

**ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ БЕЛКА МЕМБРАННЫХ МИКРОДОМЕНОВ  
*ARABIDOPSIS THALIANA* Flot1 В РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА  
Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> АНТИПОРТЕРА *SOS1***

Л.А. Халилова<sup>1</sup>, О.В. Майорова<sup>1</sup>, Ю.В. Орлова<sup>1</sup>, И.В. Карпычев<sup>1</sup>, Н.А. Мясоедов<sup>1</sup>,  
О.И. Неделяева<sup>1</sup>, Л.Г. Попова<sup>1</sup>, Ю.В. Балнокин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия, [lhililova@mail.ru](mailto:lhililova@mail.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, Россия

**Аннотация.** Исследование содержания мРНК в органах методом количественной ОТ-ПЦР продемонстрировало у инсерционного мутанта *A. thaliana flot1* (GK-467G04) повышенную транскрипцию *AtFlot1* и *AtSOS1* по сравнению с ДТ. Изменения в транскрипции этих генов сопровождались увеличением массы органов, снижением содержания в них Na<sup>+</sup>, а также активированием образования пост-Гольджи везикул. Предполагается, что *AtFlot1* регулирует экспрессию *AtSOS1* и доставку последнего в плазмалемму посредством экзоцитоза.

**Ключевые слова:** *Arabidopsis thaliana*, мутант *flot1*, фенотип, *AtSOS1*, аппарат Гольджи  
**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-790-794

В плазмалемме (ПМ) клеток растений имеются области, названные мембранными микродоменами (МД), которые отличаются от своего окружения по своим физическим свойствам и химическому составу. МД обогащены стеринами, сфинголипидами, насыщенными фосфолипидами и содержат глюкозилфосфатидил инозитол (GPI)-заякоренные и интегральные белки [Demir et al., 2013]. Помимо адресования (targeting) белков при экзоцитозе и эндоцитозе МД вовлечены в мембранный транспорт и сигнальную трансдукцию [Ikonen, 2001]. Важным компонентом МД являются GPI-заякоренные белки, флотиллины, которые относятся к большому суперсемейству белков, выполняют различные функции и обнаруживаются у всех эукариот. Геном *Arabidopsis thaliana* содержит три кодирующие области гомологов флотиллинов (*At5g25250*, *At5g25260* и *At5g64870*), названных, соответственно, *AtFlot1*, *AtFlot2* и *AtFlot3* [Danek et al., 2016]. Транскрипция *AtFlot1* и *AtFlot2* происходит преимущественно в побегах, тогда как *AtFlot3* – в цветках и плодах. Флотиллины обнаруживаются не только в ПМ, но также в эндосомах и других везикулярных компартментах клетки [Liu et al., 2005].

Цель настоящей работы состояла в исследовании роли *AtFlot1* в регуляции транскрипции гена Na<sup>+</sup>-транспортирующего белка ПМ *AtSOS1* и опосредованно, через содержание *AtSOS1* в мембране – в поддержании Na<sup>+</sup> гомеостаза клеток. Для этого определяли уровень транскрипции генов *AtFlot1* и *AtSOS1* у мутанта *Atflot1* и его ДТ, а также исследовали мутантный фенотип (рост, содержание ионов Na<sup>+</sup> в органах, ультраструктуру клеток) в присутствии и в отсутствие 100 мМ NaCl в среде выращивания растений.

**Материалы и методы исследований.** Объект исследований: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (экотип Col-0) и его инсерционный мутант *Atflot1* (GK-467G04). Согласно информации, содержащейся на сайте ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)), вставка находится в промоторе гена. У похожего инсерционного мутанта *A. thaliana* по гену *AtFlot1* (также со вставкой в промоторе) наблюдался повышенный уровень транскрипции *AtFlot1* (Li et al., 2012). Растения выращивали в условиях водной культуры. Семена проращивали на

агаризованной питательной среде  $\frac{1}{2}$  Мурасиге-Скуга ( $\frac{1}{2}$ МС), дополнительно содержащей 1% сахарозу. 14-дневные проростки переносили на жидкий ПР ( $\frac{1}{2}$ МС), содержащий или не содержащий 100 мМ NaCl. Измерения массы органов, содержания в них  $\text{Na}^+$  и уровня транскриптов *AtFlot1* и *AtSOS1* проводили на растениях 45-дневного возраста.

**Количественное определение содержания транскриптов в органах.** кОТ-ПЦР использовали для анализа экспрессии генов *Atflot1* и *AtSOS1* в мутантных растениях и растениях ДТ с использованием *ACT2* в качестве референсного гена. Программа для амплификации была создана в соответствии с рекомендациями производителя прибора АНК-32 (Синтол) и инструкции к набору «Готовая Смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBRmix» (Евроген). Праймеры подбирали с использованием программы LightCycler Probe Design 2.0 (Roche). Относительный уровень представленности транскрипта (R) вычисляли с помощью метода  $C_t (2^{-\Delta\Delta C_t})$ .

**Определение содержания ионов в органах.** Высушенный при 90 °С материал измельчали, подвергали водной экстракции при 100 °С в течение 1 ч. Концентрацию  $\text{Na}^+$  в экстрактах органов измеряли с помощью пламенного фотометра ФПА-2-01 (Россия). Содержание ионов рассчитывали на сырой вес органов.

**Электронная микроскопия.** Для исследования ультраструктуры клеток корня использовали 4-дневные проростки, выращенные на агаризованной питательной среде  $\frac{1}{2}$  Мурасиге-Скуга ( $\frac{1}{2}$ MS), дополнительно содержащей 1% сахарозу, с добавлением или без добавления 100 мМ NaCl. Ультраструктуру клеток изучали с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Образцы подготавливали в соответствии со стандартной методикой [Балнокин и др., 2007].

**Результаты. Исследование экспрессии генов *AtFlot1* и *AtSOS1*.** Исследование экспрессии гена *AtFlot1* методом количественной ОТ-ПЦР показало, что для мутанта *flot1* в целом характерен более высокий уровень транскрипции этого гена, чем у растений ДТ. Повышенный уровень транскрипции был обнаружен в корнях при отсутствии NaCl в среде, а в листьях, как при отсутствии NaCl в ПР, так и в условиях засоления.

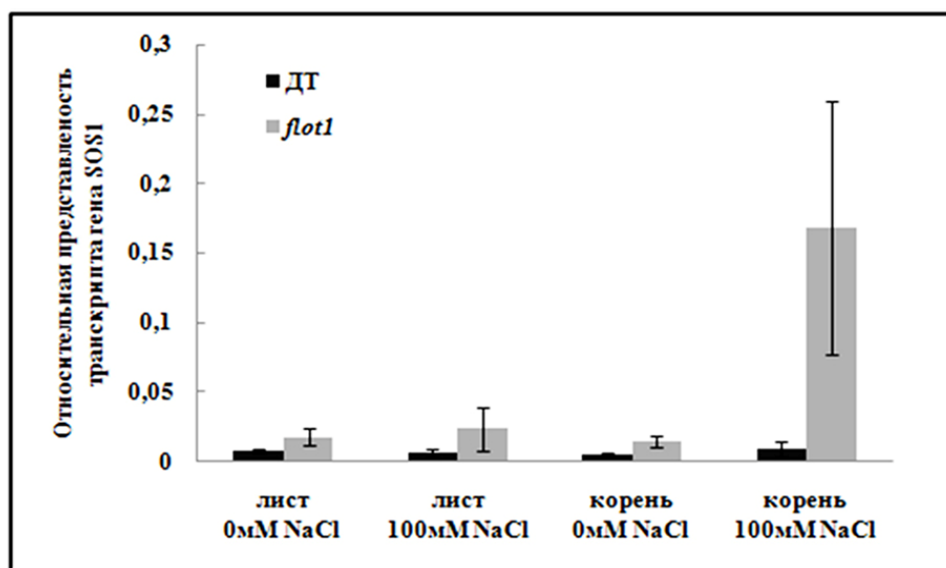


Рис. 1. Относительная представленность транскриптов гена *AtSOS1* у мутанта *Atflot1* и ДТ *A. thaliana* при выращивании растений в среде, содержащей 0 или 100 мМ NaCl. Данные представлены как средние значения и их стандартные ошибки.

Наряду с изменениями в уровне транскрипции *AtFlot1* у мутанта наблюдалось значительно более высокое содержание транскриптов гена  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортера ПМ *AtSOS1*. В результате мутации *flot1* содержание транскриптов *AtSOS1* возросло, как в корнях, так и в листьях, особенно заметно (в 19 раз) при выращивании растений на среде, содержащей 100 мМ NaCl.

**Рост и содержание ионов  $\text{Na}^+$  в органах мутанта *flot1* и растений ДТ *A. thaliana*.** Вызванные мутацией изменения в экспрессии генов *AtFlot1* и *AtSOS1* сопровождались изменениями в росте и ионном статусе растений. 100 мМ NaCl, внесенный в ПР, тормозил рост как корней, так и листьев *A. thaliana*. Подавление роста в присутствии соли наблюдалось и у мутанта, и у растений ДТ и было выражено в листьях в значительно большей степени, чем в корнях. Однако сравнение масс корней мутанта *flot1* и растений ДТ показало, что мутация в целом оказывает стимулирующее действие на рост *A. thaliana*. У мутанта в отсутствие соли рост корней был больше на 19%, а рост листьев – на 55 и 40% при 0 и 100 мМ NaCl в ПР, соответственно.

Содержание  $\text{Na}^+$  в корнях и листьях, как мутанта *flot1*, так и растений ДТ в условиях засоления многократно возрастало (рис. 1). Однако у мутанта содержание  $\text{Na}^+$  в органах при засолении было существенно ниже, чем у ДТ (на 50 и 37% в корнях и листьях, соответственно).

**Ультраструктура клеток корня мутанта *flot1* и растений дикого типа.** Электронно-микроскопическое исследование клеток корня растений *A. thaliana* ДТ, выращенных на ПР без NaCl, обнаружило типичную для растительной клетки ультраструктуру. Выращивание растений ДТ на среде, содержащей 100 мМ NaCl, привело к ряду изменений в ультраструктуре клеток корня. Эти изменения в основном затронули аппарат Гольджи (АГ) и пост-Гольджи структуры. В частности, активировался процесс отпочковывания везикул транс-Гольджи сети/ранних эндосом (ТГС/РЭ) от секреторного полюса АГ (рис. 2). Отпочковавшиеся везикулы накапливались в цитоплазме. Иногда они были прозрачными, но чаще содержали мембранный материал, что, по-видимому, указывает на превращение ТГС/РЭ в поздние эндосомы/мультивезикулярные тела (ПЭ/МВТ), которые затем, по-видимому, сливались с ПМ или тонопластом. Иногда наблюдалось гомотипическое слияние ТГС/РЭ с образованием микровакуолей (МВ) (рис. 2).

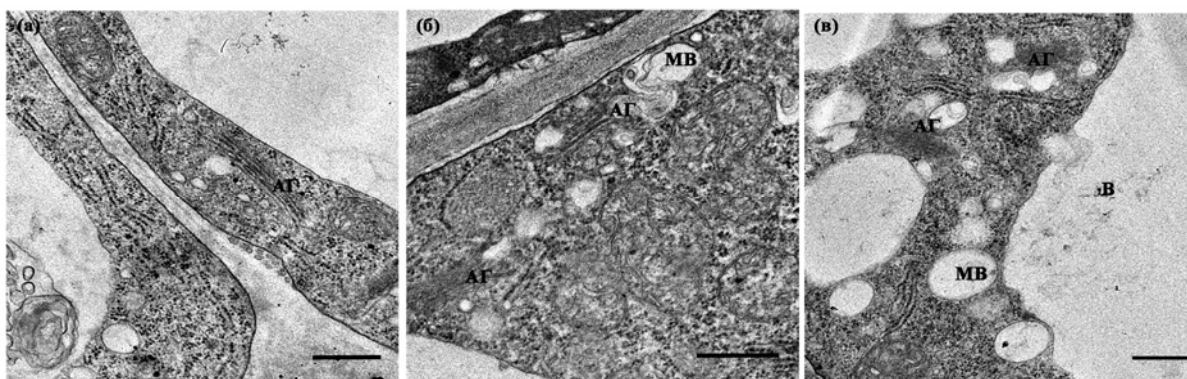
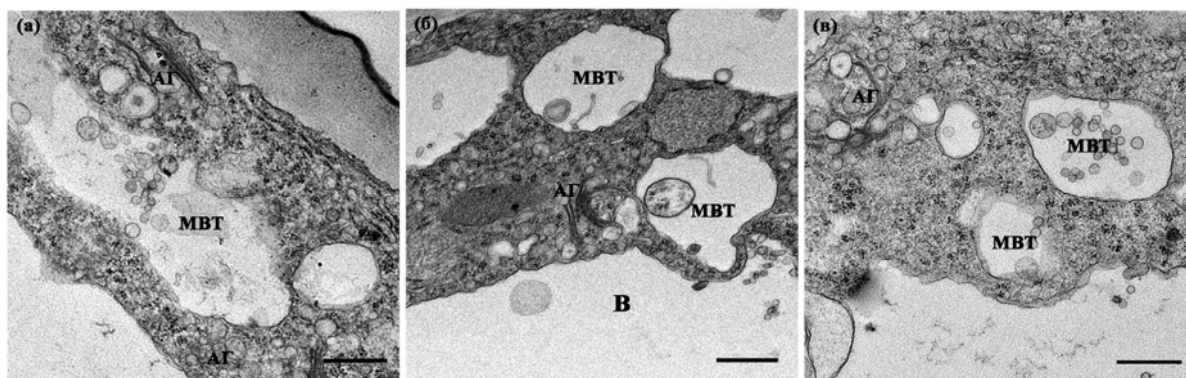


Рис. 2. Аппарат Гольджи в клетках корня растений дикого типа *A. thaliana*. а – контроль (3 мМ NaCl), б, в – 100 мМ NaCl. АГ – аппарат Гольджи, МВ – микровакуоль, В – вакуоль. Масштабный отрезок – 0,5 мкм.

Сравнение ультраструктуры клеток мутанта и растений ДТ показало, что мутация, как и условия засоления, привела к активированию процесса образования пост-Гольджи везикул. АГ у мутанта отпочковывал значительно больше везикул ТГС/РЭ и,

соответственно, образовывал значительно больше ПЭ/МВТ, чем у ДТ. Это наблюдалось как при отсутствии засоления, так и в присутствии 100 мМ NaCl в среде выращивания (рис. 3). Однако активирование образования пост-Гольджи везикул в результате мутации в условиях засоления было более заметным. Вызванные мутацией изменения в АГ проявлялись не только в активировании образования пост-Гольджи структур. У мутанта наблюдалось также снижение числа диктиосом в комплексе Гольджи и их деформация с образованием кольцеподобных структур, что было особенно заметно в условиях засоления (рис. 3). Такие изменения АГ могут свидетельствовать об ускоренном расходе материала АГ.



**Рис. 3.** Аппарат Гольджи в клетках корня мутанта *flot1 A. thaliana*. а – контроль (3 мМ NaCl), б, в – 100 мМ NaCl. АГ – аппарат Гольджи, В – вакуоль MBT – мультивезикулярное тело. Масштабный отрезок – 0,5 мкм.

**Закключение.** Измерение содержания мРНК в органах методом количественной ОТ-ПЦР продемонстрировало более высокий уровень транскрипции *AtFlot1* у мутанта *flot1*, чем у ДТ. Повышенное содержание белка *AtFlot1* в мембранных МД, являющихся «платформой» для встраивания в мембрану белков, по-видимому, является причиной повышенного уровня экспрессии *AtSOS1*,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  антипортера ПМ, а также активирования доставки этого белка к ПМ посредством экзоцитоза. Об активировании экзоцитоза клеток корня у мутанта свидетельствуют данные электронно-микроскопического исследования, продемонстрировавшего образование большого количества пост-Гольджи структур. С повышенной экспрессией *AtSOS1* согласуется более низкое содержание  $\text{Na}^+$  в органах мутанта в условиях засоления и его ускоренный рост по сравнению с ДТ.

*Работа частично поддержана грантом РФФИ № 18-04-00504.*

#### Литература

- Балнокин Ю.В., Куркова Е.Б., Халилова Л.А., Мясоедов Н.А., Юсуфов А.Г. Пиноцитоз в клетках корня соленакапливающего галофита *Suaeda altissima* и его возможное участие в транспорте ионов  $\text{Cl}^-$  // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – С. 892–901.
- Demir F., Horntrich C., Blachutzik J. O., Scherzer S., Reinders Y., Kierszniowska S., Schulze W. X., Harms G. S., Hedrich R., Geiger D., Kreuzer, I. *Arabidopsis* nanodomain delimited ABA signaling pathway regulates the anion channel SLAH3 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2013. – V. 110. – P. 8296–8301
- Ikonen E. Roles of lipid rafts in membrane transport // Curr. Opin. Cell Biol. – 2001. – P. 470–477.

Danek, M., Valentova O., Martinec J. Flotillins, erlins, and hirs: from animal base camp to plant new horizon // Plant Sciences. – 2016. – V. 35. – P. 191 – 214.

Liu J., DeYoung S. M., Zhang M., Dold L. H., Saltiel A. R. The stomatin/prohibitin/flotillin/HflK/C domain of Flotillin-1 contains distinct sequences that direct plasma membrane localization and protein interactions in 3T3–L1 adipocytes // J. Biol. Chem. – 2005. – V. 280. – P. 16125–16134.

Li R. L., Liu P., Wan Y. L., Chen T., Wang Q. L., Mettbaach U., Baluska F., Samaj J., Fang X. H., Lucas W. J., Lin J. A membrane microdomain-associated protein, *Arabidopsis* Flot1, is involved in a clathrin-independent endocytic pathway and is required for seedling development // Plant Cell. – 2012. – V. 24. – P. 2105–2122.

### **POSSIBLE ROLE OF Flot1, THE MEMBRANE MICRODOMAIN PROTEIN FROM *ARABIDOPSIS THALIANA*, IN REGULATION OF Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> ANTIPORTER *AtSOS1* EXPRESSION**

L.A. Khalilova<sup>1</sup>, O.V. Majorova<sup>1</sup>, Y.V. Orlova<sup>1</sup>, I.V. Karpychev<sup>1</sup>, N.A. Myasoedov<sup>1</sup>, O.I. Nedelyaeva<sup>1</sup>, L.G. Popova<sup>1</sup>, Y.V. Balnokin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>K.A. Timiryazev Institute of Plant Physiology RAS, Moscow, Russia, [lkhalilova@mail.ru](mailto:lkhalilova@mail.ru)

<sup>2</sup>Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

**Abstract.** The investigation of mRNA content in organs of *Arabidopsis thaliana* by the quantitative RT-PCR method has demonstrated an increased transcription of *AtFlot1* and *AtSOS1* in the insertion *A. thaliana* mutant *flot1* (GK-467G04), compared to the WT. Changes in the transcription of these genes were accompanied by an increase in the FW of organs, a decrease in the Na<sup>+</sup> content, and an activation of post-Golgi vesicle formation. It is hypothesized that *AtFlot1* stimulates the expression of *AtSOS1* and its delivery to the plasma membrane by exocytosis.

**Keywords:** *Arabidopsis thaliana*, mutant *flot1*, phenotype, *AtSOS1*, Golgi apparatus