

УДК 581.1

ХЛОРИДНЫЕ КАНАЛЫ И ТРАНСПОРТЕРЫ СЕМЕЙСТВА CLC У РАСТЕНИЙ

© 2020 г. О. И. Неделева^а, *, А. В. Шувалов^а, Ю. В. Балнокин^а

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

*e-mail: olga.nedelyaeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.02.2020 г.

После доработки 16.03.2020 г.

Принята к публикации 17.03.2020 г.

Белки семейства хлоридных каналов CLC (ChLoride Channel) обнаружены у прокариот и эукариот. Семейство включает анионные каналы и анион/протонные антипортеры. В растениях белки CLC обнаруживаются в разных тканях и разных внутриклеточных мембранах. Белки CLC выполняют множество функций и играют важную роль в ключевых физиологических процессах, таких как нитратное и хлоридное гомеостатирование, проявляющееся как на уровне клетки, так и целого растения, регуляция трансмембранного электрического потенциала мембран органелл и pH их люменов, участие в распределении *de novo* синтезированных белков по внутриклеточным компартментам, формирование механизмов, лежащих в основе устойчивости растений к стрессовым факторам биотической и абиотической природы и ряде других процессов. В обзоре приводится информация об известных на сегодняшний день белках CLC растений, гены которых идентифицированы на молекулярно-генетическом и функциональном уровнях, приводятся и обсуждаются данные о белках CLC из *Arabidopsis thaliana* и других видов растений с акцентом на результаты, полученные в последнее десятилетие. Рассматриваются функциональные и структурные аспекты растительных CLC-белков, их физиологическая роль в нормальных и стрессовых условиях. Приводится гипотеза об участии эндосом и локализованных в эндосомальных мембранах белках семейства CLC в анионном гомеостатировании цитоплазмы. Кратко рассматриваются возможные направления дальнейших исследований семейства CLC растений.

Ключевые слова: семейство хлоридных каналов (CLC), *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Glycine soja*, *Zea mays*, *Poncirus trifoliata*, *Thellungiella halophila*, *Suaeda altissima*, анионные каналы, анион/протонные антипортеры, анионное гомеостатирование

DOI: 10.31857/S0015330320050103

ВВЕДЕНИЕ

Название семейства хлоридных каналов (CLC – ChLoride Channel) произошло от первого открытого белка этого семейства CLC-0, обнаруженного в электрическом органе ската *Torpedo californica* и оказавшегося потенциал-зависимым хлоридным каналом [1]. Долгое время считалось, что белки этого семейства участвуют только в пассивном транспорте хлорид-иона, то есть как и CLC-0 являются хлоридными каналами. Клонирование похожих генов из других организмов и исследование функций кодируемых ими белков путем экспрессии в ооцитах шпорцевой лягушки [2] привело к открытию многих родственных генов [3]. Обнаружили, что семейство CLC включает не только анионные каналы, но и анион/протонные антипор-

теры. Последние могут осуществлять вторично-активный транспорт анионов в обмен на протоны, используя в качестве источника энергии градиент электрохимического потенциала протонов.

Белки семейства хлоридных каналов являются мембранными интегральными белками, которые включают 10–12 трансмембранных доменов [4]. Все эукариотические CLC содержат два гидрофильных регуляторных CBS-домена (цистатионин-β-синтеазных домена) [5]. Еще одной особенностью белков семейства CLC является наличие трех аминокислотных мотивов, участвующих в формировании анион-проводящего пути: (1) GxGxPE, (2) GKxGPxxH, (3) PxxGxLF [6–8]. Мотив (1) является селективным фильтром [8, 9]. Присутствие в нем серина (GSGxPE) определяет его хлоридную специфичность [10, 11], а пролина (GPGxPE) – нитратную специфичность [12, 13]. Анион/протонным антипортерам свойственно на-

Сокращения: АГ – аппарат Гольджи, ДТ – дикий тип, ЭПР – эндоплазматический ретикулум, CBS-домен – цистатионин-β-синтеазный домен.

личие двух ключевых консервативных глутаматов – “воротного” и “протонного”. У *Escherichia coli* воротный и протонный глутаматы занимают положения 148 (E148) и 203 (E203) соответственно [9, 14]. Воротный глутамат отвечает за воротный процесс, контролирующей его ионную проводимость [9]. У анионных каналов этого семейства может присутствовать лишь один, а именно воротный глутамат. Протонный глутамат участвует в сопряжении переноса аниона с противоположно направленным транспортом протона [14]. Воротный глутамат находится в мотиве (2) – GKEGRxxH. Протонный глутамат расположен в четвертой позиции, следующей за мотивом (3) – RxxGxLFxxxE [4]. Белки CLC могут функционировать в мономерной и гомодимерной формах. Каждый мономер образует ион-проводящий путь [5].

Представители семейства CLC широко распространены среди организмов, они найдены у прокариот, грибов, животных и растений. Девять представителей этого семейства обнаружено у млекопитающих [15], семь найдено у *Arabidopsis thaliana* [7]. Цитрусовые, соя, кукуруза, рис и тополь содержат в своих геномах от 5 до 9 генов CLC [16]. Семнадцать генов CLC идентифицировано у *Nicotiana tabacum* [17] и 22 гена у *Brassica napus* [18].

Филогенетический анализ последовательностей белков семейства CLC у растений показывает, что большая часть известных белков этого семейства образует “эукариотическую” ветвь. Остальные белки CLC растений в наибольшей степени родственны бактериальным CLC и формируют далеко отстоящую от эукариот “прокариотическую” ветвь. На рис. 1 представлена дендрограмма, построенная нами на основе последовательностей белков CLC, кодируемых клонированными из растений генами. Обе ветви присутствуют на дендрограмме, как и в работе [19].

Являясь анионными каналами и анион/протонными антипортерами, белки семейства CLC участвуют во множестве процессов и физиологических функций. О важной роли белков CLC свидетельствуют генетические болезни млекопитающих, вызываемые нарушениями в первичной структуре генов CLC, такие, например, как идиопатическая эпилепсия, синдром Баттера, болезнь Дента, остеопетроз и многие виды миопатии [3]. У растений белки CLC вовлечены в устьичные движения, в транспорт анионов из цитоплазмы в вакуоль, осморегуляцию и поддержание тургора, формирование устойчивости к биотическим и абиотическим стрессам. Так же как представители CLC других царств, CLC растений играют важную роль в везикулярном транспорте, регулируя pH люменов органелл и их мембранный потенциал [20, 21].

Лучше всего изучены белки семейства CLC у млекопитающих. Данные о них представлены в ряде

исчерпывающих обзоров [15, 22–25]. Меньше известно о представителях семейства CLC растений. Вместе с тем за время, прошедшее после опубликования последних обзоров, посвященных семейству CLC растений [7, 26], о нем появилось много новой информации. Значительная часть новых данных традиционно получена с использованием модельного растения *A. thaliana*. Наряду с этим существенно увеличился перечень видов растений, у которых представители CLC идентифицированы на молекулярно-генетическом и функциональном уровнях. Полученная за это время информация о семействе CLC растений нуждается в систематизации и обобщении, что и явилось мотивацией для написания данного обзора. В настоящем обзоре приводятся и обсуждаются данные о белках семейства CLC из *A. thaliana* и других видов растений с акцентом на результаты, полученные в последнее десятилетие. Рассматриваются функциональные и структурные аспекты растительных CLC-белков, их физиологическая роль в нормальных и стрессовых условиях.

СЕМЕЙСТВО БЕЛКОВ CLC У *ARABIDOPSIS THALIANA*

Семейство CLC у *A. thaliana* включает 7 белков, которые локализованы во внутриклеточных мембранах: AtCLCa, AtCLCb, AtCLCc, AtCLCd, AtCLCe, AtCLCf и AtCLCg [27–29] (рис. 2.). Уровень экспрессии генов *AtCLCa-g* в значительной степени зависит от ткани и органа растения, а также от стадии его развития [19]. Почти все представители семейства AtCLC экспрессируются в сосудистых тканях, что предполагает участие этих белков в дальнем транспорте ионов [19]. Исключением являются AtCLCc и AtCLCe. AtCLCc экспрессируется преимущественно в замыкающих клетках устьиц [19, 30], а AtCLCe – в фотосинтезирующих тканях [19]. AtCLCa-AtCLCc и AtCLCg локализованы в вакуолярных мембранах [19, 29–32], AtCLCe – в тилакоидах хлоропластов [28], а AtCLCd и AtCLCf – в аппарате Гольджи [19, 20, 28].

Функции белков семейства CLC у *A. thaliana* остаются до конца не выясненными. Транспорт анионов и анионная селективность в прямых экспериментах продемонстрированы только для двух представителей этого семейства – AtCLCa и AtCLCb [31, 32]. В аминокислотных последовательностях AtCLCa-AtCLCd содержатся оба консервативных глутамата, как протонный, так и воротный [26]. AtCLCg содержит только протонный глутамат, а AtCLCe и AtCLCf – только воротный глутамат. Это дает основание предположить, что AtCLCa-AtCLCd функционируют как анион/протонные антипортеры, а у AtCLCe-AtCLCg – другой механизм транспорта анионов [19, 26]. Ниже при-

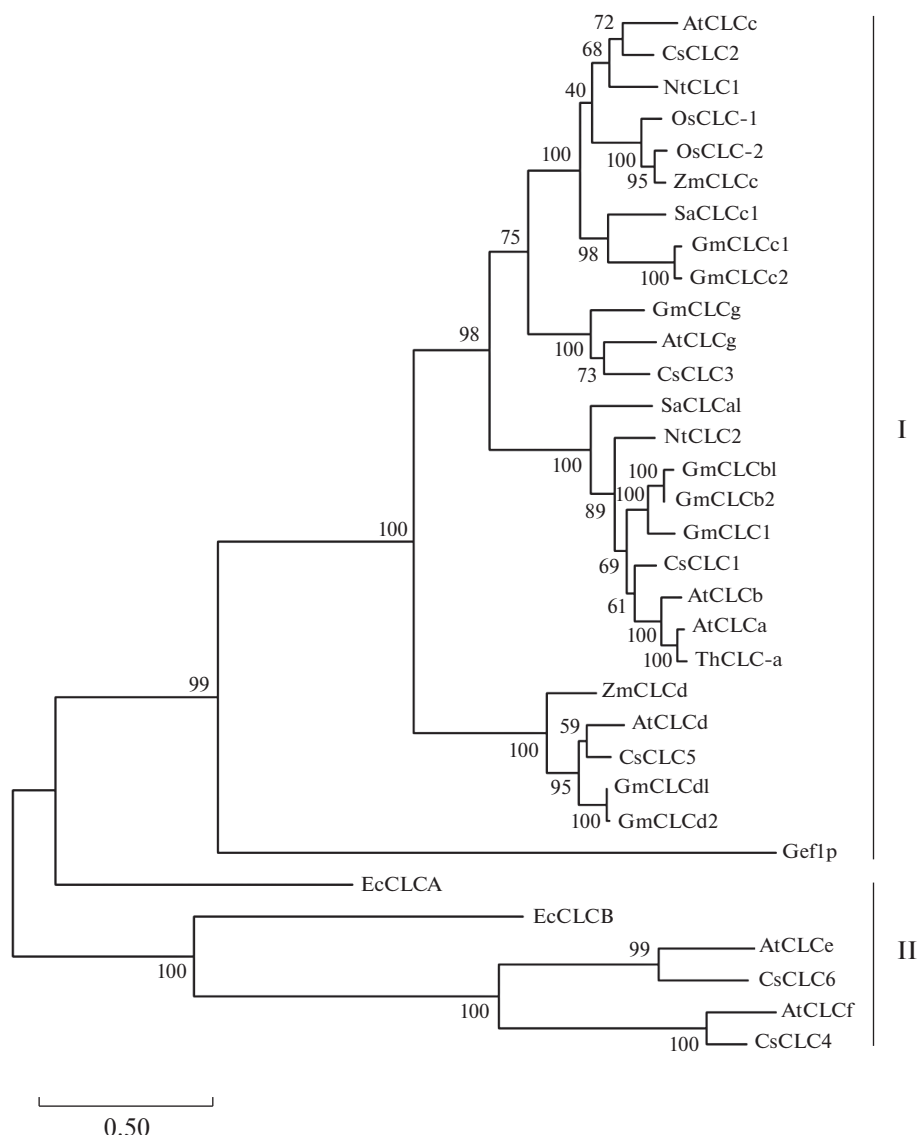


Рис. 1. Филогенетическое дерево, иллюстрирующее степень сходства между белками семейства CLC *S. cerevisiae*, *E. coli* и растений (*A. thaliana*, *O. sativa*, *N. tabacum*, *G. max*, *Z. mays*, *P. trifoliolate*, *T. halophila*, *S. altissima*). EcCLCA (P37019), EcCLCB (P76175.2), Gef1p (P37020.2), AtCLCa (NP_198905.1), AtCLCb (NP_189353.1), AtCLCc (NP_199800.1), AtCLCd (NP_197996.1), AtCLCe (NP_001190924.1), AtCLCf (Q8RXR2.2), AtCLCg (NP_198313.2), NtCLC1 (NP_001312418.1), NtCLC2 (AAD29679.1), OsCLC-1 (BAB97267.1), OsCLC-2 (BAB97268.1), GmCLC1 (AAY43007.1), GmCLCb1 (KRH06955.1), GmCLCb2 (XP_003553925.1), GmCLCc1 (XP_003533268.2), GmCLCc2 (XP_006599656.1), GmCLCd1 (XP_003517583.1), GmCLCd2 (XP_006590397.1), GmCLCg (XP_003542650.1), ZmCLCc (AAP04392.2), ZmCLCd (AGR03817.1), PtrCLC1 (Cs2g25150), PtrCLC2 (Cs3g03450), PtrCLC3 (Cs4g05340), PtrCLC4 (Cs4g07570), PtrCLC5 (Cs9g06580), PtrCLC6 (orange1.1t03372), ThCLC-a (ADD09860.1), SaCLCa1 (ANG09048.1), SaCLCc1 (AVQ93350.1). Все последовательности белков взяты из NCBI, за исключением последовательностей *P. trifoliolate*, полученных из базы данных (<http://citrus.hzau.edu.cn/cgi-bin/orange/search>). Подгруппа I – “эукариотическая” ветвь, подгруппа II – “прокариотическая” ветвь. Филогенетическое дерево построили в программе MEGA X v. 10.0.1 (<https://www.megasoftware.net/>) методом максимального правдоподобия, основанном на модели Джонаса-Тейлора-Торнтонна. Проведено 100 бутстреп-репликаций, в узлах указаны значения бутстреп-поддержки.

ведено подробное описание каждого представителя семейства CLC у *A. thaliana*.

AtCLCa был первым исследованным на функциональном уровне потенциал-зависимым NO_3^-/H^+ -антипортером семейства хлоридных каналов у *A. thaliana* [31, 33].

На растениях дикого типа (ДТ) и нокаут-мутантах *clca* методом локальной фиксации потенциала на выделенных вакуолях был продемонстрирован перенос анионов через мембрану белком AtCLCa. Перенос анионов был сопряжен со встречным потоком протонов, стехиометрия NO_3^-/H^+ обмена составля-

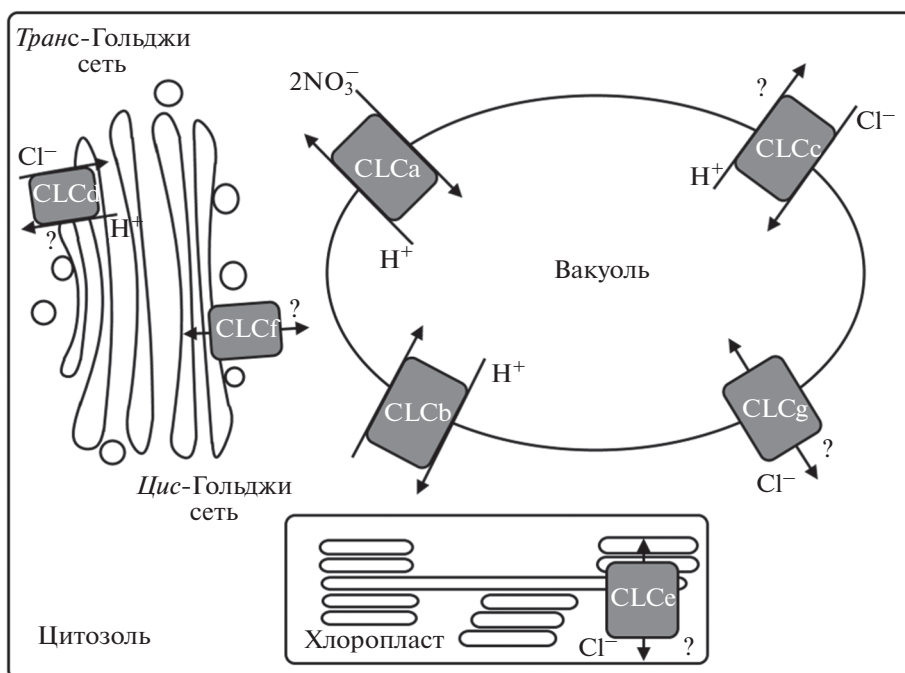


Рис. 2. Внутриклеточная локализация белков семейства CLC у *A. thaliana* (по [7] с изменениями). Все белки семейства CLC локализованы во внутриклеточных мембранах: AtCLCa-с и AtCLCg – в тонопласте, AtCLCd и AtCLCf – в мембранах АГ, AtCLCe – в тилакоидах.

ла 2 : 1. Селективность AtCLCa убывала в ряду $\text{NO}_3^- \approx \text{I}^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-} >$ глутамат. AtCLCa транспортировал NO_3^- в вакуоль при физиологических значениях мембранного потенциала и концентрациях NO_3^- в цитозоле ($-40 \dots -20$ мВ и $4.2 \dots 19.2$ мМ соответственно) [31].

Методом локальной фиксации потенциала также показано, что замена воротного глутамата Glu-203 AtCLCa на аланин (E203A) путем сайт-направленного мутагенеза привела к разобщению анион/ H^+ -проводимости. Транспорт аниона у этого мутанта не сопровождался транспортом H^+ [12]. Замещение протонного глутамата Glu-270 аланином (E270A) привело к прекращению переноса ионов AtCLCa [12]. Однако замена обеих аминокислот в последовательности белка AtCLCa (E203A, E270A) привела к тому же эффекту, что и замена только воротного глутамата. Транспорт Cl^- , разобщенный с переносом H^+ , у белка AtCLCa (E203A, E270A) восстанавливался [12]. Предполагается, что Glu-270 важен для транспорта и аниона, и протона [7]. Пролин в положении 160 отвечает за нитратную селективность белка AtCLCa и его проводимость. Замена пролина у AtCLCa на серин в положении 160 привела к изменению селективности белка. AtCLCa(P160S) транспортировал Cl^- с большей эффективностью, чем NO_3^- [13]. Результаты цитированных работ указывают на вовлечение AtCLCa в NO_3^- гомеостаз и рН-статирование цитоплазматического

и вакуолярного компартментов, а также на участие ключевых глутаматов и мотива селективного фильтра в регуляции анион/протонного обмена через тонопласт.

На важную функциональную роль белка AtCLCa указывают результаты исследования экспрессии и активности промотора его гена. *AtCLCa* экспрессируется во всех органах и на всех стадиях онтогенеза *A. thaliana*. Наибольший уровень транскрипции гена наблюдается в листьях. Показано, что количество транскриптов *AtCLCa* было наибольшим у 2-недельных растений и заметно снижалось с их возрастом [19]. Активность промотора *AtCLCa*, измеренная с помощью репортерного фермента β -глюкуронидазы, проявлялась уже у проростков *A. thaliana* и обнаруживалась во всех органах взрослых растений [19]. Наибольшая активность промотора гена была найдена в устьичных клетках семян и зрелых листьях [34].

Экспрессия *AtCLCa* в 5–10 раз выше экспрессии остальных генов семейства *AtCLC* [32]. Количество транскриптов *AtCLCa* возрастает в корнях и надземных органах в ответ на добавление нитрата в среду культивирования [32, 33]. Экспрессия *AtCLCa* изменяется в течение суток. На протяжении почти всего темного периода количество транскриптов *AtCLCa* было в 2–3 раза больше, чем в световой период. Предполагается, что AtCLCa участвует в запасании нитрат-иона в вакуолях в течение ночи, когда восстановление NO_3^- подавлено [32].

Помимо регуляции экспрессии гена *AtCLCa* на транскрипционном уровне имеются данные о регуляции активности этого транспортера некоторыми метаболитами. Фосфатидилинозитол-3,5-бисфосфат (PI(3,5)P₂) подавляет активность *AtCLCa*, что стимулирует закисление вакуолярного люмена [36]. Методом локальной фиксации потенциала на выделенных из клеток *A. thaliana* вакуолях продемонстрировано, что АТФ обратимо ингибирует транспортную активность *AtCLCa*. АДФ и АМФ не подавляют активность *AtCLCa*. С-конец белка *AtCLCa*, обращенный в цитозоль и содержащий два CBS-мотива, участвует в узнавании и связывании АТФ. Однако АМФ конкурирует с АТФ за сайт связывания *AtCLCa*, препятствуя ингибиторному эффекту АТФ. Подобного эффекта не обнаружено для АДФ. Аффинность нуклеотидов к белку *AtCLCa* убывает в ряду АТФ \approx АМФ > АДФ. Сайт-направленный мутагенез *AtCLCa*, приводящий к замене аспартата на аланин (D753A), полностью нивелировал ингибиторный эффект АТФ, что свидетельствует о непосредственном участии аспартата в положении 753 в регуляторном связывании с АТФ. Таким образом, размер запасного пула нитрата, определяемого активностью *AtCLCa*, может регулироваться изменением отношения АТФ/АМФ, которое определяется скоростью метаболических процессов, например, фотосинтеза и ассимиляции нитрата [37].

AtCLCa принимает непосредственное участие в ближнем транспорте нитрата, осуществляя перенос этого аниона из цитоплазмы в вакуоль, а также в накоплении нитрата в целом растении. Нокаут-мутанты *clca* обладают ярко-выраженным фенотипом. Содержание нитрата при стандартной концентрации этого аниона в питательной среде (10–50 мМ) в корнях и надземных органах мутантов было в 2 раза ниже, а содержание нитрита и малата в 1.5–2 раза выше, чем у растений ДТ [33, 38]. Мутация *clca* приводит к перераспределению нитрата между внутриклеточными компартментами. Накопление нитрата снижается в вакуоли, и, соответственно, увеличивается концентрация NO₃⁻ в цитозоле клеток [39]. Предполагается, что увеличение содержания нитрата в клетках корня является индуктором экспрессии нитратного транспортера *AtNRT1.5*, участвующего в загрузке нитрата в ксилему, и подавляет экспрессию *AtNRT1.8*, отвечающего за обратное поступление нитрата в клетку из ксилемы [39]. В результате изменения экспрессии этих генов увеличивается содержание нитрата в ксилемном соке и в цитозоле клеток надземных органов мутанта *clca*, что вызывает повышение активности нитратредуктазы и глутаминсинтетазы. Повышение активности этих ферментов, в свою очередь, приводит к возрастанию эффективности утилизации азота (NUE – Nitrogen Use Efficiency) у мутантов *clca* по сравнению с растениями ДТ [18, 39] (рис. 3). Наряду с этим в корнях мутанта

clca подавляется экспрессия генов нитратных транспортеров *AtNPF6.3(NRT1.1)*, *AtNRT2.1* и *AtNRT2.5*, отвечающих за поглощение нитрата из почвы, что может быть следствием повышения концентрации нитрата и/или нитрита в цитозоле клеток корня [38].

Мутация *clca* приводит к изменению уровней экспрессии остальных генов семейства *CLC*, что, вероятно, связано с потребностью восстановить ионный баланс тканей. Экспрессия *AtCLCb*–*AtCLCd*, *AtCLCf* и *AtCLCg* возрастает в 2–10 раз, а экспрессия *AtCLCe* в 2–3 раза снижается. Механизмы, лежащие в основе зависимости экспрессии генов *CLC* и нитратных транспортеров от экспрессии *AtCLCa*, остаются невыясненными [38].

AtCLCa осуществляет не только компартментацию нитрата в вакуолях. Wege с соавторами показали, что во время закрывания устьиц, происходящего в ответ на действие АБК, через *AtCLCa* происходит обратный выход анионов из вакуоли в цитозоль [34]. Направление переноса NO₃⁻ (вход/выход) через белок *AtCLCa* зависит от фосфорилирования/дефосфорилирования треонина в положении 38 (Thr³⁸) на N-конце *AtCLCa*, обращенном в цитоплазму. Thr³⁸ является основной мишенью киназы OST1 (Open Stomata kinase) и необходим для модуляции активности *AtCLCa* в ответ на действие АБК. Фосфорилирование Thr³⁸ киназой OST1 приводит к увеличению выходящего анионного тока через вакуолярную мембрану, что является необходимым условием для закрывания устьиц [34]. В этой работе, а также в фосфопротеомном исследовании [40] обнаружен второй сайт фосфорилирования *AtCLCa* (Ser⁴⁰) на N-конце, расположенный рядом с первым. Однако до настоящего времени функция Ser⁴⁰ не определена.

Направление анионного транспорта через *AtCLCa* может регулироваться фосфатазой PP2A (Protein Phosphatase 2A). Показано взаимодействие каталитической субъединицы С5 этого фермента с *AtCLCa* [41]. Таким образом, *AtCLCa* осуществляет транспорт нитрата через тонопласт в двух направлениях: из цитоплазмы в вакуоль и из вакуоли в цитоплазму в зависимости от потребности клетки. Это означает, что физиологическая роль *AtCLCa* не сводится к созданию вакуолярного нитратного пула, этот белок участвует также в реутилизации накопленного ранее в вакуолях нитрата [42, 43]. *AtCLCa* также важен для регуляции устьичных движений, как открывания, так и закрывания устьиц.

AtCLCb – второй NO₃⁻/H⁺-антипортер тонопласта, осуществляющий перенос нитрата через тонопласт. По аминокислотной последовательности *AtCLCb* в наибольшей степени сходен с *AtCLCa* [32].

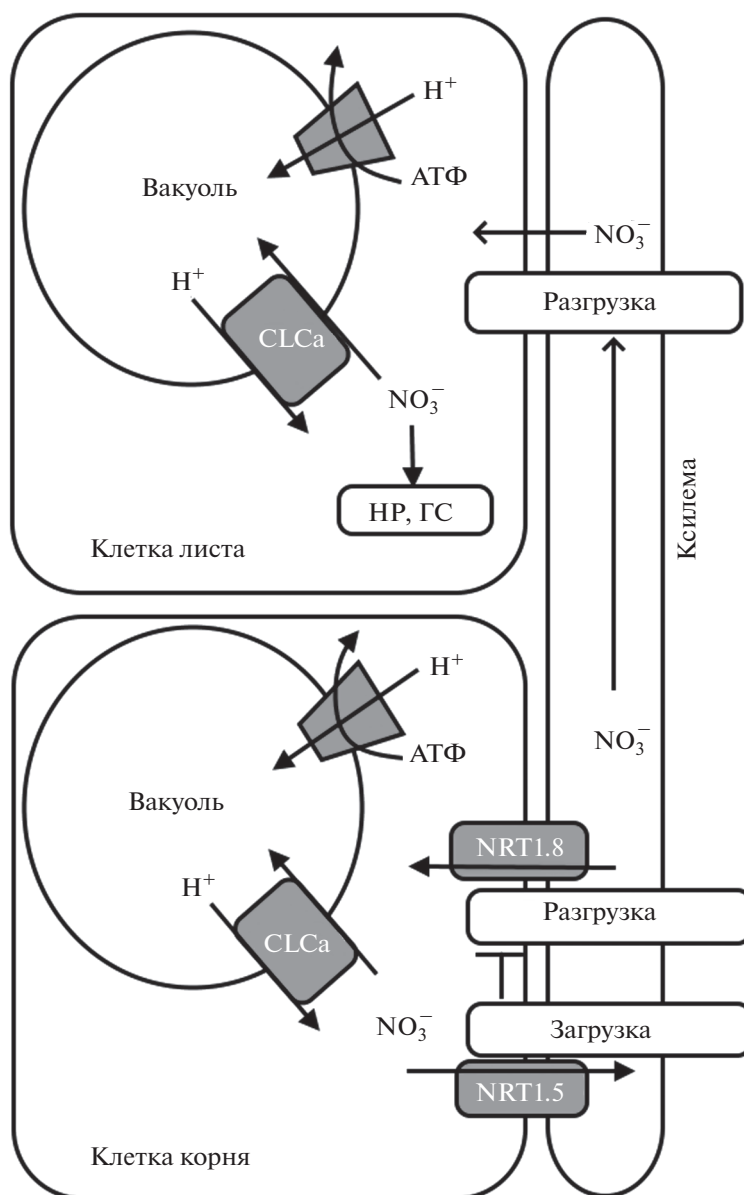


Рис. 3. Гипотеза, объясняющая участие транспортера *AtCLCa* в дальнем транспорте нитрата (по [39] с изменениями). *AtCLCa* отвечает за ближний транспорт нитрата, регулируя его распределение между вакуолью и цитозолем. Транспортёры *AtNRT1.5* и *AtNRT1.8* осуществляют транспорт нитрата в ксилему и из ксилемы, соответственно. При повышении концентрации NO_3^- в цитоплазме *AtNRT1.5* загружает нитрат в ксилему, при снижении цитоплазматической концентрации NO_3^- последний переносится из ксилемы в цитоплазму белком *AtNRT1.8*. Обозначения: НР – нитратредуктаза, ГС – глутаминсинтетаза.

Исследование экспрессии *AtCLCb* и активности промотора этого гена показало, что паттерны экспрессии *AtCLCb* отчасти совпадают с таковыми *AtCLCa*. Однако *AtCLCb* экспрессируется преимущественно на ранних стадиях развития растений. Наибольшая экспрессия наблюдается в гипокотиле, семядолях и корнях проростков, а также лепестках и тычиночных нитях цветков растений [19, 32].

Повышение концентрации нитрата в питательной среде приводит к небольшой индукции экспрессии *AtCLCb* [32]. Экспрессия *AtCLCb* значительно изменяется в течение суток. Количество транскриптов гена постепенно возрастает на протяжении всего темного периода, достигая максимального значения в предрассветные часы (увеличивается в 20 раз), и затем снижается в течение светового периода до исходного уровня.

Это может быть связано с участием AtCLCb в транспорте накопленного в течение ночи нитрата из вакуоли в цитоплазму для последующей ассимиляции этого аниона в световой период [32].

С помощью метода локальной фиксации потенциала было показано, что перенос анионов через AtCLCb сопряжен с противоположно направленным током протонов. Анионная проводимость AtCLCb убывает в ряду $\text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{малат}^- = \text{I}^-$ [32].

Нокаут-мутанты *clcb* не отличаются от растений ДТ по морфологическим признакам и содержанию ионов при выращивании растений на средах с разным ионным составом и при разной продолжительности фотопериода. На основании того, что у мутанта *clcb* повышена экспрессия гена *AtCLCa* [32], можно предположить, что отсутствие белка AtCLCb компенсируется большим количеством AtCLCa. Вероятно, белок AtCLCb, как и AtCLCa, участвует в накоплении нитрата в вакуолях [32].

По-видимому, активность AtCLCb модулируется путем фосфорилирования/дефосфорилирования аминокислотной последовательности. Показано, что серин в положении 39 (S³⁹) на N-конце AtCLCb является сайтом фосфорилирования [40]. Необходимо также отметить присутствие треонина в аминокислотной последовательности AtCLCb в положении 37 (Thr³⁷), аналогичного Thr³⁸ белка AtCLCa. Очень вероятно, что Thr³⁷ AtCLCb, так же как Thr³⁸ AtCLCa, является сайтом фосфорилирования протеинкиназы OST1 [34]. В работе [41] выявлено взаимодействие AtCLCb с субъединицей C5 фосфатазы PP2A. Вышеприведенные данные дают основание предположить, что AtCLCb, как и AtCLCa, может переносить нитрат в двух направлениях, регулируя его концентрацию в вакуоли и цитозоле в зависимости от внешних факторов, потребностей и физиологического состояния растительного организма. По-видимому, два NO_3^-/H^+ -антипортера тонопласта AtCLCa и AtCLCb могут функционально замещать друг друга.

AtCLCc — хлоридный транспортер тонопласта, локализованный преимущественно в устьичных клетках [30]. Обнаружено, что AtCLCc играет важную роль в регуляции движения устьиц, солеустойчивости растений и, вероятно, может участвовать в гомеостазе нитрата [30, 45]. Показано, что AtCLCc экспрессируется преимущественно в клетках устьиц и пыльце. Обработка эпидермы листьев АБК индуцирует экспрессию *AtCLCc* как в клетках эпидермы, так и в замыкающих клетках устьиц [30].

Нокаут-мутанты *clcc* (Col-0, Ws) отличаются нарушенной регуляцией устьичной проводимости при действии света и АБК. После 2 ч освещения апертура устьиц у мутантов была на треть меньше,

чем у растений ДТ. Обработка АБК не приводила к закрыванию устьиц у мутанта. Вследствие нарушения регуляции движения устьиц температура листьев у *clcc* была выше, чем у растений ДТ. Содержание Cl^- в клетках устьиц у мутанта было меньше, по сравнению с таковым у растений ДТ [30].

Мутация *clcc* не влияет на развитие растений и их морфологию, а также на фертильность пыльцы. Однако мутанты *clcc* характеризуются повышенной чувствительностью к NaCl [30]. Надземные органы мутантных растений при засолении содержали больше хлорид-иона, чем растения ДТ [29].

QTL-анализ (Quantitative Trait Loci), направленный на поиск локусов хромосом, ответственных за накопление нитрата, показал, что AtCLCc может участвовать в гомеостазе этого аниона [45]. В подтверждение этому в побегах растений *clcc A. thaliana* экотипа No-0 было снижено содержание NO_3^- и цитрата и увеличено содержание малата [45].

Белок AtCLCc (Col-0) содержит 2 сайта фосфорилирования, в частности серины S²⁷ и S⁶⁷² на N- и C-концах, соответственно [40, 46]. Фосфорилирование S⁶⁷² индуцировалось обработкой растений хлористым натрием [46]. Показано также взаимодействие N- (1-92) и C- (562-779) концевых частей белка AtCLCc с субъединицей C5 фосфатазы PP2A [41], что предполагает регуляцию активности AtCLCc за счет фосфорилирования/дефосфорилирования его аминокислотной последовательности.

AtCLCd был первым анионным транспортером растений, который обнаружили в компартментах, участвующих в эндоцитозном мембранном трафике. Показано, что AtCLCd находится в мембранах *транс*-Гольджи сети, где он локализован с H^+ -АТФазой V-типа, [19, 20, 27, 28]. Наиболее вероятно, AtCLCd вовлечен в регуляцию pH и концентрации хлорида в люмене *транс*-Гольджи сети и поздних эндосом. Предполагается, что этот белок участвует в транспорте Cl^- в эндосомальный люмен для компенсации накапливающихся там положительных зарядов вследствие функционирования H^+ -АТФазы и стимулирует этим закисление люмена, которое необходимо для эндоцитозного и секреторного процессов [20].

Активность промотора гена *AtCLCd* наблюдалась во всех органах и тканях, уровень активности промотора зависел от стадии развития и органа растений. Наиболее заметной активностью промотора *AtCLCd* была в корнях и семядолях проростков, гидатодах и цветках, особенно в пыльниках и пыльце [20]. С помощью вестерн-блоттинга белок AtCLCd детектировали во всех органах, наибольшее количество этого белка было в стручках [27].

Нокаут-мутанты *clcd* не отличаются от растений ДТ по морфологии, ростовым параметрам и содержанию ионов при разных концентрациях Cl^-

и NO_3^- в среде. Однако рост корней мутантов подавляется на слабо кислых средах (рН 6.8–6.2). Мутанты *clcd* характеризуются повышенной чувствительностью к блокатору H^+ -АТФазы V-типа конканамицину А [20].

Обнаружено, что *AtCLCd* выполняет роль негативного регулятора РАРМ-индуцируемого (Pathogen-Associated Molecular Pattern) иммунитета растений, по-видимому, за счет участия в трафике рецептора *FLS2* (Flagellin-Sensitive 2) [47]. Мутанты *clcd* отличались большей устойчивостью к вирулентному штамму бактерий *Pseudomonas syringae*. Мутация *clcd* приводила к усиленным ранним и поздним ответам при действии элиситоров (*flg22*, *elf18* или хитина). Обработка элиситорами привела к повышению уровня АФК в тканях и большему отложению каллозы у мутанта *clcd* по сравнению с растениями ДТ. Вместе с этим, экспрессия РАРМ-индуцируемых генов (*FRK1* – *Flg22*-induced Receptor-like Kinase 1, *At1g51890*, *At2g17740*), а также гена позднего ответа (*PR1* – *Pathogenesis-Related gene 1*) значительно возрастала у мутанта *clcd* после обработки *flg22* по сравнению с растениями ДТ. Сверхэкспрессия *AtCLCd* в растениях *A. thaliana* привела к противоположным эффектам, растения становились более восприимчивыми к действию патогена. Показано, что экспрессия *AtCLCd* регулируется сигнальными комплексами, включающими РАРМ-распознающий рецептор *FLS2* и киназы *SERK3* и *SERK4* (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase). Связывание элиситоров с этими комплексами приводит к подавлению экспрессии как *AtCLCd*, так и остальных представителей семейства *CLC A. thaliana* [47].

AtCLCe локализован в тилакоидных мембранах хлоропластов [28]. Исследование флуоресценции хлорофилла у мутантов *clce* и растений ДТ выявило участие белка *AtCLCe* в световых реакциях фотосинтеза [19, 28]. При этом мутация *clce* не влияла на параметры роста растений [28]. Исследования кинетики индукции флуоресценции и темновой релаксации возбужденного состояния хлорофилла *a* продемонстрировали у мутанта *clce* лишь незначительные изменения в свето-зависимом переносе e^- в ЭТЦ хлоропластов. У мутантов, однако, наблюдались изменения в соотношении электрической ($\Delta\psi$) и химической (ΔpH) составляющих протондвижущей силы ($\Delta\mu$), которая формировалась на свету, а также нарушения в ультраструктуре хлоропластов [48]. Авторы высказали предположение, что *AtCLCe* участвует в экспорте хлорид-иона из тилакоидного люмена при переходе от условий освещения к темноте и играет лишь второстепенную роль в транспорте Cl^- в люмен тилакоидов в световых реакциях фотосинтеза [48].

Кроме того, имеются данные, свидетельствующие об участии белка *AtCLCe* в гомеостазе нитрата.

Мутация *clce* приводит к фенотипическим проявлениям, сходным с таковыми у мутантных растений *clca*. Мутанты *clce* характеризуются пониженным содержанием нитрата и повышенным содержанием нитрита и малата по сравнению с растениями ДТ. На возможное участие белка *AtCLCe* в гомеостазе нитрата указывают также данные, которые были получены при поиске у *A. thaliana* локусов хромосом, ответственных за накопление нитрата (QTL-анализ) [45]. Тем не менее функции белков *AtCLCa* и *AtCLCe* не дублируют друг друга, на что указывает участие *AtCLCe* в процессах ионного гомеостатирования тилакоидов [38]. Ген *AtCLCe* экспрессируется, главным образом, в надземных органах – листьях, розетках и стручках. Уровень экспрессии *AtCLCe* сопоставим с уровнем экспрессии *AtCLCf* и значительно ниже, чем уровень экспрессии генов *AtCLCa-AtCLCd* [19, 38]. Высказано предположение, что существует взаимодействие (“cross-talk”) между генами *AtCLCe*, *AtCLCa* и генами семейств нитратных транспортеров [38].

AtCLCf локализован преимущественно в цис-Гольджи компартментах и в меньшем количестве – в транс-Гольджи сети [28]. Комплементация геном *AtCLCf* мутантного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* *Δgef1* (мутант по единственному гену семейства *CLC* в этом организме, кодирующему Cl^- транспортер *Gef1p*) показала, что продукт гена *AtCLCf* также, по-видимому, транспортирует хлорид-ионы [28]. *AtCLCf* экспрессируется во всех органах *A. thaliana* [19]. Согласно результатам этой же работы, содержание транскриптов гена *AtCLCf* в органах зависит от возраста растений, оно увеличивается в ходе онтогенеза. Предполагается участие этого белка во внутриклеточном везикулярном трафике через его вовлечение в ионное гомеостатирование аппарата Гольджи и транс-Гольджи сети. Функция *AtCLCf* может частично совпадать с функцией *AtCLCd* [28]. Наряду с этим, имеются данные QTL-анализа, свидетельствующие о возможном участии продукта гена *AtCLCf* в накоплении нитрата у *A. thaliana* [45]. *AtCLCf* остается наименее изученным на сегодняшний день белком семейства *AtCLC*, не до конца выяснены его транспортная функция и физиологическая роль.

AtCLCg локализован в тонопласте и может участвовать в депонировании Cl^- в вакуоли при солевом стрессе [19, 29]. Нокаут-мутанты по этому гену имеют ярко выраженный фенотип. Параметры роста – сырая масса, длина корня, количество боковых корней – у мутантов *clcg* снижены по сравнению с растениями ДТ при выращивании на засоленных средах. Мутанты накапливают больше Cl^- в надземных органах и SO_4^{2-} в корнях в условиях засоления [29].

AtCLCg по аминокислотной последовательности наиболее сходен с *AtCLCc*. Экспрессия *AtCLCg*

подавляется в мутанте *clcc*, и наоборот, экспрессия *AtCLCс* снижается в мутанте *clcg*, что предполагает взаимодействие этих генов [29]. Физиологические функции белков *AtCLCg* и *AtCLCс* не дублируют друг друга, каждый из них вносит свой специфический вклад в солеустойчивость растения: двойной мутант *clccclcg* не отличается повышенной чувствительностью к NaCl по сравнению с мутантами по одному из генов, *clcc* или *clcg* [29].

Наибольшая активность промотора *AtCLCg* наблюдается в клетках мезофилла, флоэме, в клетках паренхимы зоны корневых волосков, гидатодах и прилегающих к ним зонах листовой пластинки. Высокая активность промотора *AtCLCg* в гидатодах может свидетельствовать об участии *AtCLCg* в экскреции Cl⁻-ионов во внешнюю среду в условиях засоления. Наличие активности промотора гена в клетках флоэмы наряду с высоким содержанием хлорида в побегах мутантов дают основание предположить, что *AtCLCg* может быть вовлечен в рециркуляцию Cl⁻. Возможно также участие этого белка в загрузке ксилемы хлоридом. *AtCLCg* в клетках паренхимы корня, расположенных в зоне корневых волосков, может регулировать цитозольную концентрацию Cl⁻ и способствовать компартментации этого аниона в вакуоли в условиях засоления [29].

СЕМЕЙСТВО CLC БЕЛКОВ У ДРУГИХ РАСТЕНИЙ

Полноразмерные последовательности генов семейства CLC клонированы не только из *A. thaliana*, но также и из ряда других растений: табака (*Nicotiana tabacum*) [21, 49, 50], риса (*Oryza sativa*) [51, 52], сои (*Glycine max*) [16, 53], (*Glycine soja*) [16], кукурузы (*Zea mays*) [54–56], понцируса трехлисточкового (*Poncirus trifoliata*) [57, 58], солеисключающего галофита *Thellungiella halophila* [59] и эуалофита *Suaeda altissima* [60, 61].

Первым клонированным геном CLC из растений был *NtCLC1*, продукт которого близок по аминокислотной последовательности *AtCLCс* [49]. *NtCLC1* экспрессировался во всех органах *N. tabacum*. Наибольшая экспрессия наблюдалась в стеблях. Белок *NtCLC1*, экспрессированный в ооцитах лягушки, опосредовал медленно активируемый входящий ток в ответ на гиперполяризацию плазматической мембраны и был проницаем для Cl⁻, NO₃⁻, I⁻, Br⁻ и в меньшей степени для малата, SO₄²⁻ и глутамата [49, 50]. Белок *NtCLC1* локализован в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР) и, как показали эксперименты с рН-чувствительным флуоресцентным красителем рНluoGin, слитым с тетрапептидом HDEL (рНluoGin-HDEL), удерживающим белки в ЭПР, участвует в регуляции рН люмена ЭПР, приводя к его защелачиванию [21]. С помощью секретируемой формы GFP (*secGFP*)

было продемонстрировано участие *NtCLC1* в секретиции белков [21]. Промоторную активность *NtCLC1* детектировали во всех органах растений. Вероятно, *NtCLC1* участвует в росте и развитии растений. Об этом свидетельствует тот факт, что высота растений и размер цветков двойного нокаут-мутанта *nbclca nbclcb* по гомологичным *NtCLC1* генам близкородственного вида *N. benthamiana* меньше, чем у растений ДТ [21]. *NtCLC1* вовлечен также в вирусный патогенез растений табака. Показано взаимодействие *NtCLC1* с белком 6K2 потивируса PVY (*Potato virus Y*). Предполагается, что вирус PVY, связываясь с транспортером *NtCLC1*, активирует последний, что вызывает изменение рН люмена ЭПР и последующее образование из ЭПР вирус-содержащих везикул, доставляющих вирусные частицы к плазмалемме и способствующие этим системной инфекции [21].

Связь белков семейства CLC с вирусным патогенезом была обнаружена также у растений томата *Solanum lycopersicum*, пораженных виroidом веретенновидности клубней картофеля. Транскрипция гомолога *AtCLCb* у томата, *SlCLCb*, замалчивалась малыми РНК вириды за счет деградации мРНК *SlCLCb* [62]. Вирус-индуцируемый сайленсинг *SlCLCb* вызывал замедление роста и курчавость листьев [62], что предполагает важную роль белка *SlCLCb* в росте и развитии растений. Однако функцию *SlCLCb* на клеточном уровне еще предстоит изучить.

В геноме *N. tabacum*, кроме вышеописанного *NtCLC1*, обнаружено еще 16 генов семейства CLC, *NtCLC2-NtCLC17* [17]. Однако транскрипты пяти из них (1, 4, 11, 14, 16) не были обнаружены в органах и тканях растений в этой работе. Гены 6, 7, 9, 10, 17 экспрессировались главным образом в стебле, 3, 5, 8, 12, 13 – в почках, 15 – в пестике. В условиях солевого стресса количество транскриптов всех генов возрастало в надземных органах, а генов 2, 3 и 12 также в корнях. Подавление в растениях *N. benthamiana* экспрессии генов, гомологичных генам 2 и 13 из *N. tabacum*, привело к снижению и увеличению, соответственно, содержания хлорида в надземных органах [17], что предполагает участие этих генов в дальнем транспорте Cl⁻-иона.

Из риса (*O. sativa*) клонировано 2 гена семейства CLC, *OsCLC-1* и *OsCLC-2*, гомологичных гену *NtCLC1*. *OsCLC-1* экспрессировался во всех тканях, тогда как *OsCLC-2* – только в корнях, узлах и междоузлиях стебля, а также в листовом влагалище. Белки *OsCLC-1* и *OsCLC-2* локализованы в тонопласте и участвуют в транспорте Cl⁻ через вакуолярную мембрану [52]. Эти белки важны для роста и развития растений риса, на что указывает подавление роста нокаут-мутантов по генам *OsCLC-1* и *OsCLC-2*. Уровень транскриптов *OsCLC-1* возрастал в корнях и листьях пророст-

ков риса при наличии в среде NaCl, экспрессия *OsCLC-2* не зависела от присутствия NaCl в среде. Высказано предположение, что *OsCLC-1* участвует в процессах, ответственных за солеустойчивость растений, осуществляя, по-видимому, компартментацию ионов Cl^- в вакуоли [52]. Физиологическая роль *OsCLC-2* остается невыясненной.

Семейство хлоридных каналов полностью клонировано из умеренно-солеустойчивого культурного вида сои *G. max* и солеустойчивого дикорастущего вида сои *G. soja* [16]. Оно включает 8 генов: *CLC1, b1, b2, c1, c2, d1, d2* и г. Все гены семейства *CLC* *G. max* и *G. soja* экспрессировались в корнях, стеблях и листьях растений. Индукция экспрессии *CLC1, b1, b2, c1* и *c2* в условиях солевого шока в органах сои предполагает участие продуктов этих генов в процессах, ответственных за формирование свойства солеустойчивости [16].

GmCLC1 более детально был исследован в работах [53, 63, 64]. В электрофизиологических экспериментах с использованием ооцитов лягушки установлено, что *GmCLC1* является Cl^-/H^+ -антипортером. Белок *GmCLC1* локализован в тонопласте, участвует в компартментации ионов Cl^- в вакуолях клеток и играет важную роль в солеустойчивости этого вида растений. *GmCLC1* транспортирует Cl^- и NO_3^- [16, 63]. Экспрессия *GmCLC1* повышает солеустойчивость трансгенных растений *A. thaliana* за счет снижения поступления иона Cl^- в надземные органы [64]. Повышенная устойчивость к солевому стрессу наблюдалась также в растениях тополя, экспрессирующих *GmCLC1* [65].

GsCLC2 является потенциал-зависимым, вакуолярным транспортером, участвующим в переносе Cl^- в вакуоль и вносящим вклад в устойчивость растений *G. max* к солевому стрессу. Проводимость *GsCLC2* убывала в ряду $\text{Br}^- \geq \text{I}^- > \text{Cl}^- > \text{NO}_3^-$. Трансгенные растения *G. max* с оверэкспрессией *GsCLC2* отличались большей солеустойчивостью [16]. Несмотря на присутствие в последовательности белка *GsCLC2* обоих консервативных глутаматов, перенос ионов, опосредованный этим транспортером, не зависел от pH. *GsCLC2* функционировал как анионный канал [16].

Клонированы полноразмерные кодирующие последовательности генов белков *ZmCLC* и *ZmCLCd* из кукурузы [54–56]. *ZmCLC* локализован в митохондриях. Предполагается, что *ZmCLC* участвует в транспорте Cl^- , на что указывает снижение потоков Cl^- и I^- через внутреннюю мембрану митохондрий антителами к этому белку. Показано также вовлечение *ZmCLC* в обеспечение устойчивости *Z. mays* к низким температурам. Установлено, что холодовой стресс индуцирует экспрессию этого белка в проростках кукурузы. Экспрессия *ZmCLC* была выше у линий кукурузы, от-

личавшихся большей холодоустойчивостью при прорастании семян и развитии растений [54].

Было обнаружено, что *ZmCLCd* экспрессируется в листьях, корнях и стеблях. Наибольший уровень транскрипции *ZmCLCd* наблюдался в листьях. Растения *A. thaliana* со сверхэкспрессией *ZmCLCd* отличались повышенной устойчивостью к холодному стрессу, засолению, засухе и окислительному стрессу [56]. Транспортная функция и локализация *ZmCLCd* не исследованы до настоящего времени.

Шесть генов семейства *CLC*, *PtrCLC1-PtrCLC6*, обнаружены в геноме понцируса трехлисточкового *P. trifoliata* и клонированы [57, 58]. Гены *PtrCLC* экспрессируются во всех тканях, наибольшая экспрессия была в листьях, наименьшая – в корнях, а также экспрессия *PtrCLC* изменялась в ответ на варьирование концентраций нитрата в среде и на засоление [58]. Гетерологичная экспрессия *PtrCLC2* в растениях *A. thaliana* дикого типа и нокаут-мутанта *clcc* приводила к повышению солеустойчивости трансгенных растений по сравнению с нетрансформированными растениями за счет снижения содержания Cl^- -иона в побегах. Предполагается, что белки семейства *PtrCLC* вовлечены в NO_3^- - и Cl^- -гомеостатирование [57].

Из солеисключающего галофита *Thellungiella halophila* – растения, как и *A. thaliana*, принадлежащего семейству *Brassicaceae*, клонирован ген *ThCLC-a* [59]. *ThCLC-a* локализован в вакуолярной мембране, где он, по-видимому, участвует в транспорте NO_3^- через тонопласт и накоплении этого аниона в вакуолях. *ThCLC-a* экспрессировался во всех органах галофита, уровень его экспрессии в корнях был выше, чем в побегах. Экспрессия *ThCLC-a* индуцировалась в ответ на добавление NO_3^- в среду культивирования. Содержание NO_3^- было снижено в побегах и корнях растений *T. halophila* с пониженной экспрессией *ThCLC-a* по сравнению с растениями ДТ. Содержание NO_3^- в тканях у растений *A. thaliana* со сверхэкспрессией *ThCLC-a* было больше, чем у растений ДТ в условиях дефицита NO_3^- [59].

Секвенирование транскриптома листьев соле- и засухоустойчивого растения *Arabidopsis pumila* позволило идентифицировать гены *ApCLCa*, *ApCLCc* и *ApCLCd*. На основании того, что экспрессия *ApCLCa* значительно индуцировалась в ответ на солевой стресс, предполагается участие продукта этого гена в формировании свойства солеустойчивости *A. pumila* [66].

Клонированы два гена, *SaCLCa1* и *SaCLCc1*, семейства хлоридных каналов из эугалофита *Suaeda altissima* [60, 61]. Белок *SaCLCc1* участвует в транспорте Cl^- [60], а *SaCLCa1*, вероятно, – в транспорте NO_3^- [61]. Экспрессия *SaCLCc1* в клетках мутанта *Agef1 S. cerevisiae* приводила к комплемен-

тации мутации (восстановлению роста мутанта на селективных средах) [60], в то время как экспрессия *SaCLCa1* – не приводила. Замена пролина в селективном фильтре *SaCLCa1* на серин (P188S) привела к частичному восстановлению роста клеток *Agef1* [61]. *SaCLCa1* и *SaCLCc1* экспрессируются в корнях и листьях *S. altissima*. Экспрессия *SaCLCa1* индуцировалась в корнях дефицитом нитрата в среде или засолением среды хлористым натрием, что предполагает участие *SaCLCa1* в регуляции поступления NO_3^- в надземные органы. Экспрессия *SaCLCc1* возрастала в листьях в ответ на засоление NaCl, что может быть связано с участием *SaCLCc1* в накоплении Cl^- в надземных органах [61].

В геноме *Cucumis sativus* идентифицированы гены *CsCLCa*, *CsCLCc* и *CsCLCg*, гомологичные генам вакуолярных белков *AtCLCa*, *AtCLCc* и *AtCLCg* [67]. В корнях наибольший уровень экспрессии наблюдали у *CsCLCa* и *CsCLCg*, наименьший – у *CsCLCc*. Дефицит NO_3^- в среде подавлял экспрессию *CsCLCa* и *CsCLCg* и не влиял на экспрессию *CsCLCc*. Внесение NO_3^- в питательную среду растений, выращивавшихся при дефиците NO_3^- , приводило к индукции *CsCLCa* и *CsCLCc* в корнях [67]. Предполагается, что *CsCLCa* играет ведущую роль в накоплении NO_3^- в вакуолях клеток огурца [67], как это показано и для *AtCLCa*.

В геноме чайного растения *Camellia sinensis* обнаружено 8 представителей семейства CLC – *CsCLC1-8* [68]. Предполагается участие белков семейства CLC в накоплении ионов F^- в листьях *C. sinensis*, обладающего устойчивостью к этому аниону и относящегося к гипераккумуляторам фторид-ионов [68]. Результаты исследования экспрессии генов *CsCLC* при обработке растений ионами Cl^- или F^- позволяют предположить, что *CsCLC4-8*, *CsCLC6* и *CsCLC7* участвуют в транспорте и депонировании в вакуолях Cl^- , а *CsCLC1-3* – фторид-иона. Однако необходимы дальнейшие исследования для подтверждения предполагаемых функций белков *CsCLC* [68].

В геноме аллотетраплоидного рапса *Brassica napus* (*B. rapa* × *B. oleracea*) обнаружено 22 гена семейства CLC: *BnaCLCa1-4*, *BnaCLCb1-4*, *BnaCLCc1-4*, *BnaCLCd1-2*, *BnaCLCe1-2*, *BnaCLCf1-4*, *BnaCLCg1-2* [18]. Идентифицирована их экзон-интронная структура, выявлены предполагаемые цис-действующие элементы в промоторах генов этого семейства и консервативные мотивы соответствующих им белков [18]. По-видимому, белки *BnaCLCa* и *BnaCLCb*, аналогично белкам *AtCLCa* и *AtCLCb*, играют важную роль в гомеостазе нитрата. Так же как *AtCLCa*, экспрессия *BnaCLCa1-4* индуцировалась в корнях и побегах при добавлении NO_3^- в среду. *BnaCLCa3* отводится ведущая роль в транспорте NO_3^- через вакуолярную мембрану, как это предпо-

лагается для *AtCLCa*, поскольку экспрессия этого гена в ответ на добавление NO_3^- возрастала больше, чем экспрессия других генов *BnaCLCa* [18]. Внесение нитрата в среду индуцировало также экспрессию *BnaCLCb* в побегах. Следует отметить, что в корнях в условиях дефицита NO_3^- в среде экспрессия генов *BnaCLCb1*, *BnaCLCb3* и *BnaCLCb4* была на высоком уровне и снижалась в ответ на добавление к среде NO_3^- [18]. В корнях экспрессия *BnaCLCb4* также индуцировалась у линии *B. napus* с высоким NUE в условиях дефицита нитрата в среде [69].

В таблице 1 суммированы вышеприведенные данные о белках семейства CLC у *A. thaliana* и других растений.

ПРЕДПОЛАГАЕМОЕ УЧАСТИЕ Cl^-/H^+ -АНТИПОРТЕРОВ ЭНДОСОМ В ПРОЦЕССАХ, ОТВЕТСТВЕННЫХ ЗА УСТОЙЧИВОСТЬ РАСТЕНИЙ К NaCl

Локализованные в эндосомальных мембранах Cl^-/H^+ - и Na^+/H^+ -антипортеры, такие, например, как *AtCLCd*, *AtCLCf* [20, 27, 19, 28], *AtNHX5* и *AtNHX6* [70] могут быть непосредственно вовлечены в Cl^- - и Na^+ -гомеостатирование цитоплазмы клеток растений в условиях солевого стресса. Эндосомы, поглощающие ионы Cl^- и Na^+ с помощью Cl^-/H^+ - и Na^+/H^+ -антипортеров, могут сливаться с тонопластом и/или плазмалеммой, экспортируя Cl^- и Na^+ , соответственно, в вакуоль и/или апопласт.

Активность электрогенного Cl^-/H^+ -антипортера была продемонстрирована нами во фракции, обогащенной мембранами аппарата Гольджи (АГ), выделенной из корня эукариота *S. altissima* [71]. Как было показано с помощью флуоресцентного рН-индикатора пиранина, загруженного в везикулы, и сафранина O, индикатора электрического потенциала ($\Delta\psi$), при создании на выделенных везикулах концентрационного градиента Cl^- (ΔpCl), направленного из наружной среды в везикулярный люмен, происходил выход H^+ наружу (заче- лачивание люмена) и генерация $\Delta\psi$, отрицательного внутри везикул. Поддержание длительного ΔpCl -зависимого транспорта H^+ из везикул требовало присутствия в среде проникающих катионов, тетрафенилфосфония⁺ или трис⁺, которые нейтрализовывали отрицательные заряды, поступающие в везикулярный люмен в ходе Cl^-/H^+ -обмена [71].

В соответствии с предполагаемым везикулярным транспортом Cl^- и вовлечением в этот процесс Cl^- -транспортеров, электронно-микроскопические исследования ультраструктуры клеток *S. altissima* обнаружили в цитоплазме клеток растений, выращенных в условиях засоления, интенсивное образование мембранных структур

Таблица 1. Семейство белков CLC у *A. thaliana* и других растений

Белки CLC	Локализация	Функция	Селективный фильтр	E148 ¹	E203 ¹	Физиологическая роль	Ссылки
AtCLCa	Тонопласт	$2\text{NO}_3^-/\text{H}^+$ -обмен	GPGIP	E	E	Накопление в вакуоли/отток из вакуоли NO_3^- , открывание/закрывание устьиц	[12, 13, 26, 31, 33, 34]
AtCLCb	Тонопласт	NO_3^-/H^+ -обмен	GPGIP	E	E	Накопление в вакуоли/отток из вакуоли NO_3^- ?	[26, 27, 32,]]
AtCLCc	Тонопласт	Cl^-/H^+ -обмен?	GSGIP	E	E	Регуляция устьичных движений, солеустойчивость, гомеостаз NO_3^- ?	[19, 26, 30, 45]
AtCLCd	<i>транс</i> -Гольджи сеть	Cl^-/H^+ -обмен?	GSGIP	E	E	Мембранный трафик, стимуляция закисления люмена везикул?	[19, 20, 26–28]
AtCLCe	Тилакоиды	Cl^- -канал?	ESAGK	E	S	Регуляция ионного гомеостаза пластид и соотношения $\Delta\psi$ и ΔpH протондвижущей силы (Δp)	[26, 28, 38, 45, 48]
AtCLCf	<i>цис</i> - и <i>транс</i> -Гольджи сеть	Cl^- -канал?	EILDQ	E	T	Не известна	[19, 26, 28, 45]
AtCLCg	Тонопласт	Cl^- -канал?	GSGIP	A	E	Накопление Cl^- в вакуолях клеток мезофилла, солеустойчивость, рециркуляция Cl^- ?, гуттация?	[26, 29]
ThCLC-a	Тонопласт	NO_3^-/H^+ -обмен?	GPGIP	E	E	Накопление NO_3^- в вакуоли	[59]
OsCLC-1	Тонопласт	Cl^-/H^+ -обмен?	GSGIP	E	E	Накопление Cl^- в вакуолях, рост и развитие растений, формирование солеустойчивости	[52]
OsCLC-2	Тонопласт	Cl^-/H^+ -обмен?	GSGIP	E	E	Рост и развитие растений, накопление Cl^- в вакуолях?	
GmCLC1	Тонопласт	$\text{Cl}^- \approx \text{NO}_3^-/\text{H}^+$ -обмен	GPGIP	E	E	Депонирование Cl^- в вакуолях клеток корня, формирование солеустойчивости	[16, 53, 63–65]

Таблица 1. Окончание

Белки CLC	Локализация	Функция	Селективный фильтр	E148 ¹	E203 ¹	Физиологическая роль	Ссылки
Gm/GsCLCb1	?	NO ₃ ⁻ /H ⁺ -обмен?	GPGIP	E	E	Не известна	[16]
Gm/GsCLCb2	?	NO ₃ ⁻ /H ⁺ -обмен?	GPGIP	E	E	Не известна	
Gm/GsCLCc1	?	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Не известна	
GsCLCc2	Тонoplast	Cl ⁻ -канал	GSGIP	E	E	Гомеостаз Cl ⁻ и NO ₃ ⁻ , солеустойчивость	
GmCLCc2	?	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Не известна	
Gm/GsCLCd1	?	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Не известна	
Gm/GsCLCd2	?	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Не известна	
Gm/GsCLCg	?	Cl ⁻ -канал?	GSGIP	A	G	Не известна	
NtCLC1	ЭПР	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Регуляция pH люмена ЭПР, секреция белков, рост и развитие растений	[21, 49, 50]
NtCLC2	?	NO ₃ ⁻ /H ⁺ -обмен?	GPGIP	E	E	Не известна	GenBank: AF133209.1
ZmCLCc	Мембраны митохондрий	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Холодоустойчивость	[54]
ZmCLCd	?	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Холодо-, засухо-, солеустойчивость, устойчивость к тепловому и окислительному стрессам	[55, 56]
PtrCLC1(a,b)	?	NO ₃ ⁻ /H ⁺ -обмен?	GPGIP	E	E	Накопление NO ₃ ⁻ ?	[57, 58]
PtrCLC2(c)	?	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Солеустойчивость?	
PtrCLC3(g)	?	Канал?	GSGIP	A	E	Солеустойчивость, засухоустойчивость?	
PtrCLC4(f)	?	Канал?	EILNQ	E	T		
PtrCLC5(d)	?	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Не известна	
PtrCLC6(e)	?	Канал?	YALSL	E	S	Не известна	
SaCLCa1	?	NO ₃ ⁻ /H ⁺ -обмен?	GPGIP	E	E	Регуляция содержания NO ₃ ⁻ в цитоплазме, участие в загрузке ксилемы?	[61]
SaCLCc1	?	Cl ⁻ /H ⁺ -обмен?	GSGIP	E	E	Депонирование Cl ⁻ в вакуолях надземных органах?	[60]

Примечание: E148¹, E203¹ – воротный и прогонный глутаматы EsCLC, соответственно.

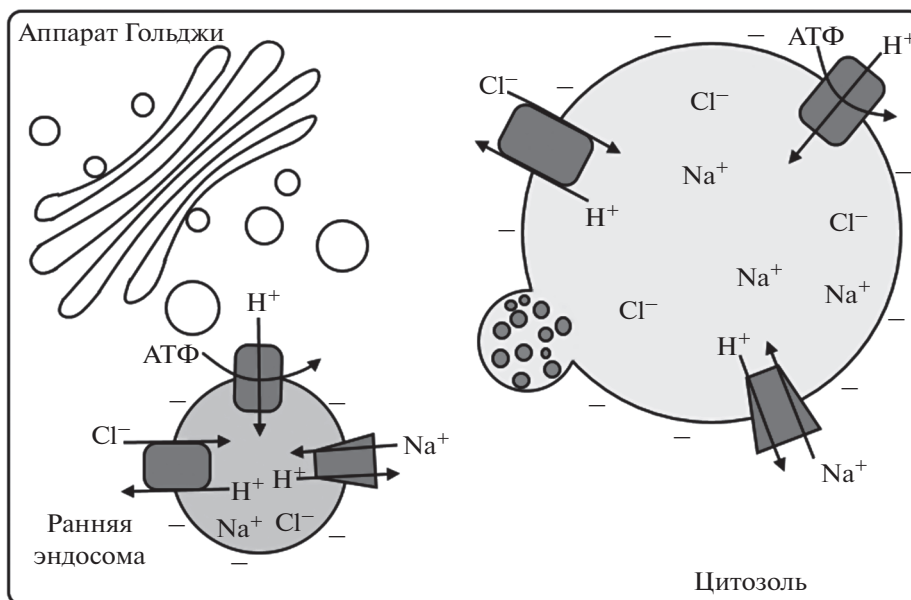


Рис. 4. Предполагаемый механизм вовлечения эндосомальных форм ионных транспортеров в экспорт Cl^- и Na^+ из цитоплазмы в вакуоль. Ранние эндосомы накапливают Cl^- и Na^+ в результате согласованного функционирования эндосомальных форм Cl^-/H^+ -антипортера, Na^+/H^+ -антипортера и H^+ -АТФазы V-типа и созревают в поздние эндосомы. Наружная мембрана поздних эндосом сливается с тонопластом, доставляя Cl^- и Na^+ в вакуоль. В нижней левой части рисунка изображена ранняя эндосома, в мембране которой функционируют Cl^-/H^+ -антипортер, Na^+/H^+ -антипортер и H^+ -АТФаза V-типа. В верхней правой части рисунка изображена поздняя эндосома на стадии слияния ее наружной мембраны с тонопластом.

разного размера, в том числе мультивезикулярных тел. Больше всего их скапливалось в зонах, прилегающих к тонопласту и плазмалемме. Методом электронной цитохимии, основанном на формировании электронно-плотных гранул AgCl после обработки тканей ионами серебра, в этих же зонах была обнаружена аккумуляция Cl^- , что, возможно, указывает на стимулированное хлористым натрием слияние наружной мембраны Cl^- -содержащих эндосом с тонопластом и плазмалеммой [72].

Стимуляция образования мембранных структур в цитоплазме под действием NaCl и их слияние с вакуолями было показано также в клетках интактных растений и суспензионной культуры *A. thaliana* [73–76], суспензионных культур мангрового растения *Bruguiera sexangula* и ячменя [77] и в клетках интактного растения *Chenopodium album* [78]. Существенный вклад в их формирование вносили мембраны АГ и пост-Гольджи везикулы – именно те структуры, в которых были локализованы *AtCLC*d [20], *AtNHX*-5, *AtNHX*-6 [70].

Выше приведенные данные предполагают следующий механизм согласованного функционирования Cl^-/H^+ -антипортера, Na^+/H^+ -антипортера и H^+ -АТФазы V-типа в эндосомах (рис. 4). V-АТФаза транспортирует H^+ внутрь эндосом, в результате чего на эндосомальной мембране образуются концентрационный градиент H^+ ($\Delta\mu\text{H}$)

и электрический потенциал ($\Delta\psi$). Для поддержания работы АТФазы необходимо нейтрализовать положительные заряды, накапливающиеся на внутренней стороне эндосомальных мембран. Эту функцию выполняет Cl^-/H^+ -антипортер, переносящий внутрь везикул отрицательно заряженные хлорид-ионы, а в обратном направлении положительно заряженные протоны. В результате создаваемый АТФазой $\Delta\psi$ конвертируется в $\Delta\mu\text{H}$. Последний используется как источник энергии электронейтральным Na^+/H^+ -антипортером для аккумуляции ионов Na^+ ранними эндосомами, которые после созревания в поздние эндосомы переносятся к соответствующей мембране-акцептору и, сливаясь с ней, экспортируют Na^+ и Cl^- из цитоплазмы. Вовлечение пост-Гольджи структур в различные ветви везикулярного транспорта, по-видимому, играет важную роль в Cl^- - и Na^+ -гомеостатировании цитоплазматических органелл в условиях солевого стресса. Известно, что *транс*-Гольджи сеть является клеточным компартментом, в котором пересекаются эндоцитозный и секреторный пути; через *транс*-Гольджи сеть осуществляется рециркуляция эндоцитозных везикул к плазмалемме; первичные транспортные везикулы, образующиеся из плазмалеммы при эндоцитозе, сливаются также с мембранами *транс*-Гольджи сети. Часть ранних эндосом и продуктов их слияния с транспортными везикулами созревает

в поздние эндосомы (ПЭ) /мультивезикулярные тела (МВТ)/превакуолярные компартменты (ПВК), отсортировывая мембранные белки и липиды для доставки в тонопласт или плазмалемму, а часть белков и липидов в вакуолярный люмен или периплазматическое пространство [79–81]. Ионы Na^+ и Cl^- , поглощенные клеткой в условиях солевого стресса, могут быть компартиментализованы структурами *транс*-Гольджи сети и ее производными при участии эндосомальных форм ионных транспортеров, таких как AtCLCd [20], AtNHX-5, AtNHX-6 [70], и экспортированы затем из цитоплазмы эндосомами в вакуоль или периплазматическое пространство.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Приведенные в обзоре данные свидетельствуют о вовлечении белков семейства CLC у растений во множество процессов и физиологических функций. Важнейшим из них является нитратное и хлоридное гомеостатирование, участие белков CLC в котором на уровне клетки и целого организма хорошо доказано. NO_3^- - и Cl^- -гомеостатирование необходимо для роста и развития растений, а также для обеспечения устойчивости растений к хлоридному засолению, водному дефициту и другим неблагоприятным факторам среды. Одной из важнейших задач является поиск и исследование изоформ CLC, локализованных в мембранах АГ и пост-Гольджи везикул и участвующих таким образом в везикулярном транспорте NO_3^- и Cl^- в клетке. Подавляющая часть исследований транспорта NO_3^- и Cl^- белками CLC проведена на модельном растении *A. thaliana*. Функции и физиологическая роль представителей семейства CLC у других растений только начинают изучаться. Имеются лишь отрывочные сведения об участии этих белков в распределении ионов NO_3^- и Cl^- в системе целого растения. До конца непонятен механизм, с помощью которого белки CLC регулируют трансмембранный электрический потенциал ($\Delta\psi$) и pH люменов органелл у растений, включая *A. thaliana*, а также у дрожжей. Имеющиеся на этот счет сведения и выдвинутые на их основе гипотезы противоречивы. Необходимость исследования механизмов, с помощью которых такая регуляция осуществляется, представляется очевидной. Регуляция pH люменов цитоплазматических компартментов, в частности *транс*-Гольджи сети, ответственной за внутриклеточное распределение белков (sorting), чрезвычайно важна для везикулярного транспорта. Последний играет ключевую роль в ремоделировании белкового и липидного состава мембран, которое происходит в ответ на внутренние и внешние стимулы. К последним относятся стрессовые факторы биотической и абиотической природы. Регуляция везикуляр-

ного транспорта белками семейства CLC поэтому является важной составляющей процессов, определяющих устойчивость растений к этим факторам. Исследование роли белков семейства CLC в регуляции везикулярного транспорта является одной из актуальных задач клеточной физиологии.

Авторы выражают благодарность д.б.н., в.н.с. лаборатории транспорта ионов и солеустойчивости ИФР РАН Поповой Л.Г. за критическое чтение рукописи, сделанные замечания и рекомендации.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Miller C., White M.M. A voltage-dependent chloride conductance channel from *Torpedo* electroplax membrane // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1980. V. 341. P. 534. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1980.tb47197.x>
2. Jentsch T.J., Steinmeyer K., Schwarz G. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes // Nature. 1990. V. 348. P. 510. <https://doi.org/10.1038/348510a0>
3. Miller C. ClC chloride channels viewed through a transporter lens // Nature. 2006. V. 440. P. 484. <https://doi.org/10.1038/nature04713>
4. Barbier-Brygoo H., Vinauger M., Colcombet J., Ephritikhine G., Frachisse J.M., Maurel C. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role // Biochim. Biophys. Acta, Biomembr. 2000. V. 1465. P. 199. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(00\)00139-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(00)00139-5)
5. Accardi A. Structure and gating of CLC channels and exchangers // J. Physiol. 2015. V. 593. P. 4129. <https://doi.org/10.1113/JP270575>
6. Fahike C., Yu H.T., Beck C.L., Rhodes T.H., George J. Pore-forming segments in voltage-gated chloride channels // Nature. 1997. V. 390. P. 529. <https://doi.org/10.1038/37391>
7. Barbier-Brygoo H., De Angeli A., Filleur S., Frachisse J.-M., Gambale F., Thomine S., Wege S. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks // Annu. Rev. Plant Biol. 2011. V. 62. P. 25. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103741>
8. Dutzler R., Campbell E.B., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity // Nature. 2002. V. 415. P. 287. <https://doi.org/10.1038/415287a>
9. Dutzler R., Campbell E.B., MacKinnon R. Gating the selectivity filter in ClC chloride channels // Science. 2003. V. 300. P. 108. <https://doi.org/10.1126/science.1082708>
10. Picollo A., Malvezzi M., Houtman J.C.D., Accardi A. Basis of substrate binding and conservation of selectivity in the CLC family of channels and transporters // Nat.

- Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. P. 1294.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1704>
11. Zifarelli G., Pusch M. Conversion of the $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$ antiporter CLC-5 in a NO_3^-/H^+ antiporter by a single point mutation // EMBO J. 2009. V. 28. P. 175.
<https://doi.org/10.1038/emboj.2008.284>
 12. Bergsdorf E.Y., Zdebek A.A., Jentsch T.J. Residues important for nitrate/proton coupling in plant and mammalian CLC transporters // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 11184.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M901170200>
 13. Wege S., Jossier M., Filleur S., Thomine S., Barbier-Brygoo H., Gambale F., De Angeli A. The proline 160 in the selectivity filter of the *Arabidopsis* NO_3^-/H^+ exchanger AtCLCa is essential for nitrate accumulation in planta // Plant J. 2010. V. 63. P. 861.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04288.x>
 14. Accardi A., Walden M., Nguitragool W., Jayaram H., Williams C., Miller C. Separate ion pathways in a Cl^-/H^+ exchanger // J. Gen. Physiol. 2005. V. 126. P. 563.
<https://doi.org/10.1085/jgp.200509417>
 15. Jentsch T.J., Pusch M. CLC chloride channels and transporters: structure, function, physiology, and disease // Physiol. Rev. 2018. V. 98. P. 1493.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2017>
 16. Wei P., Che B., Shen L., Cui Y., Wu S., Cheng C., Liu F., Li M.W., Yu B., Lam H.M. Identification and functional characterization of the chloride channel gene, *GsCLC-c2* from wild soybean // BMC Plant Biol. 2019. V. 19:121.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1732-z>
 17. Zhang H., Jin J., Jin L., Li Z., Xu G., Wang R., Zhang J., Zhai N., Chen Q., Liu P., Chen X., Zheng Q., Zhou H. Identification and analysis of the chloride channel gene family members in tobacco (*Nicotiana tabacum*) // Gene. 2018. V. 676.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.073>
 18. Liao Q., Zhou T., Yao J.Y., Han Q.F., Song H.X., Guan C.Y., Hua Y.P., Zhang Z.H. Genome-scale characterization of the vacuole nitrate transporter Chloride Channel (CLC) genes and their transcriptional responses to diverse nutrient stresses in allotetraploid rapeseed // PLoS One. 2018. V. 13: e0208648.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208648>
 19. Lv Q., Tang R., Liu H., Gao X., Li Y., Zheng H., Zhang H. Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* chloride channel gene family // Plant Sci. 2009. V. 176. P. 650.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.006>
 20. von der Fecht-Bartenbach J., Bogner M., Krebs M., Stierhof Y.D., Schumacher K., Ludewig U. Function of the anion transporter AtCLC-d in the *trans*-Golgi network // Plant J. 2007. V. 50. P. 466.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03061.x>
 21. Sun H., Shen L., Qin Y., Liu X., Hao K., Li Y., Wang J., Yang J., Wang F. CLC-Nt1 affects Potato Virus Y infection via regulation of endoplasmic reticulum luminal Ph // New Phytol. 2018. V. 220. P. 539.
<https://doi.org/10.1111/nph.15310>
 22. Jentsch T.J. CLC Chloride Channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology // Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 2008. V. 43. P. 3.
<https://doi.org/10.1080/10409230701829110>
 23. Jentsch T.J. Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function and pathophysiology // J. Physiol. 2015. V. 593. P. 4091.
<https://doi.org/10.1113/JP270043>
 24. Stauber T., Weinert T., Jentsch T.J. Cell biology and physiology of CLC chloride channels and transporters // Comprehensive Physiology. 2012. V. 2. P. 1701.
<https://doi.org/10.1002/cphy.c110038>
 25. Poroca D.R., Pelis R.M., Chappe V.M. CLC channels and transporters: structure, physiological functions, and implications in human chloride channelopathies // Front. Pharmacol. 2017. V. 8: 151.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00151>
 26. Zifarelli G., Pusch M. CLC transport proteins in plants // FEBS Lett. 2010. V. 584. P. 2122.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.12.042>
 27. Hechenberger M., Schwappach B., Fischer W.N., Frommer W.B., Jentsch T.J., Steinmeyer K. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 33632.
<https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33632>
 28. Marmagne A., Vinauger-Douard M., Monachello D., De Longevialle A.F., Charon C., Allot M., Rappaport F., Wollman F.A., Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G. Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and golgi membranes, respectively // J. Exp. Bot. 2007. V. 58. P. 3385.
<https://doi.org/10.1093/jxb/erm187>
 29. Nguyen C.T., Agorio A., Jossier M., Depré S., Thomine S., Filleur S. Characterization of the chloride channel-like, AtCLCg, involved in chloride tolerance in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. 2015. V. 57. P. 764.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcv169>
 30. Jossier M., Kroniewicz L., Dalmas F., Le Thiec D., Ephritikhine G., Thomine S., Barbier-Brygoo H., Vavasseur A., Filleur S., Leonhardt N. The *Arabidopsis* vacuolar anion transporter, AtCLCc, is involved in the regulation of stomatal movements and contributes to salt tolerance // Plant J. 2010. V. 64. P. 563.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04352.x>
 31. De Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Frachisse J.M., Thomine S., Gambale F., Barbier-Brygoo H. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles // Nature. 2006. V. 442. P. 939.
<https://doi.org/10.1038/nature05013>
 32. von der Fecht-Bartenbach J., Bogner M., Dynowski M., Ludewig U. CLC-b-mediated NO_3^-/H^+ exchange across the tonoplast of *Arabidopsis* vacuoles // Plant Cell Physiol. 2010. V. 51. P. 960.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcq062>
 33. Geelen D., Lurin C., Bouchez D., Frachisse J.M., Lelièvre F., Courtial B., Barbier-Brygoo H., Maurel C. Disruption of putative anion channel gene *AtCLC-a* in

- Arabidopsis* suggests a role in the regulation of nitrate content // Plant J. 2000. V. 21. P. 259.
https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2000.00680.x
34. *Wege S., De Angeli A., Droillard M.J., Kroniewicz L., Merlot S., Cornu D., Gambale F., Martinoia E., Barbier-Brygoo H., Thomine S., Leonhardt N., Filleur S.* Phosphorylation of the vacuolar anion exchanger AtCLCa is required for the stomatal response to abscisic acid // Sci. Signaling. 2014. V. 7: ra65.
https://doi.org/10.1126/scisignal.2005140
 35. *Gifford M.L., Dean A., Gutierrez R.A., Coruzzi G.M., Birnbaum K.D.* Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity // PNAS. 2008. V. 105. P. 803.
https://doi.org/10.1073/pnas.0709559105
 36. *Carpaneto A., Boccaccio A., Lagostena L., Di Zanni E., Scholz-Starke J.* The signaling lipid phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate targets plant CLC-a anion/H⁺ exchange activity // EMBO Rep. 2017. V. 18. P. 1100.
https://doi.org/10.15252/embr.201643814
 37. *De Angeli A., Moran O., Wege S., Filleur S., Ephritikhine G., Thomine S., Barbier-Brygoo H., Gambale F.* ATP binding to the C terminus of the *Arabidopsis thaliana* nitrate/proton antiporter, AtCLCa, regulates nitrate transport into plant vacuoles // J. Biol. Chem. 2009. V. 284. P. 26526.
https://doi.org/10.1074/jbc.M109.005132
 38. *Monachello D., Allot M., Oliva S., Krapp A., Daniel-Vedele F., Barbier-Brygoo H., Ephritikhine G.* Two anion transporters AtCLCa and AtCLCe fulfil interconnecting but not redundant roles in nitrate assimilation pathways // New Phytol. 2009. V. 183. P. 88.
https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02837.x
 39. *Han Y.L., Song H.X., Liao Q., Yu Y., Jian S. F., Lepo J.E., Liu Q., Rong X.M., Tian C., Zeng J., Guan C.Y., Ismail A.M., Zhang Z.H.* Nitrogen use efficiency is mediated by vacuolar nitrate sequestration capacity in roots of *Brassica napus* // Plant Physiol. 2016. V. 170. P. 1684.
https://doi.org/10.1104/pp.15.01377
 40. *Whiteman S.A., Serazetdinova L., Jones A.M.E., Sanders D., Rathjen J., Peck S.C., Maathuis F.J.M.* Identification of novel proteins and phosphorylation sites in a tonoplast enriched membrane fraction of *Arabidopsis thaliana* // Proteomics. 2008. V. 8. P. 3536.
https://doi.org/10.1002/pmic.200701104
 41. *Hu R., Zhu Y., Wei J., Chen J., Shi H., Shen G., Zhang H.* Overexpression of PP2A-C5 that encodes the catalytic subunit 5 of protein phosphatase 2A in *Arabidopsis* confers better root and shoot development under salt conditions // Plant, Cell Environ. 2017. V. 40. P. 150.
https://doi.org/10.1111/pce.12837
 42. *Харитонашвили Е.В., Черный С.Г., Алехина Н.Д.* Формирование запасного пула нитрата в корнях проростков пшеницы // Физиология растений. 1993. Т. 40. С. 443.
 43. *Измайлов С.Ф.* насыщение и использование фондов нитрата в листьях гороха и сахарной свеклы // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 211.
 44. *Bläsing O.E., Gibon Y., Günther M., Höhne M., Morcuende R., Osuna D., Thimm O., Usadel B., Scheible W.R., Stitt M.* Sugars and circadian regulation make major contributions to the global regulation of diurnal gene expression in *Arabidopsis* // Plant Cell. 2005. V. 17. P. 3257.
https://doi.org/10.1105/tpc.105.035261
 45. *Harada H., Kuromori T., Hirayama T., Shinozaki K., Leigh R.A.* Quantitative trait loci analysis of nitrate storage in *Arabidopsis* leading to an investigation of the contribution of the anion channel gene, *AtCLC-c*, to variation in nitrate levels // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 2005.
https://doi.org/10.1093/jxb/erh224
 46. *Vialaret J., Di Pietro M., Hem S., Maurel C., Rossignol M., Santoni V.* Phosphorylation dynamics of membrane proteins from *Arabidopsis* roots submitted to salt stress // Proteomics. 2014. V. 14. P. 1058.
https://doi.org/10.1002/pmic.201300443
 47. *Guo W., Zuo Z., Cheng X., Sun J., Li H., Li L., Qiu J.L.* The chloride channel family gene *CLCd* negatively regulates pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity in *Arabidopsis* // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 1205.
https://doi.org/10.1093/jxb/ert484
 48. *Herdean A., Nziengui H., Zsiros O., Solymosi K., Garab G., Lundin B., Spetea C.* The *Arabidopsis* thylakoid chloride channel AtCLCe functions in chloride homeostasis and regulation of photosynthetic electron transport // Front. Plant Sci. 2016. V. 7: 115.
https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00115
 49. *Lurin C., Geelen D., Barbier-Brygoo H., Guern J., Maurel C.* Cloning and functional expression of a plant voltage-dependent chloride channel // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 701. https://doi.org/https://doi.org/10.1105/tpc.8.4.701
 50. *Lurin C., Güçlü J., Cheniclet C., Carde J.P., Barbier-Brygoo H., Maurel C.* CLC-Nt1, a putative chloride channel protein of tobacco, co-localizes with mitochondrial membrane markers // Biochem. J. 2000. V. 348. P. 291.
https://doi.org/10.1042/0264-6021:3480291
 51. *Diédhiou C.J., Goldack D.* Salt-dependent regulation of chloride channel transcripts in rice // Plant Sci. 2006. V. 170. P. 793.
https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.11.014
 52. *Nakamura A., Fukuda A., Sakai S., Tanaka Y.* Molecular cloning, functional expression and subcellular localization of two putative vacuolar voltage-gated chloride channels in rice (*Oryza sativa* L.) // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47. P. 32.
https://doi.org/10.1093/pcp/pci220
 53. *Li W.Y.F., Wong F.L., Tsai S.N., Phang T.H., Shao G., Lam H.M.* Tonoplast-located *GmCLC1* and *GmNHX1* from soybean enhance NaCl tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells // Plant, Cell Environ. 2006. V. 29. P. 1122.
https://doi.org/10.1016/j.diamond.2005.12.024
 54. *Tampieri E., Baraldi E., Carnevali F., Frascaroli E., De Santis A.* The activity of plant inner membrane anion channel (PIMAC) can be performed by a chloride channel (CLC) protein in mitochondria from seedlings of maize populations divergently selected for cold toler-

- ance // J. Bioenerg. Biomembr. 2011. V. 43. P. 611.
<https://doi.org/10.1007/s10863-011-9386-z>
55. Yang G., Zou H., Wu Y., Liu H., Yuan Y. Identification and characterisation of candidate genes involved in chilling responses in maize (*Zea mays* L.) // Plant Cell, Tissue Organ Cult. 2011. V. 106. P. 127.
<https://doi.org/10.1007/s11240-010-9900-8>
 56. Wang S., Su S.Z., Wu Y., Li S.P., Shan X.H., Liu H.K., Wang S., Yuan Y.P. Overexpression of maize chloride channel gene *ZmCLC-d* in *Arabidopsis thaliana* improved its stress resistance // Biol. Plant. 2015. V. 59. P. 55.
<https://doi.org/10.1007/s10535-014-0468-8>
 57. Wei Q., Liu Y., Zhou G., Li Q., Yang C., Peng S. Overexpression of *CsCLCc*, a chloride channel gene from *Poncirus trifoliata*, enhances salt tolerance in *Arabidopsis* // Plant Mol. Biol. Rep. 2013. V. 31. P. 1548.
<https://doi.org/10.1007/s11105-013-0592-1>
 58. Wei Q.J., Gu Q.Q., Wang N.N., Yang C.Q., Peng S.A. Molecular cloning and characterization of the chloride channel gene family in trifoliolate orange // Biol. Plant. 2015. V. 59. P. 645.
<https://doi.org/10.1007/s10535-015-0532-z>
 59. Zhou C., Wang H., Zhu J., Liu Z. Molecular cloning, subcellular localization and functional analysis of *ThCLC-a* from *Thellungiella halophila* // Plant Mol. Biol. Rep. 2013. V. 31. P. 783.
<https://doi.org/10.1007/s11105-012-0545-0>
 60. Nedelyaeva O.I., Shuvalov A.V., Mayorova O.V., Yurchenko A.A., Popova L.G., Balnokin Y.V., Karpichev I.V. Cloning and functional analysis of *SaCLC1*, a gene belonging to the chloride channel family (CLC), from the halophyte *Suaeda altissima* (L.) Pall. // Dokl. Biochem. Biophys. 2018. V. 481. P. 186.
<https://doi.org/10.1134/S1607672918040026>
 61. Nedelyaeva O.I., Shuvalov A.V., Karpichev I.V., Beliaev D.V., Myasoedov N.A., Khalilova L.A., Khramov D.E., Popova L.G., Balnokin Y.V. Molecular cloning and characterisation of *SaCLCa1*, a novel protein of the chloride channel (CLC) family from the halophyte *Suaeda altissima* (L.) Pall. // J. Plant Physiol. 2019. V. 240: 152995.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2019.152995>
 62. Adkar-Purushothama C.R., Iyer P.S., Perreault J.P. Potato spindle tuber viroid infection triggers degradation of chloride channel protein *CLC-b-like* and *Ribosomal protein S3a-like* mRNAs in tomato plants // Sci. Rep. 2017. V. 7: 8341.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-08823-z>
 63. Wong T.H., Li M.W., Yao X.Q., Lam H.M. The *GmCLC1* protein from soybean functions as a chloride ion transporter // J. Plant Physiol. 2013. V. 170. P. 101.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.08.003>
 64. Wei P., Wang L., Liu A., Yu B., Lam H.M. *GmCLC1* confers enhanced salt tolerance through regulating chloride accumulation in soybean // Front Plant Sci. 2016. V. 7: 1082.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01082>
 65. Sun W., Deng D., Yang L., Zheng X., Yu J., Pan H., Zhuge Q. Overexpression of the chloride channel gene (*GmCLC1*) from soybean increases salt tolerance in transgenic *Populus deltoides* *P. euramericana* “Nanlin895”. Plant Omics. 2013. V. 6. P. 347.
 66. Yang L., Jin Y., Huang W., Sun Q., Liu F., Huang X. Full-length transcriptome sequences of ephemeral plant *Arabidopsis pumila* provides insight into gene expression dynamics during continuous salt stress // BMC Genomics. 2018. V. 19: 717.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-5106-y>
 67. Migocka M., Warzybok A., Papierniak A., Kłobus G. NO_3^-/H^+ antiport in the tonoplast of cucumber root cells is stimulated by nitrate supply: evidence for a reversible nitrate-induced phosphorylation of vacuolar NO_3^-/H^+ antiport // PLoS One. 2013. V. 8: e73972.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073972>
 68. Xing A., Ma Y., Wu Z., Nong S., Zhu J., Sun H., Tao J., Wen B., Zhu X., Fang W., Li X., Wang Y. Genome-wide identification and expression analysis of the CLC superfamily genes in tea plants (*Camellia sinensis*) // Funct. Integr. Genomics. 2020 (in press).
<https://doi.org/10.1007/s10142-019-00725-9>
 69. Li Q., Ding G., Yang N., White P.J., Ye X., Cai H., Lu J., Shi L., Xu F. Comparative genome and transcriptome analysis unravels key factors of nitrogen use efficiency in *Brassica napus* L. // Plant, Cell Environ. 2019 (in press).
<https://doi.org/10.1111/pce.13689>
 70. Bassil E., Ohto M., Esumi T., Tajima H., Zhu Z., Cagnac O., Belmonte M., Peleg Z., Yamaguchi T., Blumwald E. The *Arabidopsis* intracellular Na^+/H^+ antiporters NHX5 and NHX6 are endosome associated and necessary for plant growth and development // Plant Cell. 2011. V. 23. P. 224.
<https://doi.org/10.1105/tpc.110.079426>
 71. Shuvalov A.V., Orlova J.V., Khalilova L.A., Myasoedov N.A., Andreev I.M., Belyaev D.V., Balnokin Y.V. Evidence for the functioning of a Cl^-/H^+ antiporter in the membranes isolated from root cells of the halophyte *Suaeda altissima* and enriched with Golgi membranes // Russ. J. Plant Physiol. 2015. V. 62. P. 45.
<https://doi.org/10.1134/S1021443715010124>
 72. Balnokin Y.V., Kurkova E.B., Khalilova L.A., Myasoedov N.A., Yusufov A.G. Pinocytosis in the root cells of a salt-accumulating halophyte *Suaeda altissima* and its possible involvement in chloride transport // Russ. J. Plant Physiol. 2007. V. 54. P. 797.
<https://doi.org/10.1134/S102144370706012X>
 73. Hamaji K., Nagira M., Yoshida K., Ohnishi M., Oda Y., Uemura T., Goh T., Sato M.H., Morita M.T., Tasaka M., Hasezawa S.I., Nakano A., Hara-Nishimura I., Maeshima M., Fukaki H. et al. Dynamic aspects of ion accumulation by vesicle traffic under salt stress in *Arabidopsis* // Plant Cell Physiol. 2009. V. 50. P. 2023.
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcp143>
 74. Baral A., Irani N.G., Fujimoto M., Nakano A., Mayor S., Mathew M.K. Salt-induced remodeling of spatially restricted clathrin-independent endocytic pathways in *Arabidopsis* root // Plant Cell. 2015. V. 27. P. 1297.
<https://doi.org/10.1105/tpc.15.00154>
 75. Orlova Y.V., Sergienko 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.* Sodium transport by endocytic vesicles in cultured *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cells // *In Vitro Cell. Dev. Biol.: Plant.* 2019. V. 55. P. 359.
<https://doi.org/10.1007/s11627-019-10005-7>
76. *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* (At5g2525) gene promotor possesses increased resistance to NaCl // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 275.
<https://doi.org/10.1134/S1021443720020077>
77. *Mimura T., Kura-Hotta M., Tsujimura T., Ohnishi M., Miura M., Okazaki Y., Mimura M., Maeshima M., Washitani-Nemoto S.* Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress // *Planta.* 2003. V. 216. P. 397.
<https://doi.org/10.1007/s00425-002-0878-2>
78. *Ivanova T.V., Maierova O.V., Orlova Y.V., Kuznetsova E.I., Khalilova L.A., Myasoedov N.A., Balnokin Y.V., Tsyden-*
dambaev V.D. Cell ultrastructure and fatty acid composition of lipids in vegetative organs of *Chenopodium album* L. under salt stress conditions // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 763.
<https://doi.org/10.1134/S1021443716060054>
79. *Jaillais Y., Fobis-Loisy I., Miège C., Gaude T.* Evidence for a sorting endosome in *Arabidopsis* root cells // *Plant J.* 2008. 53. P. 237.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03338.x>
80. *Feraru E., Feraru M.I., Asaoka R., Paciorek T., De Rycke R., Tanaka H., Nakano A., Frimla J.* BEX5/RabA1b regulates trans-Golgi network-to-plasma membrane protein trafficking in *Arabidopsis* // *Plant Cell.* 2012. V. 24. P. 3074.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.098152>
81. *Cui Y., Shen J., Gao C., Zhuang X., Wang J., Jiang L.* Biogenesis of plant prevacuolar multivesicular bodies // *Mol Plant.* 2016. V. 9. P. 774.
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.011>