

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Лобрева Ольга Викторовна

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

Специальность 1.5.21. Физиология и биохимия растений

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук

Научные руководители: *Балнокин Юрий Владимирович* – доктор биологических наук, профессор

Карнычев Игорь Викторович – кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: *Казнина Наталья Мстиславовна* – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической физиологии растений и заместитель директора по научной работе Института биологии – обособленного подразделения ФГБУН ФИЦ «Карельского научного центра Российской академии наук»

Соловченко Алексей Евгеньевич – доктор биологических наук, профессор кафедры биоинженерии Биологического факультета ФГБОУ ВО Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

Мамаева Анна Станиславовна – кандидат биологических наук, научный сотрудник и заведующий лабораторией системного анализа белков и пептидов ФГБУН Института биоорганической химии им. Академиков Ю.А. Овчинникова и М.М. Шемякина РАН

Защита диссертации состоится «7» февраля 2025 г. В 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.015.6 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу 119234, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет МГУ, аудитория М-1.; E-mail: dissovet_00155@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3299>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Д.М. Гершкович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Ряд исследований указывает на вовлечение везикулярного транспорта (ВТ) в механизмы ионного гомеостатирования и солеустойчивости растений. В частности, нокаут-мутации 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 нераскрытыми. 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^+ антипортерами плазматической мембраны (ПМ) и тонопласта, экспортирующими Na^+ из цитоплазмы (Qiu et al., 2003; Bassil et al., 2012; Bassil et al., 2019). Протон-движущая сила, необходимая для переноса Na^+ , генерируется H^+ -АТФазами ПМ и тонопласта, а также H^+ -транслоцирующей пирофосфатазой тонопласта (Apse et al., 2007, Falhof et al., 2016; Li et al., 2022).). Потоки Na^+ через мембраны, а следовательно, и внутриклеточные концентрации Na^+ , могут регулироваться через изменения содержания этих белков в мембране посредством везикулярного транспорта. Участие ВТ в изменении содержания белка в мембране в ответ на разные стимулы показаны для K^+ -канала KAT1 (Sutter et al., 2007; Nieves-Cordones et al., 2022), переносчиков индолил-3 уксусной кислоты (ауксина) PIN1 и PIN2 (Kleine-Vehn et al., 2008 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 в содержании мембранных белков (ремоделирование белкового состава мембран) осуществляются при участии двух главных путей везикулярного транспорта, эндоцитоза и экзоцитоза (секреторного пути) (Otegui and Spitzer 2008; Peer et al., 2011; Dragwidge, Van Damme, 2020; Zhu et al., 2022). Изменения в соотношении скоростей эндоцитоза и экзоцитоза приводят к изменениям содержания мембранных белков, вовлеченных в поддержание Na^+ -гомеостаза клеток растений в условиях засоления. Однако, такого рода сведения ограничены. В везикулярном транспорте мембранных белков участвуют флотиллины – белки мембранных нанодоменов (Otto & Nichols, 2011; Yu et al., 2017; Li et al., 2023). Мало сведений имеется о вовлечении флотиллинов в изменения белкового состава мембран посредством ВТ у растений. Известно, что в клетках млекопитающих и дрожжей эти белки вовлечены в ВТ и выполняют ряд важных функций. К ним относятся: организация мембранных нанодоменов, передача сигналов, регуляция ионного и водного обмена, эндоцитоз, межклеточные

коммуникации и ответ клеток на атаку патогенов (Zhao et al., 2011; Gauthier-Rouvière et al., 2020; Kwiatkowska et al., 2020; Li et al., 2023).

Физиологическая роль везикулярного транспорта у растений в условиях солевого стресса, по-видимому, не ограничивается регуляцией содержания мембранных белков, вовлеченных в Na^+ -гомеостаз. Имеется ряд косвенных данных, свидетельствующих в пользу участия везикулярного транспорта непосредственно в переносе ионов (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).

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 научной конференции 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В разделе приводятся имеющиеся в литературе сведения о везикулярном транспорте у растений, его различных путях, типах эндосом, их биогенезе и транспорте белков везикулами. Анализируются данные о белках мембранных нанодоменов – флотиллинах, структуре и функциях H^+ -АТФазы Р-типа растений, ее регуляции, участии во вторичных транспортах, росте растений и адаптации к абиотическим стрессам. Приводятся сведения о переносе ионов везикулами, свойствах флуоресцентных маркеров и ингибиторах везикулярного транспорта, использовавшихся в работе.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования являлись растения *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (экотип Columbia-0) дикого типа (ДТ) и мутанты, созданные на его основе: (1) мутант с повышенной экспрессией гена *Flot1 – Atflot1oe* (CS444812GK) и (2) нокаут-мутант по этому гену – *Atflot1ko* (SALK_205125C), а также суспензионная культура клеток *A. thaliana* (Col-0), полученная из каллуса листьев растений ДТ.

Растения выращивали в факторостатной камере, в условиях водной и почвенной культуры, а также на агаризованной питательной среде (проростки). Полученная ранее (Фоменков и др., 2014) суспензионная культура клеток *A. thaliana* была предоставлена авторами данной статьи.

ДНК и РНК выделяли согласно (Murray, Thompson, 1980) и (Yuorieva et al., 2018), соответственно. Синтез кДНК осуществляли с помощью MMLV / MINT-ревертазы (Евроген, Россия) по инструкции производителя.

Гомозиготные формы мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko* отбирали посредством ПЦР-анализа, используя геномную ДНК и праймеры на мутантный аллель и аллель ДТ, с помощью амплификатора «БИС» (Россия).

Количественную ОТ-ПЦР (кОТ-ПЦР) в реальном времени проводили на матрице кДНК, используя амплификатор LightCycler 96 (Roche, Швейцария).

Подбор праймеров для определения гомозиготных форм мутантов и проведения кОТ-ПЦР в реальном времени осуществляли с помощью программ Oligo 7 и Light Cycler Probe Design Software 2.0 (Roche, Швейцария), соответственно.

Вестерн-блот анализ мембранных фракций, обогащенных ПМ, проводили, разделяя белки в 10% SDS-PAGE согласно Лэммли (Laemmli et. al., 1970) и

переносили их на нитроцеллюлозную мембрану для иммунодетекции с поликлональными антителами к H⁺-АТФазе Р-типа (Agriser, Швеция).

Общее содержание белка в мембранных фракциях определяли с помощью бицинхонинового метода (BCA Protein Assay, Pierce), согласно рекомендациям производителя.

Получение мембранных фракций, обогащенных ПМ, проводили с помощью двухфазной полимерной системы полиэтиленгликоль / декстран (Larsson et al., 1987).

Определение содержания ионов K⁺ и Na⁺ в органах растений проводили путем приготовления водных экстрактов из растительного материала и измерения в них концентраций данных ионов с помощью пламенного фотометра (ФПА-2-01 ОАО ЗОМЗ, Россия).

Ультраструктуру клеток корней интактных проростков и суспензионной культуры исследовали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы приготавливали стандартным способом (Балнокин др., 2007) и просматривали в электронных микроскопах JEM-1400 (JEOL Ltd., Япония) или Libra 120 (Carl Zeiss, Германия).

Эндоцитозную активность клеток корней проростков ДТ и мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko* определяли по интенсивности поглощения флуоресцентного зонда FM4-64 с помощью эпи-флуоресцентного микроскопа AxioImager Z2 (Carl Zeiss, Германия).

Ионы Na⁺ в эндоцитозных везикулах клеток суспензионной культуры *A. thaliana* выявляли, определяя внутриклеточную ко-локализацию флуоресценции FM 4-64 и зонда на ионы Na⁺ в непроникающей через мембраны форме ANG-2 TMA с помощью эпи-флуоресцентного микроскопа AxioImager Z2 (Carl Zeiss, Германия) и конфокального лазерного микроскопа LS-710-NLO.

Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа, используя программу Microsoft Excel 2010. Полученные данные представлены как средние значения и их стандартные ошибки (n ≥ 3). Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при разных значениях вероятности: p ≤ 0.05 - (*), p ≤ 0.01 - (**), p ≤ 0.001 - (***) . Количественную оценку ко-локализации двух зондов в клетках проводили с помощью графиков рассеяния и расчетов коэффициентов корреляции Пирсона и коэффициентов ко-локализации Мандерса (Manders et al., 1993; Zinchuk et al., 2007).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Молекулярная характеристика инсерционных мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko*. Для выявления участия белка мембранных нанодоменов Flot1 в

везикулярном транспорте H^+ -АТФазы Р-типа были использованы гомозиготные мутантные растения *A. thaliana* по гену *AtFlot1* (GK-467G04): (1) *Atflot1oe* (CS444812GK) и (2) *Atflot1ko* (SALK_205125C), охарактеризованные нами (Khalilova et al., 2020; Khalilova et al., 2023). Вставка Т-ДНК у первого мутанта находилась в промоторе гена *AtFlot1*, у второго – в первом экзоне (рис. 1). Первый мутант характеризовался повышенной экспрессией гена *AtFlot1* в корнях, у второго его экспрессия была подавлена (нокаут-мутация) (рис. 2а, б). Добавление NaCl приводило к существенной стимуляции транскрипции *AtFlot1* в корнях растений ДТ и *Atflot1oe*. Экспрессия гена у мутанта *Atflot1oe* была заметно больше, чем у ДТ (рис. 2 а). У *Atflot1oe* в листьях экспрессия *AtFlot1* под действием NaCl практически не изменялась (рис. 2 а).

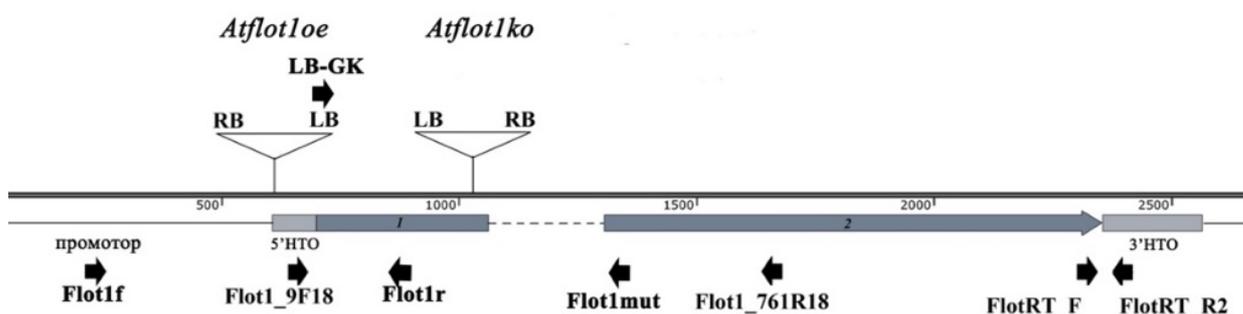


Рис. 1. Структура аллеля гена *AtFlot1* и расположение вставок Т-ДНК у мутантов *Atflot1oe* и *Atflot1ko*. Темный прямоугольник и темная стрелка – 1-ый и 2-ой экзоны соответственно; серые прямоугольники – нетранслируемые области; пунктирная линия – интрон; треугольники – вставки Т-ДНК; черные стрелки в нижней строке – положение праймеров.

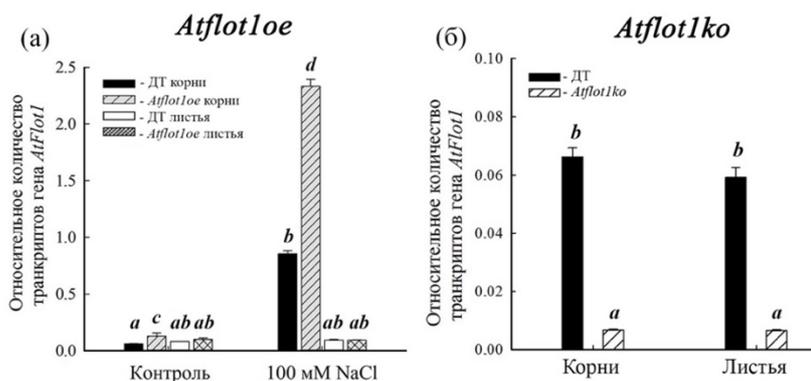


Рис. 2. Экспрессия гена *AtFlot1* в корнях и листьях 45-дневных растений мутантных линий *AtFlot1oe* (а), *AtFlot1ko* (б) и ДТ. Растения выращивали на ПС $1/2$ Хогланда. Шок – 100 мМ NaCl, контроль – без NaCl.

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

У растений обеих мутантных линий и ДТ присутствие NaCl в среде подавляло рост и эффект 100 мМ NaCl был больше, чем 50 мМ NaCl. Мутация, вызывающая повышенную экспрессию гена *Flot1* (*AtFlot1oe*), стимулировала рост, биомасса органов растений была больше, чем у ДТ как в контроле, так и в условиях засоления (рис. 3 а, б). Не было статистически достоверных различий в биомассе органов у нокаут-мутанта (*AtFlot1ko*) и дикого типа (графики для *AtFlot1ko* приведены в диссертации). И NaCl, и обе мутации практически не влияли на содержание воды в

органах (рис. 3 в, г). Исследование ионного статуса растений трех линий показало, что добавление NaCl приводит к уменьшению содержания K^+ и к увеличению содержания Na^+ в органах растений ДТ и обоих мутантов. Мутация *AtFlotloe* ослабляла эффект NaCl. По мере повышения концентрации NaCl в среде не наблюдалось такого сильного повышения содержания Na^+ и снижения содержания K^+ в органах, как у ДТ (рис. 3 д, е, ж, з). Практически не наблюдалось различий в содержании K^+ и Na^+ в органах нокаут-мутанта и ДТ.

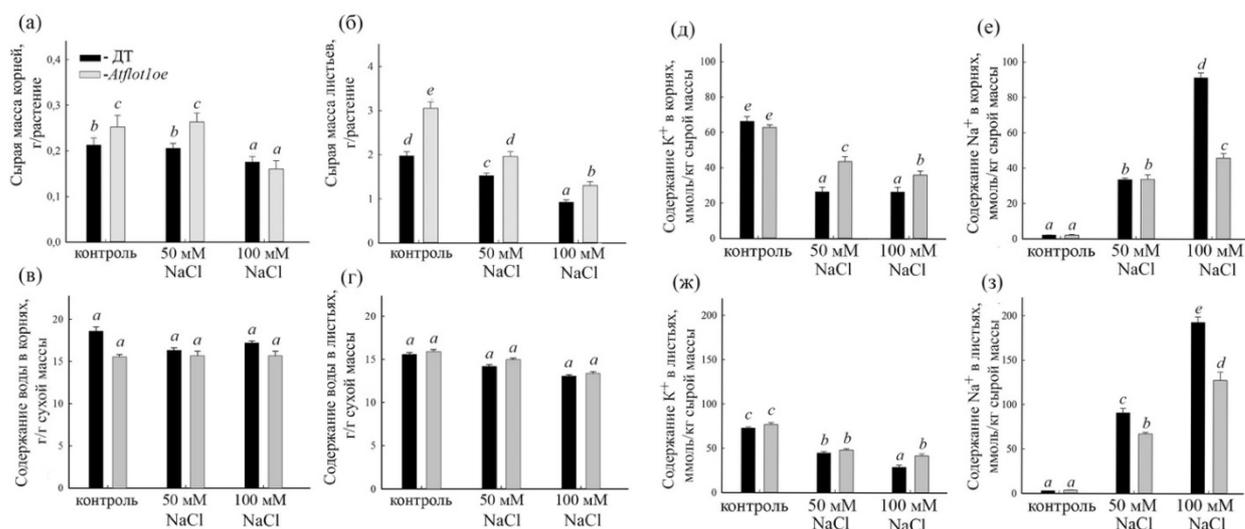


Рис. 3. Сырая масса (а, б), содержание K^+ (д, ж), Na^+ (е, з) и воды (в, г) в органах мутанта *AtFlotloe* и растений ДТ в условиях засоления. Растения выращены при концентрациях NaCl в питательной среде ½ Хогланда (ПС) 0 (контроль), 50 и 100 мМ.

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

С помощью иммуноблоттинга было исследовано относительное содержание H^+ -АТФазы в ПМ, выделенной из органов ДТ и двух мутантов, в присутствии и отсутствии (контроль) NaCl в среде. H^+ -АТФаза Р-типа была выбрана как мембранный белок, играющий ключевую роль в ионном гомеостатировании, особенно в условиях засоления. H^+ -АТФаза Р-типа на блотах была представлена в виде двух иммунореактивных полос с молекулярными массами, близкими по значению 100 и 115 кДа (рис. 4 а), что отражает взаимодействие антител с основными изоформами H^+ -АТФазы. Как мутации, так и присутствие NaCl влияли на содержание H^+ -АТФазы в плазмалемме (ПМ).

В отсутствие соли обе мутации приводили к увеличению содержания H^+ -АТФазы в ПМ клеток корней (рис. 4 в). У ДТ также наблюдалось увеличение содержания фермента под действием NaCl. Возрастание содержания H^+ -АТФазы, наблюдавшееся в контроле у обоих мутантов, в присутствии соли устранялось. Подобные эффекты нокаут-мутации и соли наблюдались в листьях (рис. 4 г).

Влияние мутаций *Atflot1oe*, *Atflot1ko* и солевого стресса на содержание транскриптов генов H^+ -АТФазы Р-типа *АНА1* и *АНА2* 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 методом КОТ-ПЦР была исследована экспрессия генов двух изоформ H^+ -АТФазы, *АНА1* (At2g18960) и *АНА2* (At4g30190) (рис. 5) (Khalilova et al., 2023). Гены этих изоформ H^+ -АТФазы, по сравнению с другими изоформами, характеризуются наибольшей транскрипционной активностью. Обе мутации практически не влияли на экспрессию *АНА1* и *АНА2*, как в условиях засоления, так и в отсутствие соли. Изменения в содержании H^+ -АТФазы в плазмалемме, вызванные мутациями и NaCl, вследствие этого, наиболее вероятно, связаны с везикулярным транспортом.

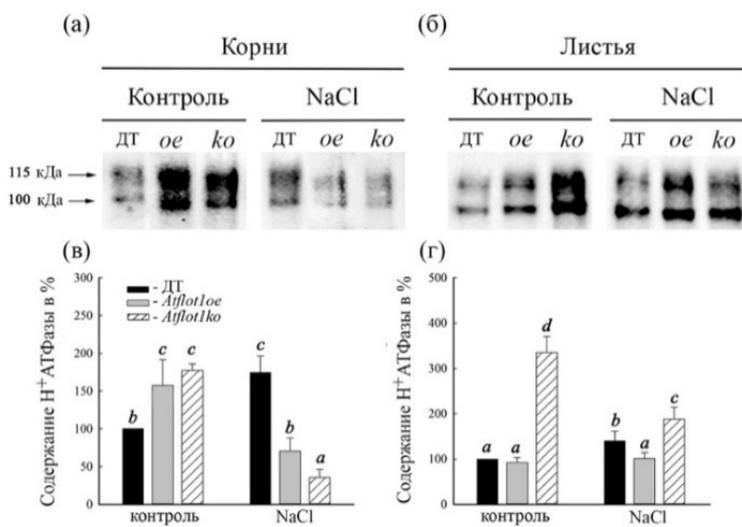
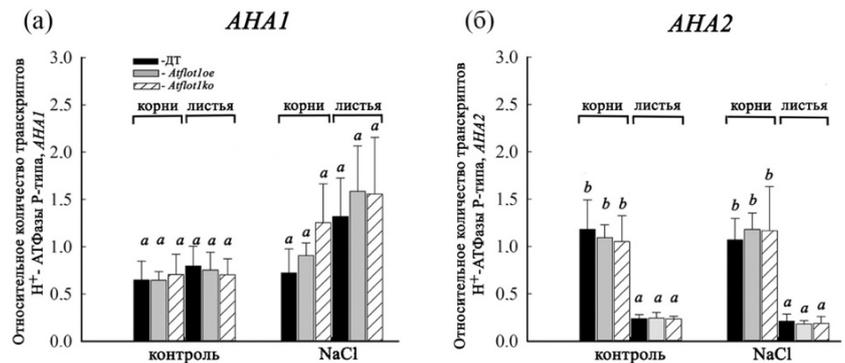


Рис. 4. Иммуноблоттинг мембранных препаратов из корней и листьев мутантов *Atflot1oe* (*oe*), *Atflot1ko* (*ko*) и растений ДТ в контрольных условиях и в условиях солевого шока (100 мМ NaCl). Блоты, полученные для корней (а) и листьев (б); относительное содержание изоформ H^+ -АТФазы в ПМ клеток корней (в) и листьев (г). За 100% принято значение ДТ в контроле.

Рис. 5. Относительное содержание транскриптов генов *АНА1* (а) и *АНА2* (б) в корнях и листьях растений *A. thaliana* трех линий, в контрольных условиях и в условиях солевого шока (100 мМ NaCl).



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

Для определения эндоцитозной активности в клетках мутантов и растений ДТ и влияния на них солевого шока была исследована динамика поглощения флуоресцентного маркера эндоцитозных структур FM4-64 клетками корней 5-дневных проростков. Известно, что гидрофобные молекулы FM4-64 поглощаются клетками за счет связывания с липидами ПМ и последующей интернализации в

составе эндоцитозных везикул (Volte et al., 2004). Проростки ДТ, *Atflot1oe* и *Atflot1ko* в контрольных условиях поглощали FM4-64 практически с одинаковой скоростью (рис. 6 а). Солевой шок заметно увеличил скорость интернализации FM4-64 у мутанта *Atflot1oe* (рис. 6 б), что, по-видимому, связано с индукцией флотиллин-зависимого эндоцитозного пути в дополнение к путям, имевшим место в отсутствие соли.

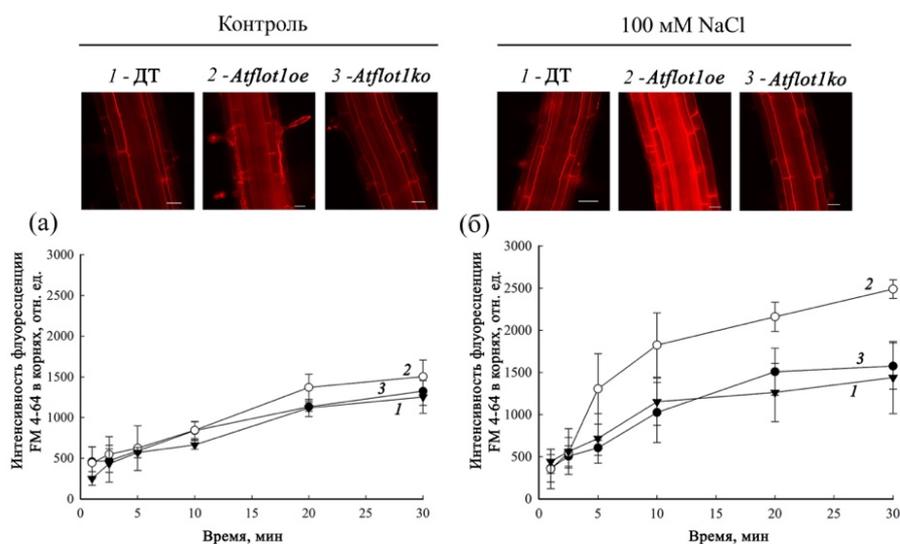


Рис. 6. Динамика поглощения эндоцитозного зонда FM4-64 корнями проростков *A. thaliana*. Проростки были инкубированы в среде $\frac{1}{2}$ Мурасиге-Скуга (МС), содержащей 2 мкМ FM4-64, в контрольных условиях (а) и в

условиях солевого шока (100 мМ NaCl) (б). 1 – ДТ, 2 – *Atflot1oe*, 3 – *Atflot1ko*. Цветные изображения показывают интенсивность FM4-64 в клетках корня через 30 минут инкубации. Масштаб – 20 мкм.

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

Чтобы получить сведения о влиянии мутаций и NaCl на ВТ, с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), была исследована ультраструктура клеток корня *A. thaliana* ДТ и двух мутантов, *Atflot1oe* и *Atflot1ko*, в контрольных условиях и в условиях засоления (рис. 7). Был выполнен подсчет количества комплексов Гольджи (КГ), мультивезикулярных тел (МВТ), парамуральных тел (ПМТ) и производных парамуральных тел (ППМТ) в расчете на единицу площади среза (рис. 7 а, б; рис. 8 б, в).

У ДТ NaCl активировал везикуляцию и вакуолизацию цитоплазмы, наблюдалось набухание цистерн эндоплазматического ретикулула (ЭР) и их фрагментация, микровакуоли сливались в более крупные структуры. Под действием соли становилось больше КГ, больше отпочковывалось везикул от секреторного полюса КГ и больше формировалось ранних (РЭ) и поздних (ПЭ) эндосом, или везикул *транс*-Гольджи сети (ТГС) и МТВ, соответственно (рис. 7). Часто наблюдалось слияние МВТ с ПМ или тонопластом. К похожему эффекту привела мутация *Atflot1oe*, в цитоплазме накапливались везикулы и МВ, увеличивалось содержание КГ и МВТ. Мутация оказала более сильное действие, чем засоление, а эффекты этих двух факторов суммировались. У мутанта *Atflot1oe* наблюдалось

снижение числа диктиосом в комплексах Гольджи, особенно заметное в условиях засоления, указывая на активирование биогенеза комплексов Гольджи. У *Atflot1ko* и ДТ в контроле содержание КГ практически не различалось, тогда как содержание МВТ у первого было заметно ниже, чем у второго. В присутствии NaCl нокаут-мутация привела к существенному снижению содержания КГ и МВТ (рис. 7).

Исследование ультраструктуры ДТ, *Atflot1oe* и *Atflot1ko* выявило в клетках корня трех линий парамуральные тела (ПМТ) – инвагинации в вакуоль сразу двух мембран – ПМ и тонопласта (Wang et al., 2005; An et al., 2007) (рис. 8 а), что, по-видимому, представляет собой особый тип эндоцитоза. Отделяясь в вакуоль, ПМТ образуют в ней двумембранные структуры (производные парамуральных тел – ППМТ) (рис. 8 а), которые в дальнейшем подвергаются деградации (рис. 8 а). Можно предположить, что они играют важную роль в переносе материала цитоплазмы и ПМ в вакуоль. Исследование частот встречаемости ПМТ и ППМТ показало, что засоление и мутация с повышенной экспрессией гена *Flot1* ускоряют биогенез таких структур (рис. 8 б, в).

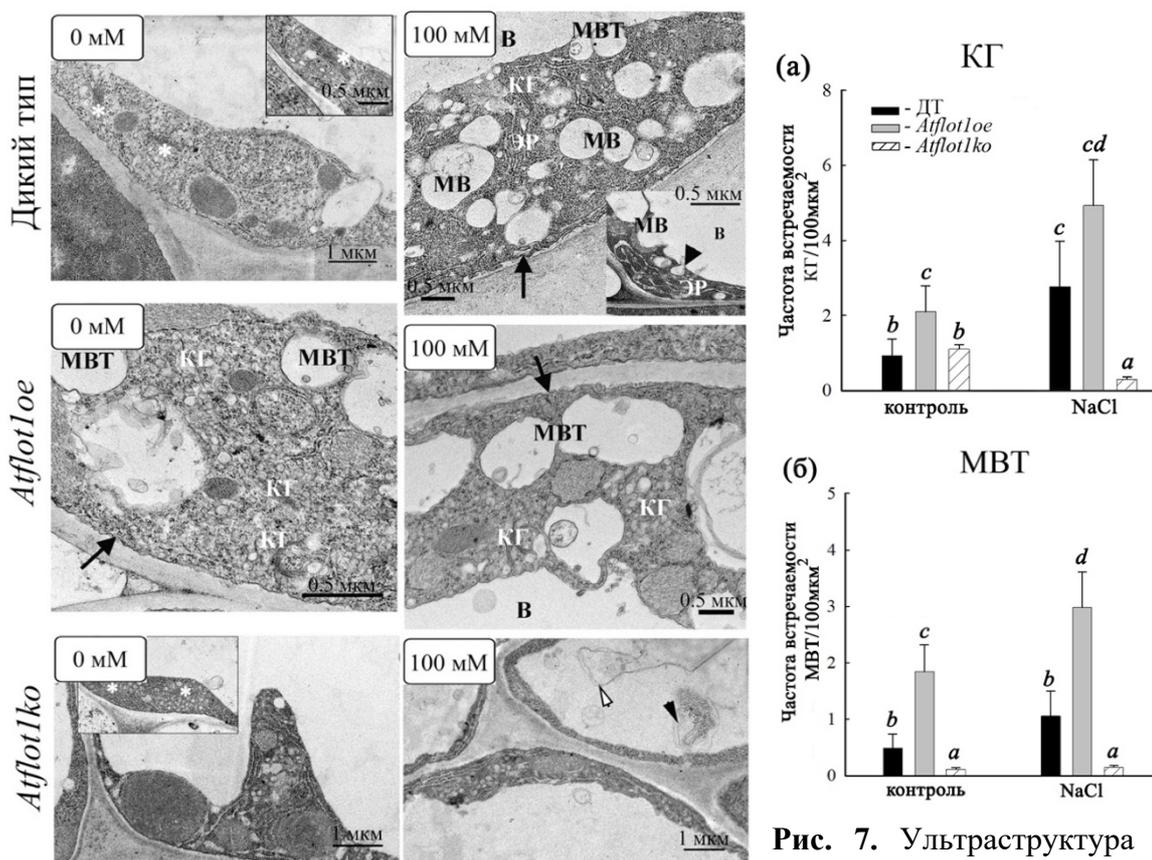


Рис. 7. Ультраструктура клеток корней и частота встречаемости

комплексов Гольджи (КГ) (а) и поздних эндосом / мультивезикулярных тел (ПЭ/МВТ) (б) (количество/100 мкм² среза) в клетках корней проростков ДТ, *Atflot1oe*, *Atflot1ko* в контрольных условиях и в условиях засоления (100 мМ). МВ – микровакуоли, В – вакуоль, ЭР – эндоплазматический ретикулум, черные стрелки – ПМ, черные треугольники – структуры, сливающиеся с тонопластом.

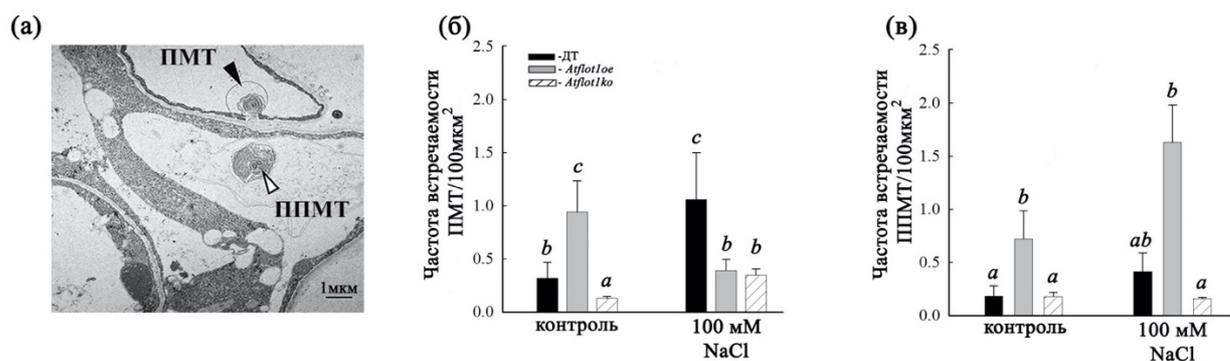


Рис. 8. Частота встречаемости ПМТ (а) и ППМТ (б) (количество/100 мкм² среза) в клетках корней проростков ДТ, *Atflot1oe* и *Atflot1ko*, в контрольных условиях и в условиях засоления (100 мМ).

Обсуждение результатов, представленных в разделе 1.

Эффекты двух мутаций и NaCl на эндосомальную систему и содержание H⁺-АТФазы в ПМ суммированы в табл. 1.

| | 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

Табл. 1. Влияние мутаций *Atflot1oe*, *Atflot1ko* и NaCl на везикулярный транспорт и относительное содержание H⁺-АТФазы в ПМ *A. thaliana*.

Полученные результаты находят объяснение в рамках представлений о цикличности везикулярного транспорта H⁺-АТФазы и вовлечении Flot1 в эти пути. На их основе сформулирована гипотеза (Khalilova et al., 2023) о перестройке путей везикулярного транспорта H⁺-АТФазы под действием этих факторов (рис. 9). Содержание в ПМ белка, например H⁺-АТФазы, определяется балансом экзоцитозного, эндоцитозного и вакуолярного путей везикулярного транспорта (4). Предполагаемый избыток Flot1 в клетках мутанта *Atflot1oe* приводит в контрольных условиях к стимуляции МВТ/ПЭ-опосредованного экзоцитозного пути (4), смещению баланса в пользу экзоцитоза и к увеличению содержания H⁺-АТФазы в ПМ. В условиях солевого шока у этого мутанта активируется эндоцитоз (пути 3 и 6, рис. 9) и возможно подавляется экзоцитозный путь (4) на стадии слияния МВТ с ПМ. Оба фактора приводят к снижению содержания H⁺-АТФазы в ПМ.

У *Atflot1ko* в контрольных условиях происходит ингибирование превращения РЭ в МВТ/ПЭ и подавление экзоцитозного пути 4 (рис. 9), что может быть следствием предполагаемого отсутствия белка Flot1. Однако, при этом стимулируются альтернативные пути экзоцитоза от КГ и ТГС к ПМ (1, 2) в обход образования ПЭ. Как и у *Atflot1oe*, в контрольных условия происходит смещение баланса в пользу экзоцитоза и возрастание содержания H^+ -АТФазы в ПМ. Солевой шок у нокаут-мутанта ингибирует образование КГ и РЭ из ЭПР, что может указывать на вовлечение белка Flot1 в экзоцитоз на стадии формирования комплексов Гольджи. В этих условиях подавляются как МВТ-опосредованные (4, 5), так и альтернативные (1, 2) экзоцитозные пути, что приводит к снижению содержания H^+ -АТФазы в ПМ (рис. 9). Наличие путей переноса белков транспортными везикулами, минуя стадию образования МВТ, у *A. thaliana* показано в ряде работ (Contento, Bassham, 2012; Wang, 2018; Zhang et al., 2019; Hu et al., 2020).

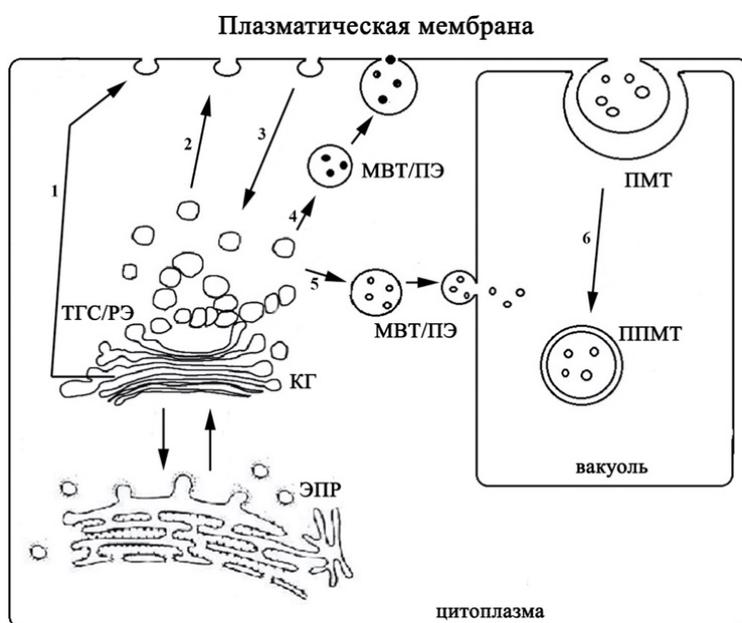


Рис. 9. Гипотетическая схема, описывающая перестройку секреторных путей у нокаут-мутанта *Atflot1ko* и стимуляцию пути из ПМ в вакуоль через биогенез ПМТ у мутанта *Atflot1oe* с повышенной экспрессией Flot1 в корне. Пути везикулярного транспорта в клетках *A. thaliana*: 1, 2, 4 – экзоцитоз, 3, 6 – эндоцитоз, 5 – вакуолярный путь. Показаны предполагаемые альтернативные пути экзоцитоза у нокаут-мутанта (1, 2) в обход образования МВТ. ЭПР – эндоплазматический

ретикулум, ТГС/РЭ – транс-Гольджи сеть/ранние эндосомы, ВТ/ПЭ – мультивезикулярные тела/поздние эндосомы, ПМТ – парамуральные тела, ППМТ – производные парамуральных тел.

Таким образом, подавление МВТ-опосредованного экзоцитозного пути в условиях засоления происходит у обоих мутантов, однако на разных стадиях – стадии слияния МВТ с ПМ у *Atflot1oe* и стадии формирования комплексов Гольджи у *Atflot1ko*. Можно заключить с большой вероятностью, что белок Flot1, локализованный в мембранных нанодоменах вовлечен как в экзоцитозные, так и эндоцитозные пути везикулярного транспорта H^+ -АТФазы, и участвует, согласно сложившимся представлениям, в создании платформ для встраивания белков, в том числе H^+ -АТФазы, в ПМ. Роль флотиллинов1, вероятно, заключается во влиянии на другие белки посредством белок-белковых взаимодействий (Ma et al., 2022; Li et al., 2023). Обнаруженная нами у *Atflot1oe* стимуляция эндоцитоза в условиях солевого шока согласуется с активированием флотиллин-зависимого эндоцитоза хлористым

натрием, наблюдавшимся у *A. thaliana* ранее (Li et al., 2011; Li et al., 2012; Nao et al., 2014), и предполагает участие флотиллин-зависимого эндоцитоза в переносе H⁺-АТФазы ПМ. Следует отметить, что у *Atflot1oe* в условиях засоления также активировался биогенез ПМТ и их превращение в ППМТ (путь б). Поскольку пассивное поступление Na⁺ в клетки зависит от электрического потенциала ПМ, главным генератором которого является H⁺-АТФаза (Haruta et al., 2015; Li et al., 2022), то изменения соотношения экзоцитоз/эндоцитоз для этого белка могут быть способом быстрой регуляции поступления Na⁺ в клетки при повышении концентрации NaCl в среде и одним из путей вовлечения флотиллинов в механизмы солеустойчивости, прежде всего в ионный и водный обмены. Их участие 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; Namaji et al., 2009; Ebine et al., 2011; Li et al., 2011; Baral et al., 2015; Sergienko et al., 2022). Хотя флотиллины вовлечены в механизмы солеустойчивости растений, мы не обнаружили угнетения роста, а также нарушений Na⁺-, K⁺- гомеостаза у нокаут-мутанта *Atflot1ko* (данные приведены в диссертации). Это может быть связано с активацией альтернативных путей везикулярного транспорта, а также с выполнением функций Flot1 другими изоформами флотиллина. На важность AtFlot1 для везикулярного транспорта H⁺-АТФазы ПМ указывают стимуляция роста (рис. 3 а, б, в), повышенное содержания K⁺ и пониженное содержание Na⁺ при солевом стрессе у мутанта с повышенной экспрессией гена этого белка – *Atflot1oe* (рис. 3 д – з).

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

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

С помощью эпи-флуоресцентной микроскопии (Orlova et al., 2018; Orlova et al., 2019) был исследован ответ клеток суспензионной культуры *A. thaliana* на солевой шок (100 mM NaCl). Сначала при +4°C плазмалемму окрашивали эндоцитозным зондом FM 4-64, затем добавляли NaCl вместе с индикатором ионов Na⁺ в непроникающей через мембраны форме ANG-2 TMA и суспензию переносили в тепло, индуцируя эндоцитоз. В ходе 2-х часовой инкубации оба зонда накапливались в клетках, и их ко-локализация возрастала. Флуоресцирующий комплекс ионов Na⁺ с Na⁺-индикатором ANG-2 TMA мог попасть внутрь клетки только с помощью эндоцитоза. Конфокальная лазерная микроскопия показала, что зонды были ко-локализованы в дискретных структурах размером до 5 мкм,

показывая, что происходило слияние образующихся исходно мелких эндоцитозных везикул, содержащих Na^+ , с микровакуолями (МВ) (рис. 10).

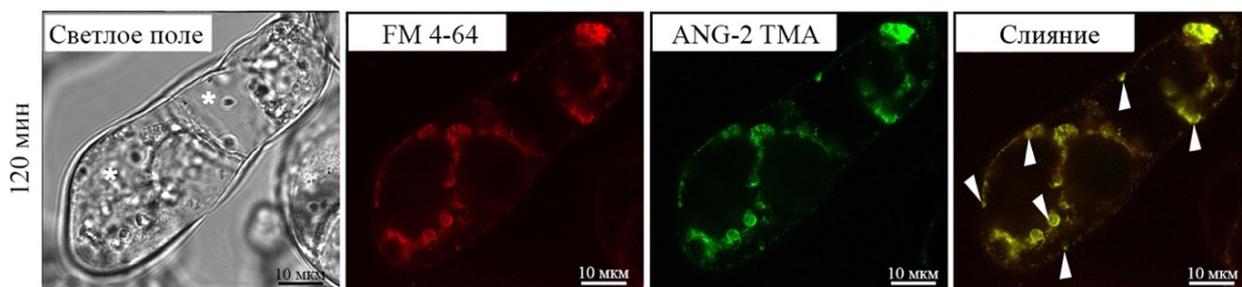


Рис. 10. Ко-локализация точечной флуоресценции эндоцитозного маркера FM 4-64 и индикатора ионов Na^+ ANG-2 TMA в клетках суспензионной культуры *A. thaliana*. Изображения получены с помощью конфокальной лазерной микроскопии через 2 часа после внесения NaCl в реакционную среду. Красный канал – FM 4-64, зеленый канал – ANG-2 TMA. Звездочками отмечены вакуоли, стрелками – дискретные мембранные структуры.

Количественная оценка ко-локализованной флуоресценции двух зондов в клетках суспензионной культуры *A. thaliana*

Количественная оценка структур, содержащих ко-локализованные зонды FM 4-64 и ANG-2 TMA, была проведена с помощью диаграмм рассеяния (scatter plots) в ходе 2-х часовой инкубации клеток с этими зондами и NaCl (рис. 11) (Orlova et al., 2018; Orlova et al., 2019). С течением времени количество пикселей увеличивалось в третьем квадранте диаграмм, указывая на возраставшую ко-локализацию двух зондов в клетках (рис. 11 а). Об этом же свидетельствует одновременный рост интенсивности флуоресценции двух зондов FM 4-64 и ANG-2 TMA (рис. 11 б), и коэффициента их корреляции (коэффициент Пирсона) (рис. 11 в). Динамика коэффициентов ко-локализации Мандерса, M1 и M2 (отношение флуоресценции ко-локализованного флуорофора к общей флуоресценции в данном канале), также соответствует модели, согласно которой комплекс ANG-2 TMA с Na^+ , проникал в клетки путем эндоцитоза. В целом полученный результат показывает, что Na^+ , наряду с ионными каналами и транспортерами, проникает в клетки путем эндоцитоза.

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

Исследование с помощью ТЭМ ультраструктуры клеток суспензионной культуры в динамике их ответа на солевой шок показало, что NaCl в среде усиливает вакуолизацию цитоплазмы, что происходит, вероятно, за счет стимуляции фрагментации ЭПР и отпочковывания везикул от КГ (рис. 12). Образующиеся микровакуоли сливаются в более крупные структуры, что подтверждается морфометрическими измерениями (представлено в диссертации). С течением времени возрастает как количество вакуолей, так и их размер (рис. 12).

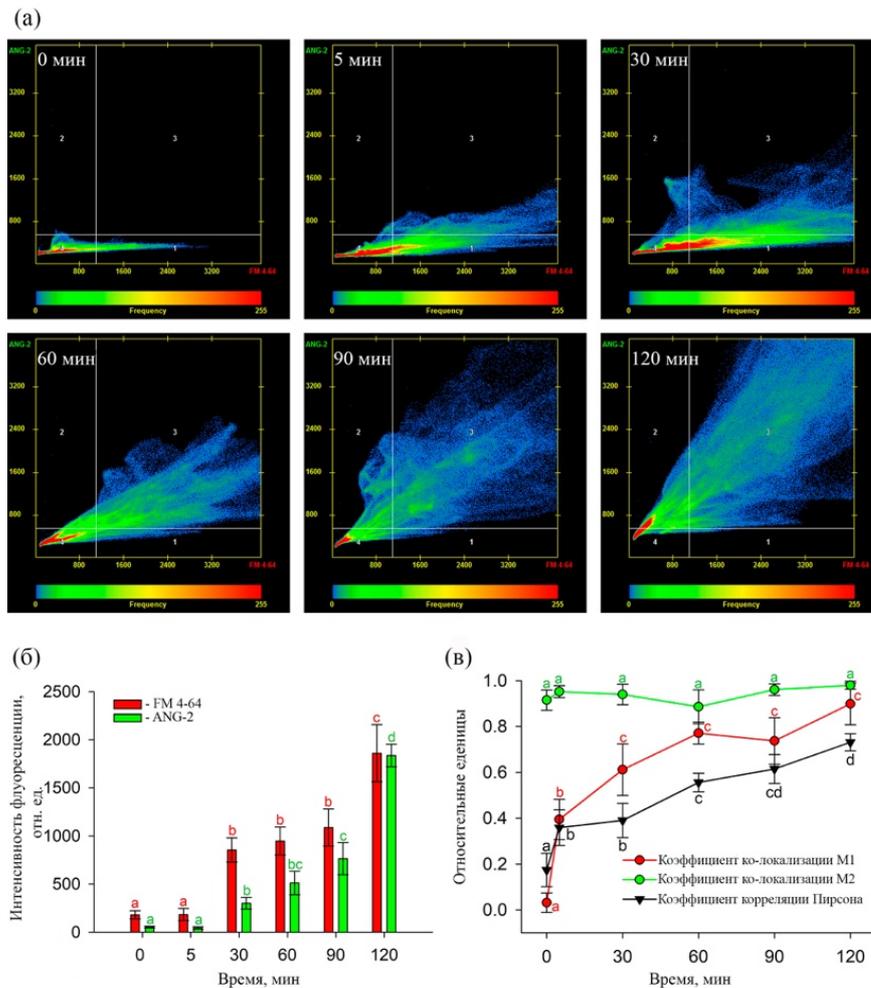
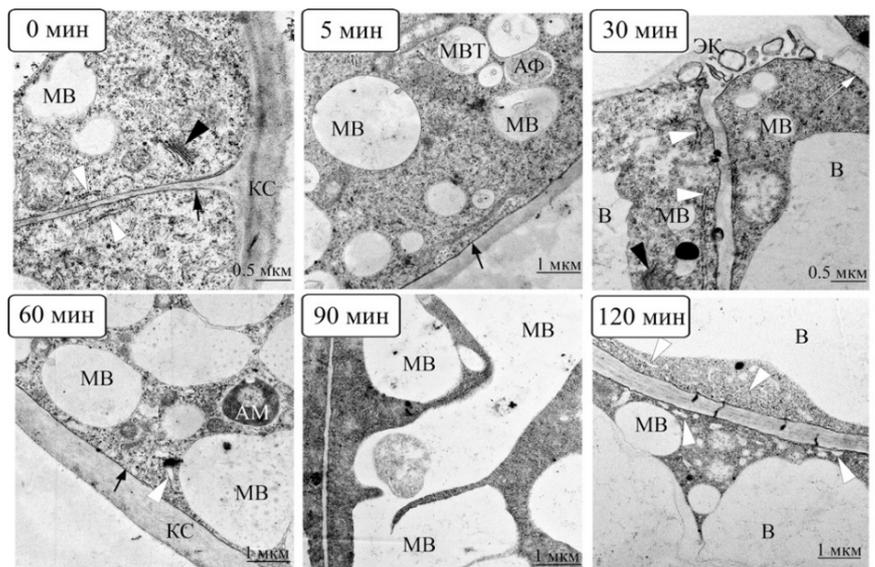


Рис. 11. Количественный анализ поглощения клетками эндоцитозного зонда FM 4-64 (красный канал – ось абсцисс) и Na^+ -индикатора ANG-2 TMA (зеленый канал – ось ординат) в динамике ответа клеток на NaCl шок; (а) – ко-локализация FM 4-64 и ANG-2 TMA в виде диаграмм рассеяния; линейки под графиками отражают частоту встречаемости пикселей с разной интенсивностью флуоресценции двух зондов; (б) – средняя интенсивность флуоресценции FM 4-64 и ANG-2 TMA в клетках; (в) – коэффициент корреляции Пирсона, коэффициенты ко-локализации Мандерса, M1 и M2, двух зондов.

Рис. 12. Трансмиссионная электронная микроскопия клеток суспензионной культуры *A. thaliana* в динамике их ответа на солевой шок. АФ – автофагосомы, КС – клеточная стенка, ЭК – экзосомы, МВ – микровакуоль, МВТ – мультивезикулярное тело, АМ – амилопласт, В – вакуоль; стрелки – плазматическая мембрана; черные треугольники – аппарат Гольджи (АГ); белые треугольники – эндоплазматический ретикулум.



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

Процессы везикуляции и вакуолизации цитоплазмы сопровождаются накоплением Na^+ в вакуолях. Об этом свидетельствуют результаты эксперимента с ингибиторами везикулярного транспорта. Икаругамицин (ИКА) – ингибитор клатрин-опосредованного эндоцитоза (Elkin et al., 2016) и брефелдин А (БФА) – ингибитор экзоцитозного пути на стадии формирования транс-Гольджи сети (ТГС/РЭ) (Emans et al., 2002; Ritzenthaler et al., 2002) не влияли на содержание Na^+ в клетках (рис. 13). В отличие от них, вортманнин – ингибитор фосфатидилинозитол-3- и фосфатидилинозитол-4-киназ, блокирующий слияние МВТ/ПЭ с вакуолями (Wang et al., 2009; Foissner et al., 2016), снижал содержание Na^+ в клетках (рис. 13). Таким образом, захваченные эндоцитозными везикулами ионы Na^+ депонируются в вакуолях, при этом клатрин-зависимый эндоцитоз и экзоцитозный путь не участвуют в этом процессе.

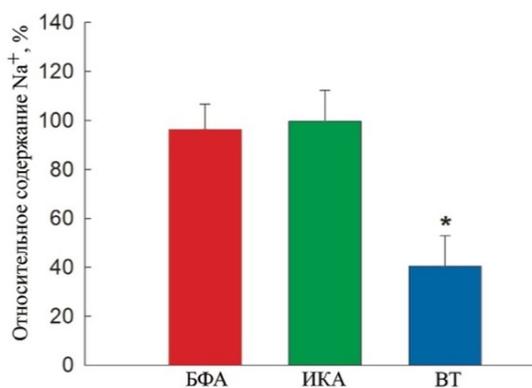


Рис. 13. Влияние ингибиторов везикулярного транспорта на внутриклеточное содержание Na^+ в клетках суспензионной культуры *A. thaliana* при солевом шоке. БФА – брефелдин А, ИКА – икаругамицин, ВТ – вортманнин. Значения даны в % по отношению к контролю (в отсутствие ингибиторов).

Обсуждение результатов, представленных в разделе 2.

Полученные в этом разделе результаты указывают на участие эндоцитоза в интернализации Na^+ клетками суспензионной культуры *A. thaliana* в условиях солевого стресса. Микровакуоли с ко-локализованными зондами, по-видимому, являются продуктами слияния более мелких мембранных компартментов, образованных первичными эндоцитозными инвагинациями. Диффузная ко-локализованная флуоресценция, вероятно, связана с этими мелкими компартментами. Точечное и фоновое распределение ко-локализованных флуорофоров согласуется с результатами, полученными с помощью электронной микроскопии. Наряду с МВ, размеры которых составляют 0.25 – 5 мкм, в цитоплазме наблюдались инвагинации ПМ и везикулы гораздо меньших размеров.

Снижение содержания Na^+ в клетках под действием вортманнина согласуется с данными об ингибировании вортманнином слияния МВТ/ПЭ с вакуолью (Wang et al., 2009; Foissner et al., 2016). Вортманнин, подавляя доставку Na^+ в вакуоли, тормозит поступление Na^+ в клетки. Отсутствие влияния ИКА на содержание Na^+ в клетках указывает на то, что клатрин-зависимый эндоцитоз скорее всего не участвует в поглощении Na^+ и свидетельствует в пользу вовлечения флотиллин-зависимого эндоцитоза в этот процесс. Также не влиял на содержание Na^+ в клетках

БФА – ингибитор экзоцитозного пути (рис. 18), показывая, что этот путь тоже не вовлечен в поглощение Na^+ .

NaCl известен как фактор, стимулирующий эндоцитоз (Mazel et al., 2004; Namaji et al., 2009; Baral et al., 2015a). Результаты, представленные в этом разделе, показывают, что введение NaCl в реакционную среду стимулирует везикуляцию и вакуолизацию цитоплазмы. Такое же действие NaCl мы наблюдали в клетках интактных корней *A. thaliana* (рис. 7, рис. 12), а также в клетках корня *Chenopodium album* (Ivanova et al., 2016). Поглощение ионов Na^+ эндоцитозными везикулами с их последующим слиянием с МВ может обеспечить прямой транспорт Na^+ в вакуоли что, 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.

Заключение

В работе рассматривалось участие везикулярного транспорта в ответе растений на солевой стресс в двух аспектах: (1) вовлечения везикулярного транспорта в NaCl -индуцированное ремоделирование белкового состава мембран, в частности, в изменения содержания H^+ -АТФазы Р-типа в плазматической мембране и (2) индукции солью транспорта ионов Na^+ непосредственно везикулами, не требующего участия ион-транспортирующих белков мембраны. Оба эти процесса вносят вклад в поддержание ионного гомеостаза. В первом случае может изменяться качественный и количественный состав мембранных белков, к которым относятся: ионные каналы и транспортеры, транспортные АТФазы, включая H^+ -АТФазу Р-типа, ответственную за генерацию протонного градиента на плазматической мембране и вторично-активные транспортные процессы. Полученные результаты показали, что везикулярный транспорт вовлечен в регуляцию содержания H^+ -АТФазы Р-типа в ПМ и свидетельствуют о вовлечении белка мембранных нанодоменов AtFlot1 в экзоцитозные и эндоцитозные пути переноса H^+ -АТФазы Р-типа везикулами. Согласно существующему в настоящее время представлению (Yu et al., 2020; Ma et al., 2022), флотиллины, являясь компонентами мембранных нанодоменов, создают платформу для встраивания и сортировки функционально-активных мембранных белков. Хотя флотиллины вовлечены во многие физиологические функции, в 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 флотиллинов.

Наряду с ремоделированием белкового состава мембран, в условиях засоления включаются также процессы переноса ионов Na^+ и, по-видимому, Cl^- , непосредственно везикулами. Полученные результаты указывают на «захват» ионов

натрия эндоцитозными везикулами, интернализацию Na^+ -содержащих везикул клетками и последующее слияние везикул с вакуолярными компартментами. Физиологическая роль этих процессов, по-видимому, состоит в предотвращении попадания токсичных ионов Na^+ в цитоплазму в условиях солевого стресса. Поступающие в клетки ионы натрия, заключенные в эндоцитозные везикулы, транспортируются в вакуоли, минуя цитоплазматический компартмент. Полученные результаты демонстрируют двойную роль везикулярного транспорта в условиях солевого стресса – ремоделирование белкового состава мембран и перенос ионов натрия везикулами. Каждый из этих процессов 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 [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 [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 [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 [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.) Heynh. // *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.