

12. Mattos L. M., Moretti C. L. oxidative stress in plants under drought conditions and the role of different enzymes. 2015.–Enzyme Engineering, 5: 1.

13. Kvesitadze E., Sadunishvili T., Kvesitadze G. Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants //World Acad Sci Eng Technol. – 2009. – Т. 55. – №. 6. – С. 458-468.

14. Сотникова Ю.М., Федяев В.В., Григориади А.С., Гарипова М.И., Галин И.Р., Габидуллина Г.Ф., Фархутдинов Р.Г. Роль фитогормонов в формировании устойчивости растений-фиторемедиантов в условиях почвенного нефтяного загрязнения на фоне комплексного применения биопрепаратов. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2021. № 4. С. 52- 60.

Редокс-регулируемые K^+ -каналы GORK и анионные каналы ALMT1 вовлечены в отток электролитов из клеток корня *Arabidopsis thaliana*

**Гриусевич П. В.^A, Толкачева Ю. В.^A, Новосельский И. Ю.^A,
Демидчик В. В.^{A*}**

^A *Белорусский государственный университет, кафедра клеточной биологии и биоинженерии растений, Минск, Беларусь. *E-mail: dzemidchuk@bsu.by*

Отток электролитов из тканей растений – это реакция, наблюдающаяся в ходе стресса, и в ряде процессов нормальной физиологии. Интенсивность и обратимость выхода электролитов рассматривается в качестве генерализованного индикатора устойчивости растений к неблагоприятным факторам среды [1]. На сегодняшний день природа оттока электролитов остается малоизученной, неясны первичные мембранные механизмы данного явления и не идентифицированы молекулярные мишени, запускающие выход электролитов из клеток. В последние годы показано, что при умеренном стрессе отток электролитов – явление обратимое, то есть регулируемое и не приводящее к гибели клеток растения, что указывает на вероятное вовлечение ион-транспортных систем в данную реакцию. Стресс-индуцированный выход электролитов из растительных клеток практически всегда сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК). Данные явления регистрируются одновременно и практически сразу с момента воздействия стрессоров, приводя к потере K^+ и выходу анионов, а также к активации редокс-зависимых сигнальных процессов [2; 3]. В последние годы также установлено, что генетическое нокаутирование редокс-регулируемого K^+ -канала наружного выпрямления «Guard cell Outward-Rectifying K^+ channel» (GORK) многократно снижает отток K^+ при стрессе [3; 4]. При этом неясно, каким образом активируется данный канал при развитии стрессовой реакции. Исследования на близком GORK канале «Stelar K^+ Outward-Rectifying channel» (SKOR), обеспечивающем загрузку K^+ в ксилему, показали наличие в его структуре уникального

АФК-сенсора, ответственного за рост проводимости в присутствии АФК [5]. Таким образом, АФК, продуцируемые при стрессе, могут напрямую активировать канал. АФК-сенсор представлен у SKOR аминокислотным остатком

Цис.-168 в линкерном участке между 3 и 4 трансмембранными доменами, обеспечивающими потенциал-зависимость гейтинга. В лаборатории физиологии и биотехнологии растений БГУ совместно с Техническим университетом Мадрида была выдвинута гипотеза, согласно которой гомологичная Цис.-168 аминокислота Цис.-151 в комплексе GORK также функционирует как сенсор АФК. Коллегами из Технического университета Мадрида с использованием сайт-специфического мутагенеза были получены трансгенные растения *A. thaliana* с модифицированными АФК-сенсорами (Цис.-151 заменен на редокс-инертный Сер), которые были использованы в настоящей работе. Помимо потока K^+ , важной составляющей оттока электролитов при стрессе является выход из клеток анионов, что необходимо для уравнивания потоков K^+ [1; 2]. У высших растений в анионном составе цитоплазмы и вакуоли доминируют органические анионы, такие как малат, цитрат, сукцинат, аскорбат и др., в отличие от животных, у которых доминирует Cl^- [6]. Пока непонятно, какие ионные каналы и потоки каких анионов обеспечивают анионную составляющую стресс-индуцированного оттока электролитов. Можно предположить, что за выход органических анионов могут отвечать каналы семейства «ALuminum-activated Malate Transporter» (ALMT). Известно, что ALMT1 обеспечивает отток малата из клеток корня *Triticum aestivum* L. в ответ на стресс, вызываемый Al^{3+} [7]. Гипотетически, ALMT1 способен кроме малата транспортировать и другие органические и неорганические анионы. Ген, кодирующий ALMT1, обнаружен во всех известных геномах высших растений. Тем не менее, универсальность ALMT1 в качестве системы выхода различных анионов не подтверждена. В этой связи целью настоящей работы являлось установление роли редокс-регулируемых K^+ -каналов GORK и анионных каналов ALMT в оттоке электролитов из клеток корня *A. thaliana*.

В работе использовались 6-12-дневные проростки *A. thaliana* экотипов Col-0 и WS-0, а также нокаутных линий: *gork1-1*, Компл.*gork1-1*, Сер.-151, *almt1*. Семена различных экотипов *A. thaliana* и трансгенных линий по гену *Gork* были предоставлены профессором Инго Дреером из Технического университета Мадрида, нокаутная линия *almt1* – профессором Стивенном Таерманом из Университета Аделаиды. *A. thaliana* культивировались в стерильных условиях на среде Мурасиге и Скуга [8]. Гидроксил-генерирующая смесь (ГГС) включала 1 мМ Cu^{2+} , 1 мМ L-аскорбиновой

кислоты, 1 мМ H_2O_2 . Протопласты изолировались ферментативно из измельченных корней согласно стандартному протоколу [8]. Регистрация трансмембранных токов осуществлялась при помощи техники пэтч-кламп с использованием ранее разработанных рабочих растворов в конфигурации целая клетка [4].

Анализ выходящих ионных токов у растений *A. thaliana* дикого типа (экотип WS-0) продемонстрировал наличие быстро- и медленно-активирующихся компонент в наружу-направленной проводимости плазматической мембраны. Введение ГГС в наружный раствор приводило к увеличению медленно-активирующейся компоненты выходящего тока и незначительному росту быстро-активирующихся токов во всех протестированных протопластах. Активация ионных токов наблюдалась в течение 15-20 мин с момента начала генерации HO^\bullet в наружном растворе. Наружу-направленная проводимость снижалась при замене калия на блокатор K^+ -каналов ТЭА⁺ в составе пипеточного раствора. Это указывает на то, что в отток K^+ при воздействии HO^\bullet вовлечены ТЭА⁺-чувствительные K^+ -селективные каналы, которые, как было показано ранее, кодируются геном *Gork* и локализованы в плазматической мембране ризодермы [4]. Для установления группы ионных каналов, обеспечивающих отток K^+ при окислительном стрессе, была проведена серия электрофизиологических тестов на трансгенной линии *gork1-1*, лишенной функционального наружу-выпрямляющего K^+ -канала GORK. Анализ ионных токов через плазматическую мембрану протопластов, выделенных из клеток корня данной линии, в контрольных условиях продемонстрировал наличие только быстрой компоненты тока (отсутствие время-зависимости наружу-направленных токов). Редукция медленной части тока свидетельствует об отсутствии активности GORK, который отличается медленной активацией. Мгновенная компонента тока, обусловленная активацией неселективных катионных каналов, была сопоставима с компонентой GORK. Введение ГГС в наружный раствор не приводило к модификации ионных токов через плазматическую мембрану у *gork1-1*. В работе был проведен анализ проницаемости плазматической мембраны у двух линий растений *A. thaliana* с возвращенным нативным K^+ -каналом GORK. В контрольных условиях у линий Компл.*gork1-1* и растений *A. thaliana* дикого типа регистрировались сходные ионные проводимости. Наружу-направленная проводимость у линий Компл.*gork1-1* в контроле состояла главным образом из быстрой компоненты тока. Время-зависимая компонента не была зарегистрирована. Введение в наружный раствор ГГС приводило к росту наружу-направленной проводимости и появлению медленной (время-зависимой) компоненты тока. Были проанализированы ионные токи через плазматическую мембрану клеток корня *A. thaliana* трех линий Сер.-151, экспрессирующих

наружу-выпрямляющий калиевый канал GORK с замещенным цистеиновым остатком по положению 151 на серин. Замена цистеина на серин приводила к снижению чувствительности GORK к АФК. Воздействие ГГС не приводило к активации наружу-выпрямляющего K^+ -тока при деполяризации плазматической мембраны у линий Сер.-151. В целом, характеристики ионных токов у линий с модифицированными каналами GORK были сходны с линией *A. thaliana gork1-1*.

С использованием техники пэтч-кламп был проведен анализ проницаемости плазматической мембраны клеток корня *A. thaliana* (экотип Col-0) к органическим анионам. При введении в пипеточный раствор 40 мМ малата регистрировались высокие значения отрицательного тока, соответствующего выходу анионов, которые снижались в 5 раз при добавлении блокатора анионных каналов 9-антраценкарбоновой кислоты (9-АЦ). Малатные токи обладали быстрой кинетикой активации, слабой потенциалзависимостью, что свидетельствует о вероятном вовлечении анионных каналов семейства ALMT в выход малата из клеток корня. Дальнейшие эксперименты были направлены на получение доказательства участия функционального ALMT во внутри-направленной анионной проводимости клеток корня. В качестве гена-кандидата среди *Almt* был выбран ген *Almt1*. Это было обусловлено тем, что данный ген обильно экспрессируется в клетках корня высших растений и отвечает за отток малата при Al^{3+} -стрессе у *Triticum aestivum* L. [9]. Были исследованы токи, ответственные за выход малата через плазматическую мембрану клеток корня нокаутной линии *Atalmt1*, лишенной канала ALMT1. У данных растений значения малатного тока были приблизительно в 5 раз ниже по сравнению с растениями дикого типа. Полученные данные указывают на то, что продукты гена *Almt1* участвуют в выходе малата из клеток корня *A. thaliana*. Проанализирована проницаемость клеток корня *A. thaliana* к аскорбату. При добавлении в ПР 40 мМ L-аскорбата был зарегистрирован высокий отрицательный ток, который снижался приблизительно в 2 раза при действии 1 мМ 9-АЦ. У линии *A. thaliana*, лишенной канала ALMT1, регистрировался ток аскорбата приблизительно в 3 раза ниже по сравнению с величиной такого же тока у растений дикого типа. Таким образом, было впервые установлено, что ALMT1 обеспечивает транспорт аскорбата из клеток корня *A. thaliana* во внешнюю среду. Ранее данный механизм транспорта аскорбата из клеток корня высших растений не был известен. В ходе анализа проницаемости ALMT к цитрату были выявлены 2 группы протопластов, отличающиеся по селективности к данному аниону. В первой группе клеток (68%) отрицательный ток был ниже приблизительно в 6 раз по сравнению с второй группой (32%). Добавление в пипеточный раствор 1 мМ 9-АЦ

приводило к снижению анионного тока приблизительно в 4,5 раза. Биофизические свойства токов цитрата были сходны с токами малата, что указывает на вероятное участие ALMT1 в выходе цитрата из клеток корня. В растениях *almt1* величина тока цитрата была приблизительно в 7,5 раза ниже, чем у растений дикого типа. Таким образом, полученные данные указывают на высокую вероятность того, что ALMT1 ответственен за отток цитрата из клеток корня *A. thaliana*. Установлено, что плазматическая мембрана клеток корня *A. thaliana* обладает низкой проницаемостью для фумарата, пропионата и глюконата. Зарегистрированные анионные токи были ниже приблизительно в 3 раза по сравнению с токами, опосредованными выходом малата из клеток. Токи данных анионов характеризовались быстрой кинетикой активации и слабой потенциал-зависимостью, что указывает на то, что плазматическая мембрана клеток ризодермы *A. thaliana* пропускала очень небольшие количества данных органических анионов, вероятно, вследствие работы ALMT-подобных анионных каналов.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (проект Б24-060).

Библиографические ссылки

1. Demidchik, V. Mechanisms and physiological roles of K⁺ efflux from root cells / V. Demidchik // J. Plant Physiol. – 2014. – Vol. 171. – P. 696–707.
2. Early copper-induced leakage of K⁺ from *Arabidopsis* seedlings is mediated by ion channels and coupled to citrate efflux / A. S. Murphy [et al.] // Plant Physiol. – 1999. – Vol. 121. – P. 1375–1382.
3. Demidchik, V. The role of ion disequilibrium in induction of root cell death and autophagy by environmental stresses / V. Demidchik, E. V. Tyutereva, O. V. Voitsekhovskaja // Funct. Plant Biol. – 2018. – Vol. 45. – P. 28–46.
4. *Arabidopsis* root K⁺ efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced cell death / V. Demidchik [et al.] // J. Cell Sci. – 2010. – Vol. 123. – P. 1468–1479.
5. A minimal cysteine motif required to activate the SKOR K channel of *Arabidopsis* by the reactive oxygen species H₂O₂ / C. Garcia-Mata [et al.] // J. Biol. Chem. – 2010. – Vol. 285, № 38. – P. 29286–29294.
6. Anion channels in plant cells / H. Kollist [et al.] // FEBS J. – 2011. – Vol. 278. – P. 4277–4292.
7. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter / T. Sasaki [et al.] // Plant J. – 2004. – Vol. 37. – P. 645–653.
8. Demidchik, V. Sodium fluxes through non-selective cation channels in the plasma membrane of protoplasts from *Arabidopsis thaliana* roots / V. Demidchik, M. Tester // Plant Physiol. – 2002. – Vol. 128, № 2. – P. 379–387.
9. Kinraide, T. B. Organic acid secretion as a mechanism of aluminium resistance: a model incorporating the root cortex, epidermis, and the external unstirred layer / T. B. Kinraide, D. R. Parker, R. W. Zobel // J. Exp. Bot. – 2005. – Vol. 56, № 417. – P. 1853–1865.