

УДК 581.1

ИНДУЦИРОВАННЫЙ БАКТЕРИАЛЬНЫМ ЭЛИСИТОРОМ FLG22 ЭНДОЦИТОЗ В ИММУННОЙ РЕАКЦИИ КЛЕТОК КОРНЕЙ *Arabidopsis thaliana*

© 2024 г. Л. А. Халилова^{а, *}, А. С. Воронков^а

^аФедеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: lhalilova@mail.ru

Поступила в редакцию 31.08.2023 г.

После доработки 03.10.2023 г.

Принята к публикации 04.10.2023 г.

Разнообразные молекулы патогенного происхождения, такие как бактериальный флагеллин (flg22), распознаются растениями через рецепторы плазматической мембраны и индуцируют как местные, так и системные иммунные реакции. При этом везикулярный транспорт является ключевым в обеспечении быстрого и точного реагирования. При взаимодействии с патогенами, локализованными на поверхности клеток, иммунные рецепторы подвергаются эндоцитозу по общему эндосомальному пути. Какой из везикулярных путей патогены используют для проникновения в ткани и какое значение имеет в этом процессе flot1 остается не до конца изученным. Данное исследование посвящено влиянию биотических факторов стресса на иммунную реакцию растений *Arabidopsis thaliana* дикого типа и его нокаут-мутанта *Atflot1ko*. Изучены процессы эндоцитоза под действием разных агентов: 1-нафталинуксусной кислоты и метил-β-циклодекстрина. С помощью трансмиссионной электронной микроскопии выявлены различия в ответных реакциях клеток на стресс, индуцированный flg22. Показано, что биотический стресс у нокаут-мутантов активирует секреторный путь (экзоцитоз), необходимый для защиты клеток от действия патогена на поверхности клетки, тогда как у растений дикого типа активируется эндоцитоз, направленный на перемещение патогена в вакуоль. Полученные данные показали, что обработка мутантов *Atflot1ko* бактериальным пептидом сохраняет активность работы комплекса Гольджи и способность этой структуры формировать ранние эндосомы, принимающие непосредственное участие в транспорте защитных белков к месту проникновения патогена.

Ключевые слова: *Arabidopsis thaliana*, бактериальный пептид, биотический стресс, иммунный ответ, клатрин-зависимый эндоцитоз, патогены, рецепторы мембраны, флотилин, экзоцитоз, flg22

DOI: 10.31857/S0015330324010011, EDN: NWQHLL

ВВЕДЕНИЕ

Растения, как и все другие живые организмы, неразрывно связаны со средой обитания. Однако, в силу прикрепленного образа жизни, их зависимость от окружающей среды значительно выше, чем у подвижных форм, и они постоянно вынуждены приспосабливаться к ее изменениям. В природе растения постоянно подвержены комбинированному стрессу, который условно можно разделить на абиотическую и биотическую составляющие [1]. В настоящее время адаптация к абиотическим факторам среды изучена

значительно полнее, чем к биотическим, вследствие простоты модуляции воздействия отдельных абиотических стрессоров в лабораторных условиях [1]. Растительные организмы для изучения окружающей среды используют рецепторы своих клеток. Известно, что растения имеют врожденные поверхностные и внутриклеточные иммунные рецепторы, способные обнаруживать присутствие микробных патогенов и запускают защитные реакции для прекращения или ограничения их роста [2]. Таким образом, очевидно, что изучение механизмов рецепции и ответных реакций организма растений на биотические стрессоры является крайне важной задачей для оценки адаптационного потенциала растений в целом.

У растений представлено два основных типа везикулярного транспорта: 1) секреторный путь, который транспортирует вновь синтезированные

Сокращения: ЭР — эндоплазматический ретикулум; ПМ — плазматическая мембрана; ПП — переплазматическое пространство; ПЭ/МВТ — поздние эндосомы/мультивезикулярные тела; КЗЭ/КНЗЭ — клатрин зависимый и клатрин независимый эндоцитоз; РЭ — ранние эндосомы; КГ — комплекс Гольджи; ТГС — транс Гольджи сеть.

белки из эндоплазматического ретикулула (ЭР) в плазматическую мембрану (ПМ) или переплазматическое пространство (ПП); 2) эндоцитарный путь (клатрин-зависимый и независимый), который перебрасывает поверхностно локализованные белки ПМ через ранние эндосомы, а также интернализирует груз в вакуоль через поздние эндосомы/мультивезикулярные тела (ПЭ/МВТ). Процесс мембранного трафика по обоим путям включает отпочковывание везикул от донорской мембраны и последующий транспорт, привязывание и слияние везикул с мембраной-мишенью [3]. Клатрин-опосредованный (зависимый) эндоцитозный путь (КЗЭ) является основным и наиболее изученным в клетках растений [4]. К клатриновому пути относится и рецептор-опосредованный эндоцитоз (РОЭ), который играет важную роль в развитии, росте и защите клеток от патогенов, регулируя уровни и распределение рецепторов клеточной поверхности [5–7], однако такой эндоцитоз у растений мало изучен. Другой, клатрин-независимый (КНЗЭ), путь эндоцитоза в клетках растений связан с рафтами (участками ПМ, обогащенными стеринами и сфинголипидами), которые включают в себя специфические мембранные белки, такие как флотилин 1 (Flot1) [8]. Известно, что абиотический стресс индуцирует КНЗЭ в клетках растений, и флотилины в составе микродоменов ПМ участвуют в образовании ранних эндосом на транс-стороне комплекса Гольджи (КГ) [8, 9]. Нами также было показано, что нокаут-мутация *flot1* в условиях абиотического стресса приводит к деформации КГ и, как следствие, к дефекту образования ранних эндосом в клетках корней *Arabidopsis thaliana* [10].

ПМ образует первичный интерфейс эукариотических клеток для обнаружения потенциально вторгающихся патогенов. Распознавание ассоциированных с микробами молекулярных паттернов (microbe-associated molecular patterns, MAMPs) на ее поверхности опосредуется рецепторами распознавания образов (pattern recognition receptors, PRRs) — важнейшими компонентами врожденной иммунной системы растений. Охарактеризован широкий спектр различных PRR для консервативных микробных паттернов, включая более 10 с известными лигандами [11, 12] *A. thaliana* широко используется в качестве модельной растительной системы для изучения взаимодействия растения с патогенами в целом. Яркими примерами трансмембранных рецепторных киназ являются иммунные рецепторы флагеллина 2 (FLS2). FLS2 представляет собой PRR, который обнаруживает консервативные молекулярные паттерны, связанные с микробами или патогенами (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) [13, 14], такими как грибковый хитин [15], флагеллин [16], липо-

полисахариды [17]. Когда рецепторный белок распознает одну такую микробную молекулу, активируется и образуется комплекс с другими белками — корецепторами. Затем белковый комплекс посылает сигнал в клетку, чтобы вызвать иммунный ответ. Flg22 представляет собой фрагмент бактериального флагеллина, который, связываясь с флагеллин-чувствительным рецептором 2 (FLS2) [18], индуцирует взаимодействие последнего с его корецептором — BRI1-ассоциированной киназой 1 (BAK1) [19, 20] и запускает эндоцитоз FLS2 [16]. В результате данных процессов активируется консорциум защитных механизмов, в том числе и иммунный ответ растений [19, 21]. FLS2 функционирует как важный рецептор клеточной поверхности в иммунитете растений против бактериальной инфекции и запускает защитные силы растений после стимуляции бактериальным флагеллином или производным от флагеллина пептидом flg22 [21]. Нарушение интернализации FLS2 коррелирует с измененными ответами flg22 [16, 19, 22]. FLS2-рецепторы ПМ постоянно подвергаются РОЭ и возвращаются обратно в плазмалемму через ранние эндосомы/транс Гольджи сети (ТГС) (секреторный путь) [23, 24]. Лиганд-активированные рецепторы сортируются в ТГС и транспортируются в поздние эндосомы/мультивезикулярные тела (ПЭ/МВТ) [16, 25, 26]. Деградация таких FLS2-эндосом происходит внутри вакуолей, поскольку убиквитинированные белки, удаляемые с ПМ путем эндоцитоза, сортируются в ТГС и отправляются в МВТ и далее в вакуоль для дальнейшей деградации [27, 28]. Таким образом, распознавание flg22 растениями и быстрый локальный иммунный ответ ослабляют рост бактерий и могут индуцировать системную устойчивость к последующей инфекции [29].

Цель работы — анализ изменений, происходящих в клетках корней растений *A. thaliana* в ответ на биотический стресс, индуцированный бактериальным пептидом flg22, и выявление участия флотилинов и белков микродоменов ПМ в иммунном ответе растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования. Работа выполнена на растениях *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. дикого типа (ДТ) (экотип Col-0) и его нокаут-мутанте *Atflot1ko* (SALK_205125C). Данные о вставке и характеристика мутанта были опубликованы нами ранее [30]. Пятидневные проростки *A. thaliana* ДТ и *Atflot1ko* как для FM-окрашивания, так и для трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) были выращены на агаризованной ½ МС-среде с 0.5% сахарозой при температуре $23 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности воздуха $70 \pm 5\%$, фотопериоде 16 ч/сут и интен-

сивности света 80 мкмоль квантов ФАР/м² с, полученного от люминесцентных ламп ЛБ-80 (“Philips”, Польша).

FM4-64 окрашивание. В ходе эксперимента 5-дневные проростки инкубировали в 1 мл жидкой ½ МС-среде (без 0.5% сахарозы, pH 5.8). Для изучения динамики поглощения FM4-64 через 5, 15, 30, 45, 60 мин отбирали растения для детекции сигнала маркера. В контрольном варианте опыта проростки инкубировали с эндоцитозным красителем FM4-64 (2 мкМ) при комнатной температуре в течение 1 ч. В опытном варианте в среду инкубации одновременно с красителем вносили 10 мкМ flg22 (GenScript, #RP19986, США). Через 1 ч проростки переносили на предметное стекло и визуализировали с помощью микроскопа Axio-Imager Z2 (“Carl Zeiss”, Германия). Изображения получали с помощью монохромной высокочувствительной камеры AxioCamMRm (“Carl Zeiss”, Германия) в программе AxioVision 4.8. Флуоресценцию FM4-64 (красный псевдоцвет) детектировали, используя наборы фильтров № 14 (λ_{ex} 510–560 нм, λ_{em} > 590 нм; “Carl Zeiss”, Германия). Средняя интенсивность пикселей цитозольной стороны клеток, исключая плазматическую мембрану, были измерены с помощью программы ZEN Blue (“Carl Zeiss”, Германия). Для анализа использовали не менее 50 снимков в каждом варианте опыта.

Обработка корней НУК и МВЦД. 5-дневные проростки в течение 30 мин инкубировали в 1 мл жидкой ½ МС-среде (без 0.5% сахарозы, pH 5.8) с добавлением 100 мкМ НУК (“Sigma”, #N1641, Великобритания). Далее корни переносили в инкубирующий раствор с добавлением 2 мкМ FM4-64 и 10 мкМ flg22 при комнатной температуре и продолжали инкубацию еще 60 мин. При одновременной предобработке проростков НУК и МВЦД в раствор ½ МС-среды добавляли 100 мкМ НУК и 10 мМ МВЦД (“Sigma”, #128446-36-6, Китай). Далее все так же, как при обработке НУК. Обработка изображений была такая же, как при окрашивании FM4-64.

Трансмиссионная электронная микроскопия. Изучение ультраструктуры клеток корней проростков *A. thaliana* ДТ и *Atflotlko* проводили с помощью ТЭМ. Образцы подготавливали в соответствии со стандартной методикой [9]. Кусочки корней (2–3 мм) были вырезаны на расстоянии 1–2 мм от кончика корня. Образцы предварительно инкубировали в 10 мкМ flg22 в течение 1 ч и далее фиксировали в 2.5% растворе глutarового альдегида в течение 3 ч с постфиксацией в 1% OsO₄ при 4°C в течение суток. Фиксирующие растворы готовили на основе 0.05 М каодилатного буфера, pH 7.2. После фиксации образцы обезвоживали в спиртах (30 и 40% – 2 раза по 15 мин; 50 и 60% – 2 раза по 30 мин; 70% – на ночь при 4°C). На следующий день образцы пе-

реносили в 96% этанол – 1 ч; 100% этанол : 100% ацетон – 1:1 (об/об) – 1 ч; 100% ацетон – 1 ч и далее в смесь эпоксидной смолы (“Fluka”, cat. № 2920114, Германия) и ацетона в соотношении 1:8, 1:4, 1:1 (об/об). После полимеризации образцов с помощью ультрамикротомы Om U3 (“Reihert”, Австрия) были получены ультратонкие срезы. Для просмотра в ТЭМ LIBRA 120 (“Carl Zeiss”, Германия) срезы помещали на сетки и контрастировали 1% уранилацетатом.

Статистический анализ. Для статистического анализа использовали факторный дисперсионный анализ с апостериорным критерием HSD для неравных выборок в программе STATISTICA10 (StatSoft). На графиках представлены средние значения и их стандартные отклонения, разными буквами указаны достоверно отличающиеся величины при $P < 0.05$ или 0.001.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика поглощения FM4-64. Чтобы получить общее представление об участии флотилинов в иммунном ответе растений, мы исследовали эндоцитоз в клетках корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana* ДТ и его нокаут-мутанта (*Atflotlko*).

Известно, что в процессе эндоцитоза FM4-64 интернализуется в ПМ клетки. На рис. 1 показана динамика поглощения зонда клетками корней в зоне растяжения у растений *A. thaliana* ДТ и *Atflotlko*. Ранее нами было продемонстрировано, что в исследуемой зоне корней у ДТ и нокаут-мутанта в условиях засоления (100 мМ NaCl) через 30 мин инкубации проростков в растворе FM4-64 интенсивность флуоресценции у растений нокаут-мутанта была выше, чем у ДТ, в 2 раза [10].

В данной работе 5-дневные проростки исследуемых линий растений подвергались действию биотического фактора стресса. Растения были предобработаны бактериальным пептидом flg22 в течение 1 ч, и затем мы оценивали динамику поглощения и сигнал флуоресценции маркера клетками корня. Полученные результаты показали, что интенсивность FM4-64 у нокаут-мутанта через 1 ч после обработки пептидом сохранялась высокой и была более чем в 2 раза выше, чем у ДТ (рис. 1; 2а, г). При этом максимум флуоресценции эндоцитозного маркера приходился на 30 мин, как и при действии абиотического стресса. Динамика поглощения FM4-64 клетками корней показала, что интенсивность флуоресценции зонда в клетках нокаут-мутанта сохранялась высокой на всем промежутке времени по сравнению с ДТ.

Для изучения роли флотилинов в иммунном ответе растений мы проанализировали flg22-ин-

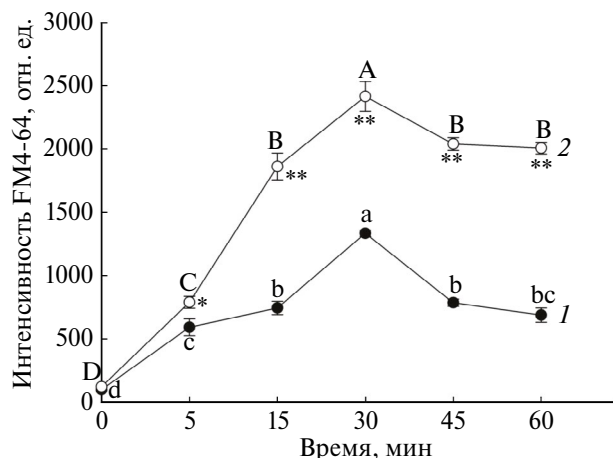


Рис. 1. Динамика конститутивного поглощения эндоцитозного маркера FM4-64 клетками корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana*. FM4-64 – 2 мкМ, 1 – дикий тип, 2 – нокаут-мутант *AtFlot1ko* (SALK_205125C). Значения сравнивали независимо для каждой временной точки (* – $P < 0.05$, ** – $P < 0.001$) и в каждом варианте на протяжении всего времени эксперимента (разными латинскими буквами обозначены статистически достоверные значения при $P < 0.05$).

дуцированную иммунную реакцию клеток растений ДТ и *Atflot1ko*. Известно, что флотилины входят в состав нанодоменов ПМ и в условиях засоления участвуют в КНЗЭ [8]. Ранее нами было показано, что внесение в среду инкубации проростков ДТ и нокаут-мутанта 100 мМ NaCl не оказало влияния на интенсивность флуоресценции FM4-64 по сравнению с условиями отсутствия NaCl в среде [10]. В отличие от абиотического стресса, действие биотических факторов среды значительно увеличивало интенсивность флуоресценции FM4-64. Обработка проростков исследуемых линий растений flg22 в течение 1 ч приводила к увеличению интенсивности поглощения FM4-64 почти в 2.5 раза в клетках корней ДТ и в 1.5 раза у нокаут-мутанта (рис. 2б, д; 3), тем самым демонстрируя активацию эндоцитоза в клетках корней.

Действие 10 мМ НУК, ингибитора КЗЭ на проростки, обработанные пептидом flg22, не оказало ингибирующего действия на эндоцитоз в клетках корней дикого типа, лишь отмечалось небольшое, статистически недостоверное снижение флуоресценции FM4-64. При этом в клет-

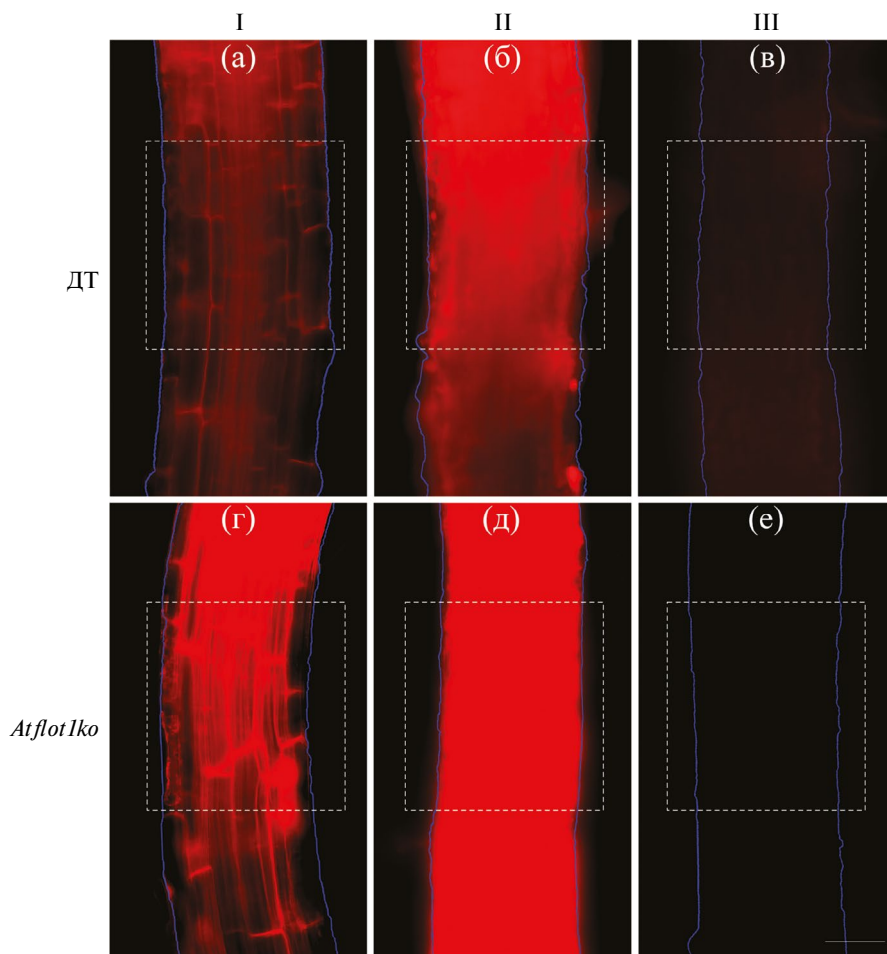


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции FM4-64 в клетках корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana* дикого типа (ДТ) (а, б, в) и нокаут-мутанта (*AtFlot1ko*) (г, д, е). I – контроль (а, г), II – 10 мкМ flg22 (б, д), III – 10 мкМ flg22 + 100 мкМ НУК + 10 мМ МВЦД (в, е). Пунктирной рамкой отмечена область корня, используемая для морфометрического расчета интенсивности сигнала FM. Масштаб – 40 мкм.

ках корней *Atflotlko* наблюдалось снижение сигнала флуоресценции в 2 раза (рис. 3). Внесение в среду инкубации 100 мкМ МВЦД, агента, вымывающего стерину из ПМ, приводило к резкому снижению сигнала флуоресценции зонда в 6 и 8 раз соответственно в клетках корней ДТ и нокаут-мутанта, предварительно обработанных флагеллином, по сравнению с контролем (обработка flg22) (рис. 3). При одновременной обработке корней исследуемых линий растений НУК и МВЦД наблюдалось снижение сигнала FM4-64 в клетках корней нокаут-мутанта в 2 раза по сравнению с ДТ (рис. 2в, е; 3). При этом ингибирование эндоцитоза у ДТ и нокаут-мутанта сохранялось.

Изучение ультраструктуры клеток. Сравнение ультраструктуры клеток корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana* ДТ и его нокаут-мутанта, выращенных в контрольных условиях, было показано нами ранее. Клетка имела типичное для растительной клетки строение [30]. Изучение структуры клеток корней исследуемых растений в условиях биотического стресса (действие бактериального пептида — flg22) показало, что реакция иммунного ответа растений отличается от реакции клеток на абиотический стресс (рис. 4а–в). В клетках корней ДТ, обработанных пептидом, ПМ формировала инвагинации, часть которых образовывала парамуральные тела (ПМТ), заполненные мелкими везикулами и мембранным материалом (рис. 4б, в), что, в свою очередь, указывало на активацию процесса эндоцитоза. В ПП экзосомы (Экз) встречались крайне редко (рис. 4в),

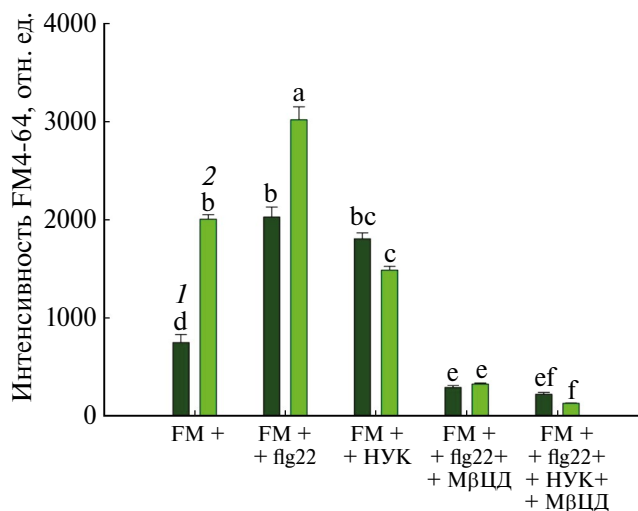


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции FM4-64 клетками корней 5-дневных проростков растений *A. thaliana*. 1 — дикий тип, 2 — нокаут-мутант *AtFlotlko* (SALK_205125C). Проростки были предобработаны 10 мкМ flg22 в течение 1 ч. FM4-64 — 2 мкМ, НУК — 100 мкМ, МВЦД — 10 мМ. Разными латинскими буквами обозначены статистически достоверные значения при $P < 0.05$.

поздние эндосомы/мультивезикулярные тела (ПЭ/МВТ), встречающиеся в цитоплазме, имели небольшие размеры (рис. 4а, б — вставка, в — вставка). ЭР преимущественно гранулярного типа был плохо развит и представлен короткими трубочками (рис. 4а). КГ в клетках встречались крайне редко в виде плотно упакованных цистерн, на транс-стороне которых формировались единичные ранние эндосомы (РЭ), что говорило о неактивном состоянии данных структур. В цитоплазме свободно плавающих РЭ не наблюдалось, общая везикуляция и вакуолизация компартмента была снижена.

Предобработка проростков ДТ flg22 и одновременное внесение в среду инкубации НУК и МВЦД привели к ингибированию эндоцитоза в клетках корней ДТ (рис. 4г–е). В ПП наблюдалось отсутствие экзосом, ПМ плотно прилегала к клеточной стенке (КС) и не образовывала инвагинации и ПМТ. В цитоплазме встречались ПЭ/МВТ крупных размеров (рис. 4е — вставка). КГ был хорошо развит, на его транс-стороне активно формировались РЭ. Ингибирование эндоцитоза и формирование многочисленного количества ранних эндосом, свободно плавающих в цитоплазме, приводило к ее сильной везикуляции в данных условиях. ЭР был хорошо развит и представлен длинными трубчатыми тяжами (рис. 4г–е). На концах таких трубочек формировались вздутия, которые затем отшнуровывались и превращались также в эндосомы (рис. 4г, д). Мелкие везикулы, наблюдаемые в цитоплазме, чаще всего сливались с тонопластом, придавая мембране извилистую форму (рис. 4г). В данных условиях обработки корней ДТ мы наблюдали активацию секреторного пути и направление транспорта веществ в секреторных пузырьках к центральной вакуоли.

Ультраструктура клеток корней проростков нокаут-мутантов, обработанных flg22, имела иную картину. Между ПП и ПМ скапливались экзосомы разных размеров и формы (рис. 4ж, з — вставка, и — вставка), чередуясь с участками ПМ, плотно прилегающей к КС. ЭР гранулярного типа был хорошо развит и имел вид длинных трубчатых тяжей (рис. 4ж–и). КГ встречался также редко, как и у ДТ в аналогичных условиях, однако на транс-стороне данных структур РЭ формировались чаще и имели более крупные размеры (100–200 нм), чем у ДТ (50–120 нм). (рис. 4ж). Поздние эндосомы мелких размеров (рис. 4ж — вставка), изредка сливались с тонопластом и выбрасывали свое содержимое (везикулы) в вакуоль, такое слияние мембран также приводило к усилению извилистости тонопласта (рис. 4ж — вставка), как и у ДТ. Таким образом, при данных условиях мы наблюдали активацию канонического пути экзоцитоза (секреция веществ к поверхности клеток).

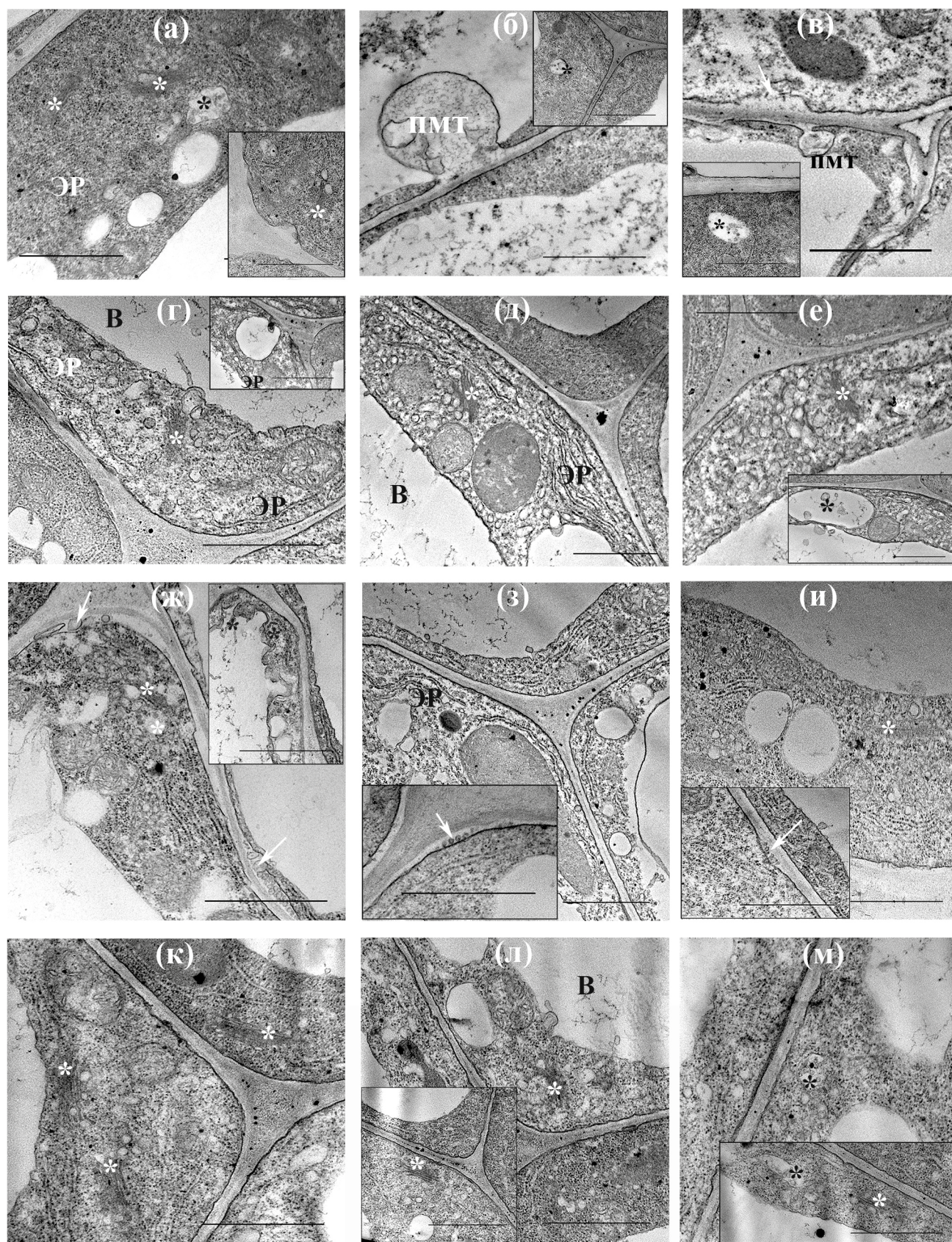


Рис. 4. Ультраструктура клеток корней 5-дневных проростков *A. thaliana* дикого типа и его нокаут-мутанта (*AtFlot1ko*): а–в – дикий тип, 10 мкМ flg22; г–е – дикий тип, 100 мкМ НУК + 10 мМ МВЦД; ж–и – *AtFlot1ko*, 10 мкМ flg22; к–м – *AtFlot1ko*, 100 мкМ НУК + 10 мМ МВЦД. ЭР – эндоплазматический ретикулум; ПМТ – парамуральное тело; В – вакуоль; белая звездочка – транс-Гольджи сеть/ранние эндосомы; черная звездочка – поздняя эндосома/мультивезикулярное тело; белая стрелка – экзосомы. Масштаб – 1 мкм.

Предобработка проростков бактериальным элиситором и одновременное действие на них НУК и МВЦД привели к тому, что в клетках корней нокаут-мутанта в ПП экзосомы не обнаруживались и ПМ плотно прилегала к КС. Визуально увеличилось количество КГ и число диктиосом в них. На транс-стороне КГ и на концах диктиосом образовывалось множество мелких секреторных везикул, которые сливались с тонопластом (рис. 4к, л). В цитоплазме встречались мелкие ПЭ/МВТ (рис. 4м). Однако, количество и размеры образующихся эндосом в клетках корней нокаут-мутанта были значительно меньше, чем у растений ДТ, что подтверждает наше предположение об участии флотилинов в процессах образования РЭ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения роли флотилинов в иммунитете растений мы проанализировали flg22-индуцированный иммунный ответ в клетках корней проростков растений *A. thaliana* ДТ и его нокаут-мутанта *Atflot1ko*. Наши исследования показали, что при обработке растений нокаут-мутанта бактериальным flg22 сигнал флуоресценции маркера FM4-64 в клетках увеличивался по сравнению с ДТ, подтверждая данные о поглощении зонда клетками через КЗЭ [31] (рис. 2б, д; 3). Тем самым мы подтвердили полученные нами ранее данные о наличии у нокаут-мутанта только клатрин-зависимого пути эндоцитоза. В предыдущей нашей работе было показано отсутствие реакции клеток как у растений ДТ, так и у нокаут-мутанта на действие абиотического стресса (100 мМ NaCl) [10]. Полученные результаты говорят о запуске иммунного ответа в клетках корней исследуемых растений при биотическом стрессе.

Обработка проростков ДТ ингибитором КЗЭ (НУК) не оказала влияния на интернализацию окрашенного FM4-64 мембранного материала клетками корней в условиях биотического стресса, тогда как у растений нокаут-мутанта наблюдалось количественное снижение сигнала зонда. В предыдущих исследованиях мы показали, что у исследуемого мутанта отсутствует клатрин-независимый путь эндоцитоза. Так, обработка мутантных проростков ауксином (НУК) в условиях абиотического стресса на 15% ингибировала КЗЭ [10], тогда как интенсивность флуоресценции FM4-64 в условиях биотического стресса при внесении НУК в среду инкубации снижалась на 50%. Таким образом, в условиях обработки растений пептидом ингибирование КЗЭ в клетках корней нокаут-мутантов сильнее выражено, чем в условиях засоления, в связи с этим мы можем утверждать, что такой путь эндоцитоза для патогенов явля-

ется доминирующим и, вероятно, в данном случае речь идет о рецепторопосредованном пути эндоцитоза, зависящем от клатрина. При этом полное его ингибирование могло бы привести к нарушению транспортных функций в целом. Снижение сигнала FM4-64 у нокаут-мутанта в 2 раза, возможно, объясняется частичной блокировкой КЗ-пути эндоцитоза, тогда как отсутствие реакции на действие ингибитора у ДТ говорит об активации КНЗ-пути, в котором участвуют флотилины. Было показано, что в условиях абиотического стресса (100 мМ NaCl) обработка проростков растений нокаут-мутанта *A. thaliana* НУК так же приводила к снижению флуоресценции до 35%, тогда как интенсивность сигнала FM4-64 в этих условиях в клетках ДТ, так же, как и при действии flg22, не изменялась [10]. Таким образом можно предположить, что в условиях стресса (как абиотического, так и биотического) в клетках растений нокаут-мутанта транспорт веществ с поверхности клетки преимущественно осуществляется по КЗ-пути эндоцитоза, а у дикого типа стресс активирует КНЗЭ с участием флотилинов.

Обогащенные стеринами рафты, содержащие специфические домены, могут играть важную роль в передаче сигналов, индуцированных молекулярными паттернами патогенов, тем самым влияя на эндоцитоз белков ПМ у растений [32, 33]. Yu с соавт. [34] показали, что обработка flg22 может усиливать эндоцитоз GFP-Flot1 с поверхности клеток, а Cui с соавт. [35] обнаружили, что FLS2-GFP колокализуется с эндосомами AtFlot1-mCherry (маркер богатых стеринами доменов), что подтверждает полученные нами результаты. В микродоменах ПМ содержатся рецепторы FLS2, которые, связываясь с flg22-пептидом, запускают рецептор-опосредованный (клатрин-зависимый) эндоцитоз с образованием FLS2-эндосом [36]. В наших исследованиях обработка проростков МВЦД агентом, вымывающим стерину из микродоменов ПМ, показала значительное ингибирование эндоцитоза (КЗЭ и КНЗЭ) как в клетках корней ДТ, так и у нокаут-мутанта (рис. 2). Полученные результаты подтверждают, что мембранные стерину, входящие в состав микродоменов ПМ, играют важную роль в запуске рецептор-опосредованного эндоцитоза, указывая на их вовлечение в интернализацию FLS2-эндосом, индуцированных flg22-пептидом. Одновременное внесение в среду инкубации НУК и МВЦД привело к статистически достоверному снижению флуоресценции зонда (в 2 раза) в клетках предобработанных flg22 проростков *Atflot1ko* (рис. 2, 3). Таким образом, мы можем утверждать, что одновременное действие трех факторов (flg22, НУК и МВЦД) в условиях биотического стресса максимально блокирует процессы эндоцитоза у нокаут-мутан-

та. Действие МБЦД на клетки корней нокаут-мутанта, по-видимому, приводит к натяжению ПМ и полному блокированию единственно-возможного пути эндоцитоза, тем самым подтверждая важную роль стерингов в составе микродоменов ПМ в процессах КЗЭ. При этом у ДТ частично сохраняется сигнал флуоресценции, что указывает на процесс КНЗЭ в клетках и участие в нем Flot1. Однако в условиях абиотического стресса аналогичное действие НУК и МБЦД на растения *A. thaliana* приводило к обратной картине – сохранению сигнала флуоресценции в клетках нокаут-мутанта [10]. Изучение данных процессов показало, что в разных условиях стресса (абиотического и биотического) в клетках корней растений ДТ и нокаут-мутанта активируется тот или иной эндоцитозный (КЗ или КНЗ) путь.

Обработка проростков бактериальным элиситором в течение 1 ч привела к следующим изменениям ультраструктуры клеток. С помощью ТЭМ в клетках корней ДТ наблюдалось активирование эндоцитоза: на поверхности клеток часто образовывались инвагинации ПМ и ПМТ (рис. 4б, в). Эти структуры, скорее всего, необходимы для переноса молекул патогена с поверхности клеток в вакуоль, где происходит их деградация, следовательно цитоплазма и ее содержимое будут защищены от токсического действия flg22. В аналогичных условиях у проростков нокаут-мутанта наблюдалось образование многочисленного количества экзосом в ПП (рис. 4ж, з – вставка, и – вставка). МВТ максимально близко располагались к ПМ. Такое расположение структур, скорее всего, приведет к слиянию двух мембран и высвобождению содержимого МВТ в ПП. Все эти процессы указывают на активацию процесса экзоцитоза в клетках (рис. 4ж, ж – вставка). Однако на рисунке 2 видно, что сигнал флуоресценции FM4-64 в клетках нокаут-мутанта увеличивается на 25%, что говорит об эндоцитозе. Образование мелких везикул размерами до 50 нм с внутренней стороны ПМ подтверждает наше предположение о двунаправленности транспортных путей в клетках корней нокаут-мутанта (рис. 4з). ЭР был хорошо развит, КГ встречался реже, чем у ДТ. Большое количество экзосом в ПП и хорошо развитый ЭР в клетках корней нокаут-мутанта говорит об активации процесса синтеза защитных белков, направленных на борьбу с бактериальными патогенами, а их транспорт к ПМ осуществляется в секреторных пузырьках. По каноническому секреторному пути должны образом свернутые белки транспортируются из ЭР к пузырькам Гольджи и впоследствии к КГ/РЭ, которые затем сливаются с ПМ для доставки растворимого груза во внеклеточное пространство или мембранного груза к ПМ. У растений КГ/РЭ служит ключевой со-

ртировочной станцией на пересечении секреторных и эндоцитарных путей. Такой процесс вновь синтезированных белков к поверхности клеток сокращает время между синтезом и секрецией иммунных молекул, демонстрируя запуск защитных механизмов в иммунном ответе клеток [37].

Одновременная обработка НУК и МБЦД растений ДТ, предобработанных бактериальным элиситором, стимулировала образование ЭР, что также является необходимым для иммунного ответа растений. Известно, что обработка растений flg22 приводит к слиянию ПЭ/МВТ с ПМ и высвобождению в ПП экзосом (экзоцитоз), содержащих каллозообразующие ферменты и играющих важную роль в защите растений [38]. Заново синтезированные ферменты в хорошо развитом ретикулуме транспортируются в РЭ к ПМ. В наших исследованиях в клетках корней ДТ утолщения КС не наблюдалось, а обработка бактериальным пептидом flg22, наоборот, привела к ингибированию экзоцитоза и активации эндоцитоза. Аналогичные условия обработки корней проростков нокаут-мутанта демонстрировали активную работу КГ, образование РЭ и их транспорт к ПМ (рис. 4ж–и). Полученные данные указывают на то, что у исследуемых растений в условиях биотического стресса существуют разные пути и способы деградации патогена с поверхности клеток, и ответная реакция растений на стресс зависит от многих факторов, в том числе и от уровня развития в клетках ЭР. В ответ на бактериальную атаку растения способны формировать связи между ПМ и вакуолью, чтобы высвободить в ПП антибактериальные молекулы. Данный процесс мы наблюдали у нокаут-мутанта, тогда как у ДТ патоген с поверхности клетки в вакуоль выводится с помощью ПМТ, минуя цитоплазму, для дальнейшего его разрушения. Возможно, в этом случае локализованные в ПМ FLS2-рецепторы распознавания flg22 [18, 21] конститутивно циркулируют в клетке в виде FLS2-эндосом [24]. Было показано, что после активации FLS2 связанный с флагеллином участок мембраны подвергается эндоцитозу и последующей деградации в вакуоли по убиквитин-протеосомному пути [16, 24, 25]. Совместная локализация эндоцитозированного FLS2, связанного с flg22 и с Ara6/7 малыми ГТФазами, которые маркируют ПЭ/МВТ, показала, что активированные FLS2-эндосомы разрушаются в вакуоли [24, 39], что также подтверждает полученные нами данные. Об активном транспорте мембранных компонентов с помощью эндо- и экзоцитоза также свидетельствуют следующие данные: во-первых, анализ временных рядов и изображений, полученных с помощью VA-TIRFM, оценивающий флуоресцентный сигнал FLS2-GFP, выявил, что

рецепторы FLS2 очень подвижны и гетерогенно распределены на ПМ [35]; во-вторых, Mbengue с соавтор. [40] показали опосредованный клатрином flg22-индуцированный эндоцитоз FLS2 эндосом из ПМ, что, в свою очередь, переключает транспорт FLS2 в поздний эндосомальный путь, связанный с деградацией рецептора. Лиганд-индуцированный эндоцитоз является консервативным механизмом. Запуск иммунной системы растений приводит к активации всех рецепторов на поверхности мембран, которые далее локализуются в ранних эндосомах. Это подчеркивает общий путь транспортировки активных рецепторов растений, подтверждая гипотезу, а также и наши данные том, что эндоцитоз рецепторов нацелен на один и тот же конечный пункт – вакуоль. Такой путь, по-видимому, является общим у различных типов семейств рецепторов и рецепторных киназ для доставки грузов с поверхности клетки в вакуоль. Известно, что патогены секретируют эффекторы, вызывающие перемещение эндосомального FLS2 в место заражения [40], что подтверждает нацеленность патогенов на этот общий эндосомальный путь подавления рецептор-опосредованного иммунитета растений.

Таким образом, были сделаны следующие выводы: 1) действие биотического стресса не оказало влияния на ультраструктуру КГ и процесс образования РЭ в клетках корней исследуемых растений, что крайне важно для правильного функционирования эндосомального пути в клетках растений; 2) бактериальный пептид у нокаут-мутанта активирует процессы защиты клеток от патогенов путем запуска синтеза защитных белков и их транспорта к ПМ и в ПП (секреторный путь). В тоже время, растения ДТ избавляются от патогена с поверхности клетки, запуская flg22-индуцированный эндоцитоз с образованием ПМТ [24, 39], в формировании которых, скорее всего, принимают участие флотилины, которые определяют количество и размерность ПМТ. Учитывая фундаментальную важность секреторных путей для защиты растений от действия стрессовых факторов окружающей среды, необходимо понимать роль различных типов секреторных пузырьков (КГ/РЭ, ПЭ/МВТ и экзосом) в запуске соответствующих иммунных реакций.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации (№ 122042700044-6 и № 122042700043-9).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mahalingam R. Consideration of combined stress: a crucial paradigm for improving multiple stress tolerance in plants // Combined Stresses in Plants / Ed. R. Mahalingam. Springer Intern. Publ. Switzerland. 2015. P. 1. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07899-1_1
2. Jones J.D., Dangl J.L. The plant immune system // Nature. 2006. V. 444. P. 323.
3. Inada N., Ueda T. Membrane trafficking pathways and their roles in plant-microbe interactions // Plant Cell Physiol. 2014. V. 55. P. 672. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu046>
4. Ortiz-Moreno F.A., Savatin D.V., Dejonghe W., Kumar R., Luo Y., Adamowski M., Van den Begin J., Dressano K., Pereira de Oliveira G., Zhao X., Lu Q., Madder A., Friml J., Scherer de Moura D., Russinova E. Danger-associated peptide signaling in Arabidopsis requires clathrin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. P. 11028. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605588113>
5. Geldner N., Robatzek S. Plant receptors go endosomal: A moving view on signal transduction // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1565. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120287>
6. Freidit Frey N., Robatzek S. Trafficking vesicles: pro or contra pathogens? // Curr. Opin. Plant Biol. 2009. V. 12. P. 437. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.002>
7. Sorkin A., von Zastrow M. Endocytosis and signalling: Intertwining molecular networks // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009. V. 10. P. 609. <https://doi.org/10.1038/nrm2748>
8. Li R., Liu P., Wan Y., Chen T., Wang Q., Mettbaach U., Baluska F., Samaj J., Fang X., 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. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.095695>
9. Khalilova L.A., Sergienko O.V., Orlova Y.V., Myasoedov N.A., Karpichev I.V., Balnokin Y.V. Arabidopsis thaliana mutant with t-DNA insertion in the Flot1 (At5g25250) gene promoter possesses increased resistance to NaCl // Russ. J. Plant Physiol. 2020. V. 67. P. 275. <https://doi.org/10.1134/S1021443720020077>
10. Khalilova L.A., Voronkov A.S. The membrane nanodomain Flot1 protein participates in formation of the early endosomes in the root cells of Arabidopsis thaliana // Russ. J. Plant Physiol. 2023. V. 70. P. 74. <https://doi.org/10.1134/S1021443723600307>
11. Boller T., Felix G. A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors // Ann. Rev. Plant Biol. 2009. V. 60. P. 379. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
12. Böhm H., Albert I., Fan L., Reinhard A., Nürnberger T. Immune receptor complexes at the plant cell surface // Curr. Opin. Plant Biol. 2014. V. 20. P. 47. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.04.007>

13. Dodds P.N., Rathjen J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions // Nat. Rev. Genet. 2010. V. 11. P. 539.
<https://doi.org/10.1038/nrg2812>
14. Monaghan J., Zipfel C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane // Curr. Opin. Plant Biol. 2012. V. 15. P. 349.
<https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.006>
15. Kunze G., Zipfel C., Robatzek S., Niehaus K., Boller T., Felix G. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 3496.
<https://doi.org/10.1105/tpc.104.026765>
16. Robatzek S., Chinchilla D., Boller T. Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis* // Gene Dev. 2006. V. 20. P. 537.
<https://doi.org/10.1101/gad.366506>
17. Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Jurkiewicz A., Fukai E., Quistgaard E.M.H., Albrechtsen A.S., James E.K., Thirup S., Stougaard J. LysM domains mediate lipochitin-oligosaccharide recognition and Nfr genes extend the symbiotic host range // EMBO J. 2007. V. 26. P. 3923.
<https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601826>
18. Gómez-Gómez L., Boller T. FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis* // Mol. Cell. 2000. V. 5. P. 1003.
[https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80265-8](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80265-8)
19. Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J.D., Felix G., Boller T. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence // Nature. 2007. V. 448. P. 497.
<https://doi.org/10.1038/nature05999>
20. Sun Y., Li L., Macho A.P., Han Z., Hu Z., Zipfel C., Zhou J.M., Chai J. Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex // Sci. 2013. V. 342. P. 624.
<https://doi.org/10.1126/science.1243825>
21. Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D., Felix G., Boller T. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception // Nature. 2004. V. 428. P. 764.
<https://doi.org/10.1038/nature02485>
22. Salomon S., Robatzek S. Induced endocytosis of the receptor kinase FLS2 // Plant Signal. Behav. 2006. V. 1. P. 293.
<https://doi.org/10.4161/psb.1.6.3594>
23. Russinova E., Borst J.W., Kwaaitaal M., Caño-Delgado A., Yin Y., Chory J., de Vries S.C. Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1) // Plant Cell. 2004. V. 16. P. 3216.
<https://doi.org/10.1105/tpc.104.025387>
24. Beck M., Zhou J., Faulkner C., MacLean D., Robatzek S. Spatio-temporal cellular dynamics of the *Arabidopsis* flagellin receptor reveal activation status-dependent endosomal sorting // Plant Cell. 2012. V. 24. P. 4205.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.100263>
25. Lu D., Lin W., Gao X., Wu S., Cheng C., Avila J., Heese A., Devarenne T.P., He P., Shan L. Direct ubiquitination of pattern recognition receptor FLS2 attenuates plant innate immunity // Sci. 2011. V. 332. P. 1439.
<https://doi.org/10.1126/science.1204903>
26. Smith J.M., Salamango D.J., Leslie M.E., Collins C.A., Heese A. Sensitivity to Flg22 is modulated by ligand-induced degradation and de novo synthesis of the endogenous flagellin-receptor FLAGELLIN SENSING2 // Plant Physiol. 2014. V. 164. P. 440.
<https://doi.org/10.1104/crp.113.229179>
27. Scheuring D., Künzl F., Viotti C., Yan M.S., Jiang L., Schellmann S., Robinson D.G., Pimpl P. Ubiquitin initiates sorting of Golgi and plasma membrane proteins into the vacuolar degradation pathway // BMC Plant Biol. 2012. V. 12. P. 164.
<https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-164>
28. Ben Khaled S., Postma J., Robatzek S. A moving view: subcellular trafficking processes in pattern recognition receptor-triggered plant immunity // Ann. Rev. Phytopathol. 2015. V. 53. P. 379.
<https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120347>
29. Mishina T.E., Zeier J. Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis* // Plant J. 2007. V. 50. P. 500.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03067.x>
30. Khalilova L.A., Lobreva O.V., Nedelyaeva O.I., Karpichev I.V., Balnokin Y.V. Involvement of the membrane nanodomain protein, AtFlot1, in vesicular transport of plasma membrane H⁺-ATPase in *Arabidopsis thaliana* under salt stress // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 1251.
<http://doi.org/10.3390/ijms24021251>
31. Narasimhan M., Gallei M., Tan S., Johnson A., Verstraeten I., Li L., Rodriguez L., Han H., Himschoot E., Wang R., Vanneste S., Sánchez-Simarro J., Aniento F., Adamowski M., Friml J. Systematic analysis of specific and nonspecific auxin effects on endocytosis and trafficking // Plant Physiol. 2021. V. 186. P. 1122.
<https://doi.org/10.1093/plphys/kiab134>
32. Keinath N.F., Kierszniowska S., Lorek J., Bourdais G., Kessler S.A., Shimosato-Asano H., Grossniklaus U., Schulze W.X., Robatzek S., Panstruga R. PAMP (pathogen-associated molecular pattern)-induced changes in plasma membrane compartmentalization reveal novel components of plant immunity // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. P. 39140.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M110.160531>
33. Malinsky J., Opekarova M., Grossmann G., Tanner W. Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi // Annu. Rev. Plant Biol. 2013. V. 64. P. 501.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120103>
34. Yu M., Liu H., Dong Z., Xiao J., Su B., Fan L., Komis G., Samaj J., Lin J., Li R. The dynamics and endocytosis of Flot1 protein in response to flg22 in *Arabidopsis* // J. Plant Physiol. 2017. V. 215. P. 73.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.05.010>

35. Cui Y., Li X., Yu M., Li R., Fan L., Zhu Y., Lin J. Sterols regulate endocytic pathways during flg22-induced defense responses in *Arabidopsis* // *Development*. 2018. V. 145. dev165688.
<https://doi.org/10.1242/dev.165688>
36. Yeh Y.H., Chang Y.H., Huang P.Y., Huang J.B., Zimmerli L. Enhanced *Arabidopsis* pattern-triggered immunity by overexpression of cysteine-rich receptor-like kinases // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 322.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00322>
37. Koh S., Andre A., Edwards H., Ehrhardt D., Somerville S. *Arabidopsis thaliana* subcellular responses to compatible *Erysiphe cichoracearum* infections // *Plant J.* 2005. V. 44. P. 516.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2005.02545.x>
38. Assaad F.F., Qiu J.L., Youngs H., Ehrhardt D., Zimmerli L., Kalde M., Wanner G., Peck S.C., Edwards H., Ramonell K., Somerville C.R., Thordal-Christensen H. The PEN1 syntaxin defines a novel cellular compartment upon fungal attack and is required for the timely assembly of papillae // *Mol. Biol. Cell.* 2004. V. 15. P. 5118.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0140>
39. Choi S.W., Tamaki T., Ebine K., Uemura T., Ueda T., Nakano A. RABA members act in distinct steps of subcellular trafficking of the FLAGELLIN SENSING2 receptor // *Plant Cell.* 2013. V. 25. P. 1174.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.108803>
40. Mbengue M., Bourdais G., Gervasi F., Beck M., Zhou J., Spallek T., Bartels S., Boller T., Ueda T., Kuhn H., Robatzek S. Clathrin-dependent endocytosis is required for immunity mediated by pattern recognition receptor kinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 11034.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1606004113>