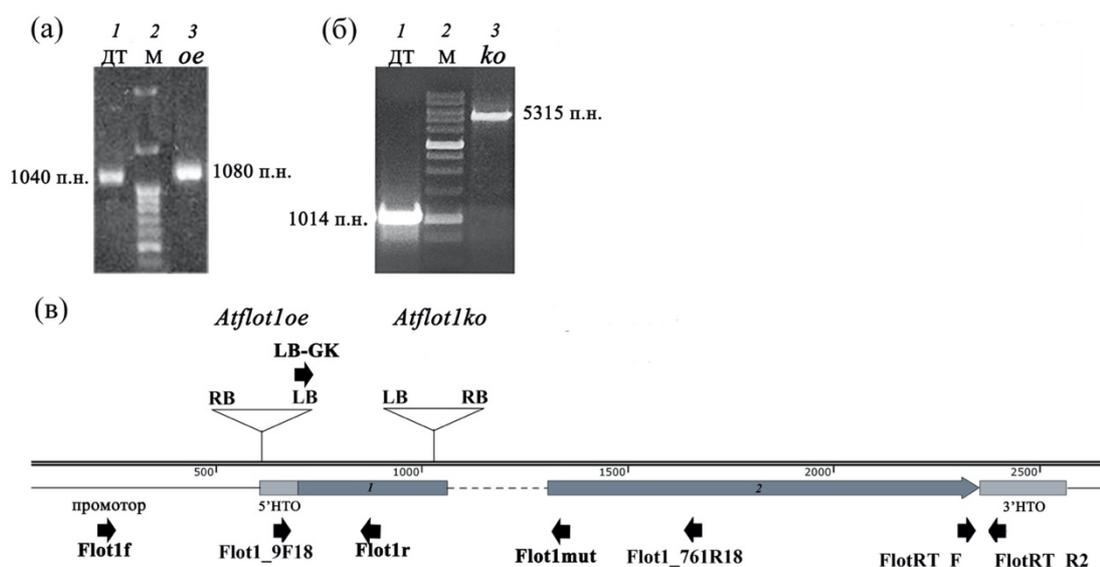


Рис. 14. Структура гена *AtFlot1* и расположение вставок Т-ДНК у мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko*. (а) Определение гомозиготности по гену *AtFlot1* в мутанте *Atflot1oe* с использованием пары праймеров FLot1mut и LB-GK на вставку Т-ДНК и пары праймеров на дикий тип Flot1f и Flot1r. При использовании ДНК ДТ синтезировался ампликон размером 1040 п.н. (дорожка 1), тогда как при наличии Т-ДНК(*oe*) образовывался ампликон размером 1080 п.н. (дорожка 3). (б) Определение гомозиготности по гену *AtFlot1* у мутантных растений *Atflot1ko* с использованием пары праймеров Flot1_9F18 и Flot1_761R18. При использовании ДНК ДТ синтезировался ампликон размером 1014 п.н. (дорожка 1), тогда как при наличии вставки Т-ДНК (*ko*) образовывался ампликон размером 5315 п.н. (дорожка 3). (в) Расположение функциональных элементов в гене *AtFlot1*. Темный прямоугольник и темная стрелка – 1-ый и 2-ой экзоны, соответственно; серые прямоугольники – нетранслируемые области; пунктирная линия – интрон; треугольники – вставки Т-ДНК; черные стрелки в нижней строке – положение праймеров.

3.1.1.2. Анализ экспрессии гена *AtFlot1* у растений *A. thaliana* ДТ и мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko*

Экспрессия гена *AtFlot1* у растений трех линий (*Atflot1oe*, *Atflot1ko* и ДТ) *A. thaliana* была исследована (Khalilova et al., 2020) методом количественной ПЦР в реальном времени в контрольных условиях и при 8-часовом действии NaCl (рис. 15а). NaCl вносили в ПС в конечной концентрации 100 мМ. Добавление хлористого натрия приводило к стимуляции транскрипции *AtFlot1* в корнях растений ДТ и *Atflot1oe*. При этом относительный уровень экспрессии *AtFlot1* в этом органе у *Atflot1oe* был существенно выше, чем у ДТ (рис. 15а). В листьях ни мутация *Atflot1oe*, ни присутствие NaCl практически не влияли на относительный уровень экспрессии *AtFlot1* (рис. 15а). У нокаут-мутанта *Atflot1ko* наблюдалась лишь «остаточная» экспрессия гена *AtFlot1* в корнях и листьях на очень низком уровне (рис. 15б).

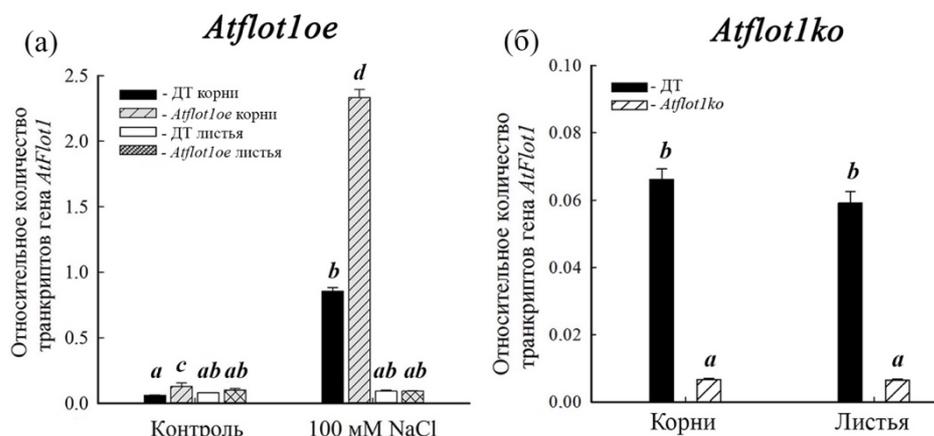


Рис. 15. Экспрессия гена *AtFlot1* в корнях и листьях 45-дневных растений *A. thaliana* у мутантов *Atflot1oe* (а), *Atflot1ko* (б) и ДТ. Растения выращивали на ПС $1/2$ Хогланда. В случае *Atflot1oe* (а) к ПС добавляли NaCl в конечной концентрации 100 мМ за 8 ч до анализа. В контрольных условиях NaCl не добавляли. Эксперименты проводили в трех биологических повторностях. В каждой повторности использовали смесь листьев или корней 20 отдельных растений. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n = 3$). Разные буквы обозначают статистически значимые различия между вариантами (ANOVA; $P < 0,05$), одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

3.1.1.3. Фенотип мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko*: ростовые характеристики, содержание воды, ионов Na^+ и K^+ в органах

Для исследования фенотипов двух указанных мутантов изучались: рост, уровень оводненности тканей, содержание ионов K^+ и Na^+ в корнях и листьях растений *Atflot1oe*, *Atflot1ko* и ДТ, выращенных как в присутствии, так и в отсутствие NaCl в питательной среде (ПС) (Khalilova et al., 2020; Khalilova et al., 2023). NaCl вносили в ПС в концентрациях 50 или 100 мМ за 20 дней до окончания роста и сбора выращенных растений для анализа (рис. 16а, е). Наличие NaCl в ПС растений *A. thaliana* ДТ и мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko* не оказывало статистически достоверного влияния на сырую массу корней при концентрации 50 мМ, но приводило к снижению биомассы этого органа при концентрации соли 100 мМ. Снижение сырой массы листьев под действием NaCl наблюдалось у растений всех трех линий как при 50, так и при 100 мМ NaCl в ПС (рис. 16 а, б в, е, ж, з.).

Подавляющее действие NaCl на рост листьев при 100 мМ было сильнее, чем при 50 мМ NaCl . Мутация *Atflot1oe* в целом оказывала стимулирующее действие на рост органов *A. thaliana* (рис. 16а, б, в). Повышенный рост корней у мутанта *Atflot1oe* наблюдался в контрольных условиях и при 50 мМ NaCl в ПС, но не при 100 мМ NaCl , тогда как стимуляция роста листьев у этого мутанта происходила как в контроле, так и при обеих концентрациях NaCl в среде.

Нокаут-мутация *Atflot1ko* не оказывала ингибирующего действия на рост растений. Не было обнаружено статистически достоверных различий в сырой массе корней и листьев у нокаут-мутанта и растений ДТ, как в контрольных условиях, так и при засолении ПС (рис. 16 е, ж, з).

Оводненность (содержание воды в расчете на единицу сухой массы корней и листьев) мало изменялась под действием NaCl у растений трех линий. Обе мутации (*Atflot1oe* и *Atflot1ko*) также практически не оказывали влияния на оводненность органов как в контроле, так и в условиях засоления (рис. 16 г, д, и, к). Отсутствие у нокаут-мутанта снижения сырой биомассы и одновременно снижения

оводненности тканей указывает на отсутствие у него торможения биосинтетических процессов.

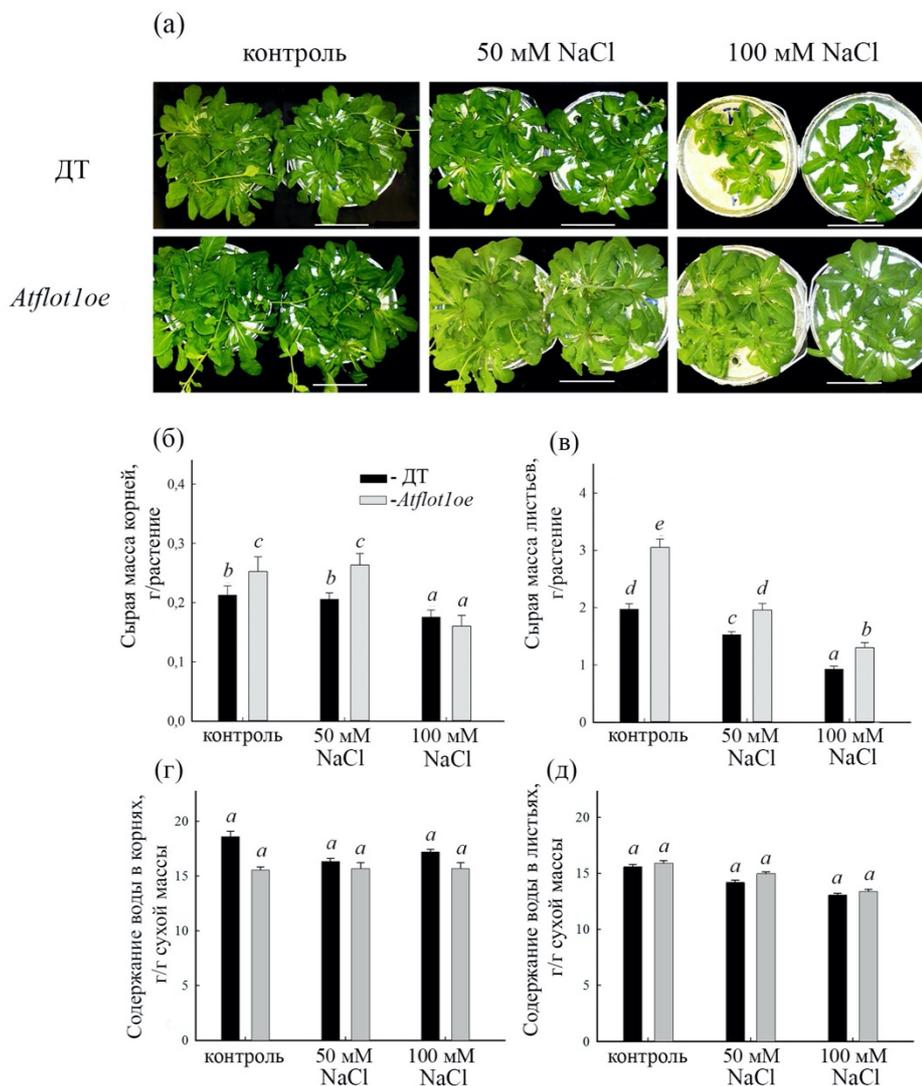


Рис. 16. Общий вид растений (а), сырая масса (б, в) и оводненность (г, д) корней и листьев ДТ и *Atflot1oe*; (б, г) – корни; (в, д) – листья. Растения выращены в отсутствие (контроль) или в присутствии NaCl в ПС в конечных концентрациях 50 и 100 мМ; (масштабная линейка – 5 см). Приведены средние значения ± стандартная ошибка (n = 3, средний вес 16 растений в каждой повторности). Разные буквы обозначают статистически значимые различия между вариантами (ANOVA; P < 0,05).

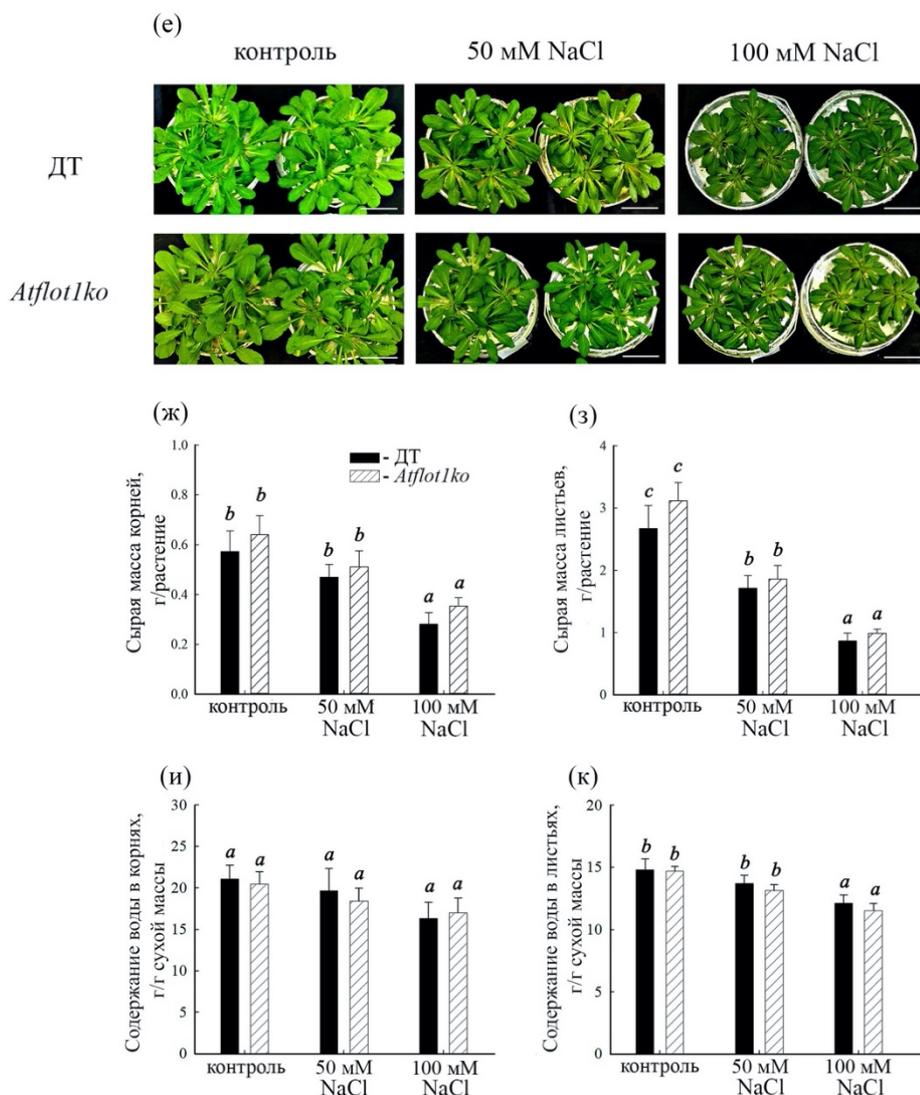


Рис. 16. Общий вид растений (е), сырая масса (ж, з) и оводненность (и, к) корней и листьев ДТ и *Atflot1ko*; (ж, и) – корни; (з, к) – листья. Растения выращены в отсутствие (контроль) или в присутствии NaCl в ПС в конечных концентрациях 50 и 100 мМ; (масштабная линейка – 5 см). Приведены средние значения ± стандартная ошибка (n = 3, средний вес 16 растений в каждой повторности). Разные буквы обозначают статистически значимые различия между вариантами (ANOVA; P < 0,05).

Содержание ионов Na⁺ и K⁺ в корнях и листьях растений ДТ и мутантов, как *Atflotloe*, так и *Atflot1ko*, изменялось в ответ на внесение NaCl в ПС. У растений ДТ и мутанта *Atflotloe* внесение NaCl в ПС приводило к снижению содержания K⁺ (рис. 17а, в) и возрастанию содержанию Na⁺ в обоих органах (рис. 17б, г). Увеличение содержания Na⁺ было более заметным при 100 мМ, чем при 50 мМ

NaCl в среде. Содержание K^+ в корнях растений *Atflot1oe* было выше, чем у ДТ при концентрациях NaCl в ПС 50 и 100 мМ (рис. 17а). В листьях этого мутанта более высокое содержание K^+ , по сравнению с ДТ, наблюдалось только при 100 мМ NaCl (рис. 17в). В целом, мутация *Atflot1oe* привела к снижению содержания Na^+ и к увеличению содержания K^+ в органах *A. thaliana*. Нокаут-мутация *Atflot1ko*, в отличие от *Atflot1oe*, не привела к статистически достоверным изменениям в содержании Na^+ и K^+ в органах, как в контрольных условиях, так и в присутствии NaCl в ПС, что указывает на способность нокаут-мутанта поддерживать Na^+ , K^+ -гомеостаз, в том числе и в условиях засоления (рис. 17 д, е, ж, з).

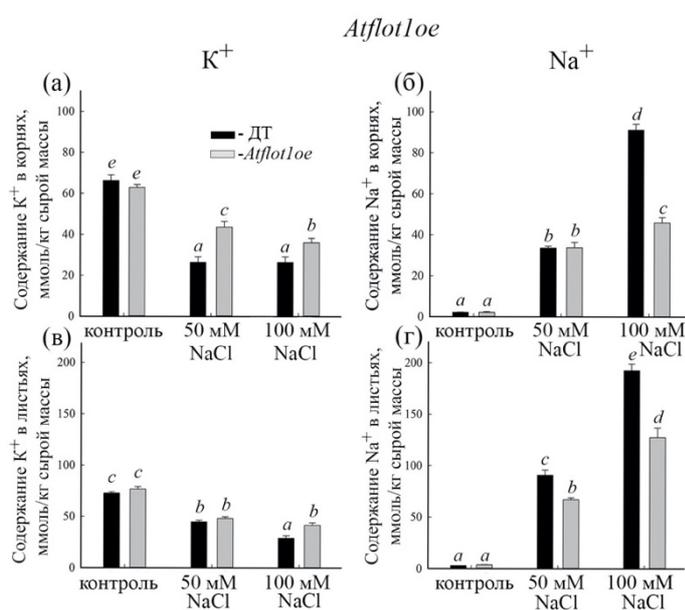


Рис. 17. Содержание K^+ (левые панели) и Na^+ (правые панели) в органах 45-дневных растений *A. thaliana* ДТ (черные столбики), *Atflot1oe* (серые столбики); (а, б) – корни; (в, г) – листья. NaCl в конечных концентрациях 50 мМ или 100 мМ добавляли к ПС за 20 дней до проведения анализов. Представленные средние значения и их стандартные ошибки ($n = 3$). Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; $P < 0.05$), одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

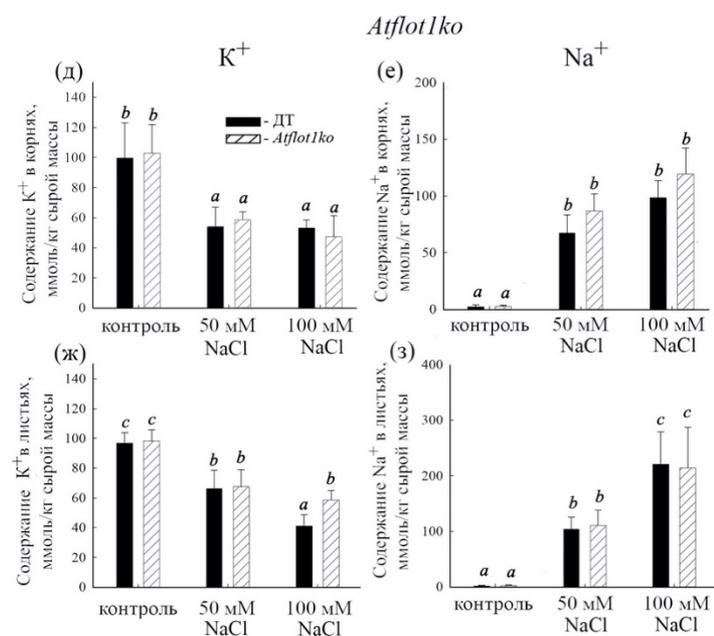


Рис. 17. Содержание K^+ (левые панели) и Na^+ (правые панели) в органах 45-дневных растений *A. thaliana* ДТ (черные столбики), *Atflot1ko* (заштрихованные столбики); (д, е) – корни; (ж, з) – листья. NaCl в конечных концентрациях 50 мМ или 100 мМ добавляли к ПС за 20 дней до проведения анализов. Представленные средние значения и их стандартные ошибки (n = 3). Разные буквы над столбиками указывают на статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; P < 0.05), одинаковые буквы указывают на отсутствие достоверных различий.

3.1.1.4. Влияние мутаций *Atflot1oe*, *Atflot1ko* и солевого шока на содержание H^+ -АТФазы Р-типа в плазматической мембране клеток органов *A. thaliana*

Относительное содержание H^+ -АТФазы в ПМ определяли с помощью иммуноблот-анализа, используя обогащенные ПМ мембранные фракции, выделенные из корней и листьев растений трех линий (ДТ, *Atflot1oe* и *Atflot1ko*) (Khalilova et al., 2023). Для выявления участия NaCl-зависимых процессов анализировали растения, выращенные при отсутствии NaCl в ПС и затем подвергавшиеся или не подвергавшиеся (контроль) солевому шоку (100 мМ NaCl, 12 ч).

Растения *Atflot1oe* и *Atflot1ko* выращивали в условиях водной культуры до 45-дневного возраста. H^+ -АТФаза Р-типа была выбрана как мембранный белок, играющий ключевую роль в ионном гомеостатировании, особенно в условиях

засоления. Для вестерн-блот анализа использовали поликлональные антитела против синтетического пептида, кодирующего консенсусную последовательность, выведенную на основе как ряда растительных H^+ -АТФаз Р-типа, так и H^+ -АТФаз Р-типа из других организмов. H^+ -АТФаза Р-типа на блотах представлена в виде двух иммуно-реактивных полос с молекулярными массами приблизительно 100 и 115 кДа (рис. 18а, б), что, по-видимому, отражает взаимодействие антител с разными изоформами H^+ -АТФазы. Две подобные иммуно-реактивные полосы были получены другими исследователями при анализе H^+ -АТФазы Р-типа *A. thaliana* (Haruta et al., 2010). Обе мутации, *Atflot1oe* и *Atflot1ko*, привели к сходным эффектам в корнях растений *A. thaliana*. При отсутствии соли в ПС в плазматической мембране, выделенной из корней обоих мутантов, относительное содержание H^+ -АТФазы в расчете на единицу массы общего белка мембранной фракции было заметно больше, по сравнению с ДТ. Солевой шок приводил к снижению относительного содержания H^+ -АТФазы в этих фракциях до значений, более низких или таких же, как в контрольном варианте растений ДТ. В корнях растений ДТ солевой шок приводил почти к двукратному увеличению относительного содержания H^+ -АТФазы в ПМ (рис. 18в). Аналогичный эффект наблюдали в листьях *A. thaliana* в случае нокаут-мутации *Atflot1ko*. В контрольных условиях относительное содержание H^+ -АТФазы в ПМ, выделенной из листьев мутанта *Atflot1ko*, было в 3.5 раза больше, чем в ПМ листьев растений ДТ в тех же условиях (рис. 18г). Внесение NaCl в ПС приводило к снижению относительного содержания H^+ -АТФазы в ПМ клеток листьев *Atflot1ko*, так же, как и в его корнях.

Однако, у *Atflot1oe*, в отличие от нокаут-мутанта, относительное содержание H^+ -АТФазы в ПМ клеток листьев было таким же, как у ДТ в контроле и оставалось на этом же уровне в условиях солевого шока. Относительное содержание H^+ -АТФазы в ПМ клеток листьев ДТ увеличивалось приблизительно в 1,5 – 2 раза в ответ на внесение NaCl в среду. Таким образом, при накоплении H^+ -АТФазы Р-типа в ПМ, выделенной из корней обоих мутантов и листьев *Atflot1ko* солевой шок приводил к устранению этого накопления. В случае «нормального», сбалансированного

содержания Flot1 в клетках, то есть в клетках с неизменной экспрессией *AtFlot1*, добавление в среду NaCl приводит или к увеличению содержания H^+ -АТФазы в мембране, или совсем не оказывает на него действия. К числу таких клеток относятся клетки корней и листьев растений ДТ, а также клетки листьев мутанта *Atflot1oe*. Следует отметить, что в листьях *Atflot1oe* в контрольных условиях, так же как у ДТ, фактически не наблюдалось повышенной экспрессии *AtFlot1* (рис. 18г).

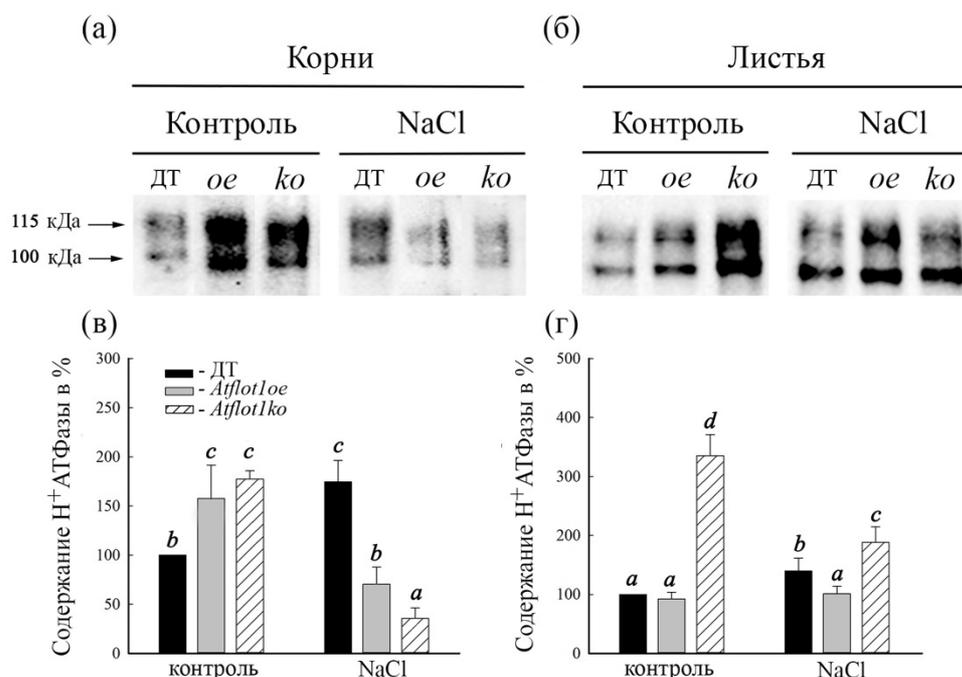


Рис. 18. Иммуноблотинг мембранных препаратов, полученных из корней и листьев ДТ, *Atflot1oe* (*oe*) и *Atflot1ko* (*ko*) мутантов *A. thaliana*, подвергавшихся или не подвергавшихся (контроль) солевому шоку. Мембранные фракции, обогащенные ПМ, полученные с использованием двухфазной полимерной системы, разделяли в 10 % SDS-PAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану для иммунодетекции с антителами к H^+ -АТФазе Р-типа. (а) – общий вид блотов для корней; (б) – общий вид блотов для листьев; (в) – относительное содержание изоформ H^+ -АТФазы в ПМ клеток корней; (г) – относительное содержание изоформ H^+ -АТФазы в ПМ клеток листьев. За 100 % принимали относительное содержание H^+ -АТФазы в растениях ДТ при отсутствии солевого шока. Приведены средние значения и их стандартные ошибки ($n = 3$). Разные буквы обозначают статистически значимые различия между выборками (однофакторный дисперсионный анализ; $P < 0,05$). Одинаковые буквы указывают на отсутствие различий между средними значениями в каждой группе (односторонний ANOVA, $P < 0,05$).

3.1.1.5. Влияние мутаций *Atflot1oe*, *Atflot1ko* и солевого стресса на содержание транскриптов генов H^+ -АТФазы Р-типа, *AHA1* и *AHA2*, в растениях *A. thaliana*

Для оценки различий в экспрессии генов H^+ -АТФазы и их возможного вклада в различия содержания АТФ-азного белка в ПМ мутантов *Atflot1ko*, *Atflot1oe* и ДТ исследовали экспрессию генов двух изоформ H^+ -АТФазы, *AHA1* (At2g18960) и *AHA2* (At4g30190) (рис. 19а, б) (Khalilova et al., 2023), характеризующихся наибольшей транскрипционной активностью по сравнению с другими изоформами этого белка. Методом кОТ-ПЦР в реальном времени было измерено относительное содержание транскриптов H^+ -АТФазы в растениях ДТ, *Atflot1oe* и *Atflot1ko*, выращенных при отсутствии NaCl в среде и подвергавшихся или не подвергавшихся (контроль) солевому шоку. Между растениями ДТ, *Atflot1oe* и *Atflot1ko* не было обнаружено различий в относительном содержании транскриптов как *AHA1*, так и *AHA2* в обоих органах, как в контрольных условиях, так и в условиях солевого шока (рис. 19а, б).

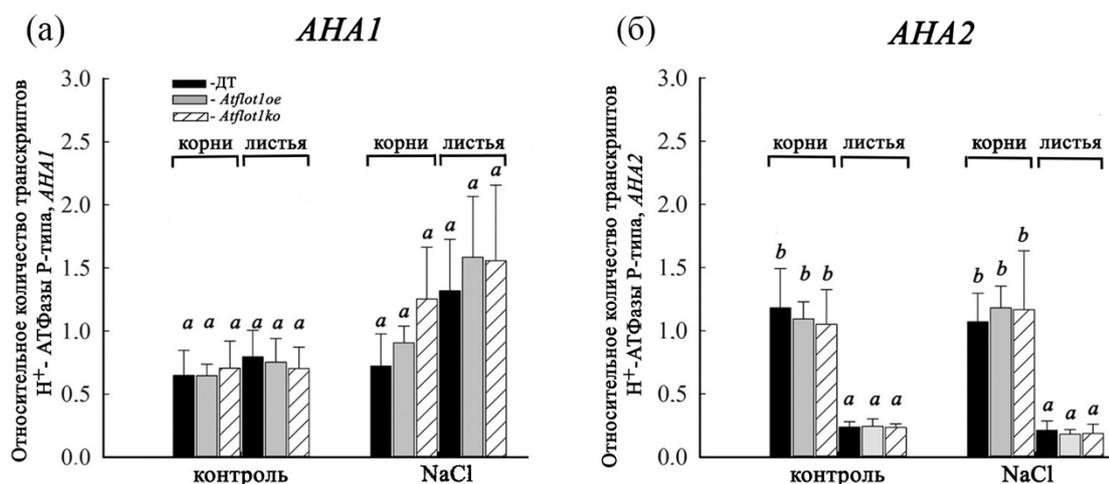


Рис. 19. Относительное содержание транскриптов генов *AHA1* и *AHA2* в корнях и листьях растений *A. thaliana* трех генотипов, не подвергавшихся (контроль) или подвергавшихся солевому шоку (100 мМ NaCl). (а) – *AHA1*, (б) – *AHA2*. Даны средние значения и их стандартные ошибки (n = 3). Разными буквами обозначены статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; P < 0.05).

Была выявлена тенденция к стимуляции экспрессии *AHA1* под действием солевого шока в листьях растений всех трех линий, а также в корнях *Atflot1ko*, однако различия в содержании транскриптов между контрольным и солевым вариантами не были статистически достоверными. Таким образом, влияние обеих мутаций на содержание H^+ -АТФазы в ПМ *A. thaliana* опосредовано скорее изменениями в везикулярном транспорте, но не изменениями в экспрессии изоформ H^+ -АТФазы. Изменения в содержании H^+ -АТФазы в ПМ в ответ на действие NaCl, по-видимому, могут быть обусловлены не только изменениями в везикулярном транспорте, но и NaCl-индуцированными изменениями в экспрессии генов H^+ -АТФазы (рис. 19а, б).

3.1.1.6. Влияние мутаций *Atflot1oe*, *Atflot1ko* и солевого стресса на поглощение эндоцитозного зонда FM4-64 корнями проростков *A. thaliana*

Для определения эндоцитозной активности клеток мутантов (*Atflot1oe* и *Atflot1ko*) и растений ДТ *A. thaliana* и влияния на нее солевого шока была исследована динамика поглощения флуоресцентного маркера эндоцитозных структур корнями 5-дневных проростков (Khalilova et al., 2023). Гидрофобные молекулы FM4-64 поглощаются клетками корня за счет связывания с липидами ПМ и последующей их интернализации в составе эндоцитозных везикул (Volte et al., 2004). Проростки трех линий *A. thaliana* (ДТ, *Atflot1oe*, *Atflot1ko*), не подвергавшихся солевому шоку (контроль), поглощали флуоресцентный краситель ПМ практически с одинаковой скоростью (рис. 20а). Солевой шок заметно увеличил скорость интернализации FM4-64 у мутанта *Atflot1oe* (рис. 20б). Вероятно, NaCl приводил к индукции эндоцитозного пути / путей в дополнение к путям, имевшим место в отсутствие соли. По-видимому, ускорение поглощения FM4-64 у *Atflot1oe* в ответ на солевой шок связано с повышенной экспрессией *AtFlot1* в корнях этого мутанта. В соответствии с этим было показано, что NaCl-зависимая стимуляция эндоцитоза связана с индукцией флотиллин-зависимого эндоцитоза в клетках растений *A. thaliana* (Li et al., 2011; Li et al., 2012).

3.1.1.7. Влияние мутаций *Atflot1oe*, *Atflot1ko* и солевого стресса на ультраструктуру клеток корней *A. thaliana*

С помощью ТЭМ, мы исследовали ультраструктуру клеток корней *A. thaliana* ДТ и двух мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko*, выращенных при отсутствии (контроль) и наличии NaCl в среде. В клетках растений этих линий на основе ТЭМ были выполнены также измерения количества комплексов Гольджи (КГ), мультивезикулярных тел (МВТ), парамуральных тел (ПМТ) и производных парамуральных тел (ППМТ) в расчете на единицу площади среза (морфометрия), отражающие содержание этих структур в цитоплазме (Khalilova et al., 2020; Khalilova et al., 2023).

В клетках корня проростков *A. thaliana* дикого типа, выращенных на среде без NaCl, обнаружили типичную для растительных клеток ультраструктуру. Аппарат Гольджи был активным, на что указывают везикулы, отделяющиеся от диктиосом и *транс*-Гольджи сети (ТГС) / ранних эндосом (РЭ). Мембраны цистерн эндоплазматического ретикулума (ЭР) имели обычный вид (рис. 21а; рис. 23а, б). Выращивание проростков ДТ на среде, содержащей 100 мМ NaCl, привело к изменениям в ультраструктуре клеток корня. Произошли изменения в ЭР, КГ и пост-Гольджи структурах.

В условиях засоления активировались процессы везикуляции и вакуолизации цитоплазмы (рис. 21б–е; рис. 23в, г). Наблюдалось набухание цистерн ЭР, которые, по-видимому, формировали микровакуоли (МВ); последние сливались в более крупные структуры. Подобное действие NaCl было обнаружено нами на ультраструктуру клеток мари белой (*Chenopodium album*) (Ivanova et al., 2016). В условиях засоления чаще наблюдалось отпочковывание везикул ТГС / РЭ от секреторного полюса КГ (рис. 21в–е). Мелкие везикулы часто находились внутри более крупных везикул, что указывает на формирование МВТ, являющихся, по-видимому, поздними эндосомами (рис. 9б, в).

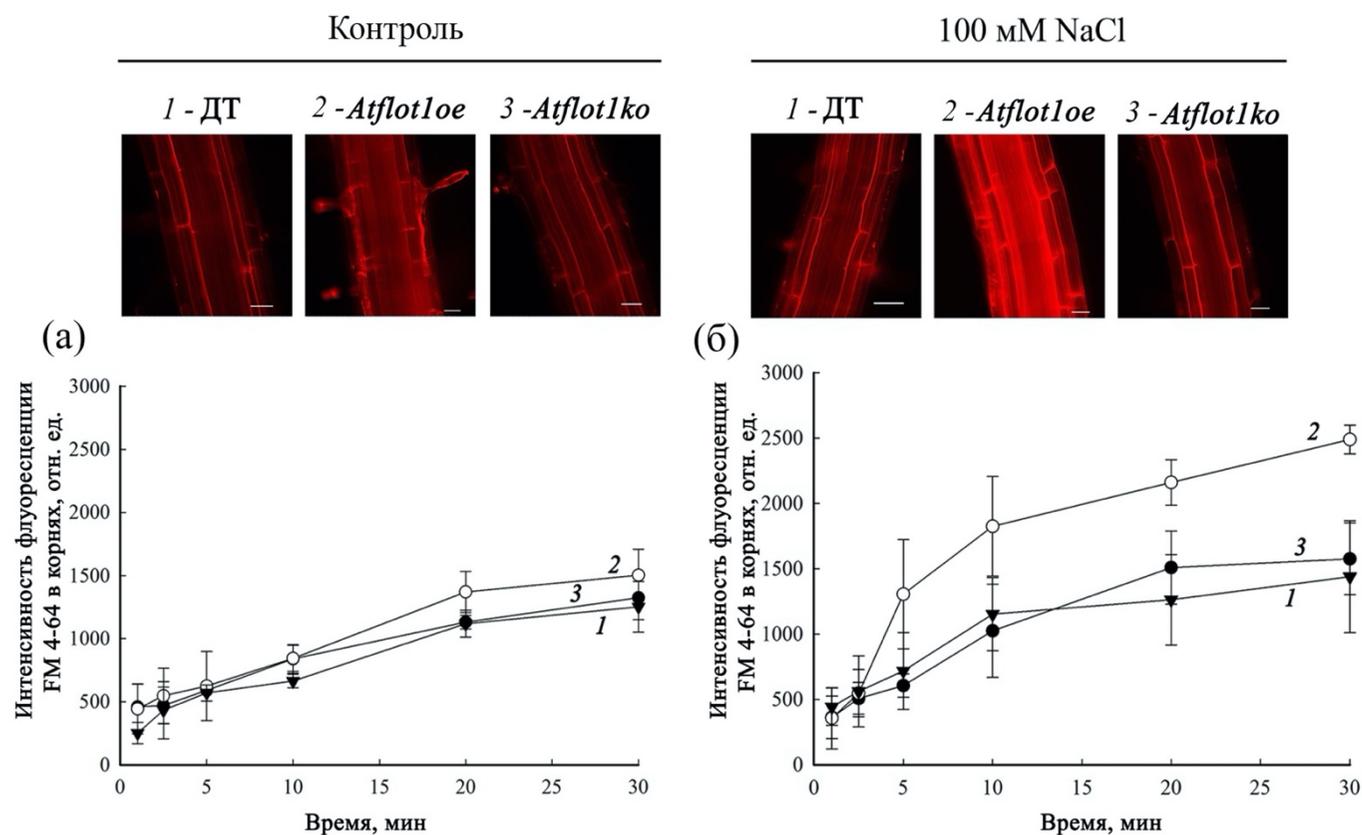


Рис. 20. Динамика поглощения эндоцитозного зонда FM4-64 корнями 5-дневных проростков *A. thaliana*. Проростки были инкубированы в среде ½ Мурасиге-Скуга, содержащей 2 мкМ FM4-64 в отсутствие (контроль) (а) или в присутствии NaCl (б) в конечной концентрации 100 мМ. 1 – ДТ, 2 – *Atflot1oe*, 3 – *Atflot1ko*. Цветные изображения показывают интенсивность FM4-64 в клетках корня после 30-мин инкубации. Приведены средние значения интенсивностей флуоресценции FM4-64 и их стандартные ошибки в корнях, полученные в трех независимых экспериментах с использованием 50 корней в каждом эксперименте. Масштаб: 20 мкм.

Количество МВТ в цитоплазме под действием NaCl увеличилось (рис. 22б). Полученный результат может указывать на активирование процесса отпочковывания пост-Гольджи везикул от КГ и созревания их в МВТ. Часто наблюдалось слияние МВТ с ПМ или тонопластом и выход везикул, содержащихся внутри МВТ, в вакуоль или периплазматическое пространство (рис. 21б, д, е).

Сравнение ультраструктуры клеток мутанта *Atflot1oe* и растений ДТ, морфометрия их структур показали, что мутация, как и условия засоления, стимулировала везикуляцию и образование эндосом. В цитоплазме накапливались везикулы и МВ размером приблизительно 30–250 нм и 1–2 мкм, соответственно (рис. 21ж–и). В некоторых клетках они занимали значительную часть объема цитоплазмы (рис. 21к). Содержание МВТ в расчете на единицу поверхности среза у мутанта было существенно больше, чем у растений ДТ (рис. 22б). Повышенное содержание МВТ и более частое их слияние с тонопластом и ПМ были результатом как мутации, так и действия NaCl.

Мутация оказывала более сильное действие, чем засоление, а эффекты этих двух факторов суммировались (рис. 21а, б, ж–н). У мутанта *Atflot1oe* наблюдалось также снижение числа диктиосом в комплексах Гольджи и происходила их деформация с образованием кольцеподобных структур на транс-стороне КГ, что было особенно заметно в условиях засоления (рис. 21к).

Такие изменения КГ могут отражать активирование везикулярного транспорта и ускоренное расходование материала комплексов Гольджи на образование эндосом. При этом совместное действие двух факторов, а именно засоления и мутации *Atflot1oe*, заметно увеличивало число комплексов Гольджи в цитоплазме (рис. 21и, к, м, н; 22а). Полученный результат может указывать на активирование биогенеза комплексов Гольджи. Мутация *Atflot1oe*, в отличие от NaCl, оказала лишь слабое влияние на образование МВ в цитоплазме.

Исследование ультраструктуры клеток корня нокаут-мутанта у растений, выращенных на среде без NaCl, показало, что мембраны ЭР часто расходились, образуя просветы и полости, не свойственные в этих условиях ЭР растений ДТ

(рис. 23д, е, з). Аппарат Гольджи у *Atflotlko* в отсутствие засоления выглядел активным, отделяя на секреторном полюсе везикулы. Везикулы отпочковывающиеся в цитоплазму у нокаут-мутанта, так же как, у ДТ и мутанта *Atflotloe*, были разного размера в диапазоне 30–250 нм. Процесс везикуляции у нокаут-мутанта *Atflotlko* выглядел более активным, чем у ДТ. В некоторых клетках нокаут-мутанта везикулы занимали значительную часть объема цитоплазмы (рис. 23д, е). Содержание КГ у *Atflotlko* и ДТ практически не различалось, тогда как содержание МВТ у нокаут-мутанта было существенно ниже, чем у ДТ (рис. 22а, б). В присутствии NaCl нокаут-мутация привела к достоверному снижению содержания КГ и МВТ в клетках корня (рис. 22а, б). Следует отметить противоположное действие нокаут-мутации и NaCl на содержание МВТ.

Исследование ультраструктуры *A. thaliana* ДТ, *Atflotloe* и *Atflotlko* выявило в клетках корня всех трех линий наличие парамуральных тел (An et al., 2007). Парамуральные тела (ПМТ) представляют собой инвагинации, направленные в вакуоль, сразу двух мембран, ПМ и тонопласта (рис. 23б, ж–м). Такие инвагинации отделяются в вакуоль, образуя в ней двумембранные структуры, которые далее по тексту будут называться производными парамуральных тел (ППМТ) (рис. 23в, з). ППМТ, находясь в вакуоли, подвергаются деградации.

При отсутствии NaCl в среде у мутанта *Atflotloe* содержание ПМТ в клетках корня было существенно выше, а у нокаут-мутанта *Atflotlko* ниже, чем у ДТ (рис. 24а). Внесение NaCl в питательную среду у растений ДТ приводило к заметному увеличению содержания ПМТ и ППМТ (рис. 24а, б). В присутствии NaCl, как у *Atflotloe*, так и у *Atflotlko* содержание ПМТ было ниже, чем у ДТ и поддерживалось на уровне ДТ в контроле (рис. 24а). Следует отметить противоположное действие нокаут-мутации и NaCl на содержание ПМТ. Содержание ППМТ в вакуолях *Atflotloe*, как в присутствии так и при отсутствии NaCl в среде было существенно выше, чем у ДТ соответствующих вариантов. Особенно высокое содержание ППМТ наблюдалось у *Atflotloe* в условиях засоления.

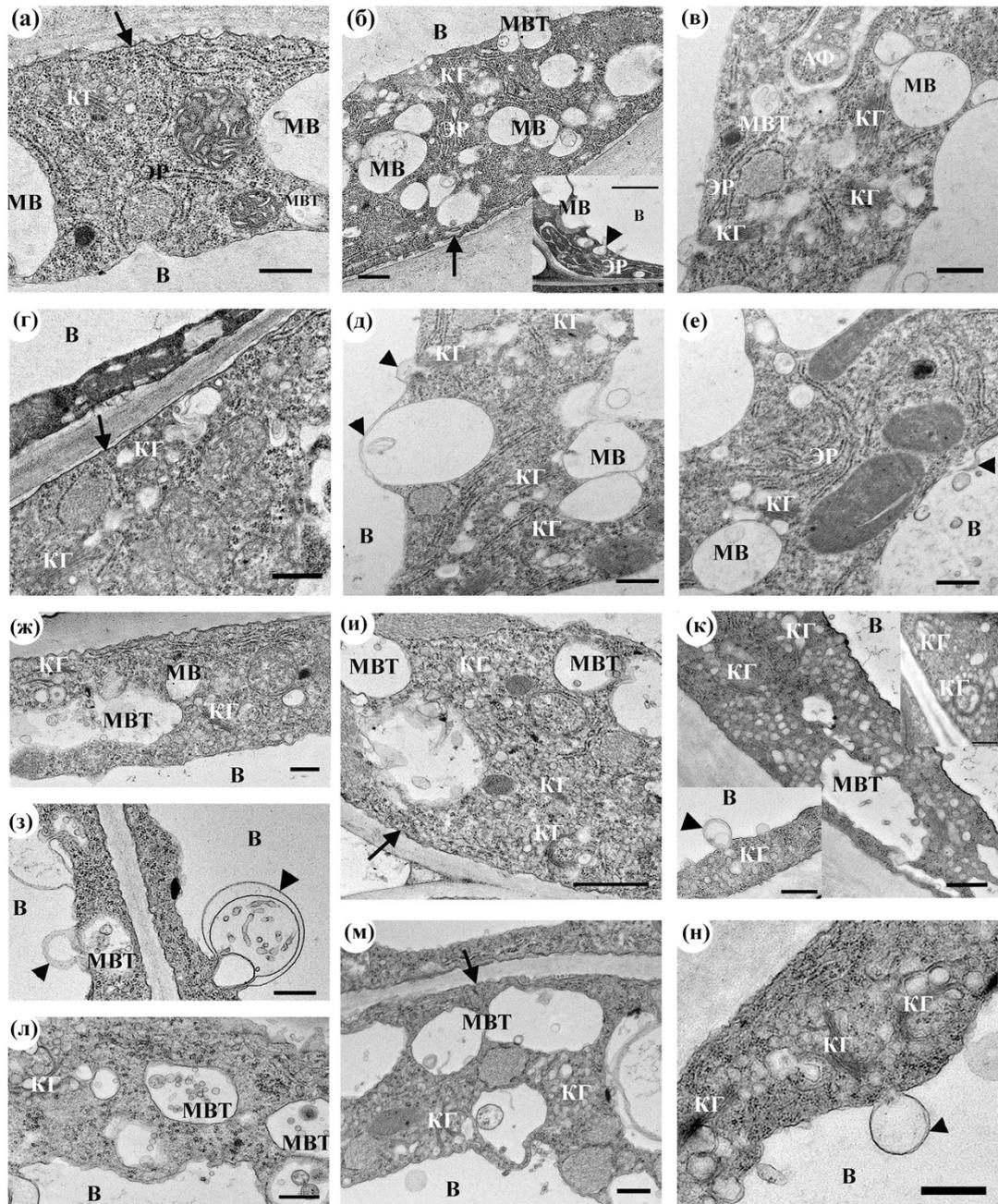


Рис. 21. Ультраструктура клеток корней 4-дневных проростков *A. thaliana* ДТ (а–е) и мутанта *Atflot1oe* (ж–н), исследованная с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Проростки выращивали на агаризованном 50 % питательном растворе МС, содержащем 1 % сахарозу с добавлением 100 мМ NaCl или без добавления NaCl (контроль). (а) – ДТ, контроль; (б–е) – ДТ, 100 мМ NaCl; (ж–и) – *Atflot1oe*, контроль; (к–н) – *Atflot1oe*, 100 мМ NaCl. MB – микровакуоли, MBT – мультивезикулярные тела, В – вакуоль, АФ – аутофагосома, ЭР – эндоплазматический ретикулум, КГ – комплекс Гольджи, черные стрелки указывают на плазмалемму, черные треугольники – на структуры, сливающиеся с тонопластом. Масштабная линейка – 0.5 мкм.

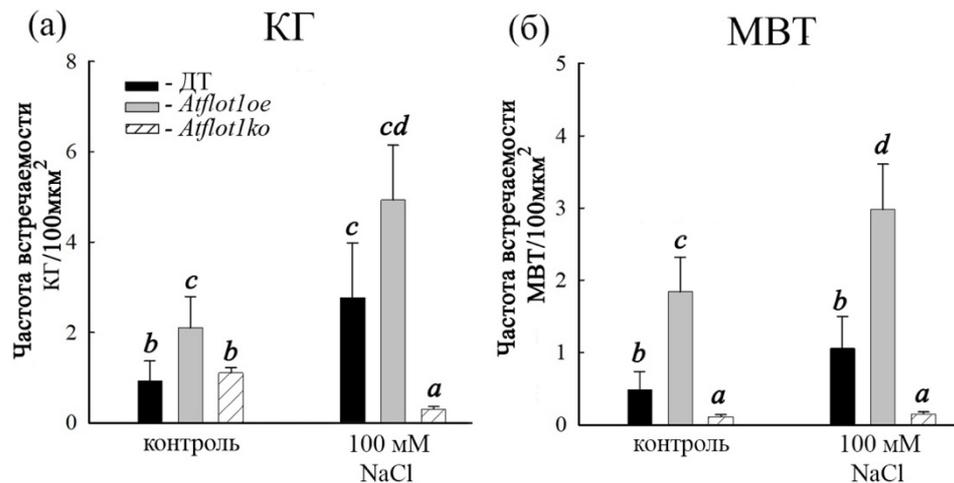


Рис. 22. Частота встречаемости КГ (а) и МВТ (б) в клетках корней 4-дневных проростков *A. thaliana* ДТ, *Atflot1oe* и *Atflot1ko*, выращенных на агаризованной среде в отсутствие NaCl (контроль) и с внесением в среду NaCl в конечной концентрации 100 мМ. Частота встречаемости – количество соответствующей структуры, подсчитанное на электронных микрофотографиях клеток в расчете на 100 мкм² среза. Для каждого варианта даны средние значения и их стандартные ошибки, определенные в 100 клетках. Разными буквами обозначены статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; $P < 0.05$).

У нокаут-мутанта содержание ППМТ и в тех, и в других условиях сохранялось на уровне ДТ в контрольном варианте (рис. 24б).

Содержание ПМТ, находящихся в цитоплазме, должно зависеть как от скорости их образования, так и от скорости их отделения от цитоплазмы и перехода в свободное состояние в вакуоли. При отсутствии NaCl в среде, наблюдалось повышенное содержание ПМТ у *Atflot1oe* и пониженное содержание этих структур у *Atflot1ko* по сравнению с ДТ. При этом у трех линий растений частота встречаемости ПМТ и ППМТ были сопоставимы (рис. 24а, б). В присутствии NaCl у ДТ и нокаут-мутанта было больше ПМТ и меньше ППМТ (рис. 24а, б). У мутанта *Atflot1oe* в условиях солевого стресса значительно увеличилось содержание ППМТ в вакуолях (рис. 24а, б). Можно предположить, что *AtFlot1* участвует, как в формировании ПМТ, так и в последующей трансформации ПМТ в ППМТ. Условия

солевого стресса, видимо, изменяют свойство мембран таким образом, что процесс отделения ПМТ от цитоплазмы, становится восприимчивым к избытку AtFlot1.

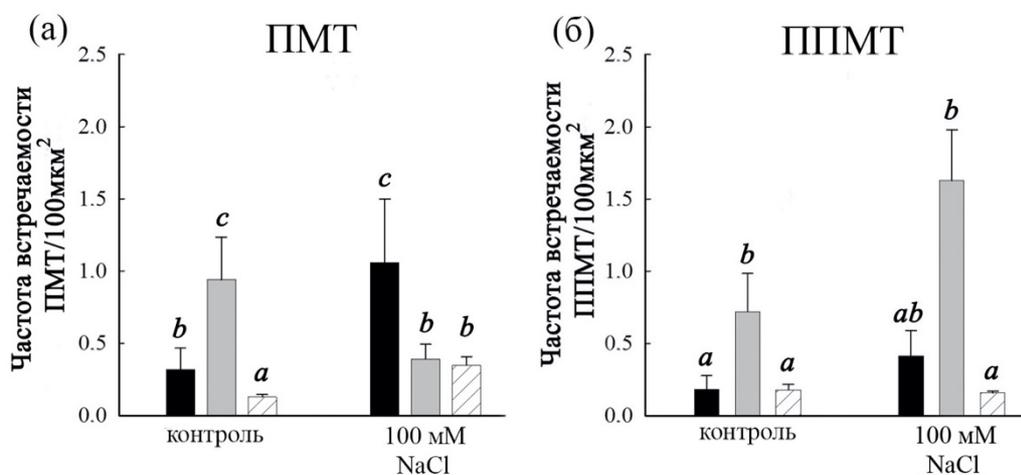


Рис. 24. Частота встречаемости ПМТ (а) и ППМТ (б) в клетках корней 4-дневных проростков *A. thaliana* ДТ, *Atflot1oe* и *Atflot1ko*, выращенных в среде без NaCl – контроль, и в присутствии NaCl в конечной концентрации 100 мМ. Частота встречаемости – количество соответствующей структуры, подсчитанное на электронных микрофотографиях клеток в расчете на 100 мкм² среза. Для каждого варианта даны средние значения частот встречаемости и их стандартные ошибки, определенные в 100 клетках. Разными буквами обозначены статистически достоверные различия между средними значениями (ANOVA; $P < 0.05$).

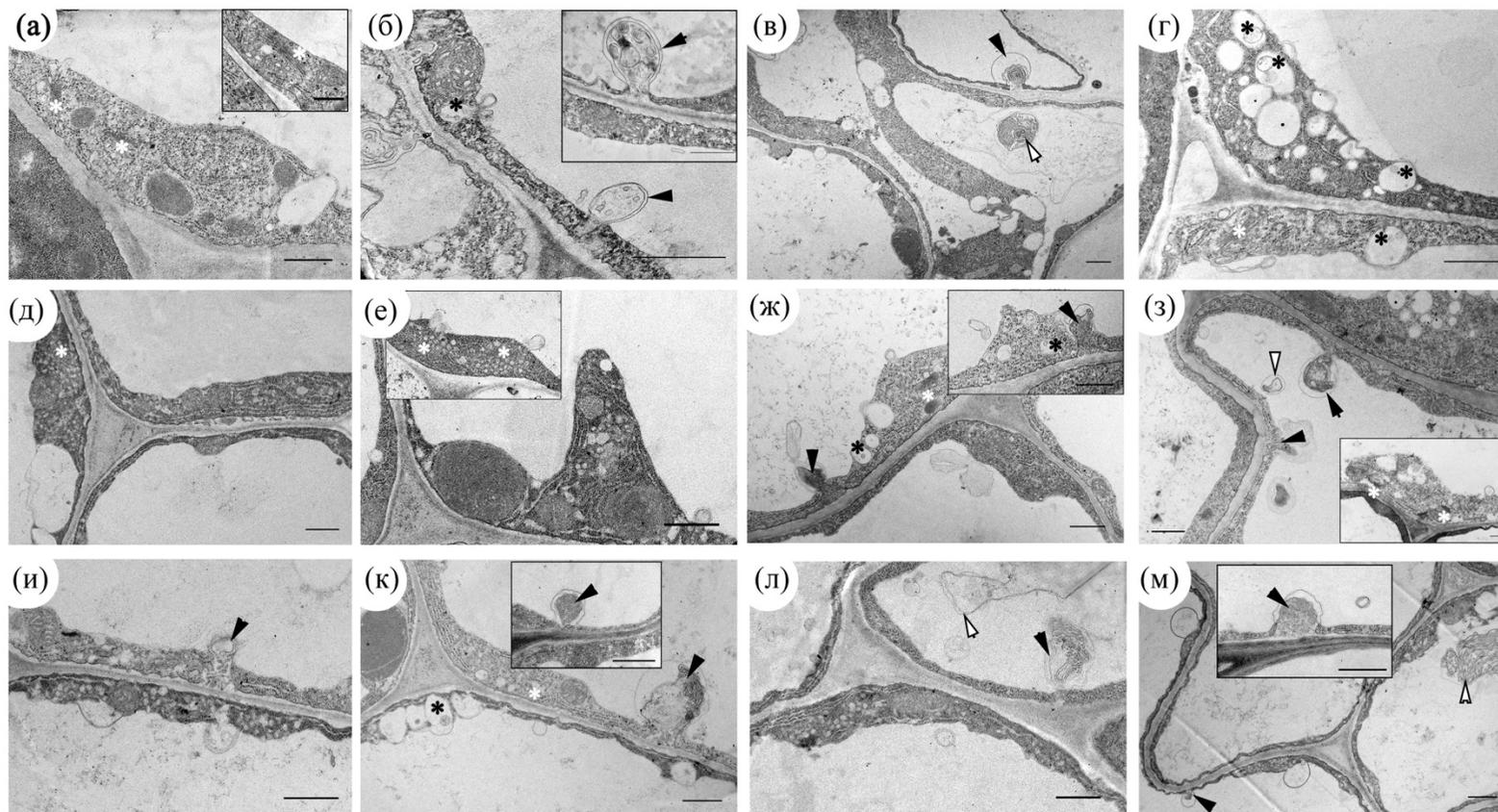


Рис. 23. Ультраструктура клеток корней 4-дневных проростков *A. thaliana* ДТ (а–г) и мутанта *Atflot1ko* (д–м), исследованная с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Проростки выращивали на агаризованной питательной среде ½ МС, содержащей 1 % сахарозу, в отсутствие (контроль) или в присутствии NaCl в конечной концентрации 100 мМ. (а, б) – ДТ, контроль; (в, г) – ДТ, 100 мМ NaCl; (д–з) – *Atflot1ko*, контроль; (и–м) – *Atflot1ko*, 100 мМ NaCl. Черные звездочки – MBT, белые звездочки – КГ, черные стрелки – парамуральные тела (ПМТ), белые стрелки – производные парамуральных тел (ППМТ). Масштаб: 1 мкм.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В РАЗДЕЛЕ 3.1.

Эффекты мутаций *Atflot1oe* и *Atflot1ko*, а также NaCl на везикулярный транспорт и содержание H⁺-АТФазы в ПМ суммированы в таблице 10 и на рисунке 25. Неожиданный результат – сходное действие нокаут-мутации *Atflot1ko* и мутации *Atflot1oe* на содержание H⁺-АТФазы в ПМ клеток корня может найти объяснение в рамках представлений о цикличности везикулярного транспорта белков и вовлечении *AtFlot1* в его пути. Содержание белка в ПМ, в частности H⁺-АТФазы, определяется балансом скоростей экзоцитоза, эндоцитоза и вакуолярного пути, по которому белок направляется на деградацию (Bandmann et al., 2011; Mulet et al., 2013; Dragwidge, Van Damme, 2020). Увеличение содержания белка в ПМ происходит за счет преобладания скорости его доставки (экзоцитоза), тогда как снижение содержания белка в ПМ, по-видимому происходит благодаря преобладанию скоростей эндоцитоза и вакуолярного пути над экзоцитозом.

Большое количество везикул и низкое содержание МВТ в цитоплазме клеток нокаут-мутанта в контрольных условиях, наблюдавшиеся при одновременном повышении содержания H⁺-АТФазы в ПМ, могут указывать на: (1) подавление процесса превращения ТГС / РЭ в МВТ / ПЭ (рис. 25, пути 4, 5), что может быть следствием отсутствия белка *AtFlot1*, (2) активирование прямого переноса карго (H⁺-АТФазы) транспортными везикулами от КГ и ТГС к ПМ (рис. 25, путей 1, 2) в обход пути, связанного с образованием МВТ / ПЭ (рис. 25, путь 4).

Наличие путей переноса белков транспортными везикулами, минуя стадию образования МВТ, у *A. thaliana* показано в ряде работ (Contento & Bassham, 2012; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2019; Hu et al., 2020). Не исключено также, что низкое содержание МВТ у нокаут-мутанта в контроле является результатом повышенной скорости слияния МВТ с ПМ, что приводит к ускоренной доставке карго к ПМ и, соответственно, к более быстрому расходованию мембранного материала МВТ. Следует, однако, отметить, что второй сценарий менее вероятен, поскольку в периплазматическом пространстве у нокаут-мутанта в контрольном

варианте практически полностью отсутствуют экзосомы – везикулы, образующиеся из МВТ (рис. 11д–з). Низкое содержание КГ и МВТ у нокаут-мутанта, наблюдавшееся в условиях засоления, может указывать на ингибирование экзоцитозного пути и вовлечение белка *AtFlot1* в экзоцитоз на стадии формирования комплекса Гольджи. Можно предположить, что *AtFlot1* необходим для секреторного пути транспорта белков, связанного с образованием МВТ, который имеет место у ДТ в этих условиях. Повышенная экспрессия *AtFlot1* также влияла на везикулярный транспорт и содержание H^+ -АТФазы в ПМ у растений *A. thaliana*. Однако, наблюдавшееся у мутанта *Atflot1oe* в контрольных условиях увеличение содержания H^+ -АТФазы в ПМ по сравнению с ДТ, сопровождалось не уменьшением, как у нокаут-мутанта, а увеличением содержания МВТ и КГ в цитоплазме (табл. 10). При этом у *Atflot1oe* высокое содержание КГ и МВТ сохранялось и в условиях засоления, когда содержание H^+ -АТФазы в ПМ было низким. Вероятно, избыток *AtFlot1* в отсутствие NaCl приводил к стимуляции экзоцитозного пути через формирование МВТ, доставляющего белок к ПМ, а воздействие NaCl приводило к его ингибированию на стадии слияния МВТ с ПМ.

Вероятно, отсутствие белка *AtFlot1* в клетках нокаут-мутанта или, наоборот, повышенное его содержание у *Atflot1oe* делают экзоцитозный путь чувствительным к NaCl.

У растений дикого типа, не подвергшихся солевому шоку, содержание H^+ -АТФазы в ПМ соответствует сбалансированному состоянию экзоцитоза и эндоцитоза, которое, вероятно, определяется физиологическим диапазоном внутриклеточного содержания *AtFlot1*. В пределах этого диапазона, NaCl-шок, по-видимому, за счет стимуляции МВТ-опосредованного пути, увеличивает содержание H^+ -АТФазы в ПМ клеток корней растений ДТ. Таким образом, согласно нашей гипотезе (Khalilova et al., 2023), солевой шок приводит к торможению экзоцитоза не только у *Atflot1ko*, но и у *Atflot1oe*, однако механизмы торможения у двух мутантов, по-видимому, различаются.

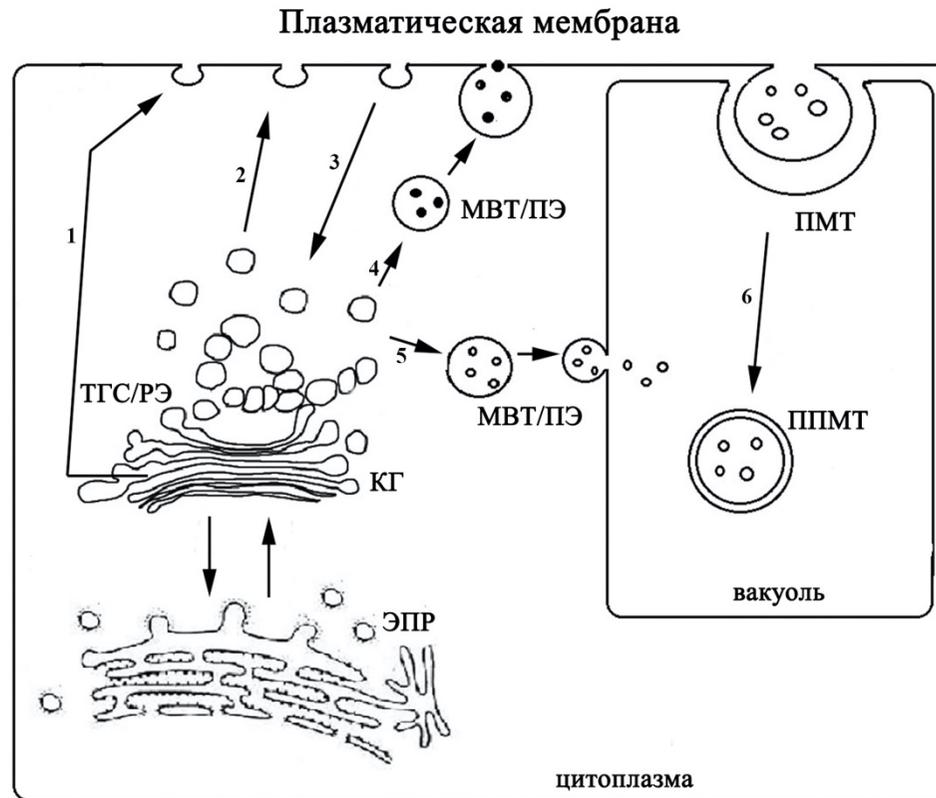


Рис. 25. Гипотетическая схема, описывающая перестройку секреторных путей у нокаут-мутанта *Atflot1ko* и стимуляцию пути из ПМ в вакуоль через биогенез ПМТ у мутанта *Atflot1oe c* повышенной экспрессией *Flot1* в корне. Пути везикулярного транспорта в клетках *A. thaliana*: 1, 2, 4, 5 – экзоцитоз, 3, 6 – эндоцитоз, 6 – вакуолярный путь. Показаны предполагаемые альтернативные пути экзоцитоза у нокаут-мутанта (1, 2, 3) в обход образования МВТ. ЭПР – эндоплазматический ретикулум, ТГС / РЭ – транс Гольджи сеть / ранние эндосомы, МВТ / ПЭ – мультивезикулярные тела / поздние эндосомы, ПМТ – парамуральные тела, ППМТ – производные парамуральных тел.

Встает вопрос, каков вклад эндоцитоза в изменения содержания H^+ -АТФазы в ПМ, вызывавшиеся мутациями и NaCl. Как показали исследования динамики поглощения эндоцитозного зонда FM 4-64 корнями проростков, влияние на эндоцитоз оказывала только мутация *Atflot1oe* в условиях солевого шока. Эти результаты согласуются с результатами, полученными другими авторами (Li et al., 2011; Li et al., 2012; Nao et al., 2014), которые показали, что флотиллин-зависимый эндоцитоз у *A. thaliana* стимулируется добавлением NaCl. Наиболее значительный вклад во флотиллин-зависимую стимуляцию эндоцитоза, индуцируемую NaCl, следует ожидать у мутанта с повышенной экспрессией гена *AtFlot1*. Результаты этого эксперимента показывают, что флотиллин-зависимый эндоцитоз скорее всего вносит вклад в регуляцию содержания H^+ -АТФазы в ПМ.

Поскольку пассивное поступление Na^+ в клетки зависит от электрического потенциала ПМ, главным генератором которого является H^+ -АТФаза, то изменения соотношения экзоцитоз/эндоцитоз для этого белка может быть способом быстрой регуляции поступления Na^+ в клетки при внесении NaCl в питательный раствор.

При изучении структурных аспектов везикулярного транспорта *A. thaliana* мы обнаружили эффекты мутаций *Atflot1oe* и *Atflot1ko* на образование ПМТ и их последующей трансформации в ППМТ. Полученные в этих экспериментах результаты свидетельствуют об участии белка мембранных нанодоменов Flot1 в биогенезе ПМТ и, соответственно, в переносе веществ в вакуоль.

Таким образом, наиболее вероятно, что AtFlot1 одновременно вовлечен в разные пути везикулярного транспорта, что согласуется с представлением о том, что флотиллины играют скорее структурную, чем функциональную роль. Следует отметить, что у флотиллинов до настоящего времени не обнаружена активность, подобная активностям ферментов или транспортеров. Роль этих белков, вероятно, заключается во влиянии на другие белки посредством белок-белковых взаимодействий (Baumann et al., 2000; Ma et al., 2022; Li et al., 2023). Показано, что AtFlot2 образует комплексы с белками, участвующими в различных метаболических процессах и физиологических функциях: ионном

гомеостатировании, транспорте воды, внутриклеточном транспорте веществ, реакции растений на биотические и абиотические стрессы, убиквитинилировании и протеасомной деградации белков, и с другими белками (Daněk et al., 2016; Junkova et al., 2018). H^+ -АТФаза плазмалеммы относится к числу белков, взаимодействующих с AtFlot2 (Junkova et al., 2018). Флотиллины могут играть важную роль в солеустойчивости растений, так как, судя по взаимодействию с другими белками, вовлечены в ионный и водный обмены. Их участие в водном и ионном обменах может осуществляться через везикулярный транспорт ион-транспортирующих белков и аквапоринов. Связь солеустойчивости с везикулярным транспортом была показана в ряде исследований, в том числе и нами (Mazel et al., 2004; Leshem et al., 2006; Hamaji et al., 2009; Ebine et al., 2011; Li et al., 2011; Baral et al., 2015a; Sergienko et al., 2022; Rodriguez-Furlan et al., 2023).

Хотя флотиллины вовлечены во многие физиологические процессы, мы не обнаружили угнетения роста (рис. 4е, ж, з), а также нарушений Na^+ -, K^+ -гомеостаза (рис. 5д–з) в клетках корня и листа нокаут-мутанта *Atflot1ko*. Это может быть связано с активацией альтернативных путей везикулярного транспорта, а также с выполнением функций AtFlot1 другими изоформами флотиллинов. Последние, в частности AtFlot2, могут участвовать в обеспечении альтернативных путей везикулярного транспорта. Предположение о функциональной взаимозаменяемости флотиллинов AtFlot1 и AtFlot2 подтверждается результатами исследования, показавшими, что полученная с помощью РНК-интерференции линия *A. thaliana* со сниженной экспрессией обеих изоформ, как AtFlot1, так и AtFlot2, были меньше по размеру, чем растения ДТ, и имели структурные дефекты в апикальной меристеме (Li et al., 2012). Кроме того, было обнаружено, что инсерционные мутанты *A. thaliana* только по одному из этих генов в условиях солевого и других абиотических стрессов не имели существенных различий в длине корней и не проявляли других заметных морфологических изменений по сравнению с растениями дикого типа (Kroumanova et al., 2019).

В то же время, повышенная экспрессия *AtFlot1* в клетках корней мутанта *Atflot1oe* приводила к заметной стимуляции роста (рис. 4а, б, в), повышению содержания K^+ и снижению содержания Na^+ в органах этого мутанта при солевом стрессе (рис. 5а, б, в, г), что свидетельствует о важности белка *AtFlot1* для роста *A. thaliana* и поддержания ионного гомеостаза в клетках в этих условиях. Хорошо известно, что фенотип, наблюдаемый при повышенной экспрессии целевого белка, может отражать подлинную биологическую роль, которую играет этот белок (Prelich, 2012). Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, указывают на вовлечение белка *AtFlot1* в процессы, лежащие в основе устойчивости *A. thaliana* к NaCl.

Табл. 9. Влияние мутаций *Atflot1oe*, *Atflot1ko* и NaCl на везикулярный транспорт и относительное содержание H⁺-АТФазы в ПМ *A. thaliana*

	Влияние NaCl на растения ДТ	Эффекты <i>Atflot1oe</i>		Эффекты <i>Atflot1ko</i>	
		контроль	NaCl	контроль	NaCl
Содержание H ⁺ -АТФазы в ПМ	возрастает в корнях и листьях	возрастает в корнях	снижается в корнях	возрастает в корнях и листьях	снижается в корнях и возрастает в листьях
Эндоцитозная активность	не изменяется	не изменяется	увеличивается	не изменяется	не изменяется
Везикуляция цитоплазмы	возрастает	возрастает	возрастает	возрастает	возрастает
Содержание КГ в цитоплазме	возрастает	возрастает	возрастает	не изменяется	снижается
Содержание МВТ в цитоплазме	возрастает незначительно	возрастает	возрастает	снижается	снижается
Содержание ПМТ в клетках	возрастает	возрастает	не изменяется	снижается	не изменяется
Содержание ППМТ в вакуолях	возрастает незначительно	возрастает	возрастает	не изменяется	не изменяется

* Эффекты мутаций и NaCl приведены по отношению к ДТ в контрольных условиях

3.2. Перенос ионов натрия эндоцитозными везикулами клеток суспензионной культуры *A. thaliana*

3.2.1. Визуализация ионов Na⁺ в эндоцитозных структурах клеток суспензионной культуры *A. thaliana*

Для обнаружения ионов Na⁺ в эндоцитозных везикулах мы использовали два флуоресцентных зонда: FM 4-64 – зонд на эндоцитозные везикулы и ANG-2 TMA – зонд на ионы Na⁺ в непроникающей через мембраны, т.е. в гидрофильной форме. Эксперимент был поставлен следующим образом. Суспензию клеток в реакционной среде (РС), содержащую FM 4-64, инкубировали на холоду (+4 °С) для связывания индикатора с ПМ и предотвращения эндоцитоза, затем одновременно добавляли NaCl и ANG-2 TMA в конечных концентрациях 100 мМ и 4 мкМ, соответственно. Суспензию нагревали до +22 °С для инициирования эндоцитоза. Через определенные интервалы времени из суспензии отбирали аликвоты, клетки промывали и исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа (Orlova et al., 2018; Orlova et al., 2019). Сразу после добавления NaCl на периферии клеток наблюдалась только красная флуоресценция FM 4-64 (рис. 26, 0 мин), что указывало на присутствие FM 4-64, связавшегося первоначально при +4 °С с ПМ. Через 5 мин, красная флуоресценция FM 4-64 незначительно увеличилась, тогда как флуоресценция ANG-2 визуально еще не наблюдалась (рис. 26, 5 мин). Визуально флуоресценция ANG-2 в клетках стала заметной лишь спустя 30 минут после нагревания суспензии до комнатной температуры. Однако, с помощью программы AxioImager Z2 флуоресценцию ANG-2 в клетках можно было наблюдать уже на пятой минуте (см. диаграммы рассеяния, рис. 27а). Интенсивность флуоресценции как FM 4-64, так и ANG-2 постепенно возрастала в ходе инкубации клеток с NaCl и достигала максимальных значений к концу эксперимента через 2 часа после добавления NaCl (рис. 26, 27а, б, 120 мин). При наложении двух изображений, полученных отдельно в красном (FM 4-64) и в

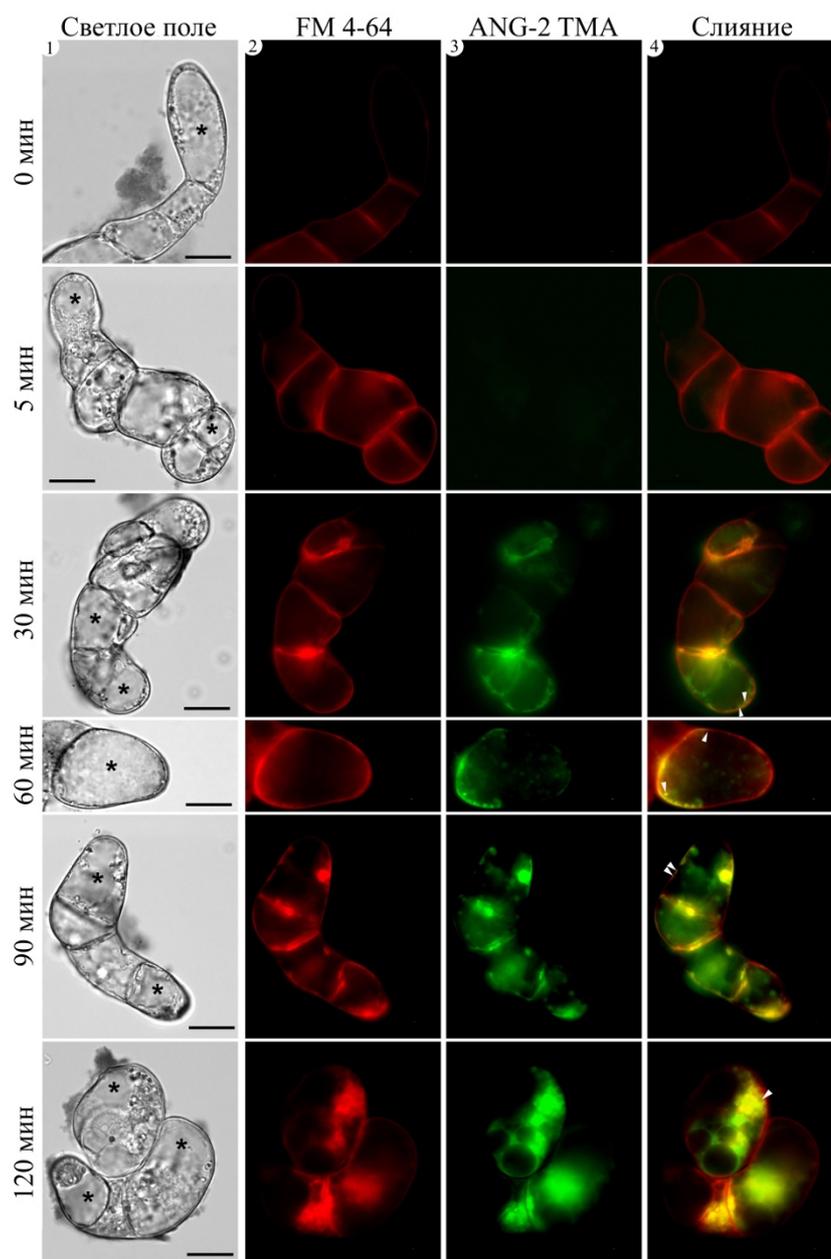


Рис. 26. Ко-локализация эндоцитозного флуоресцентного маркера FM 4-64 и Na^+ -индикатора ANG-2 TMA в клетках *A. thaliana*. Наблюдения проводились в динамике ответа клеток на солевой шок. Изображения клеток получали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа через 0, 5, 30, 60, 90 и 120 минут после внесения NaCl в реакционную среду. (1) – изображение, полученное в светлом поле; (2) – изображение в красном канале (FM 4-64); (3) – изображение в зеленом канале (ANG-2 TMA); (4) – Совмещение изображений, полученных в красном и зеленом каналах; Звездочками отмечены вакуоли; белыми стрелками отмечены дискретные мембранные структуры. Представлены репрезентативные данные одного из экспериментов. Масштаб – 20 мкм.

зеленом (ANG-2) каналах, можно было видеть ко-локализацию двух флуоресцентных индикаторов (рис. 26, 27а).

Для дальнейшей характеристики и оценки размеров эндоцитозных структур, были проведены эксперименты по совместной локализации двух зондов с помощью конфокальной микроскопии (рис. 28). Наложение изображений, полученных в красном и зеленом каналах через 120 минут после добавления NaCl, показало наличие Na^+ в везикулярных структурах в цитоплазме. Флуоресценция двух зондов была локализована в везикулах – дискретных мембранных структурах сферической формы разного размера (рис. 28, ко-локализация двух зондов показана стрелками). Ко-локализованные зонды также наблюдались в микровакуолях (МВ) размером до 5 мкм, показывая, что произошло слияние образовавшихся исходно мелких эндоцитозных везикул с этими структурами. Следует отметить, что совместная флуоресценция двух индикаторов проявлялась не только в виде дискретных свяющихся структур, но и в виде диффузного фонового излучения (рис. 27а, 28). Наиболее вероятно, что основная масса эндоцитозных везикул с захваченным Na^+ не сливалась с центральными вакуолями (обозначены звездочками на изображениях, полученных в светлом поле, рис. 28). Полученные данные согласуются с работами, в которых показано, что FM 4-64 обнаруживается в вакуолях клеток *A. thaliana*, через 12 и 24 часа, соответственно, после обработки флуоресцентным зондом корней и культуры клеток (Hamaji et al., 2009; Baral et al., 2015a).

3.2.2. Количественная оценка ко-локализованных везикул в клетках суспензионной культуры *A. thaliana*

Количественную оценку доли везикул с ко-локализованными зондами, FM 4-64 и ANG-2 TMA в ходе двухчасовой инкубации клеток (Orlova et al., 2018; Orlova et al., 2019) осуществляли, используя диаграммы рассеяния (scatter plots).

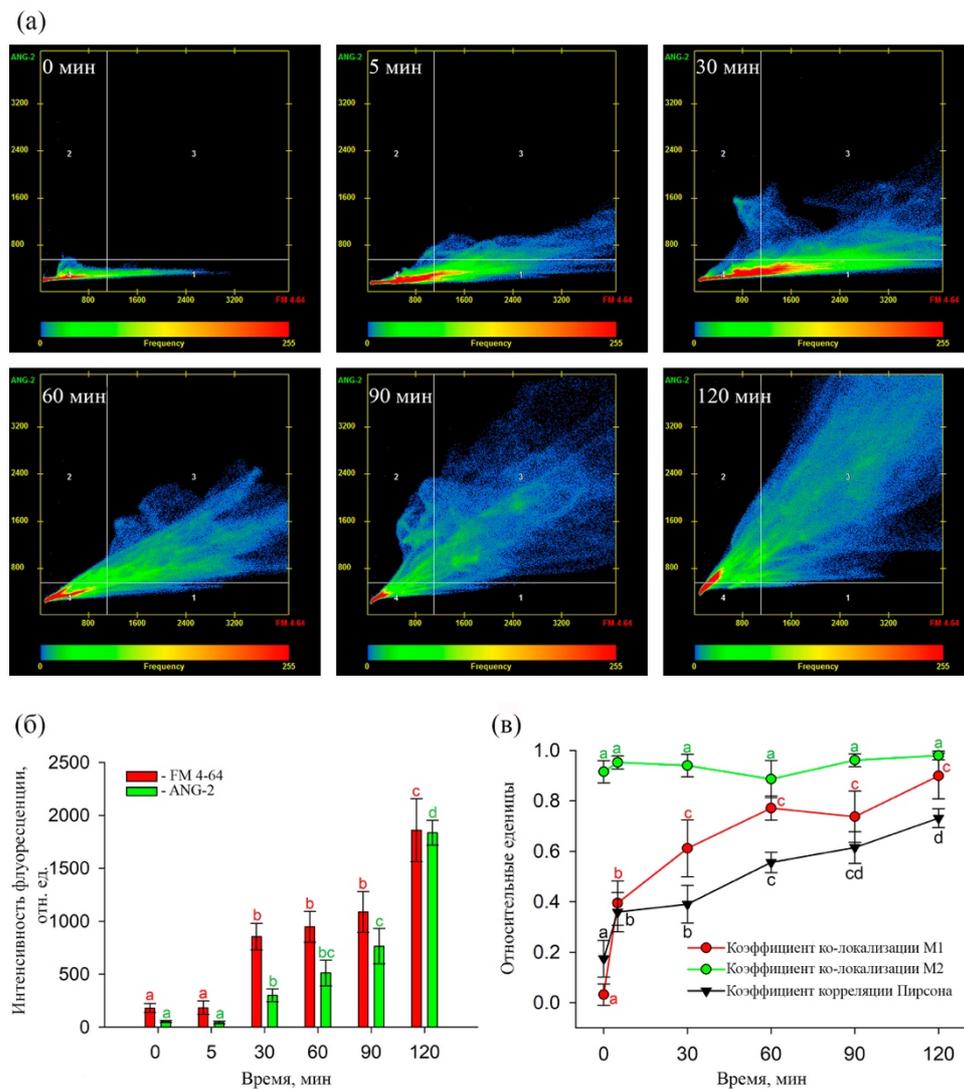


Рис. 27. Количественный анализ поглощения клетками суспензионной культуры *A. thaliana* маркера на эндоцитоз FM 4-64 и Na⁺-индикатора ANG-2 TMA в динамике ответа клеток на солевой шок. (а) – динамика ко-локализации эндоцитозного маркера FM 4-64 и Na⁺-индикатора ANG-2 TMA, представленная в виде серии диаграмм рассеяния, через: 0, 5, 10, 30, 60, 90, 120 мин после внесения NaCl в среду. (б) – средняя внутриклеточная интенсивность флуоресценции FM 4-64 и ANG-2 TMA в красном и зеленом каналах, соответственно. (в) – коэффициент корреляции Пирсона, коэффициенты ко-локализации Мандерса M1 и M2 для FM 4-64 и ANG-2 TMA, соответственно, через 0, 5, 10, 30, 60, 90, 120 мин, после внесения NaCl в среду. Средние значения, полученные из трех независимых экспериментов (30–50) изображений отдельных клеток в каждом эксперименте. Данные представлены как средние значения ± стандартные отклонения (n=3). Разные буквы над барами указывают на статистически достоверную разницу при P ≤ 0,05. Использовался однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и апостериорные критерии Тьюки.

На диаграммах, полученных сразу после добавления NaCl (рис. 27а, 0 мин.), рядом с осью абсцисс и вдоль нее виден только «хвост» пикселей, что согласуется с первичным окрашиванием ПМ зондом FM 4-64 и практически полным отсутствием Na⁺ и ANG-2 TMA, в клетках. На пятой минуте эксперимента, (рис. 27а, 5 мин.), обнаружилось некоторое количество пикселей в третьем квадранте диаграммы, то есть ко-локализованных пикселей. Это означает, что некоторое количество комплексов Na⁺ и ANG-2 TMA уже попало в клетки через 5 минут после добавления NaCl. С течением времени количество пикселей увеличивалось в третьем квадранте (рис. 27а, 120 мин), свидетельствуя о том, что ко-локализация двух маркеров возрастала в ходе ответа клеток на добавление NaCl. Динамика наблюдавшегося распределения пикселей согласуется с тем, что ионы Na⁺, находившиеся вне клетки, захватываются эндоцитозными везикулами, которые интернализируются клетками.

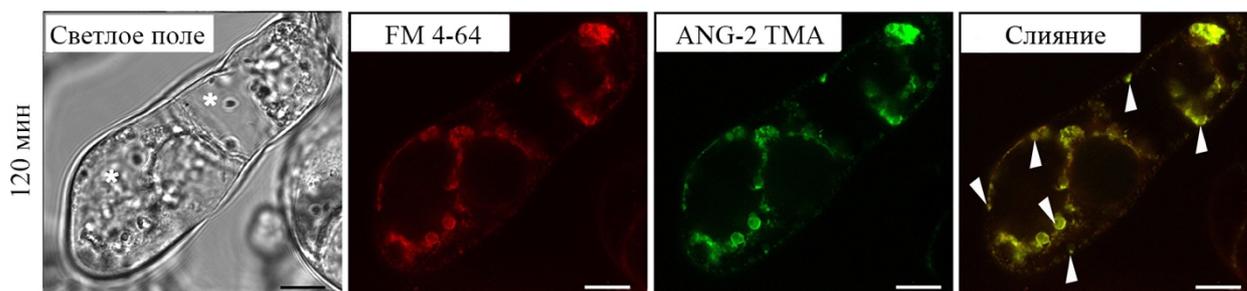


Рис. 28. Ко-локализация точечной флуоресценции эндоцитозного маркера FM 4-64 и Na⁺-индикатора ионов ANG-2 TMA в клетках суспензионной культуры *A. thaliana*. Изображения получены с помощью лазерного, сканирующего конфокального микроскопа через 120 мин после внесения NaCl в среду. Светлое поле – изображение, полученное в светлом поле, FM 4-64 – изображение флуоресценции эндоцитозного маркера FM 4-64; ANG-2 TMA – изображение флуоресценции Na⁺-индикатора ANG-2 TMA; слияние (наложение, совмещение) изображений флуоресценции FM 4-64 и ANG-2 TMA. Звездочкой отмечена вакуоль, стрелками – дискретные мембранные структуры. Масштаб – 10 мкм.

Количественную оценку ко-локализации двух зондов определяли, измеряя интенсивность их флуоресценции в ходе инкубации (рис. 27б) и рассчитывая коэффициенты корреляции Пирсона и ко-локализации Мандерса (M1 и M2) (Manders et al., 1993; Zinchuk et al., 2007) (рис. 27в). В самом начале инкубации и

через пять минут после добавления NaCl, наблюдалась красная флуоресценция (рис. 27а, б – 0 мин и 5 мин), отражающая первоначальное связывание FM 4-64 с плазмалеммой. Зеленая флуоресценция в этот период присутствовала лишь в незначительных количествах (рис. 27а, б – 0 мин и 5 мин). В дальнейшем интенсивность флуоресценции обоих зондов увеличивалась в ходе инкубации клеток с NaCl и достигала максимальных значений через 2 часа после добавления NaCl (рис. 27а, б). Для оценки степени совпадения цветных изображений, полученных с помощью двух зондов, был определен коэффициент корреляции Пирсона (Manders et al., 1993). Коэффициент корреляции Пирсона показывает, насколько пропорциональна изменчивость двух переменных, в данном случае он отражает степень перекрывания изображений в двух каналах (Manders et al., 1993). Он был минимальным в начале инкубации клеток с NaCl, (не более 0.2), увеличивался в ходе инкубации и достигал максимума (порядка 0.7) к концу эксперимента (рис. 27в, черные треугольники), что свидетельствует о существенном совпадении изображений двух флуоресцентных зондов. Для оценки степени совпадения каждого из двух зондов с другим зондом, были рассчитаны коэффициенты ко-локализации M1 и M2 (Manders et al. 1993) (рис. 27в). Коэффициенты Мандерса пропорциональны флуоресценции ко-локализованных флуорофоров в каждом канале составного изображения по отношению к общей флуоресценции в этом канале. Первый коэффициент (M1) описывает вклад красного канала FM 4-64 в ко-локализацию, тогда как второй (M2) описывает вклад зеленого ANG-2 TMA. В нулевой момент времени M1 близок к 0, что указывает на незначительную долю ко-локализованных красных пикселей, поскольку Na⁺ и ANG-2 TMA еще не вошли в клетку в заметных количествах (рис. 27в). В ходе инкубации Na⁺ и ANG-2 TMA совместно интернализировались путем эндоцитоза, M1 увеличился и достиг максимального значения (0,9) к концу 2-часовой инкубации (рис. 27в), указывая на то, что подавляющее большинство красных пикселей FM 4-64 ко-локализовалось с зелеными ANG-2 TMA. Коэффициент ко-локализации M2, в отличие от M1, был высоким, около 0,9 (рис. 27в) в самом начале инкубации

клеток с NaCl и оставался на этом уровне до конца двухчасового эксперимента. Это указывает на то, что обнаруженный этим методом в клетках Na⁺ проник в клетки с эндоцитозными везикулами и находился в продуктах слияния эндоцитозных везикул с эндосомами или МВ. Полученный результат показывает, что Na⁺, наряду с ионными каналами и транспортерами, проникал в клетки посредством эндоцитоза.

3.2.3 Ультраструктура клеток суспензионной культуры *A. thaliana* в динамике их ответа на солевой стресс

Для получения дополнительного представления о транспорте Na⁺ эндоцитозными везикулами клеток *A. thaliana* была исследована их ультраструктура в динамике их ответа на солевой шок (Orlova et al., 2018; Orlova et al., 2019), методом ТЭМ. Контрольные клетки, которые не подвергались обработке NaCl, демонстрировали типичную для растительных клеток ультраструктуру (рис. 29а, б). В цитоплазме наблюдались везикулы разного размера и МВ до 5 мкм (рис. 29а, б). Ламеллы ЭПР были плотно упакованы (рис. 29а; белые стрелки), набухшие ретикулярные цистерны отсутствовали. МВТ в цитоплазме контрольных клеток наблюдались относительно редко. В цитоплазме также были видны КГ (рис. 29, а, б, черные стрелки). Добавление NaCl к культивируемым клеткам *A. thaliana* приводило к изменению их ультраструктуры. Плазмолиз, проявляющийся сморщиванием протоплазмы и расширением периплазматического пространства наблюдали через 5 и 30 минут после добавления NaCl к клеточной суспензии (рис. 29в, д, ж, з, и). В периплазме наблюдалось обильное скопление сферических и пластинчатых мембранных структур, экзосом (рис. 29) (An et al., 2007; Rutter & Innes 2017). Экзосомы (ЭК) были размером до 1 мкм и имели различную электронную плотность (рис. 29в, ж, з, и). Появление ЭК может быть связано с уменьшением поверхности ПМ во время плазмолиза и с необходимостью производства экзосом из ПМ (Battey et al., 1999). После внесения NaCl средняя частота встречаемости МВ в цитоплазме увеличилась (рис. 29г, д) и через 30 минут

становилась почти в 2 раза больше контрольного значения (табл. 11). Средние размеры МВ в ходе инкубации не показали статистически значимых отличий от контрольных значений (табл. 10), однако, суммарная площадь, занимаемая вакуолями, увеличилась приблизительно в 2 раза. Заметно, что размеры мембранных структур, в которых были ко-локализованы FM 4-64 и ANG-2 TMA (рис. 26, 28) примерно совпадали с размерами МВ, обнаруженных с помощью ТЭМ. Аппарат Гольджи в это время казался более активным, чем в контроле, и продуцировал большее количество везикул, из ТГС / РЭ (рис. 29в, е, черные стрелки). Через 60 и 90 мин после внесения NaCl в среду в клетках наблюдалось слияние МВ (рис. 29к, л, о, п), происходило набухание цистерн ЭПР (рис. 29к-н, п, белые стрелки). Набухшие ретикулярные цистерны, по-видимому, продуцировали МВ и способствовали вакуолизации цитоплазмы (рис. 29к, л, н, п). Многие из МВ содержали мембранный материал. Также наблюдалось слияние МВТ с ПМ или тонопластом (рис. 29м, звездочки), и в периплазматическом пространстве формировались экзосомы (рис. 29к). Иногда наблюдалось расширение периплазматического пространства за счет формирования глубоких инвагинаций ПМ в цитоплазму. В этом случае плазматическая мембрана и тонопласт вместе с промежуточным цитоплазматическим слоем впячивались в вакуоли, образуя парамуральные тела (ПМТ), заполненные мембранным материалом различной формы и размеров (рис. 29н) (Marchant & Robards 1968; An et al., 2006; Goh et al., 2007). После инкубации клеток с NaCl в течение 120 мин слияние МВ и тенденция к снижению численности МВ в цитоплазме, по-видимому, сохранялись (табл. 10).

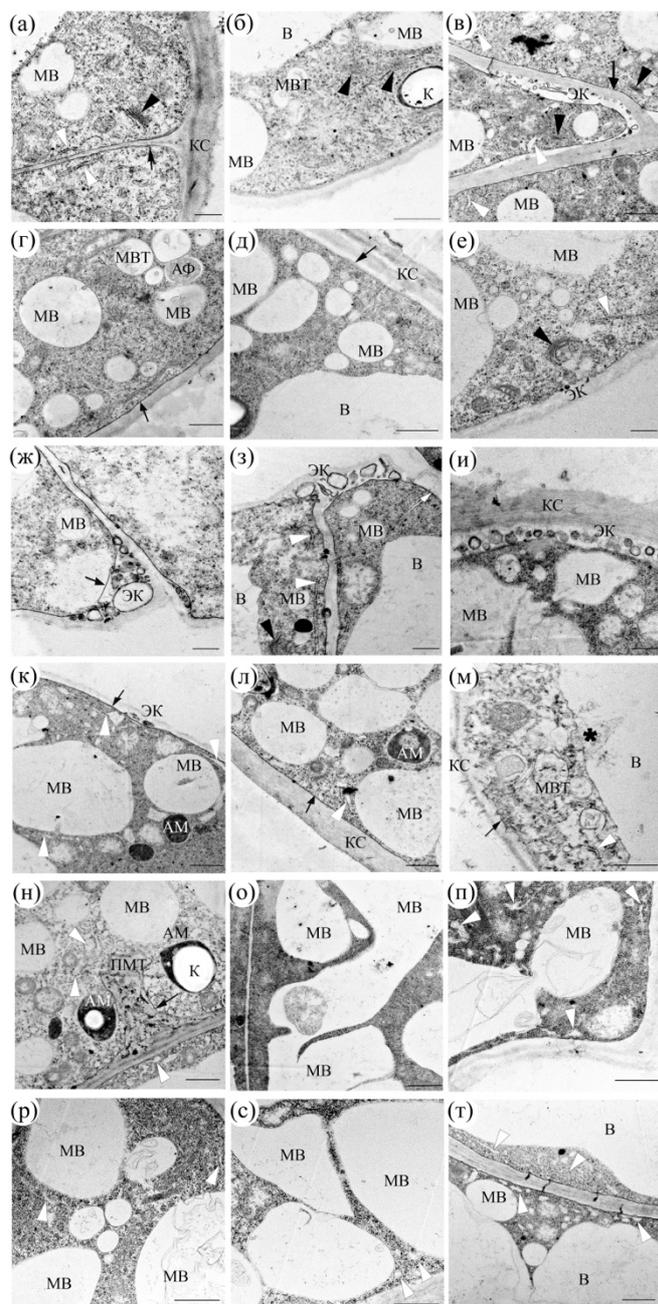


Рис. 29. Трансмиссионная электронная микроскопия клеток суспензионной культуры *A. thaliana* в динамике ответа на солевой шок. Изображения получены через: 0 мин (а, б), 5 мин (в – д), 30 мин (е – и), 60 мин (к – м), 90 мин (н – п), 120 мин (р – т) после внесения NaCl в среду. АФ – автофагосомы, КС – клеточные стенки, ЭК – экзосомы, МВ – микровacuоли, МВТ – мультивизукулярные тела, ПМТ – парамуральные тела, АМ – амилопласты, К – крахмал, В – вакуоли; черные стрелки – плазматическая мембрана; черные наконечники стрелок – аппарат Гольджи (АГ); белые наконечники стрелок – эндоплазматический ретикулум; звездочки – сливающиеся МВТ с плазматической мембраной (ПМ) и тонопластом (Т). Масштаб (м) – 0.2 мкм; (а), (е – и), и (п – с) – 0.5 мкм; (б – д), (к), (л), (н), (о), и (т) – 1 мкм.

Табл. 10. Количество и размер микровакуолей (МВ) в динамике ответа клеток *A. thaliana* на солевой шок

Время в мин после добавления NaCl	Среднее количество МВ /100 мкм ² ± стандартное отклонение	Средняя площадь МВ (мкм ² /МВ) ± стандартное отклонение	Средняя площадь, занимаемая МВ, (%)
0	9.73 ± 0.94 ^a	1.59 ± 0.39 ^{ab}	15.44
5	16.79 ± 1.36 ^b	1.51 ± 0.33 ^{ab}	25.35
30	18.42 ± 1.34 ^b	1.14 ± 0.29 ^a	21.09
60	17.47 ± 1.38 ^b	1.19 ± 0.25 ^a	20.77
90	17.04 ± 1.19 ^b	2.04 ± 0.55 ^b	34.84
120	16.21 ± 1.3 ^b	1.74 ± 0.45 ^{ab}	28.18

*Площади клеток и МВ измеряли с помощью программы ZEN2012 Microsoft, используя инструмент «контур». Измерения проводили в диапазоне размеров от 0.07 до 18.5 мкм² (от 0.25 до 5 мкм в диаметре). Для подсчетов использовали от 70 до 100 клеток для каждой временной точки. Для статистического анализа применяли Microsoft MS Excel 2007.

3.2.4. Влияние ингибиторов везикулярного транспорта на содержание ионов Na⁺ в клетках суспензионной культуры *A. thaliana* при солевом шоке

Чтобы подтвердить участие эндоцитоза в поглощении ионов Na⁺ клетками, исследовали влияние некоторых ингибиторов везикулярного транспорта на содержание Na⁺ в клетках суспензионной культуры *A. thaliana* при солевом шоке. Эффекты брефелдина А (БФА) – ингибитора секреторного пути на стадии формирования *транс*-Гольджи сети, или ранних эндосом (ТГС/РЭ), из АГ (Emans et al., 2002; Ritzenthaler et al., 2002); икаругамицина (ИКА) – ингибитора клатрин-опосредованного эндоцитоза (Elkin et al., 2016); вортманнина (ВТ) – ингибитора фосфатидилинозитол-3-и фосфатидилинозитол-4-киназ, блокирующего слияние МВТ/ПЭ с вакуолями (Wang et al., 2009; Foissner et al., 2016). После трехчасовой

инкубации клеток с NaCl в присутствии БФА внутриклеточное содержание Na⁺ было таким же, как и в контроле (рис. 30). ИКА также не влиял на содержание Na⁺ в клетках *A. thaliana*. Напротив, ВТ существенно снижал внутриклеточное содержание Na⁺ (на 60%) (рис. 30).

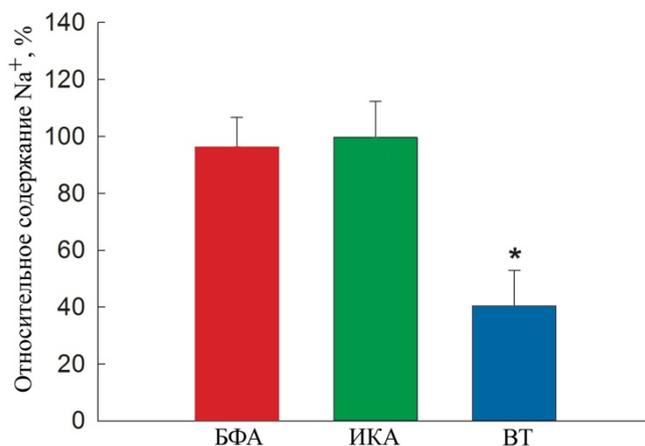


Рис. 30. Влияние ингибиторов везикулярного транспорта на внутриклеточное содержание Na⁺ в клетках суспензионной культуры *A. thaliana* при солевом шоке. БФА – брефелдин А, ИКА – икаругамицин, ВТ – вортманнин. Графики отображают среднее содержание Na⁺ в клетках, обработанных ингибиторами. Значения даны в % по отношению к контролю (отсутствие ингибиторов).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ В РАЗДЕЛЕ 3.2.

Идея о том, что ионы, присутствующие в наружной среде, могут быть захвачены зарождающимися эндоцитозными везикулами ПМ и интернализированы клетками, была высказана ранее (Baral et al., 2015b), однако, это не было экспериментально подтверждено. Результаты, представленные в разделе 3.2, свидетельствуют об участии эндоцитоза в интернализации Na⁺ клетками суспензионной культуры *A. thaliana* в условиях солевого стресса. Основным экспериментальным подходом в этой серии экспериментов был основан на ко-локализации двух флуоресцентных зондов, эндоцитозного зонда FM 4-64 и непроникающего через мембраны Na⁺-индикатора ANG-2 TMA. Na⁺-индикаторы, применявшиеся ранее в экспериментах

на растительных клетках, в проникающей, гидрофобной форме, (Mazel et al., 2004; Garcia de la Garma et al., 2015), давали информацию об общем содержании ионов Na^+ в клетках, а не только ионов Na^+ , захваченных эндоцитозными структурами, как в случае применения ANG-2 TMA. Ионные индикаторы в проникающей форме растворялись в липидном бислое, легко преодолевали мембранный барьер и образовывали комплексы с ионами Na^+ , поглощенными не только путем эндоцитоза, но и через ионные каналы и транспортеры.

Мембранные структуры с ко-локализованными зондами, по-видимому, являются продуктами слияния более мелких мембранных компартментов, образованных первичными эндоцитозными инвагинациями. Точечная флуоресценция двух зондов наблюдалась в структурах диаметром приблизительно 5 мкм (рис. 26 и 28), что отражает нахождение маркеров в МВ, тогда, как диффузное распределение флуоресценции, вероятно, было связано с более мелкими мембранными структурами. Точечное и фоновое распределение ко-локализованных флуорофоров согласуется с результатами, полученными с помощью электронной микроскопии. Наряду с МВ, размеры которых лежали в диапазоне от 0.25 до 5 мкм, в цитоплазме наблюдались инвагинации ПМ и везикулы гораздо меньших размеров. Ранее МВ сравнимых размеров были обнаружены в клетках корней *A. thaliana* после индукции хлористым натрием клатрин-независимых эндоцитозных путей, характеризующихся отсутствием карго-специфичности (Baral et al., 2015a). Авторы этой работы показали, что МВ формируются из небольших кислых компартментов. Эндоцитозные везикулы диаметром около 30 и 100 нм также были обнаружены в цитоплазме клеток *A. thaliana* (Li et al., 2012) в экспериментах, сочетающих конфокальную лазерную микроскопию, флуоресцентно-меченые белки (легкая цепь клатрина и флотиллин1) и иммуно-электронную микроскопию. Вероятно, фоновая флуоресценция FM 4-64 и ANG-2 TMA, наблюдавшаяся нами, связана с появлением мелких структур в цитоплазме на начальных стадиях эндоцитоза. В дальнейшем эти структуры сливались в более крупные структуры. Более крупные МВ стали обнаруживаться в

цитоплазме клеток *A. thaliana* не раньше, чем через 60 мин после добавления NaCl к суспензионной культуре клеток. Очевидно, что появление достаточно больших структур, различимых в световой микроскоп, требует определенного времени.

Точечная ко-локализация флуорофоров была более выражена к концу двухчасовой инкубации клеток с NaCl. Представление о том, что эндоцитоз участвует в поглощении Na⁺ клетками с последующим слиянием Na⁺-содержащих везикул в МВ, подтверждается результатами экспериментов, в которых изучалось влияние ингибиторов везикулярного транспорта на содержание Na⁺ в клетках *A. thaliana*. Вортманнин заметно снижал внутриклеточное содержание Na⁺. Полученный результат согласуется с данными об ингибировании вортманнином слияния МВТ/ПЭ с вакуолью (Wang et al., 2009; Foissner et al., 2016). По-видимому, эндоцитозные везикулы доставляли ионы натрия к эндосомам, а далее, вортманнин, блокируя вакуолярный путь, снижал доставку ионов Na⁺ в вакуоли и, соответственно, содержание Na⁺ в клетках. Следует отметить, что клатрин-зависимый эндоцитоз скорее всего не участвует в поглощении Na⁺, так как ИКА не влиял на содержание Na⁺ в клетках. Также маловероятно, что в поглощение Na⁺ вовлечен секреторный путь, поскольку добавка БФА также не влияла на содержание Na⁺ в клетках (рис. 30). Можно предположить, что эндоцитоз, вовлечённый в поглощение ионов натрия, относится к категории жидкофазного эндоцитоза (ЖФЭ) (Etxeberria et. al., 2012). ЖФЭ, по-видимому, является распространенным механизмом поглощения различных веществ, находящихся в периплазме. Одним из примеров ЖФЭ является поглощение флуоресцентно-меченной глюкозы протопластами клеток суспензионной культуры табака ВУ-2 (Bandmann & Homann 2012). В этой работе было показано, что глюкоза стимулировала отделение инвагинаций от ПМ. Захват глюкозы клетками был нечувствителен к ИКА, ингибитору клатрин-зависимого пути. Другим примером ЖФЭ является включение сахарозы и флуоресцентного маркера эндоцитоза Люцефера желтого (LY) в клетки суспензионной культуры платана (*Acer pseudoplatanus*) (Etxeberria et al., 2005). Включение обоих веществ было

чувствительно к ингибиторам эндоцитоза вортманнину и LY294002 и активировалось повышением концентрации сахарозы в среде (Etxeberria et al., 2005). В двух примерах, приведенных выше, вещества, транспортируемые внутри эндоцитозных везикул, стимулировали эндоцитоз. NaCl также известен как фактор, стимулирующий эндоцитоз (Mazel et al., 2004; Namaji et al., 2009; Baral et al., 2015a). Результаты, представленные в этом разделе, также показали, что введение NaCl в реакционную среду стимулировало вакуолизацию цитоплазмы. Такое же действие NaCl мы наблюдали в клетках интактных корней *A. thaliana* (см. раздел 3.1.1.7 этой работы), а также ранее в клетках корня *Chenopodium album* (Ivanova et al., 2016). У *A. thaliana* стимуляция вакуолизации цитоплазмы наблюдалась в течение первых 5 мин после добавления NaCl. Последующая инкубация клеток с NaCl не привела к заметным изменениям количества МВ в цитоплазме. Вакуолизация происходила одновременно со слиянием МВ, что согласуется с увеличением ко-локализации FM 4-64 и ANG-2 TMA и с накоплением Na⁺ в сливающихся МВ. Интернализация ионов Na⁺ с последующим слиянием Na⁺-содержащих везикул с МВ может обеспечить прямой транспорт Na⁺ в вакуоли. Везикулярный транспорт Na⁺ в вакуоли, по-видимому, является более выгодным путем, по сравнению с поступлением Na⁺ через ионные каналы и транспортеры. Можно предположить, что при солевом стрессе интернализация Na⁺ и, вероятно, Cl⁻ посредством эндоцитоза, а также последующий перенос этих ионов в вакуоль защищают цитоплазму от их токсического действия. Одновременно с этим происходит снижение водного потенциала содержимого вакуоли, что способствует поглощению воды клетками. Следует отметить, что в движение ионов Na⁺ и Cl⁻ в вакуоли могут быть вовлечены также эндосомальные изоформы переносчиков ионов Na⁺ и Cl⁻, Na⁺/H⁺ антипортеры NHX5 и NHX6 (Pardo et al., 2006; Bassil et al., 2011) и Cl⁻ транспортеры CLCd (von der Fecht-Bartenbach., 2007) и CLCf (Marmagne et al., 2007), соответственно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В главах 2 и 3 рассматривались два аспекта участия везикулярного транспорта в ответе растений на солевой стресс. Первый аспект связан с вовлечением везикулярного транспорта в ремоделирование белкового состава мембран, позволяющее мембране, модифицированной везикулярным транспортом, поддерживать клеточный гомеостаз в стрессовых условиях. Второй аспект связан с индукцией солью транспорта ионов Na^+ непосредственно везикулами, что также вносит вклад в поддержание Na^+ -гомеостаза в условиях засоления. В обоих случаях наблюдается адекватный ответ на изменяющиеся условия среды, который направлен на поддержание физиологических процессов клетки при солевом стрессе. В случае ремоделирования белкового состава мембран может изменяться качественный и количественный состав мембранных белков, к которым относятся: ионные каналы и транспортеры, транспортные АТФазы, переносчики различных органических соединений, в том числе ауксина, гормональные рецепторы, белки антиоксидантной системы и другие. Все эти белки вовлечены в поддержание клеточного гомеостаза и могут играть определенную роль в ответе растений на солевой стресс и в солеустойчивости растения. Важную роль в физиологических процессах и в ответе растений на стрессовые воздействия играет H^+ -АТФаза Р-типа, которая, создавая градиент электрохимического потенциала протона, поставляет энергию для вторично-активного транспорта ионов, в частности, для выведения Na^+ из цитоплазмы Na^+/H^+ -антипортером (Yang et al., 2021). Результаты экспериментов с использованием вестерн-блот анализа с антителами к H^+ -АТФазе Р-типа, количественная ОТ-ПЦР в реальном времени в совокупности с электронно-микроскопическими исследованиями эндосомального комплекса и исследования эндоцитоза с применением флуоресцентного зонда FM 4-64 показали, что H^+ -АТФаза Р-типа (H^+ -АТФаза ПМ) транспортируется везикулами под действием NaCl , присутствующего в среде. В экспериментах с использованием нокаут-мутанта по гену белка мембранных нанодоменов *AtFlot1* (*Atflot1ko*) и мутанта с

повышенной экспрессией этого гена (*Atflot1oe*) получены данные, указывающие на участие AtFlot1 в переносе H^+ -АТФазы везикулами в разных путях везикулярного транспорта (экзоцитозе и эндоцитозе). Можно предположить, что флотиллины при этом играют скорее структурную, чем функциональную роль. Согласно существующему в настоящее время представлению, флотиллины, создают платформу для встраивания белков в мембрану (Ma et al., 2022). Роль флотиллинов, вероятно, заключается во влиянии на другие белки посредством белок-белковых взаимодействий (Baumann et al., 2000).

Флотиллины могут играть важную роль в солеустойчивости растений. Известно, что изоформа *AtFlot2* взаимодействует с белками, вовлеченными в ионный и водный обмен (Junkova et al., 2018). Хотя флотиллины вовлечены во многие физиологические функции, в нашей работе не было обнаружено угнетения роста, и нарушения Na^+ -, K^+ - гомеостаза у нокаут-мутанта *Atflot1ko*, что может быть связано с активацией альтернативных путей везикулярного транспорта, а также с выполнением функций AtFlot1 другими изоформами флотиллина.

В настоящей работе показано, что, в условиях солевого стресса, наряду с ремоделированием белкового состава мембран, включаются также процессы переноса ионов Na^+ и, по-видимому, Cl^- , непосредственно везикулами. В исследовании ко-локализации двух флуоресцентных зондов – зонда на эндоцитоз FM 4-64 и индикатора ионов натрия в непроникающей через мембраны форме ANG-2 TMA на клетках суспензионной культуры *A. thaliana* мы получили результаты, указывающие на захват ионов натрия эндоцитозными везикулами, интернализацию везикул, содержащих натрий. Исследование ультраструктуры клеток продемонстрировало активацию эндоцитоза, везикуляцию и последующее слияние везикул с вакуолярными компартментами клетки под действием NaCl. Вортманнин – ингибитор везикулярного транспорта, блокирующий слияние поздних эндосом с вакуолями (Wang et al., 2009; Foissner et al., 2016) заметно снижал содержание Na^+ в клетках суспензионной культуры *A. thaliana*, подвергнутых действию NaCl. Физиологическая роль этих процессов, по-

видимому, состоит в защите цитоплазмы от токсичных ионов Na^+ в условиях солевого стресса. Поступающие в клетки ионы натрия, заключенные в эндоцитозные везикулы, транспортируются в вакуоли, минуя, цитоплазматический компартмент. Полученные в работе результаты демонстрируют двойную роль везикулярного транспорта в условиях солевого стресса – ремоделирование белкового состава мембран и перенос ионов натрия везикулами, каждый из которых вносит свой вклад в ответ растения на солевой стресс.

ВЫВОДЫ

1. Нокаут-мутация *Atflot1ko* по гену белка мембранных нанодоменов AtFlot1 не оказывает влияния на рост и Na^+ -, K^+ -гомеостаз *A. thaliana*; мутация *Atflot1oe*, приводящая к повышенной экспрессии *AtFlot1*, стимулирует рост, снижает содержание Na^+ , повышает содержание K^+ в органах *A. thaliana* в условиях засоления.

2. У растений дикого типа NaCl в среде стимулирует доставку H^+ -АТФазы Р-типа к ПМ, активируя, по-видимому, экзоцитозный путь, связанный с образованием МВТ/ПЭ; к такому же эффекту приводит мутация *Atflot1oe* в отсутствие NaCl , тогда как NaCl стимулирует у этого мутанта эндоцитоз, что, приводит к снижению содержания H^+ -АТФазы Р-типа в ПМ.

3. Нокаут-мутация в отсутствие NaCl в среде ингибирует превращение ТГС/РЭ в МВТ/ПЭ и, по-видимому, активирует альтернативные пути доставки H^+ -АТФазы Р-типа к ПМ в обход формирования МВТ, а в присутствии NaCl ингибирует экзоцитозный путь доставки H^+ -АТФазы Р-типа к ПМ на стадии образования комплексов Гольджи.

4. Белок мембранных нанодоменов AtFlot1 вовлечен в трафик H^+ -АТФазы Р-типа в ходе экзо- и эндоцитоза, а следовательно, и в Na^+ -, K^+ -гомеостатирование *A. thaliana*.

5. В поглощение Na^+ клетками суспензионной культуры *A. thaliana* в условиях солевого стресса непосредственно вовлечены эндоцитозные везикулы, в дальнейшем сливающиеся с вакуолями, что вносит вклад в поддержание цитоплазматических концентраций Na^+ на нетоксическом уровне.

6. Изменения содержания H^+ -АТФазы Р-типа в плазматической мембране посредством везикулярного транспорта, а также перенос Na^+ эндоцитозными везикулами, по-видимому, вносят вклад в поддержание ионного гомеостаза клеток в их ответе на солевой стресс.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Список публикаций в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных WoS, SCOPUS и базе ядра Российского индекса научного цитирования «eLibrary Science Index», рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах/вклад автора)

1. Khalilova L.A., **Lobreva O.V.**, Nedelyaeva O.I., Karpichev I.V., Balnokin Y.V. (2023) Involvement of the Membrane Nanodomain Protein, AtFlot1, in Vesicular Transport of Plasma Membrane H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana* under Salt Stress. // *International Journal of Molecular Sciences*, V. 24 (2), 1251. doi: [10.3390/ijms24021251](https://doi.org/10.3390/ijms24021251) [WoS, Scopus, JIF=4.9] 0.6 п.л. / вклад автора: выращивание растений в условиях водной культуры, изучение характеристик инсерционного нокаут-мутанта, выделение мембран и их очистка, определение содержания H⁺-АТФазы в мембранах, оценка экспрессии генов, подготовка материалов к публикации, участие в обсуждении и написании статьи.
2. **Sergienko (Lobreva) O.V.**, Khalilova L.A., Orlova Y.V., Shuvalov A.V., Myasoedov N.A., Karpichev I.V. (2022) Mutation of the ARA7/AtRabF2b gene, that increases the content of the Ara7 protein regulating endocytic trafficking pathways, improves salt tolerance of the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh plants. // *Russian Journal of Plant Physiology*, V. 69 (1), 11. doi: [10.1134/S1021443722010198](https://doi.org/10.1134/S1021443722010198) [WoS, Scopus, JIF=1.1] 0.5 п.л. / вклад автора: выращивание растений в условиях водной культуры, изучение характеристик мутантного растения, включая определение гомозиготности, картирование начала транскрипции мРНК, выявление дополнительных вставок Т-ДНК в геноме мутантного растения, оценка экспрессии генов; экспрессия целевого гена для использования в качестве положительного контроля для иммуноферментного анализа, подготовка материалов к публикации, участие в обсуждении и написании статьи.
3. Khalilova L.A., **Sergienko (Lobreva) O.V.**, Orlova Y.V., Myasoedov N.A., Karpichev I.V., Balnokin Y.V. (2020) *Arabidopsis thaliana* mutant with T-DNA insertion in the Flot1 (At5g25250) gene promoter possesses increased resistance to NaCl. // *Russian Journal of Plant Physiology*, V. 67 (2), 275-284. doi: [10.1134/S1021443720020077](https://doi.org/10.1134/S1021443720020077) [WoS, Scopus, JIF=1.1] 0.3 п.л. / вклад автора: выращивание растений в условиях водной культуры, выявление гомозиготных растений, оценка экспрессии генов, подготовка материалов к публикации, участие в обсуждении и написании статьи.
4. Orlova Y.V., **Sergienko (Lobreva) O.V.**, Khalilova L.A., Voronkov A.S., Fomenkov A.A., Nosov A.V., Popova L.G., Shuvalov A.V., Ryabova A.V., Balnokin Y.V. (2019) Sodium transport by endocytic vesicles in cultured *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. // *In*

Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant, V. 55 (4), 359-370. doi: [10.1007/s11627-019-10005-7](https://doi.org/10.1007/s11627-019-10005-7) [WoS, JIF=2.2] 0.4 п.л. / вклад автора: проведение экспериментов по идентификации ионов натрия в эндоцитозных везикулах в динамике ответа клеток на солевой шок, подготовка материалов к публикации, участие в обсуждении и написании статьи.

5. Орлова Ю.В., **Майорова (Лобрева) О.В.**, Халилова Л.А., Воронков А.С., Фоменков А.А., Носов А.В., Попова Л.Г., Балнокин Ю.В. (2018) Участие эндоцитоза в поглощении ионов натрия клетками суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana* (L.) Heunh. // *Биологические мембраны*, Т. 35 (4), 309-317. doi: [10.1134/S0233475518040114](https://doi.org/10.1134/S0233475518040114) [WoS, Scopus, JIF=0.1] 0.3 п.л. / вклад автора: проведение экспериментов по идентификации ионов натрия в эндоцитозных везикулах, подготовка материалов к публикации, участие в обсуждении и написании статьи.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность своим научным руководителям, д.б.н., проф. Балнокину Ю.В. и к.б.н., с.н.с. Карпычеву И.В. за помощь в организации и планировании экспериментов, в анализе и интерпретации полученных экспериментальных данных, ценные идеи, внимание и всестороннюю поддержку на всех этапах выполнения работы.

Благодарю всех сотрудников лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости ИФР РАН, нынешних и тех, кто работал со мной в ней ранее: Орлову Ю.В., Халилову Л.А., Шувалова А.В., Беляева Д.В., Неделеяеву О.В., Волкова В.С., Маталина Д.А., Попову Л.Г., Ростовцеву Е.И., Храмова Д.Е. за теплую обстановку, совместную работу и публикации, ценные научные советы, консультации, поддержку и творческий подход.

Благодарю всех соавторов моей работы, без участия которых это исследование не могло бы состояться.

Я искренне признательна сотрудникам Института физиологии растений РАН Трофимовой М.С. и Пиотровскому М.С. за ценные советы по выделению мембранных фракций, переданный опыт, отзывчивость, теплое отношение и возможность работать на приборах их лаборатории; благодарю Носова А.В. и Фоменкова А.А. за предоставленную культуру клеток, интерес к нашей теме и участие в работе; благодарю Воронкова А.С., Иванову Т.В., Райхмана Л.А., Смирнова В.А. за помощь в работе на микроскопах, центрифугах и дружеское отношение; благодарю Загоскину Н.В., Казанцеву В.В., Зубову М.Ю. и других сотрудников их лаборатории за дельные советы по улучшению диссертационной работы, поддержку и доброе отношение; Ломина С.Н., Мякушину Ю.А., Гетман И.А., Зорину А.А., Миронова К.С., Старикова А.Ю., Леусенко А.В., Леусенко П.А., Кузнецова В.В., Лысенко Е.А., Пожидаеву Е.С., Иванова В.Б., Кожевникову А.Д., Мошкова И.Е. за отзывчивость, ценные советы и предоставленную возможность работать на приборах их лаборатории.

Искренне благодарю свою большую семью, мужа, родителей за пробуждение интереса к науке, за поддержку, отзывчивость и мотивацию, что мне очень помогло в работе, моего брата за разработку идеи и реализацию устройства для измельчения растительного материала, благодарю также всех моих друзей.

Благодарю всех, кто помогал мне, воодушевлял и наставлял меня, но, к сожалению, не дожил до завершения моей работы: Мясоедова Н.А., Новикову Г.В., Райхмана Л.А.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Ali A., Maggio A., Bressan R.A., Yun D.J.** (2019) Role and functional differences of HKT1-type transporters in plants under salt stress. *International journal of molecular sciences*, 20, 5, 1059.
2. **Alvarez I., Tomaro M., Benavides M.** (2003) Changes in polyamines, proline and ethylene in sunflower calluses treated with NaCl. *Plant cell, tissue and organ culture*, 74, 51– 59.
3. **An Q., Hüchelhoven R., Kogel K.H.** (2006) Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defense response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cellular microbiology*, 8, 6, 1009 – 1019.
4. **An Q., van Bel, A.J., Hüchelhoven R.** (2007) Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies?. *Plant signaling & behavior*, 2,1, 4 – 7.
5. **Aniento F., Sánchez de Medina Hernández V., Dagdas Y., Rojas-Pierce M., Russinova E.** (2022) Molecular mechanisms of endomembrane trafficking in plants. *The Plant Cell*, 34, 1, 146 – 173.
6. **Apse M.P., Blumwald E.** (2007) Na⁺ transport in plants. *FEBS Letters*, 581, 2247 – 2254.
7. **Araya T., Kubo T., von Wirén N., & Takahashi H.** (2016) Statistical modeling of nitrogen-dependent modulation of root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58, 3, 254 – 265.
8. **Arrazola S.A., Luque M.M., Lacerda H.M., Llaveró F., Zugaza J.L.** (2021) Small GTPases of the Rab and Arf families: key regulators of intracellular trafficking in neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 4425.
9. **Asati A., Pichhode M., Nikhil K.** (2016) Effect of heavy metals on plants: an overview. *International Journal of Application or Innovation in Engineering & Management*, 5, 3, 56 – 66.
10. **Axelsen K.B., & Palmgren M.G.** (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *Journal of molecular evolution*, 46, 84 –101.

11. **Axelsen K.B., & Palmgren M.G.,** (2001) Inventory of the superfamily of P-type ion pumps in *Arabidopsis*. *Plant physiology*, 126, 2, 696 –706.
12. **Balnokin Y.V., Kurkova E.B., Khalilova L.A., Myasoedov N.A., Yusufov A.G.** (2007) Pinocytosis in the root cells of a salt-accumulating halophyte *Suaeda altissima* and its possible involvement in chloride transport. *Russ. J. Plant. Physiol.*, 54, 797 – 805.
13. **Bandmann V., Homann B.P., Thiel M.P.** (2011) Mechanisms and Kinetics of Exocytosis and Endocytosis in Plant and in Yeast Cells. *Diss. TU Darmstadt*.
14. **Bandmann V., Homann U.** (2012) Clathrin-independent endocytosis contributes to uptake of glucose into BY-2 protoplasts. *Plant J.*, 70, 578 – 584.
15. **Baral A, Irani NG, Fujimoto M, Nakano A, Mayor S, Mathew MK** (2015a) Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in *Arabidopsis* root. *Plant Cell* 27:1297 – 1315
16. **Baral A., Shruthi K.S., Mathew M.K.** (2015b) Vesicular trafficking and salinity responses in plants. *Iubmb Life*, 67, 9, 677 – 686.
17. **Barberon M., Zelazny E., Robert S., Conejero G., Curie C., Friml J., Vert G.** (2011) Monoubiquitin-dependent endocytosis of the iron-regulated transporter 1 (IRT1) transporter controls iron uptake in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 450 – 458.
18. **Bassil E., Ohto M.A., Esumi T., Tajima H., Zhu Z., Cagnac O., Belmonte M., Peleg Z., Yamaguchi T., Blumwald E.** (2011) The *Arabidopsis* intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *Plant Cell*, 23, 224 – 239.
19. **Bassil E., Ohto M.A., Esumi T., Tajima H., Zhu Z., Cagnac O., Belmonte M., Peleg Z., Yamaguchi T., Blumwald E.** (2011) The *Arabidopsis* intracellular Na⁺/H⁺ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development. *The Plant Cell*, 23, 224 – 239.

20. **Bassil E., Zhang S., Gong H., Tajima H., & Blumwald E.** (2019) Cation specificity of vacuolar NHX-type cation/H⁺ antiporters. *Plant physiology*, 179, 2, 616 – 629.
21. **Battey N.H., James N.C., Greenland A.J., Brownlee C.** (1999) Exocytosis and endocytosis. *The Plant Cell*, 11, 4, 643 – 659.
22. **Baumann, C.A., Ribon V., Kanzaki M., Thurmond D.C., Mora S., Shigematsu S., Bickel, P.E., Pessin J.E., Saltiel A.R.** (2000) CAP defines a second signaling pathway required for insulin-stimulated glucose transport. *Nature*, 407, 202 – 207.
23. **Baxter I.J., Tchieu M.R., Sussman M.B., Michael G., Palmgren M.G., Jeffrey F. Harper, & Kristian B., Axelsen.** (2003) Genomic comparison of P-type ATPase ion pumps in *Arabidopsis* and rice. *Plant physiology*, 132, 2, 618 – 628.
24. **Baxter I.R., Young J.C., Armstrong G., Foster N., Bogenschutz N., Cordova T., Peer W.A., Hazen S.P., Murphy A.S. & Harper J.F.** (2005) A plasma membrane H⁺-ATPase is required for the formation of proanthocyanidins in the seed coat endothelium of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 7, 2649 – 2654.
25. **Betz W.J., Mao F., & Smith C.B.** (1996) Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol*, 6, 365 – 71.
26. **Blatt M.R.** (2000) Cellular signaling and volume control in stomatal movements in plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*, 16, 221 – 241.
27. **Bobik K., Boutry M., Duby G.** (2010) Activation of the plasma membrane H⁺-ATPase by acid stress antibodies as a tool to follow the phosphorylation status of the penultimate activating Thr. *Plant Signal Behav*, 5, 681 – 683.
28. **Bolte S., Talbot C., Boutte Y., Catrice O., Read N.D., & Satiat-Jeunemaitre B.** (2004) FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of microscopy*, 214, 2, 159 – 173.
29. **Britto D.T., & Kronzucker H.J.** (2002) NH₄⁺ toxicity in higher plants: a critical review. *Journal of plant physiology*, 159, 6, 567 – 584.

30. **Browman D.T., Hoegg M.B., & Robbins S.M.** (2007) The SPFH domain-containing proteins: more than lipid raft markers. *Trends in cell biology*, 17, 8, 394 – 402.
31. **Brown D.A., & Rose J.K.** (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*, 68, 3, 533 – 544.
32. **Buch-Pedersen M.J., & Palmgren M.G.** (2003) Mechanism of proton transport by plant plasma membrane proton ATPases. *Journal of Plant Research*, 116, 507 – 515.
33. **Buch-Pedersen M.J., Pedersen B.P., Veierskov B., Nissen P., & Palmgren M.G.** (2009) Protons and how they are transported by proton pumps. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 457, 573 – 579.
34. **Buch-Pedersen M.J., Rudashevskaya E.L., Berner T.S., Venema K., & Palmgren M.G.** (2006) Potassium as an intrinsic uncoupler of the plasma membrane H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 50, 38285 – 38292.
35. **Burzyński M., & Kolano E.** (2003) In vivo and in vitro effects of copper and cadmium on the plasma membrane H⁺-ATPase from cucumber *Cucumis sativus* L. and maize *Zea mays* L. roots. *Acta Physiol. Plant.*, 25, 39 – 45.
36. **Cao Y., He Q., Qi Z., Zhang Y., Lu L., Xue J., & Li R.** (2020) Dynamics and endocytosis of Flot1 in *Arabidopsis* require CPI1 function. *International journal of molecular sciences*, 21, 5, 1552.
37. **Cerezo M., Tillard P., Filleur S., Munos S., Daniel-Vedele F., & Gojon A.** (2001) Major alterations of the regulation of root NO₃⁻ uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127, 1, 262 – 271.
38. **Chen K., Li G.J., Bressan R.A., Song C.P., Zhu J.K., & Zhao Y.** (2020) Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of integrative plant biology*, 62, 1, 25 – 54.

39. **Chen K.E., Healy M.D., Collins B.M.** (2019) Towards a molecular understanding of endosomal trafficking by retromer and retriever. *Traffic*, 20, 465 – 78.
40. **Chen X., Irani N.G., & Friml J.** (2011) Clathrin-mediated endocytosis: the gateway into plant cells. *Current opinion in plant biology*, 14, 6, 674 – 682.
41. **Cheng J.H., Bredow M., Monaghan J., & DiCenzo G.C.** (2021). Proteobacteria contain diverse flg22 epitopes that elicit varying immune responses in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34, 5, 504 – 510.
42. **Contento A.L., Bassham D.C.** (2012) Structure and function of endosomes in plant cells. *Journal of cell science*, 125, 15, 3511 – 3518.
43. **Dahhan D.A., Reynolds G.D., Cárdenas J.J., Eeckhout D., Johnson A., Yperman K., & Bednarek S.Y.** (2022) Proteomic characterization of isolated *Arabidopsis* clathrin-coated vesicles reveals evolutionarily conserved and plant-specific components. *The Plant Cell*, 34, 6, 2150 – 2173.
44. **Daněk M., Valentová O., & Martinec J.** (2016) Flotillins, Erlins, and HIRs: from animal base camp to plant new horizons. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 35, 4, 191 – 214.
45. **Dettmer J., Hong-Hermesdorf A., Stierhof Y.D., Schumacher K.** (2006) Vacuolar H⁺-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18, 715 – 30.
46. **Dragwidge J.M., Van Damme D.** (2020) Visualising endocytosis in plants: past, present, and future. *Journal of microscopy*, 280, 2, 104 – 110.
47. **Duby G. & Boutry M.** (2009) The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 457, 645 – 655.
48. **Ebine K., Fujimoto M., Okatani Y., Nishiyama T., Goh T., Ito E., & Ueda T.** (2011) A membrane trafficking pathway regulated by the plant-specific RAB GTPase ARA6. *Nature cell biology*, 13, 7, 853 – 859.

49. **Ekberg K., Palmgren M.G., Veierskov B., & Buch-Pedersen M.J.** (2010) A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of the protein. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 10, 7344 – 7350.
50. **Elkin S.R., Oswald N.W., Reed D.K., Metlen M., MacMillan J.B., Schmid S.L.** (2016) Ikarugamycin: a natural product of clathrin-mediated endocytosis. *Traffic*, 17, 1139 – 1149.
51. **Emans N., Zimmermann S., Fischer R.** (2002) Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *The Plant Cell*, 14, 1, 71 – 86.
52. **Emans N., Zimmermann S., Fischer R.** (2002) Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *The Plant Cell*, 14, 1, 71 – 86.
53. **Esteban R., Ariz I., Cruz C., & Moran J.F.** (2016) Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Science*, 248, 92 – 101.
54. **Estelle M.** (2001) Transporters on the move. *Nature*, 413, 6854, 374 – 375.
55. **Etxeberria E., Baroja-Fernandez E., Muñoz F.J., Pozueta-Romero J.** (2005) Sucrose-inducible endocytosis as a mechanism for nutrient uptake in heterotrophic plant cells. *Plant and Cell Physiology*, 46, 474 – 481.
56. **Etxeberria E., Pozueta-Romero J., Fernández E.B.** (2012) Fluid-phase endocytosis in plant cells. *Endocytosis in plants*, 107 – 122.
57. **Fan L., Li R., Pan J., Ding Z., & Lin J.** (2015) Endocytosis and its regulation in plants. *Trends in plant science*, 20, 6, 388 – 397.
58. **Filleur S., Dorbe M.F., Cerezo M., Orsel M., Granier F., Gojon A., & Daniel-Vedele F.** (2001) An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS letters*, 489, 2 – 3, 220 – 224.
59. **Flowers T.J., Glenn E.P., Volkov V.** (2018) Could vesicular transport of Na⁺ and Cl⁻ be a feature of salt tolerance in halophytes?. *Ann Bot*, 123, 1 – 18.

60. **Foissner I., Sommer A., Hoefftberger M., Hoepflingerand M.C., Absolonova M.** (2016) Is wortmannin-induced reorganization of the trans-Golgi network the key to explain charasome formation?. *Front. Plant. Sci.*, 7, 756.
61. **Fuglsang A.T., Guo Y., Cuin T.A., Qiu Q., Song C., Kristiansen K.A., & Zhu J.K.** (2007) *Arabidopsis* protein kinase PKS5 inhibits the plasma membrane H⁺-ATPase by preventing interaction with 14-3-3 protein. *The Plant Cell*, 19, 5, 1617 – 1634.
62. **Fuglsang A.T., Kristensen A., Cuin T.A., Schulze W.X., Persson J., Thuesen K.H., & Palmgren M.G.** (2014) Receptor kinase-mediated control of primary active proton pumping at the plasma membrane. *The Plant Journal*, 80, 6, 951 – 964.
63. **Fuglsang A.T., Palmgren M.** (2021) Proton and calcium pumping P-type ATPases and their regulation of plant responses to the environment. *Plant Physiology*, 187, 4, 1856 – 1875.
64. **Garcia de la Garma J.G., Fernandez-Garcia N., Bardisi E., Pallol B., Asensio-Rubio J.S., Bru R., Olmos E.** (2015) New insights into plant salt acclimation: the roles of vesicle trafficking and reactive oxygen species signalling in mitochondria and the endomembrane system. *New Phytol*, 205, 216 – 239.
65. **Gauthier-Rouvière C., Bodin S., Comunale F., Planchon D.** (2020) Flotillin membrane domains in cancer. *Cancer and Metastasis Reviews.*, 39, 361 – 374.
66. **Gaxiola R.A., Palmgren M.G., & Schumacher K.** (2007) Plant proton pumps. *FEBS letters*, 581, 12, 2204 – 2214.
67. **Geldner N., Anders N., Wolters H., Keicher J., Kornberger W., Muller P., & Jürgens G.** (2003) The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, 112, 2, 219 – 230.
68. **Gibeaut D.M., Hulett J., Cramer R., Seemann J.R.** (1997) Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol.*, 115, 317 – 319.

69. **Gkolemis K., Giannoutsou E., Adamakis I.S., Galatis B., & Apostolakos P.** (2023) Cell wall anisotropy plays a key role in *Zea mays* stomatal complex movement: the possible role of the cell wall matrix. *Plant Molecular Biology*, 113, 6, 331 – 351.
70. **Goh T., Uchida W., Arakawa S., Ito E., Dainobu T., Ebine K., Takeuchi M., Sato K., Ueda T., Nakano A.** (2007) VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 19, 11, 3504 – 3515.
71. **Gu X., Brennan A., Wei W., Guo G., & Lindsey K.** (2020) Vesicle transport in plants: a revised phylogeny of SNARE proteins. *Evolutionary Bioinformatics*, 16, 1176934320956575.
72. **Gu Y., & Rasmussen C.G.** (2022) Cell biology of primary cell wall synthesis in plants. *The Plant Cell*, 34, 1, 103 – 128.
73. **Hager A.** (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of plant research*, 116, 483 – 505.
74. **Hamaji K., Nagira M., Yoshida K., Ohnishi M., Oda Y., Uemura T., Goh T., Sato M.H., Morita M.T., Tasaka M., Hasezawa S., Nakano A., HaraNishimura I., Maeshima M., Fukaki H., Mimura T.** (2009) Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 50, 2023 – 2033.
75. **Haney C.H., & Long S.R.** (2010) Plant flotillins are required for infection by nitrogen-fixing bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 478 – 483.
76. **Hanton S.L., & Brandizzi F.** (2006) Protein transport in the plant secretory pathway. *Botany*, 84, 4, 523 – 530.
77. **Hao D.L., Zhou J.Y., Yang S.Y., Qi W., Yang K.J., & Su Y.H.** (2020) Function and regulation of ammonium transporters in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 10, 3557.

78. **Hao G.J., Zhao X.Y., Zhang M.M., Ying J., Yu F., Li S., & Zhang Y.** (2022) Vesicle trafficking in *Arabidopsis* pollen tubes. *FEBS letters*, 596, 17, 2231 – 2242.
79. **Hao H.Q., Fan L.S., Chen T., Li R.L., Li X.J., He Q.H., Botella M.A., & Lin J.X.** (2014) Clathrin and membrane microdomains cooperatively regulate RbohD dynamics and activity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26, 1729 – 1745.
80. **Haruta M., Burch H.L., Nelson R.B., Barrett-Wilt G., Kline K.G., Mohsin S.B., & Sussman M.R.** (2010) Molecular characterization of mutant *Arabidopsis* plants with reduced plasma membrane proton pump activity. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 23, 17918 – 17929.
81. **Haruta M., Gray W.M., Sussman M.R.** (2015) Regulation of the plasma membrane proton pump H⁺-ATPase by phosphorylation. *Current opinion in plant biology*, 28, 68 – 75.
82. **Haruta M., Sabat G., Stecker K., Minkoff B.B., & Sussman M.R.** (2014) A peptide hormone and its receptor protein kinase regulate plant cell expansion. *Science*, 343, 6169, 408 – 411.
83. **Henkel A.W., Lubke J. & Betz W.J.** (1996) FM1-43 dye ultrastructural localization in and release from frog motor nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 191823.
84. **Heucken N., & Ivanov R.** (2018) The retromer, sorting nexins and the plant endomembrane protein trafficking. *Journal of cell science*, 131, 2, jcs203695.
85. **Hirst J., Itzhak D.N., Antrobus R., Borner G.H.H., Robinson M.S.** (2018) Role of the AP-5 adaptor protein complex in late endosome-to-Golgi retrieval. *PLoS Biol*, 16, e2004411.
86. **Hirst J.D., Barlow L., Francisco G.C., Sahlender D.A., Seaman M.N., Dacks J.B., & Robinson M.S.** (2011) The fifth adaptor protein complex. *PLoS biology*, 9, 10, e1001170.

87. **Houlne G., & Boutry M.** (1994) Identification of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding a plasma membrane H⁺-ATPase whose expression is restricted to anther tissues. *The Plant Journal*, 5, 3, 311 – 317.
88. **Hsu V.W., Prekeris R.** (2010) Transport at the recycling endosome. *Current opinion in cell biology*, 22, 4, 528 – 534.
89. **Hu S., Li Y., Shen J.** (2020) A diverse membrane interaction network for plant multivesicular bodies: roles in proteins vacuolar delivery and unconventional secretion. *Frontiers in Plant Science*, 11, 425.
90. **Inoue S., Kinoshita T.** (2017) Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 174, 2, 531 – 538.
91. **Ivanov R., Vert G.** (2021) Endocytosis in plants: peculiarities and roles in the regulated trafficking of plant metal transporters. *Biology of the Cell*, 113, 1, 1 – 13.
92. **Ivanova T.V., Maiorova O.V., Orlova Y.V., Kuznetsova E.I., Khalilova L.A., Myasoedov N.A., Tsydendambaev V.D.** (2016) Cell ultrastructure and fatty acid composition of lipids in vegetative organs of *Chenopodium album* L. under salt stress conditions. *Russian Journal of Plant Physiology*, 63, 763 – 775.
93. **Jackson L.P., Kelly B.T., McCoy A.J., Gaffry T., James L.C., Collins B.M., & Owen D.J.** (2010) A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell*, 141, 7, 1220 – 1229.
94. **Jaillais Y., Fobis-Loisy I., Miege C., Rollin C., & Gaude T.** (2006) AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in *Arabidopsis*. *Nature*, 443, 7107, 106 – 109.
95. **Jaillais Y., Santambrogio M., Rozier F., Fobis-Loisy I., Miege, C. & Gaude`T.** (2007) The retromer protein VPS29 links cell polarity and organ initiation in plants. *Cell*, 130, 1057 – 1070.
96. **John W.A., Lückel B., Matschiavelli N., Hübner R., Matschi S., Hoehenwarter W., & Sachs S.** (2022) Endocytosis is a significant contributor to

- uranium (VI) uptake in tobacco (*Nicotiana tabacum*) BY-2 cells in phosphate-deficient culture. *Science of the Total Environment*, 823, 153700.
97. **Johnson A., Gnyliukh N., Kaufmann W.A., Narasimhan M., Vert G., Bednarek S.Y., & Friml J.** (2020) Experimental toolbox for quantitative evaluation of clathrin-mediated endocytosis in the plant model *Arabidopsis*. *Journal of cell science*, 133, 15, jcs248062.
98. **Junková P., Daněk M., Kocourková D., Brouzdová J., Kroumanová K., Zelazny E., & Valentová O.** (2018) Mapping of plasma membrane proteins interacting with *Arabidopsis thaliana* flotillin 2. *Frontiers in Plant Science*, 9, 991.
99. **Kabała K., Janicka M.** (2023) Structural and functional diversity of two atp-driven plant proton pumps. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 5, 4512.
100. **Kalampanayil B.D., & Wimmers L.E.** (2001) Identification and characterization of a salt-stress-induced plasma membrane H⁺-ATPase in tomato. *Plant, Cell & Environment*, 24, 9, 999 – 1000.
101. **Kanstrup C., Nour-Eldin H.H.** (2022) The emerging role of the nitrate and peptide transporter family: NPF in plant specialized metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 68, 102243.
102. **Kashtoh H., Baek K.H.** (2021) Structural and functional insights into the role of guard cell ion channels in abiotic stress-induced stomatal closure, *Plants*, 10, 12, 2774.
103. **Khalilova L.A., Lobreva O.V., Nedelyaeva O.I., Karpichev I.V., Balnokin Y.V.** (2023) Involvement of the Membrane Nanodomain Protein, AtFlot1, in Vesicular Transport of Plasma Membrane H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana* under Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 2, 1251.
104. **Khalilova L.A., Sergienko O.V., Orlova Y.V., Myasoedov N.A., Karpichev I.V., Balnokin Y.V.** (2020) *Arabidopsis thaliana* mutant with T-DNA

- insertion in the Flot1 (At5g25250) gene promoter possesses increased resistance to NaCl. *Russian journal of plant physiology*, 67, 275 – 284.
105. **Kinoshita T., Shimazaki K.** (2002) Biochemical Evidence for the Requirement of 14-3-3 Protein Binding in Activation of the Guard-Cell Plasma Membrane H⁺-ATPase by Blue Light. *Plant Cell Physiol.*, 43, 1359 – 1365
106. **Kleine-Vehn J., Wabnik K., Martinière A., Langowski Ł., Willig K., Naramoto S., & Friml J.** (2011) Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Molecular systems biology*, 7, 1, 540.
107. **Kotur Z., Mackenzie N., Ramesh S., Tyerman S.D., Kaiser B.N., & Glass A.D.** (2012) Nitrate transport capacity of the Arabidopsis thaliana NRT2 family members and their interactions with AtNAR2. 1. *New phytologist*, 194, 3, 724 – 731.
108. **Krebs M., Beyhl D., Gorlich E., Al-Rasheid K.A.S., Marten I., Stierhof Y.D., Hedrich R., Schumacher K.** (2010) Arabidopsis V-ATPase activity at the tonoplast is required for efficient nutrient storage but not for sodium accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 3251 – 3256.
109. **Kroumanova K., Kocourkova D., Daneřk M., Lamparova L., Pospichalova R., Malinska K., Krc̆kova Z., Burketova L., Valentová O., Martinec J., & Janda M.** (2019) Characterisation of Arabidopsis flotillins in response to stresses. *Biol. Plant*, 63, 144 – 152.
110. **Kurowska M.M.** (2021) Aquaporins in cereals — important players in maintaining cell homeostasis under abiotic stress. *Genes*, 12, 4, 477.
111. **Kwiatkowska K., Matveichuk O.V., Fronk J., & Ciesielska A.** (2020) Flotillins: at the intersection of protein S-palmitoylation and lipid-mediated signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 7, 2283.
112. **Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 5259, 680 – 685.

113. **Lam S.K., Siu C.L., Hillmer S., Jang S., An G., Robinson D.G., & Jiang L.** (2007) Rice SCAMP1 defines clathrin-coated, trans-Golgi-located tubular-vesicular structures as an early endosome in tobacco BY-2 cells. *The Plant Cell*, 19, 1, 296 – 319.
114. **Langhorst M.F., Reuter A., Jaeger F.A., Wippich F.M., Luxenhofer G., Plattner H., & Stuermer C.A.** (2008) Trafficking of the microdomain scaffolding protein reggie-1/flotillin-2. *Eur. J. Cell Biol*, 87, 211 – 226.
115. **Langhorst M.F., Reuter A., Stuermer C.A.** (2005) Scaffolding microdomains and beyond: The function of reggie/flotillin proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, 62, 2228 – 2240.
116. **Lanquar V., Loqué D., Hormann F., Yuan L., Bohner A., Engelsberger W.R., & Frommer W.B.** (2009) Feedback inhibition of ammonium uptake by a phospho-dependent allosteric mechanism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21, 11, 3610 – 3622.
117. **Larsson C., Widell S., Kjellbom P.** (1987) Preparation of high-purity plasma membranes. *Methods Enzymol.*, 148, 558 – 568.
118. **Law K.C., Chung K.K., Zhuang X.** (2022) An update on coat protein complexes for vesicle formation in plant post-Golgi trafficking. *Frontiers in Plant Science*, 13, 826007.
119. **Laxmi A., Pan J., Morsy M., Chen R.** (2008) Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, 3, e1510
120. **Leshem Y., Melamed-Book N., Cagnac O., Ronen G., Nishri Y., Solomon M., Cohen G., & Levine A.** (2006) Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H₂O₂-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103, 18008.
121. **Li L., Verstraeten I., Roosjen M., Takahashi K., Rodriguez L., Merrin J., & Friml J.** (2021) Cell surface and intracellular auxin signalling for H⁺ fluxes in root growth. *Nature*, 599, 7884, 273 – 277.

122. **Li R., Liu P., Wan Y., Chen T., Wang Q., Mettbach U., & Lin J.** (2012) A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development. *The Plant Cell*, 24, 5, 2105 – 2122.
123. **Li R., Zhao R., Yang M., Zhang X., & Lin J.** (2023) Membrane microdomains: Structural and signaling platforms for establishing membrane polarity. *Plant Physiology*, 193, 4, 2260 – 2277.
124. **Li W., Wang Y., Okamoto M., Crawford N.M., Siddiqi M.Y., & Glass, A.D.** (2007) Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant physiology*, 143, 1, 425 – 433.
125. **Li X.J., Wang X.H., Yang Y., Li R.L., He Q.H., Fang X.H., Luu D.T., Maurel C., Lin J.X.** (2011) Single-molecule analysis of PIP2;1 dynamics and partitioning reveals multiple modes of *Arabidopsis* plasma membrane aquaporin regulation. *Plant Cell*, 23, 3780 – 3797.
126. **Li Y., Zeng H., Xu F., Yan F., & Xu W.** (2022) H⁺-ATPases in plant growth and stress responses. *Annual Review of Plant Biology*, 73, 1, 495 – 521.
127. **Lipka V., Kwon C., Panstruga R.** (2007) SNARE-ware: The role of SNARE domain proteins in plant biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23, 147 – 174.
128. **Litovchick L.** (2013) Immunoblotting. Antibodies, Massachusetts, chapter 13, 364 – 372.
129. **Liu C., Zeng Y., Li H., Yang C., Shen W., Xu M., & Gao C.** (2021) A plant-unique ESCRT component, FYVE4, regulates multivesicular endosome biogenesis and plant growth. *New Phytologist*, 231, 1, 193 – 209.
130. **Liu K.H., Huang C.Y., Tsay Y.F.** (1999) CHL1 is a dual-affinity nitrate transporter of *Arabidopsis* involved in multiple phases of nitrate uptake. *Plant Cell*, 11, 865 – 874.
131. **Liu Y., & von Wirén N.** (2017) Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *Journal of Experimental Botany*, 68, 10, 2581 – 2592.

132. **Loqué D., Lalonde S., Looger L.L., Von Wirén N., & Frommer W.B.** (2007) A cytosolic trans-activation domain essential for ammonium uptake. *Nature*, 446, 7132, 195 – 198.
133. **Lordkaew S., Dell B., Jamjod S., & Rerkasem B.** (2011). Boron deficiency in maize. *Plant and Soil*, 342, 207 – 220.
134. **Lu M.A., Qian Y., Ma L., Guo Q., & Gao N.** (2024) Molecular mechanism of the flotillin complex in membrane microdomain organization. *BioRxiv*, 2024.05, 25.595881.
135. **Lu Y., Cheng K., Tang H., Li J., Zhang C., & Zhu H.** (2024) The role of Rab GTPase in Plant development and stress. *Journal of Plant Physiology*, 154239.
136. **Luu D.T., Martiniere A., Sorieul M., Runions J., & Maurel C.** (2012) Fluorescence recovery after photobleaching reveals high cycling dynamics of plasma membrane aquaporins in *Arabidopsis* roots under salt stress. *The Plant Journal*, 69, 5, 894 – 905.
137. **Ma C., Wang C., Luo D., Yan L., Yang W., Li N., & Gao N.** (2022) Structural insights into the membrane microdomain organization by SPFH family proteins. *Cell Research*, 32, 2, 176 – 189.
138. **Manders E.M.M., Verbeek F.J., Aten J.A.** (1993) Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images. *Journal of microscopy*, 169, 3, 375 – 382.
139. **Maniatis T., Fritsch E.F., & Sambrook J.** (1982) *Molecular cloning a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, NY.
140. **Marchant R., Robards A.W.** (1968) Membrane systems associated with the plasmalemma of plant cells. *Annals of Botany*, 32, 3, 457 – 471.
141. **Marmagne A., Vinauger-Douard M., Monachello D., De Longevialle A.F., Charon C., Allot M., Rappaport F., Wollman F.A., Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G.** (2007) Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel)

- family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *J. Exp. Bot.*, 14, 1 – 9.
142. **Marowa P., Ding A., & Kong Y. (2016)** Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant cell reports*, 35, 949 – 965.
143. **Mazel A., Leshem Y., Tiwari B.S., Levine A. (2004)** Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol* 134, 118 – 128.
144. **McDonald T.R., & Ward J.M. (2016)** Evolution of electrogenic ammonium transporters (AMTs). *Frontiers in Plant Science*, 7, 352.
145. **McMahon H.T., & Boucrot E. (2011)** Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 517 – 533.
146. **Michalak A., Wdowikowska A., Janicka M. (2022)** Plant Plasma Membrane Proton Pump: One Protein with Multiple Functions. *Cells*, 11, 24, 4052.
147. **Miller A.J., Fan X., Orsel M., Smith S.J., & Wells D.M. (2007)** Nitrate transport and signalling. *Journal of experimental Botany*, 58, 9, 2297 – 2306.
148. **Mimura T., Kura-Hotta M., Tsujimura T., Ohnishi M., Miura M., Okazaki Y., Mimura M., Maeshima M., & Washitani-Nemoto S. (2003)** Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta. vol.*, 216, 397.
149. **Minamino N., Ueda T. (2019)** RAB GTPases and their effectors in plant endosomal transport. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, 52, 61 – 8.
150. **Morsomme P., Boutry M. (2000)** The plant plasma membrane H⁺-ATPase: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes.*, 1465, 1 – 2, 1 – 16.
151. **Mulet J.M., Llopis-Torregrosa V., Primo C., Marqués M.C., & Yenush L. (2013)** Endocytic regulation of alkali metal transport proteins in mammals, yeast and plants. *Current genetics*, 59, 207 – 230.

152. **Murphy A.S., Bandyopadhyay A., Holstein S.E., & Peer W.A.** (2005) Endocytotic cycling of PM proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 56, 1, 221 – 251.
153. **Murray M.G., & Thompson W.** (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic acids research*, 8, 19, 4321 – 4326.
154. **Nable R.O., Bañuelos G.S., Paull J.G.** (1997) Boron toxicity. *Plant and soil*, 193, 181 – 198.
155. **Narasimhan M., Gallei M., Tan S., Johnson A., Verstraeten I., Li L., & Friml J.** (2021) Systematic analysis of specific and nonspecific auxin effects on endocytosis and trafficking. *Plant Physiology*, 186, 2, 1122 – 1142.
156. **Narasimhan M., Johnson A., Prizak R., Kaufmann W.A., Tan S., Casillas-Perez B., & Friml J.** (2020) Evolutionarily unique mechanistic framework of clathrin-mediated endocytosis in plants. *Elife*, 9, e52067.
157. **Nebenfuhr A., Ritzenthaler C., Robinson D.G.** (2002) Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant physiology*, 130, 3, 1102 – 1108.
158. **Nguyen T.T., Sabat G., & Sussman M.R.** (2018) In vivo cross-linking supports a head-to-tail mechanism for regulation of the plant plasma membrane P-type H⁺-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 293, 44, 17095 – 17106.
159. **Nielsen E.** (2020) The small GTPase superfamily in plants: a conserved regulatory module with novel functions. *Annual Review of Plant Biology*, 71, 1, 247 – 272.
160. **Nielsen M.E.** (2024) Vesicle trafficking pathways in defence-related cell wall modifications-papillae and encasements. *Journal of Experimental Botany*, 155.
161. **Nieves-Cordones M., Azeem F., Long Y., Boeglin M., Duby G., Mouline K., & Sentenac H.** (2022) Non-autonomous stomatal control by pavement cell turgor via the K⁺ channel subunit AtKC1. *The Plant Cell*, 34, 5, 2019 – 2037.
162. **Niggli V., Sigel E.** (2008) Anticipating antiport in P-type ATPases. *Trends in biochemical sciences*, 33, 4, 156 – 160.

163. **Niu X., Narasimhan M.L., Salzman R.A., Bressan R.A., & Hasegawa P. M.** (1993) NaCl regulation of plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in a glycophyte and a halophyte. *Plant physiology*, 103, 3, 713 – 718.
164. **Norris A., Grant B.D.** (2020) Endosomal microdomains: formation and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 65, 86 – 95.
165. **Nuhse T.S., Bottrill A.R., Jones A.M., Peck S.C.** (2007) Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J.*, 51, 931 – 940.
166. **Olmos E., García De La Garma J., Gomez-Jimenez M.C., Fernandez-Garcia N.** (2017) Arabinogalactan proteins are involved in salt-adaptation and vesicle trafficking in tobacco by-2 cell cultures. *Front. Plant. Sci.*, 8, 1092.
167. **Olsson A., Svennelid F., Ek B., Sommarin M., & Larsson C.** (1998) A phosphothreonine residue at the C-terminal end of the plasma membrane H⁺-ATPase is protected by fusicoccin-induced 14–3–3 binding. *Plant Physiology*, 118, 2, 551 – 555.
168. **Orlova Y.V., Sergienko O.V., Khalilova L.A., Voronkov A.S., Fomenkov A.A., Nosov A.V., & Balnokin Y.V.** (2019) Sodium transport by endocytic vesicles in cultured *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Cells. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 359 – 370.
169. **Østerberg J.T., Palmgren M.** (2018) Heavy metal pumps in plants: structure, function and origin. *Advances in Botanical Research*, 87, 57 – 89.
170. **Otegui M.S.** (2018) ESCRT-mediated sorting and intraluminal vesicle concatenation in plants. *Biochemical Society Transactions*, 46, 537 – 545.
171. **Otegui M.S., Spitzer C.** (2008) Endosomal functions in plants. *Traffic*, 9, 1589 – 1598.
172. **Otto G.P., Nichols B.J.** (2011) The roles of flotillin microdomains—endocytosis and beyond. *Journal of cell science*, 124, 23, 3933 – 3940.
173. **Oufattole M., Arango M., & Boutry M.,** (2000) Identification and expression of three new *Nicotiana plumbaginifolia* genes which encode isoforms

- of a plasma-membrane H⁺-ATPase, and one of which is induced by mechanical stress. *Planta*, 210, 715 – 722.
174. **Palmgren M., Morsomme P.** (2019) The plasma membrane H⁺-ATPase, a simple polypeptide with a long history. *Yeast*, 36, 4, 201 – 210.
175. **Palmgren M.G.** (2001) Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annual review of plant biology*, 52, 1, 817 – 845.
176. **Pandey G.K., Mahiwal S.** (2020) Role of potassium in plants. *Cham, Switzerl and Springer*, 49.
177. **Pardo J.M., Cubero B., Leidi E.O., Quintero F.J.** (2006) Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of experimental botany*, 57, 1181 – 1199.
178. **Pedersen B.P., Buch-Pedersen M.J., Preben Morth J., Palmgren M.G., & Nissen P.** (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature*, 450, 7172, 1111 – 1114.
179. **Peer W.A.** (2011) Plasma membrane protein trafficking. *The plant plasma membrane*, 31 – 56.
180. **Peng Z.Y., & Weyers J.D.B.** (1994) Stomatal sensitivity to abscisic acid following water-deficit stress. *J. Exp. Bot.*, 45, 835 – 845.
181. **Pereira C., Di Sansebastiano G.P.** (2021) Mechanisms of membrane traffic in plant cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 169, 102 – 111.
182. **Philippar K., Ivashikina N., Ache P., Christian M., Lüthen H., Palme K., Hedrich R.** (2004) Auxin activates KAT1 and KAT2, two K⁺-channel genes expressed in seedlings of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, 37, 815 – 827.
183. **Plociennikowska A., Hromada-Judycka A., Borzecka K., Kwiatkowska K.** (2015) Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell. Mol. Life Sci.*, 72, 557 – 581.
184. **Prasad M.N.V., Hagemeyer J., Devi S.R., & Prasad M.N.V.** (1999) Membrane lipid alterations in heavy metal exposed plants. *Heavy metal stress in plants: from molecules to ecosystems*, 99 – 116.

185. **Prelich G.** (2012) Gene Overexpression: Uses, mechanisms, and interpretation genetics. *Genetics*, 190, 841 – 854.
186. **Qi W., Zhang Y., Li M., Zhang P., Xing J., Chen Y., & Zhang L.** (2024) Endocytic recycling in plants: pathways and regulation. *Journal of Experimental Botany*, 188.
187. **Ram H., Kaur A., Gandass N., Singh S., Desmukh R., Sonah H., Sharma T.R.** (2019) Molecular characterization and expression dynamics of MTP genes under various spatiotemporal stages and metal stress conditions in rice. *PLoS ONE*, 14, 0217360.
188. **Rayle D.L., Cleland R.E.** (1992) The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiol.*, 99, 1271 – 1274.
189. **Richter S., Müller L.M., Stierhof Y.D., Mayer U., Takada N., Kost B., & Jürgens G.** (2012) Polarized cell growth in *Arabidopsis* requires endosomal recycling mediated by GBF1-related ARF exchange factors. *Nature cell biology*, 14, 1, 80 – 86.
190. **Ritzenthaler C., Nebenführ A., Movafeghi A., Stussi-Garaud C., Behnia L., Pimpl P., Staehelin L.A., Robinson D.G.** (2002) Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *The Plant Cell*, 14, 1, 237 – 261.
191. **Robinson D.G., & Pimpl P.** (2014) Clathrin and post-Golgi trafficking: a very complicated issue. *Trends. Plant. Sci.*, 19, 134 – 139.
192. **Robinson M.S.** (2015) Forty years of Clathrin-coated vesicles. *Traffic.*, 16, 1210 – 38.
193. **Robinson M.S., Bonifacino J.S.** (2001) Adaptor-related proteins. *Curr Opin. Cell. Biol.*, 13, 444 – 453.
194. **Robinson M.S., Sahlender D.A., Foster S.D.** (2010) Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Dev. Cell.*, 18, 324 – 331.

- Boehm M, Bonifacino JS (2001) Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* 12: 2907–2920.
195. **Roder P., Hille C.** (2014) ANG-2 for quantitative Na⁺ determination in living cells by time-resolved fluorescence microscopy. *Photochemical & photobiological sciences*, 13, 1699 – 1710.
196. **Rodriguez-Furlan C., Borna R., Betz O.** (2023) RAB7 GTPases as coordinators of plant endomembrane traffic. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1240973.
197. **Ruano G., Scheuring D.** (2020) Plant cells under attack: Unconventional endomembrane trafficking during plant defense. *Plants*, 9, 3, 389.
198. **Rudashevskaya E.L., Ye J., Jensen O.N., Fuglsang A.T., Palmgren M.G.** (2012) Phosphosite mapping of P-type plasma membrane H⁺-ATPase in homologous and heterologous environments. *J. Biol. Chem.*, 287, 4904 – 4913.
199. **Rutter B.D., Innes R.W.** (2017) Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins. *Plant physiology*, 173, 1, 728 – 741.
200. **Sahu B.B., & Shaw B.P.** (2009) Salt-inducible isoform of plasma membrane H⁺-ATPase gene in rice remains constitutively expressed in natural halophyte, *Suaeda maritima*. *Journal of Plant Physiology*, 166, 10, 1077 – 1089.
201. **Santi S., Locci G., Monte R., Pinton R., & Varanini Z.** (2003) Induction of nitrate uptake in maize roots: expression of a putative high-affinity nitrate transporter and plasma membrane H⁺-ATPase isoforms. *Journal of Experimental Botany*, 54, 389, 1851 – 1864.
202. **Sasaki A., Yamaji N., Ma J.F.** (2016) Transporters involved in mineral nutrient uptake in rice. *J. Exp. Bot.*, 67, 3645 – 3653.
203. **Schroeder J.I., Raschke K., Neher E.** (1987) Voltage dependence of K⁺ channels in guard-cell protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 84, 4108 – 4112.
204. **Seaman M.N.J.** (2004) Cargo-selective endosomal sorting for retrieval to the Golgi requires retromer. *J. Cell. Biol.*, 165, 111 – 122.

205. **Sergienko O.V., Khalilova L.A., Orlova Y.V., Shuvalov A.V., Myasoedov N.A., & Karpichev I.V.** (2022) Mutation of the ARA7/AtRabF2b gene, that increases the content of the Ara7 protein regulating endocytic trafficking pathways, improves salt tolerance of the *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 69, 1, 11.
206. **Shi H., Ishitani M., Kim C., & Zhu J.K.** (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the national academy of sciences*, 97, 12, 6896 – 6901.
207. **Shi H., Lee B.H., Wu S.J., & Zhu J.K.** (2003) Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature biotechnology*, 21, 1, 81 – 85.
208. **Shi Y., Luo C., Xiang Y., & Qian D.** (2023) Rab GTPases, tethers, and SNAREs work together to regulate *Arabidopsis* cell plate formation. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1120841.
209. **Shimazaki K., Doi M., Assmann S.M., Kinoshita T.** (2007) Light regulation of stomatal movement. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 219 – 247.
210. **Shpetner H., Joly M., Hartley D., & Corvera S.** (1996) Potential sites of PI-3 kinase function in the endocytic pathway revealed by the PI-3 kinase inhibitor, wortmannin. *The Journal of cell biology*, 132, 4, 595 – 605.
211. **Shuvalov A.V., Orlova J.V., Khalilova L.A., Myasoedov N.A., Andreev I.M., Belyaev D.V., Balnokin Y.V.** (2015) Evidence for the functioning of a Cl⁻/H⁺ antiporter in the membranes isolated from root cells of the halophyte *Suaeda altissima* and enriched with Golgi membranes. *Russian J. Plant Physiol.*, 62, 52 – 63.
212. **Siao W., Coskun D., Baluška F., Kronzucker H.J., Xu W.** (2020) Root-apex proton fluxes at the centre of soil-stress acclimation. *Trends Plant Sci.*, 25, 794 – 804.
213. **Sinclair R., Rosquete M.R., Drakakaki G.** (2018) Post-Golgi trafficking and transport of cell wall components. *Frontiers in Plant Science*, 9, 411929.

214. **Singh M.K., Jürgens G.** (2018) Specificity of plant membrane trafficking – ARFs, regulators and coat proteins. *Semin Cell Dev. Biol.*, 80, 85 – 93.
215. **Surpin M., & Raikhel N.** (2004) Traffic jams affect plant development and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5, 100 – 109.
216. **Sutter J.U., Sieben C., Hartel A., Eisenach C., Thiel G., Blatt M.R.** (2007) Abscisic acid triggers the endocytosis of the *Arabidopsis* KAT1 K⁺ channel and its recycling to the plasma membrane. *Current Biology*, 17, 1396 – 1402.
217. **Svennelid F., Olsson A., Piotrowski M., Rosenquist M., Ottman C., Larsson C., Oecking C., Sommarin M.** (1999) Phosphorylation of Thr-948 at the C terminus of the plasma membrane H⁺-ATPase creates a binding site for the regulatory 14-3-3 protein. *Plant Cell.*, 11, 2379 – 2391.
218. **Tahir M.M., Wang H., Ahmad B., Liu Y., Fan S., Li K., & Zhang D.** (2021) Identification and characterization of NRT gene family reveals their critical response to nitrate regulation during adventitious root formation and development in apple rootstock. *Scientia Horticulturae*, 275, 109642.
219. **Takahashi K., Hayashi K., Kinoshita T.** (2012) Auxin activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 159, 632 – 641.
220. **Takano J., Miwa K., Yuan L., von Wiren N., Fujiwara T.** (2005) Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102, 34, 12276 – 12281.
221. **Takano J., Tanaka M., Toyoda A., Miwa K., Kasai K., Fuji K., Onouchi H., Naito S., Fujiwara T.** (2010) Polar localization and degradation of *Arabidopsis* boron transporters through distinct trafficking pathways. *PNAS*, 107, 5220 – 5225.
222. **Takano J., Yoshinari A., & Luu D.T.** (2017) Plant aquaporin trafficking. *Plant Aquaporins. From Transport to Signaling*, 47 – 81.

223. **Talke I.N., Hanikenne M., Kramer U.** (2006) Zinc-dependent global transcriptional control, transcriptional deregulation, and higher gene copy number for genes in metal homeostasis of the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. *Plant Physiol.*, 142, 148 – 167.
224. **Tikkanen R.** (2009) Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin1 is required for their endocytosis. *Cell Signal.*, 21, 1287 – 1297.
225. **Traub L.M.** (2009) Tickets to ride: selecting cargo for clathrin regulated internalization. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 10, 583 – 596.
226. **Tripathy M.K., Deswal R., Sopory S.K.** (2021) Plant RABs: role in development and in abiotic and biotic stress responses. *Current Genomics*, 22, 1, 26 – 40.
227. **Tsay Y.F., Chiu C.C., Tsai C.B., Ho C.H., Hsu P.K.** (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. *FEBS Lett.*, 581, 2290 – 2300.
228. **Ueda T., Yamaguchi M., Uchimiya H., Nakano A.** (2001) Ara6, a plant unique novel type Rab GTPase, functions in the endocytic pathway of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.*, 20, 4730 – 41.
229. **Valencia J.P., Goodman K., Otegui M.S.** (2016) Endocytosis and endosomal trafficking in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 67, 309 – 35.
230. **Vernoud V., Horton A.C., Yang Z., Nielsen E.** (2003) Analysis of the small GTPase gene superfamily of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 131, 1191 – 208.
231. **Versaw W.K., & Harrison M.J.** (2002) A chloroplast phosphate transporter, PHT2;1, influences allocation of phosphate within the plant and phosphate-starvation responses. *The Plant Cell*, 14, 8, 1751 – 1766.
232. **Vitart V., Baxter I., Doerner P., & Harper J.F.** (2001) Evidence for a role in growth and salt resistance of a plasma membrane H⁺-ATPase in the root endodermis. *The Plant Journal*, 27, 3, 191 – 201.
233. **von der Fecht-Bartenbach J.V.D., Bogner M., Krebs M., Stierhof Y.D., Schumacher K., Ludewig U.** (2007) Function of the anion transporter AtCLC-d in the trans-Golgi network. *The Plant Journal*, 50, 3, 466 – 474.

234. **Wang H., Tse Y.C., Law A.H., Sun S.S., Sun Y.B., Xu Z.F., & Jiang L.** (2010) Vacuolar sorting receptors (VSRs) and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) are essential for pollen tube growth. *The Plant Journal*, 61, 5, 826 – 838.
235. **Wang J., Cai Y., Miao Y., Lam S.K., Jiang L.** (2009) Wortmannin induces homotypic fusion of plant prevacuolar compartments. *J. Exp. Bot.*, 60, 3075 – 3083.
236. **Wang P., Siao W., Zhao X., Arora D., Wang R., Eeckhout D., & Russinova E.** (2023) Adaptor protein complex interaction map in *Arabidopsis* identifies P34 as a common stability regulator. *Nature plants*, 9, 2, 355 – 371.
237. **Wang Q., Zhao Y., Luo W., Li R., He Q., Fang X., & Lin J.** (2013) Single-particle analysis reveals shutoff control of the *Arabidopsis* ammonium transporter AMT1;3 by clustering and internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 32, 13204 – 13209.
238. **Wang X., Chung K.P., Lin W., Jiang L.** (2018) Protein secretion in plants: conventional and unconventional pathways and new techniques. *J. Exp. Bot.*, 69, 21 – 37.
239. **Wdowikowska A., & Klobus G.** (2016). The plasma membrane proton pump gene family in cucumber. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38, 1 – 14.
240. **Wisniewska J., Xu J., Seifertová D., Brewer P.B., Ruzicka K., Blilou I., & Friml J.** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312, 5775, 883 – 883.
241. **Wu L.G., Hamid E., Shin W., Chiang H.C.** (2014) Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu Rev Physiol.*, 76, 301 – 331.
242. **Yamazaki M., Shimada T., Takahashi H., Tamura K., Kondo M., Nishimura M., & Hara-Nishimura I.** (2008) *Arabidopsis* VPS35, a retromer component, is required for vacuolar protein sorting and involved in plant growth and leaf senescence. *Plant Cell Physiol.*, 49, 142 – 156.

243. **Yang Y., Han X., Ma L., Wu Y., Liu X., Fu H., & Guo Y.** (2021) Dynamic changes of phosphatidylinositol and phosphatidylinositol 4-phosphate levels modulate H⁺-ATPase and Na⁺/H⁺ antiporter activities to maintain ion homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *Molecular Plant*, 14, 12, 2000 – 2014.
244. **Yepes-Molina L., Carvajal M., Martínez-Ballesta M.C.** (2020) Detergent resistant membrane domains in broccoli plasma membrane associated to the response to salinity stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 20, 7694.
245. **Yin Y., Adachi Y., Ye W., Hayashi M., Nakamura Y., Kinoshita T., Mori I.C., Murata Y.** (2013) Difference in abscisic acid perception mechanisms between closure induction and opening inhibition of stomata. *Plant Physiol.*, 163, 600 – 610.
246. **Yong Z., Kotur Z., Glass A.D.M.** (2010) Characterization of an intact two-component high-affinity nitrate transporter from *Arabidopsis* roots. *Plant J.*, 63, 739 – 748.
247. **Yoshinari A., Fujimoto M., Ueda T., Inada N., Naito S., & Takano J.** (2016) DRP1-dependent endocytosis is essential for polar localization and boron induced degradation of the borate transporter BOR1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 57, 1985 – 2000.
248. **Yoshinari A., Hosokawa T., Amano T., Beier M.P., Kunieda T., Shimada T., & Takano J.** (2019) Polar localization of the borate exporter BOR1 requires AP2-dependent endocytosis. *Plant Physiology*, 179, 4, 1569 – 1580.
249. **Yu M., Cui Y., Zhang X., Li R., & Lin J.** (2020) Organization and dynamics of functional plant membrane microdomains. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 275 – 287.
250. **Yu M., Liu H., Dong Z., Xiao J., Su B., Fan L., & Li R.** (2017) The dynamics and endocytosis of Flot1 protein in response to flg22 in *Arabidopsis*. *Journal of plant physiology*, 215, 73 – 84.

251. **Yuan L., Loqué D., Kojima S., Rauch S., Ishiyama K., Inoue E., Takahashi H., von Wirén N.** (2007) The organization of high-affinity ammonium uptake in *Arabidopsis* roots depends on the spatial arrangement and biochemical properties of AMT1-type transporters. *The Plant Cell*, 1, 19, 8, 2636 – 52.
252. **Yuorieva N.O., Voronkov A.S., Tereshonok D.V., Osipova E.S., Platonova E.V., Belyaev D.V.** (2018) An Assay for Express Screening of Potato Transformants by GFP Fluorescence. *Moscow University biological sciences bulletin*, 73, 2, 69 – 75.
253. **Zhang C., Chen L., Hou S.** (2024) The emerging roles of clathrin-mediated endocytosis in plant development and stress responses. *Journal of Plant Physiology*, 154189.
254. **Zhang L., Xing J., Lin J.** (2019) At the intersection of exocytosis and endocytosis in plants. *New phytologist*, 224, 4, 1479 – 1489.
255. **Zhang X., Wang H., Takemiya A., Song C., Kinoshita T., Shimazaki K.** (2004) Inhibition of blue light-dependent H⁺ pumping by abscisic acid through hydrogen peroxide-induced dephosphorylation of the plasma membrane H⁺-ATPase in Guard Cell Protoplasts. *Plant Physiol.*, 136, 4150 – 4158.
256. **Zhao C., Zhang H., Song C., Zhu J.K., & Shabala S.** (2020) Mechanisms of plant responses and adaptation to soil salinity. *The innovation*, 1, 1.
257. **Zhao F., Zhang J., Liu Y.S., Li L., He Y.L.** (2011) Research advances on flotillins. *Virology J.*, 8, 479.
258. **Zhou H., Ge H., Chen J., Li X., Yang L., Zhang H., & Wang Y.** (2022) Salicylic acid regulates root gravitropic growth via clathrin-independent endocytic trafficking of PIN2 auxin transporter in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 16, 9379.
259. **Zhou J.Y., Hao D.L., & Yang G.Z.** (2021) Regulation of cytosolic pH: the contributions of plant plasma membrane H⁺-ATPases and multiple transporters. *International journal of molecular sciences*, 22, 23, 12998.

260. **Zhu Y., McFarlane H.E.** (2022) Regulation of cellulose synthesis via exocytosis and endocytosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 69, 102273.
261. **Zinchuk V., Zinchuk O., Okada T.** (2007) Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta histochemica et cytochemica*, 40, 4, 101 – 111.
262. **Zwiewka M., Nodzynski T., Robert S., Vanneste S., & Friml J.** (2015) Osmotic stress modulates the balance between exocytosis and clathrin-mediated endocytosis in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant*, 8, 1175 – 87.
263. **Agneessens, J.** (2024) A study of the vesicle trafficking pathways regulating polar auxin transport and root development. Doctoral dissertation, durham university.
264. **Балнокин Ю.В., Куркова Е.Б., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., и Юсуфов А.Г.** (2007) Пиноцитоз в клетках корня соленакапливающего галофита *Suaeda altissima* и его возможное участие в транспорте ионов Cl⁻. *Физиология растений*, 54, 6, 892 – 901.
265. **Орлова Ю.В., Майорова (Лобрева) О.В., Халилова Л.А., Воронков А.С., Фоменков А.А., Носов А.В., Попова Л.Г., Балнокин Ю.В.** (2018) Участие эндоцитоза в поглощении ионов натрия клетками суспензионной культуры *Arabidopsis thaliana* (L.) Neynh. *Биологические мембраны*, 35, 4, 309 – 317
266. **Строгонов Б.П.** (1962) Физиологические основы солеустойчивости растений: (при разнокачественном засолений почвы). М.: Изд-во АН СССР, 367.
267. **Фоменков А.А., и др.** (2014) Цитофизиологические особенности культивируемых клеток *Arabidopsis thaliana* с нарушенным восприятием сигнала этилена рецептором ETR1. *Физиология растений*, 61, 5, 640 – 650.

