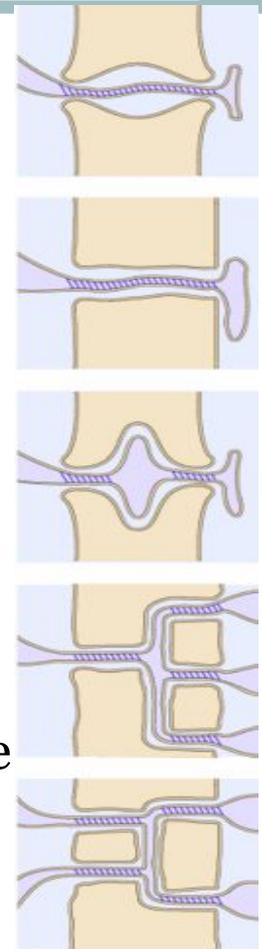
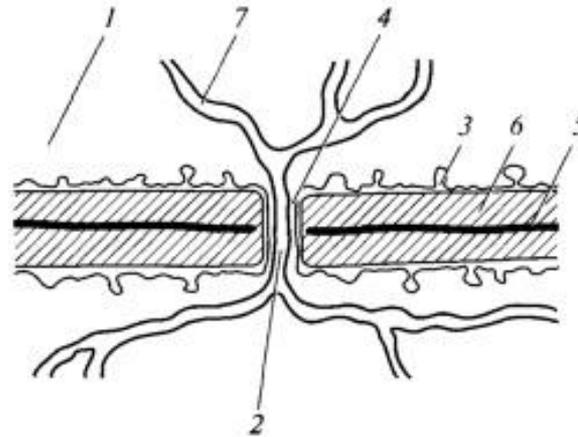


Плазмодесмы

И вместе, и по отдельности...

Что и у кого?

- 1 - цитоплазма
- 2 - десмотрубочка
- 3 - плазмалемма
- 4 - плазмодесма
- 5 - пектиновая межклеточная пластинка
- 6 - клеточная стенка
- 7 - ЭР



Плазмодесмы – микроскопические каналы, пронизывающие клеточную стенку и обеспечивающие межклеточную коммуникацию.

У кого есть плазмодесмы?

Высшие растения (land plants or embryophytes) + **Водоросли**:

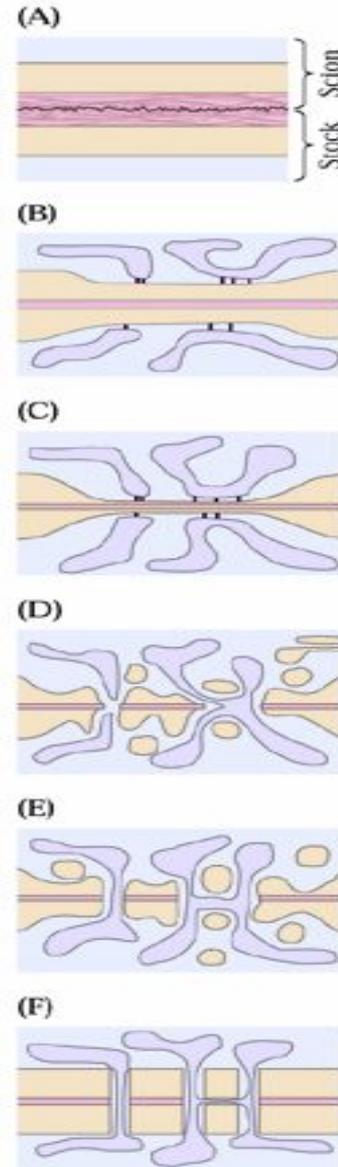
Класс: Charophyceae

Порядки: Charales (**Харовые**), Coleochaetales (**Колеохетовые**)

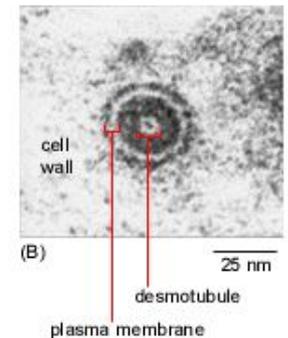
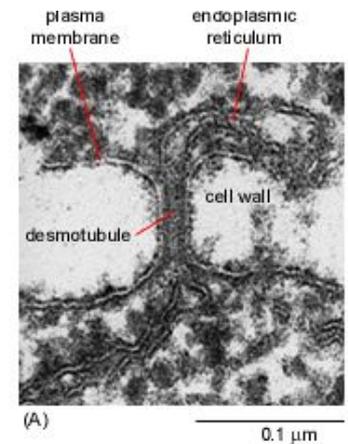
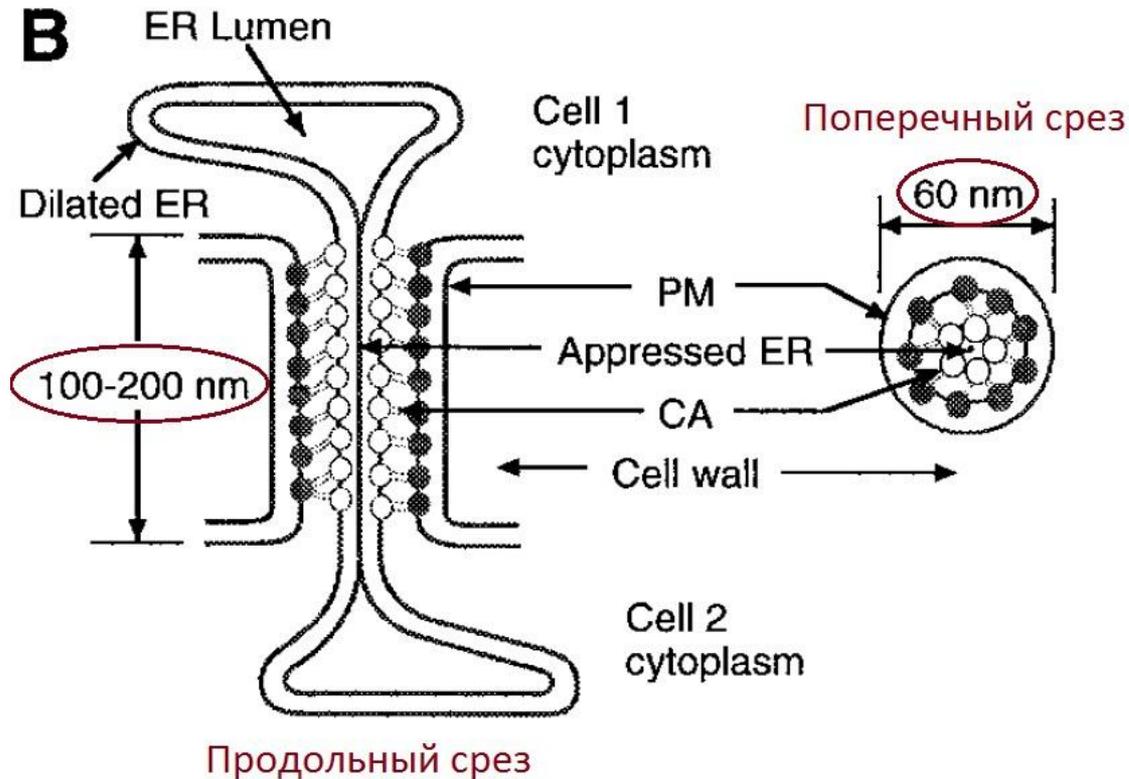
По происхождению плазмодесмы делятся на:

Первичные – формируются между сестринскими клетками, развиваются из канальцев в фрагмопласте во время цитокинеза.

Вторичные – формируются между соседними клетками, развиваются в результате ферментативной деградации материала клеточной стенки, срединной пластинки, слияния плазмалеммы соседних клеток и развития десмотрубочки в цитоплазматическом канале плазмодесмы.



Ультраструктура плазмодесм



Спицеобразные линкерные белковые структуры (миозин + актин) разделяют цитоплазматическое кольцо на микроканалы. По ним идет диффузия ионов, небольших органических метаболитов (АК, сахара), возможно, гормонов.

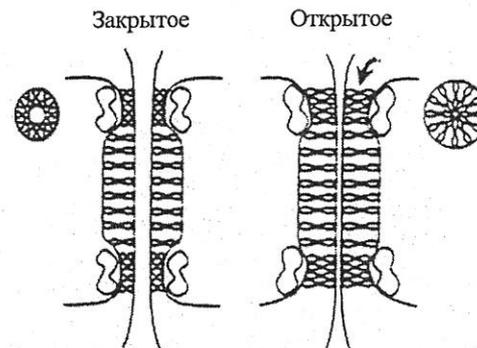
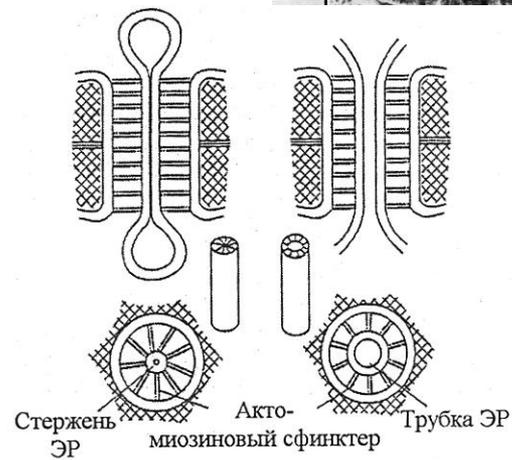
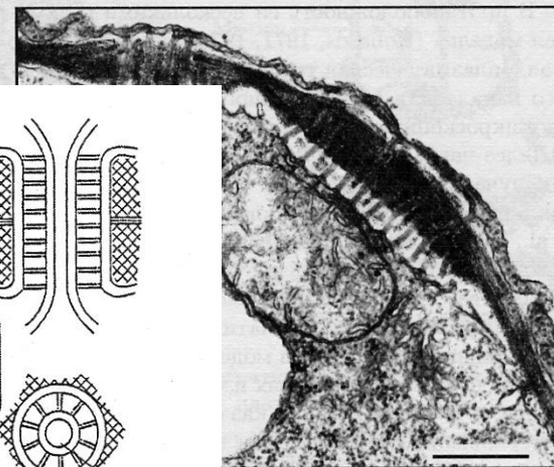
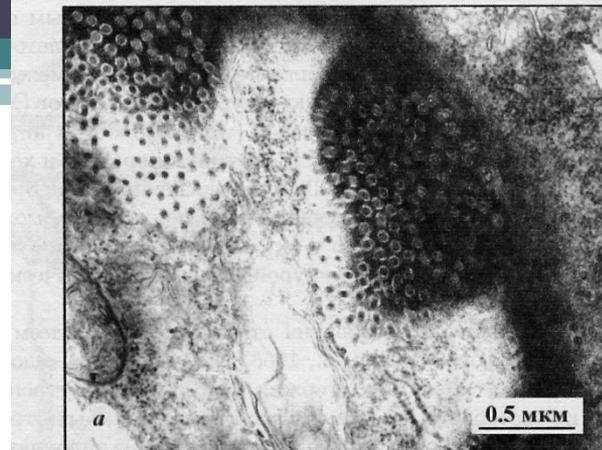
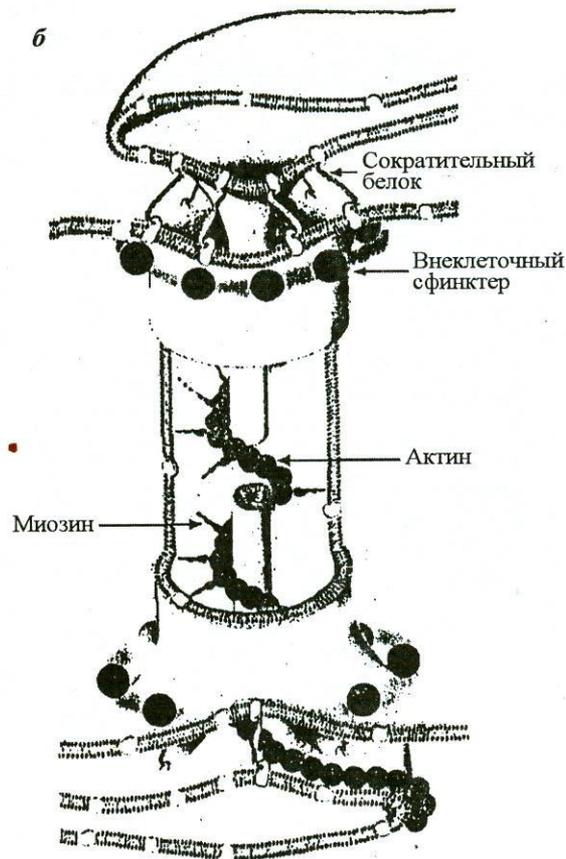
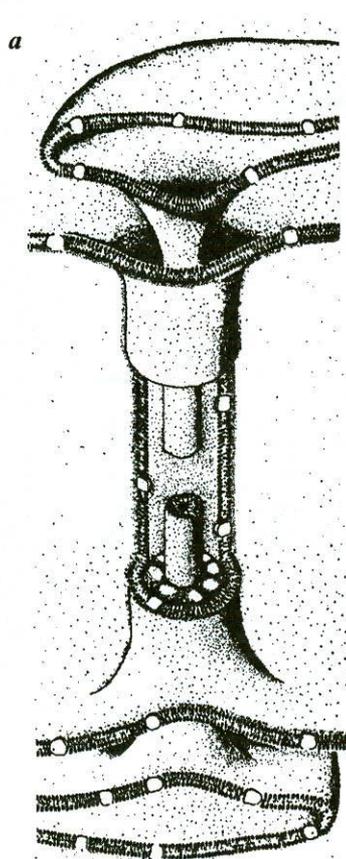
Через плазмодесмы возможен межклеточный транспорт растительных и вирусных белков

- **Косвенное подтверждение**
Использование радиоактивной метки – ^{35}S -метионин (при введении в лист, метка была зарегистрирована как в клетках-спутницах так и в безъядерных ситовидных элементах)
- На этих данных было сделано предположение, что белки, синтезированные в клетках-спутницах, транспортируются в ситовидные элементы

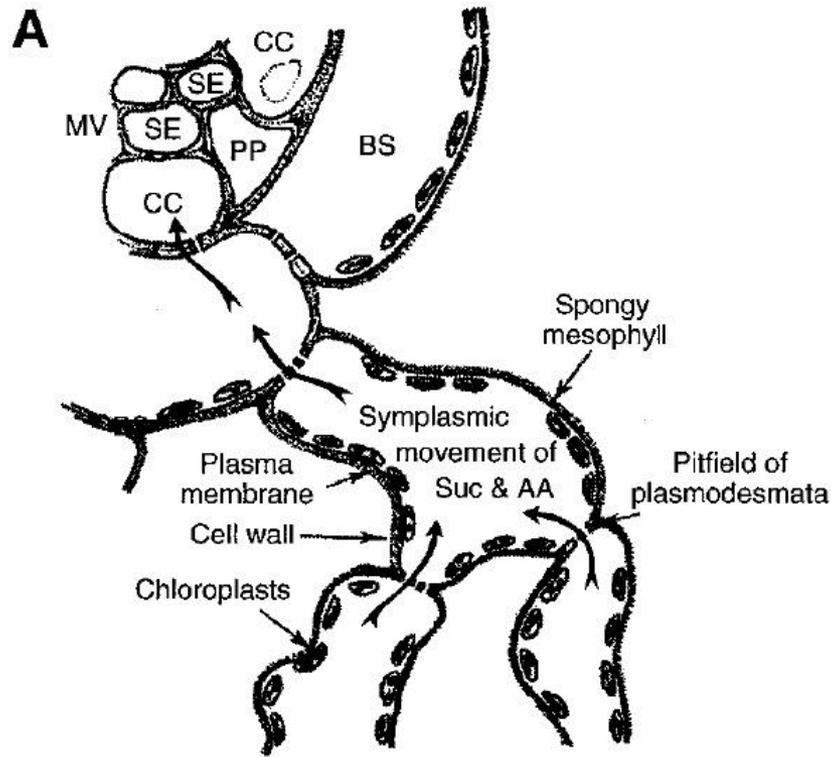
Характеристики плазмодесм

- **Плотность** ($= N \text{ плазмодесм} / S \text{ поверхности КС}$)
- **Пространственное распределение** плазмодесм на поверхности клетки (в ткани / органе) растения
 - Показатели наличия и интенсивности транспортных межклеточных потоков, используются во многих физиологических исследованиях (напр.: загрузка/разгрузка ассимилятов в системе дальнего транспорта, поглощение и транспорт по растению элементов минерального питания)
- **SEL** (**s**ize **e**xclusion **l**imit, kDa) – максимальная масса молекул, способных проникать через плазмодесму - не является постоянной величиной: 700 -1000 Da ~ 1.5 - 2.0 nm.

Структура и работа плазмодесм

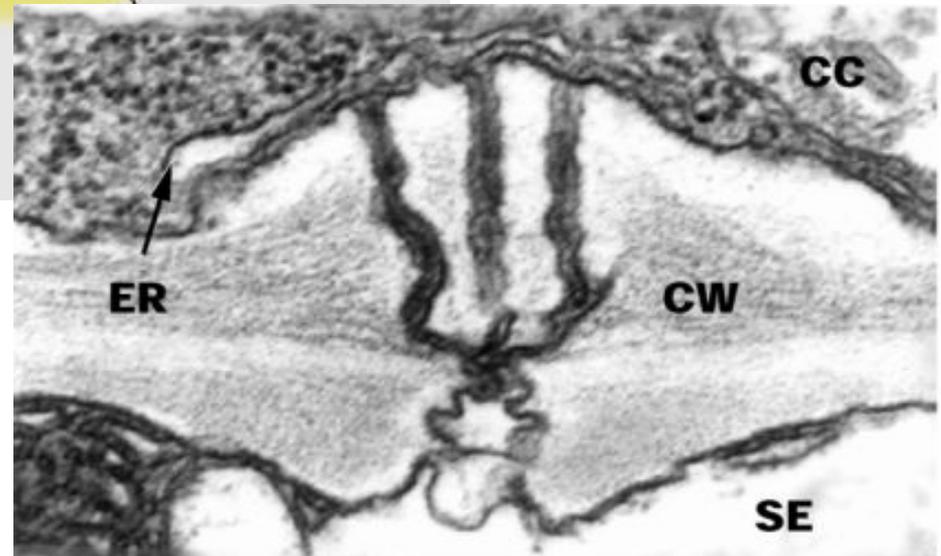
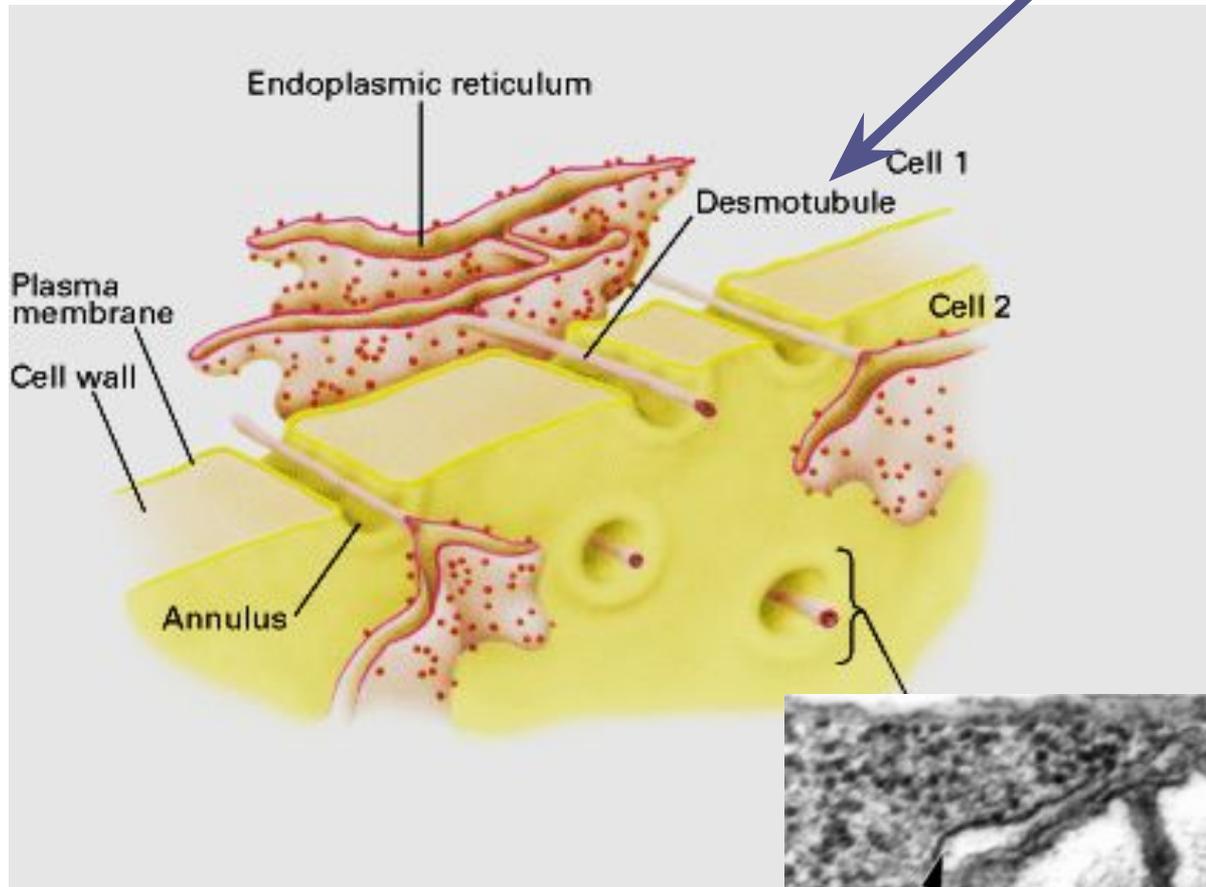


Надклеточная организация тела высших растений («supracellular organisms»)



- **Апопласт** – непрерывный континуум клеточных стенок, межклеточных пластинок и межклетников
- **Симпласт** – общеорганизменная система сообщающихся через плазмодесмы протопластов клеток
- **Эндопласт** – межклеточный континуум эндоплазматических сетей
- «Клетка» высших растений представляет собой в большинстве случаев сильно, но **не полностью изолированный** компартмент тела, включающий участки общеорганизменных систем: апопласта, симпласта (+эндопласта)
- В теле растения существуют изолированные клетки/ группы клеток (напр.: замыкающие клетки устьиц)

ЭНДОПЛАСТ



Гамалей Юрий Владимирович

Транспортная система сосудистых растений.- СПб.: Изд-во С.-Петербургского университета, 2004. - 424 с.

"Симпласт" этимологически означает континуальность клеточных протопластов растений. Но исходно термин был предложен для обозначения общности только ситовидных трубок - системы транспорта ассимилятов. Содержимое их полостей предполагалось идентичным цитоплазме. Выяснилось, что это ошибка. Оно идентично вакуолярному экссудату

Вакуом паренхимы и ситовидные трубки флоэмы – транспортная сеть для распределения фотосинтатов. В молодой клетке вакуом представлен системой канальцев и пузырьков, которые по мере роста и дифференцировки клетки увеличиваются и сливаются в одну в одну большую центральную вакуоль.

2 транспортные сети

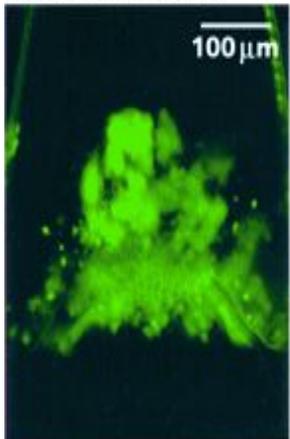
Симпласт

Апопласт

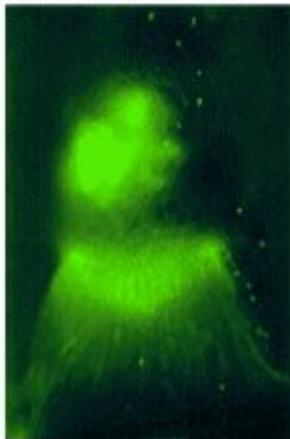
Вакуом
или
Эндопласт

Цитозоль
не имеет
серьёзного
транспортного
значения

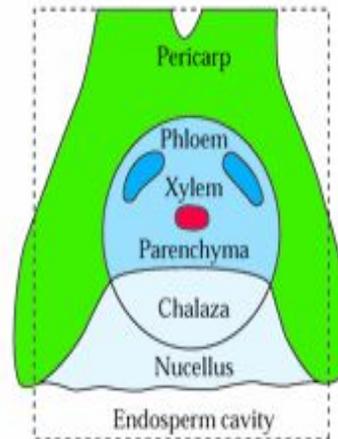
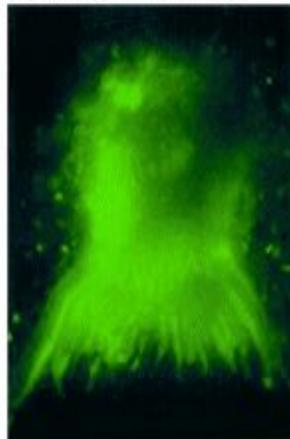
(A) 3-kDa dextran + 1 h



(B) 10-kDa dextran + 1 h



(C) 10-kDa dextran + 24 h



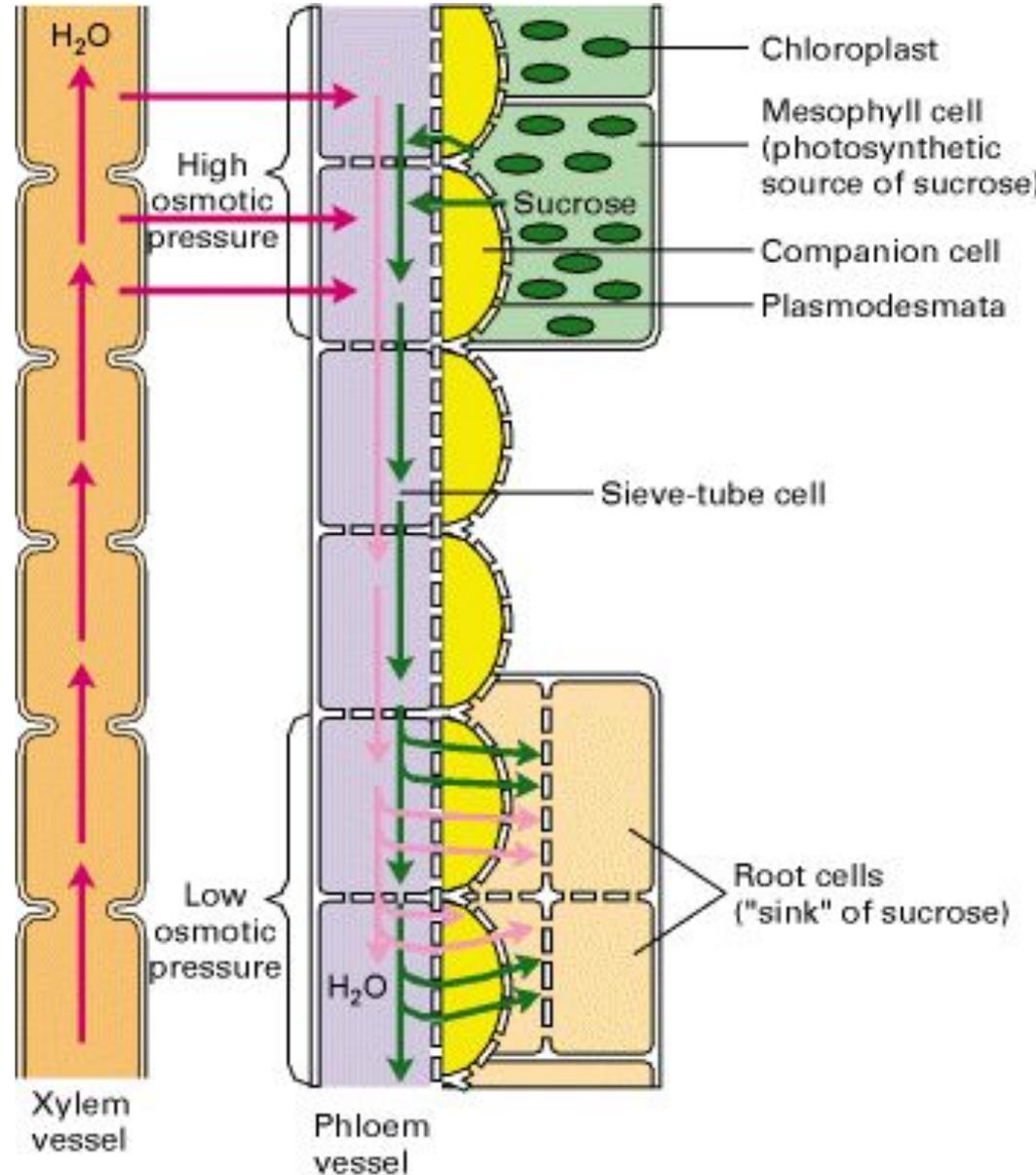
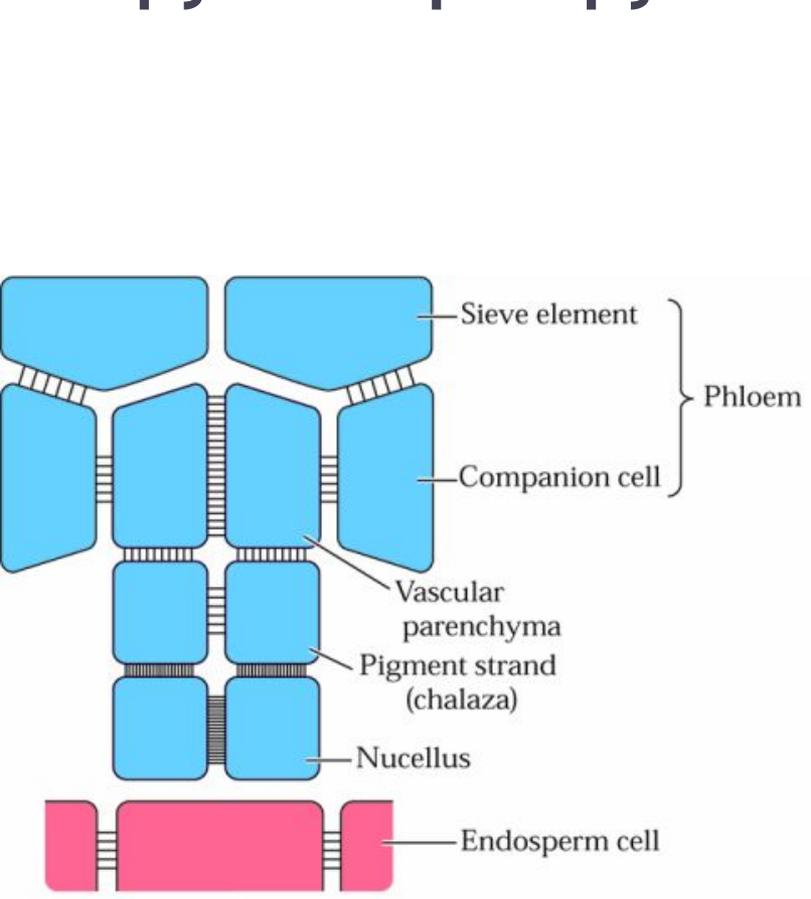
Гамалей Ю.В. «СИМПЛАСТНЫЕ И АПОПЛАСТНЫЕ ДВУДОЛЬНЫЕ»
Ботанический журнал, 2005, т 90, № 10, с. 1473-1485

- **Симпластное растение** – загружает терминальную флоэму ассимилятами по эндоплазматической сети симпласта. Определяющими являются транспортные свойства тонопласта
- **Апопластное растение** – растение, флоэма которого загружается из апопласта. Первичная причина альтернативности двух механизмов загрузки флоэмы – вариации барьерных свойств тонопласта.

Апопластные двудольные – эволюционно молодая группа растений (около 20 000 видов),

Становление группы связано с экспансией лугово-степной растительности 5–7 млн. лет назад. У этой группы происходит кардинальное изменение барьерных свойств тонопласта.

Загрузка и разгрузка флоэмы



Плазмодесмы между клетками-спутницами и ситовидными элементами - точки интенсивного транспорта веществ

- Необходим транспорт белков в безъядерные членики ситовидных трубок для поддержания их функциональной активности
- Получение (использование стилетов тлей) и исследование белкового состава флоэмного экссудата
- Микроинъекции отдельных белков, полученных при фракционировании флоэмного экссудата (PP1, PP2, Ubiquitin), и белков, полученных в культуре клеток *E. coli*, вызывают увеличение SEL, и наблюдается транспорт этих белков в соседние клетки.



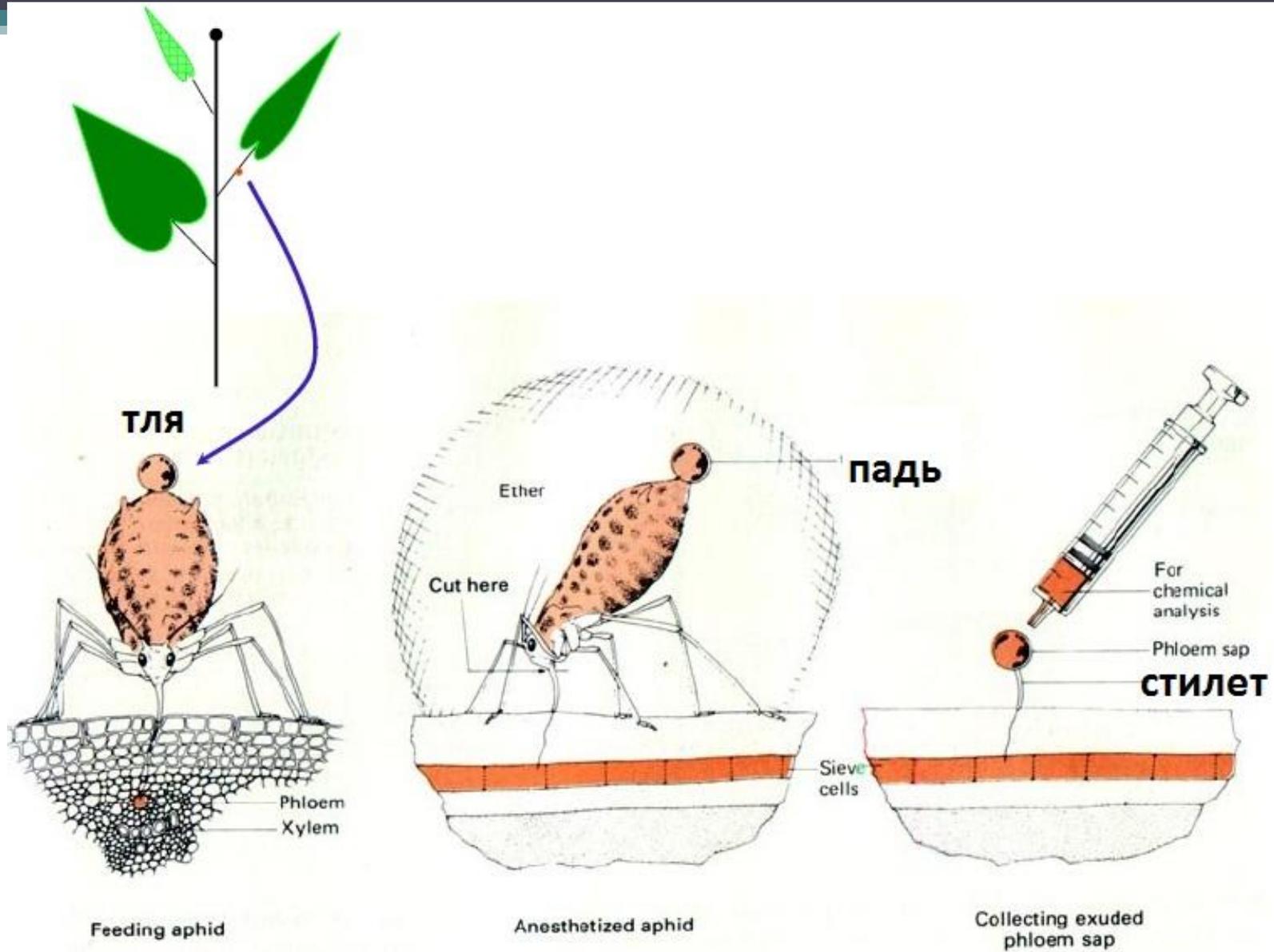


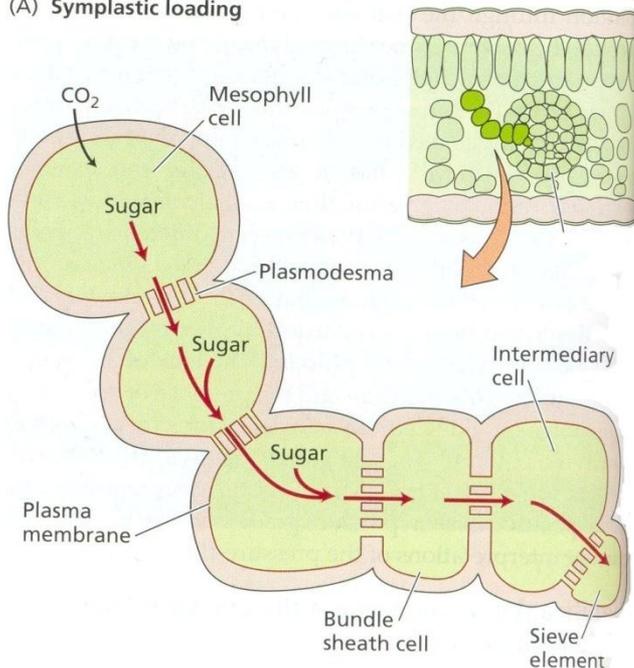
Figure 5-15 harvest phloem sap

Симпластическая загрузка флоэмы

Intermediary Cells:

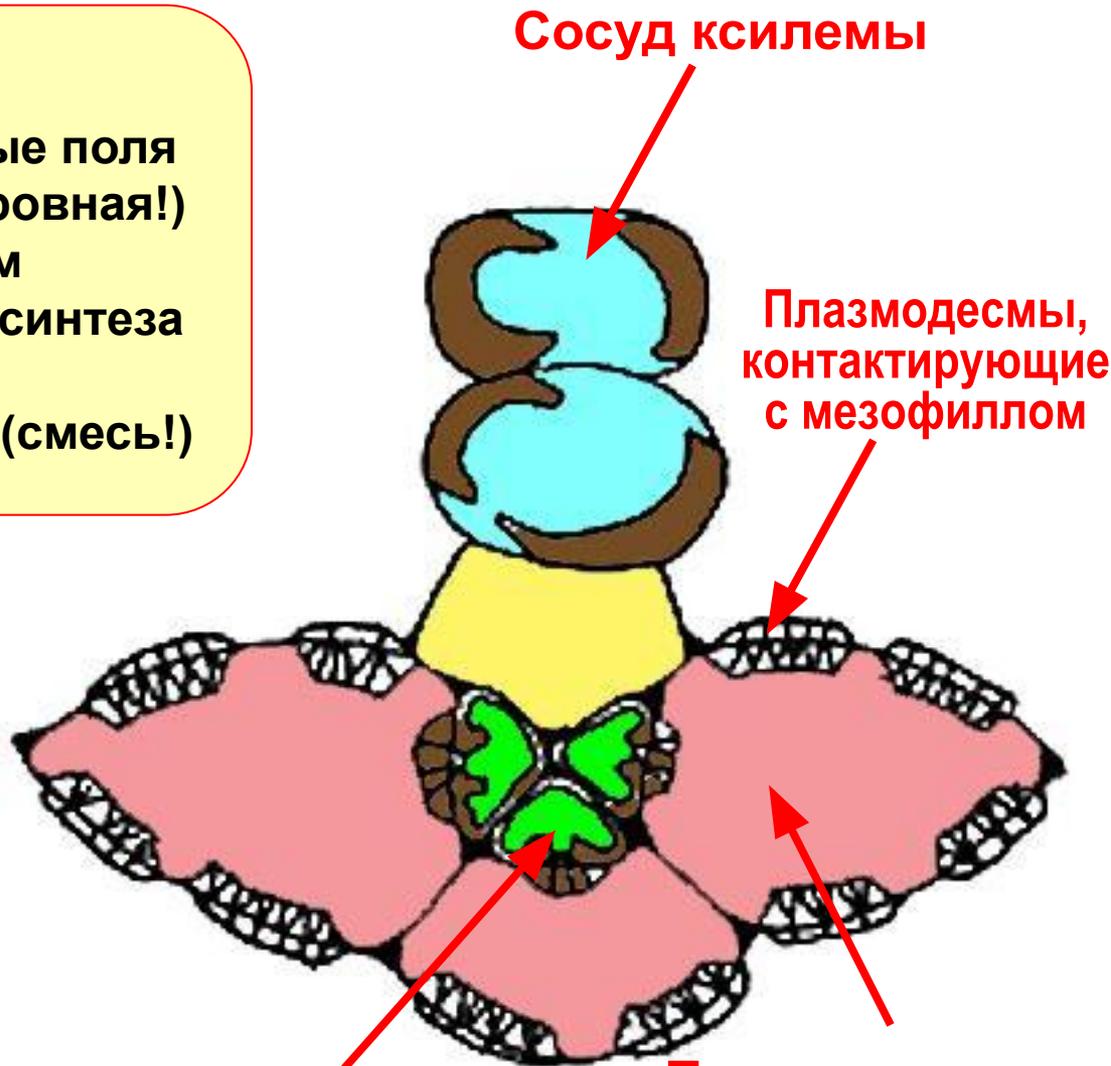
1. Обильные плазмодесменные поля
2. Толстая клеточная стенка (ровная!)
3. Развитый единый хондриом
4. Специфические ферменты синтеза
5. Разнообразные продукты транспорта фотоассимилятов (смесь!)

(A) Symplastic loading



Сосуд ксилемы

Плазмодесмы, контактирующие с мезофиллом



Ситовидный элемент флоэмы

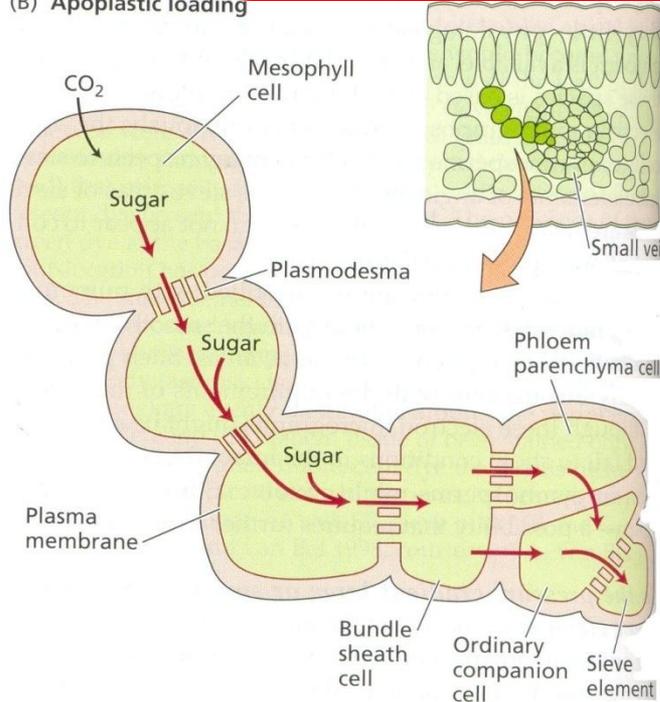
Промежуточная клетка-спутница (Intermediary Cell)

Апопластическая загрузка флоэмы

Transfer Cells:

1. Единичные плазмодесмы
2. Толстая клеточная стенка (складки!)
3. Развитый единый хондриом
4. Сахарозно-протонный симпортер + H^+ -АТФаза на мембране (рН > 7!)
5. Преимущественный продукт транспорта – сахара

(B) Apoplastic loading



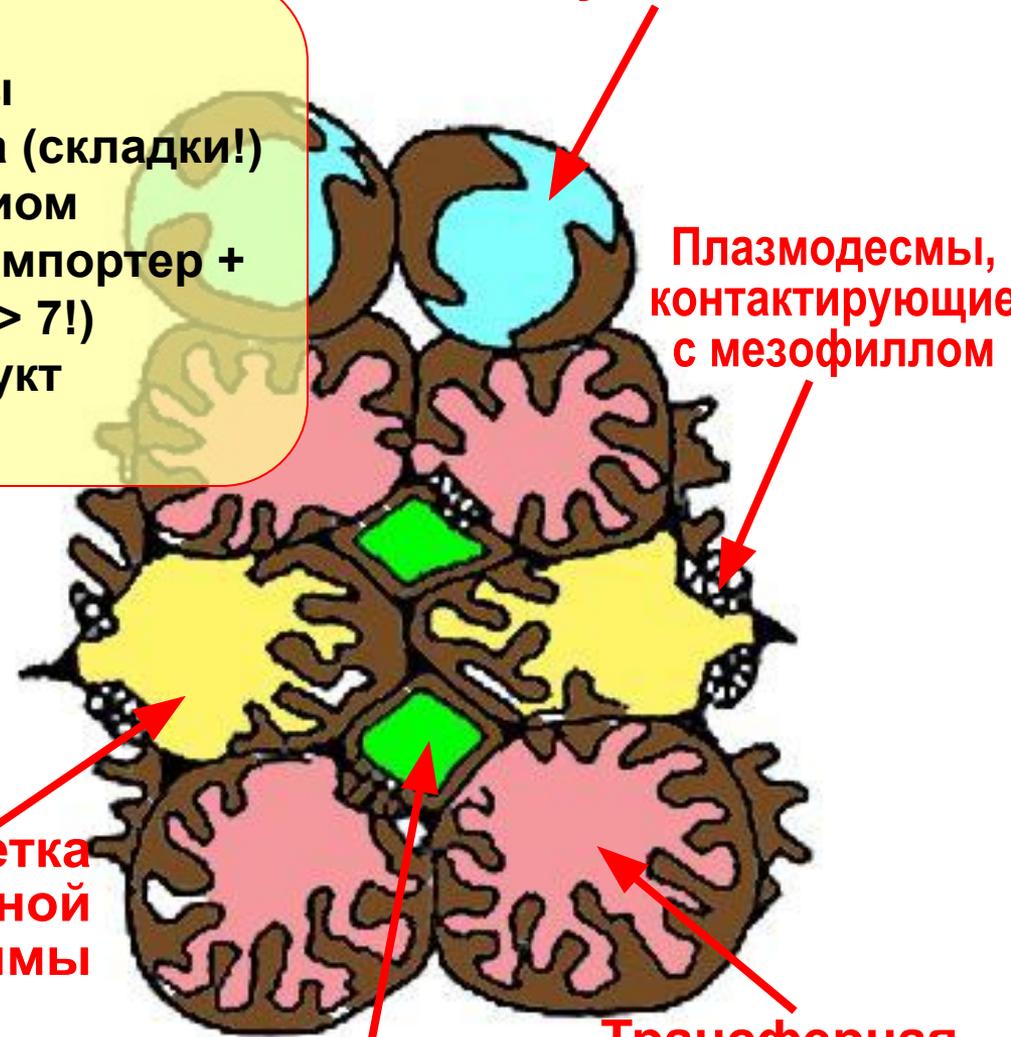
Сосуд ксилемы

Плазмодесмы,
контактирующие
с мезофиллом

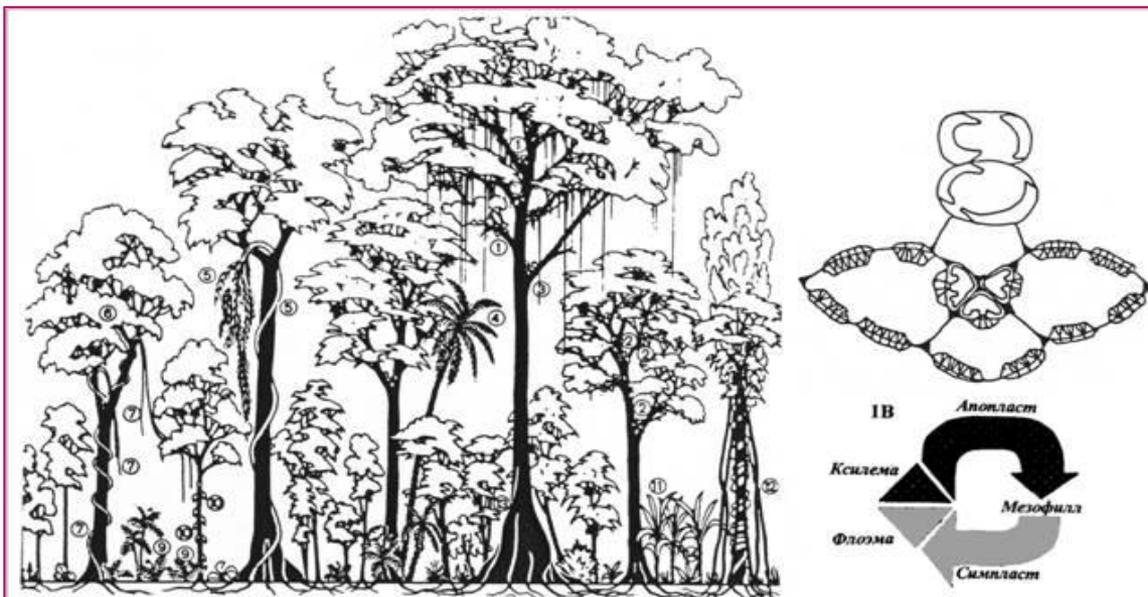
Клетка
флоэмной
паренхимы

Ситовидный
элемент флоэмы

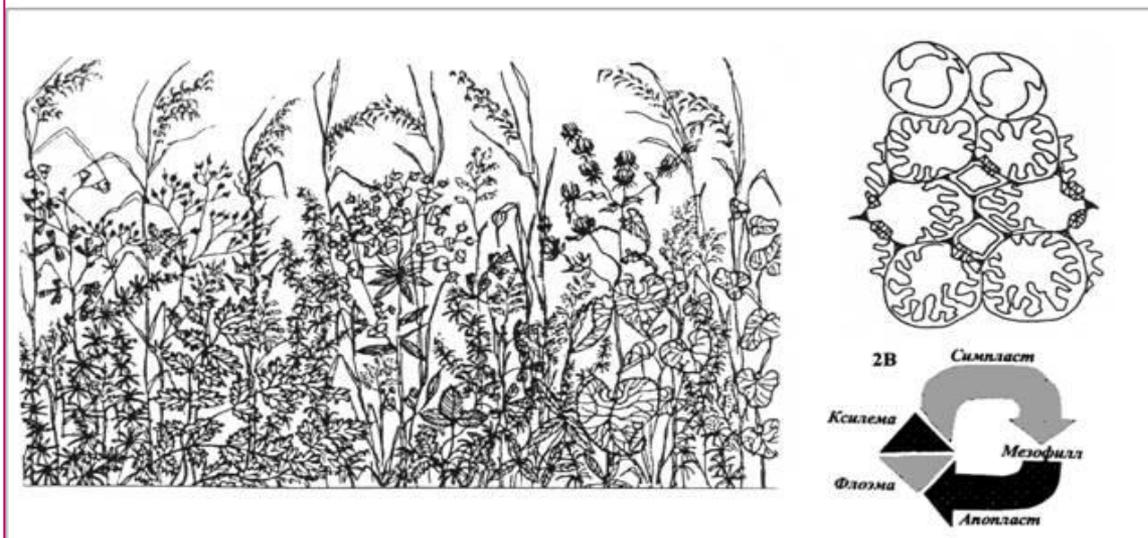
Трансферная
клетка-спутница
(Transfer Cell)



Способы загрузки и разгрузки ксилемы и флоэмы зависит от многих факторов – жизненных форм, условий существования, типа органов

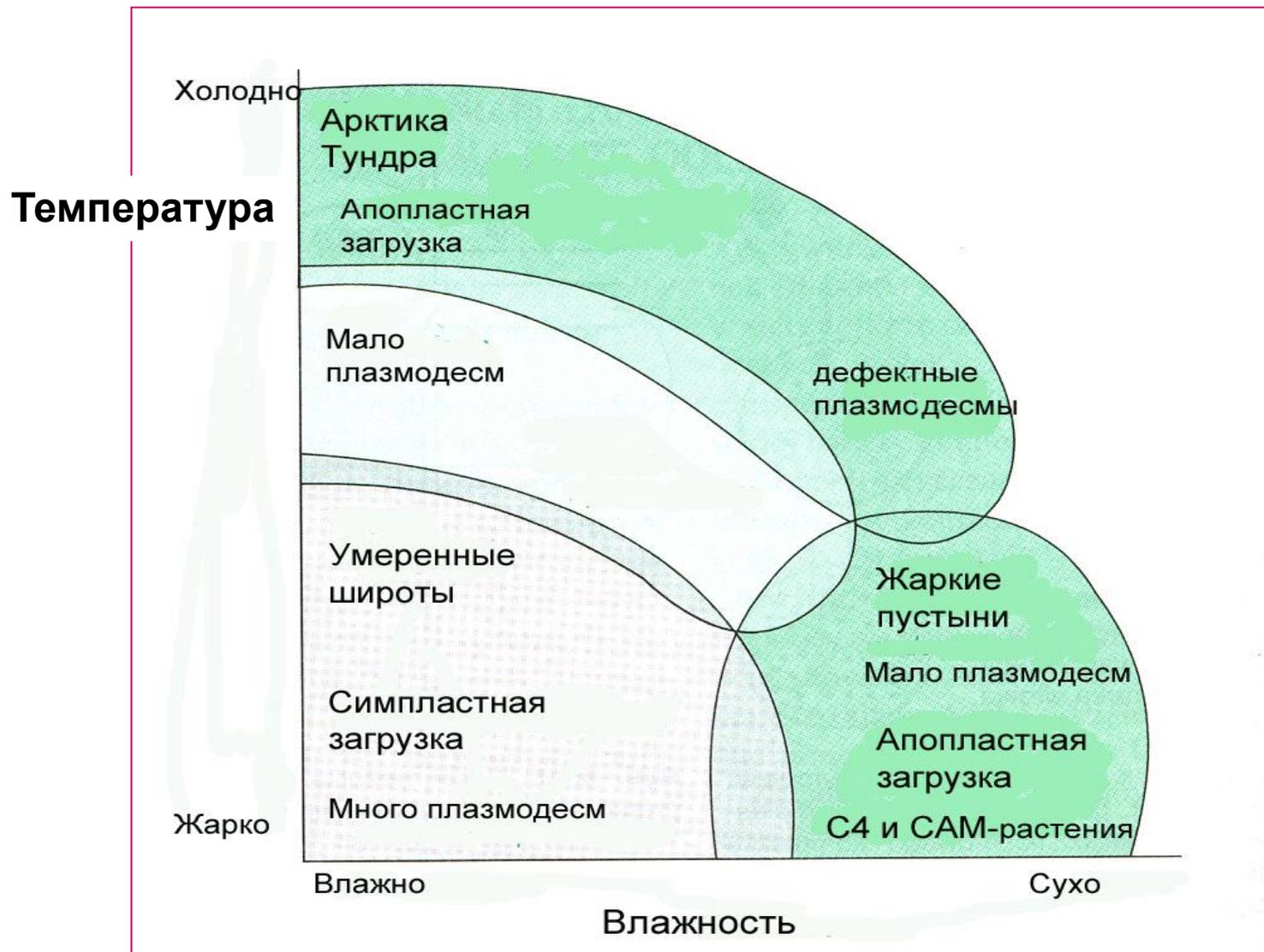


Симпластные растения



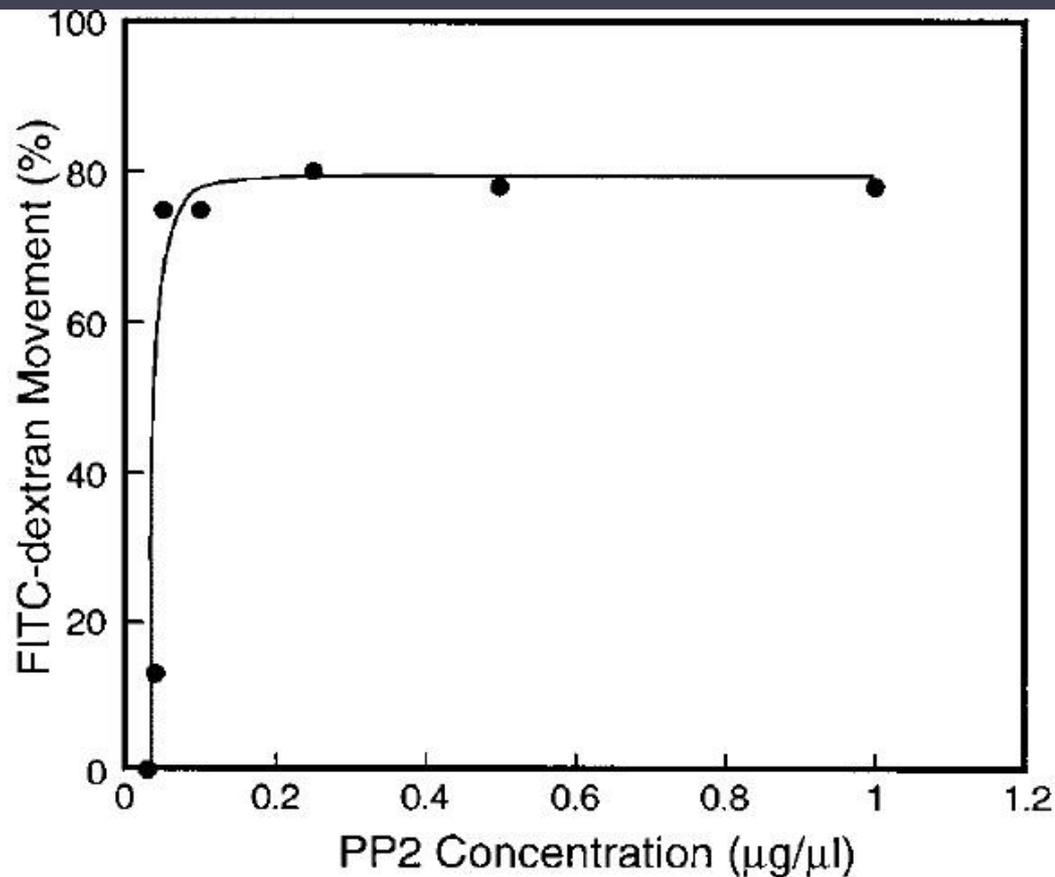
Апопластные растения

Способы загрузки и разгрузки ксилемы и флоэмы зависят от многих факторов - жизненных форм, условий существования, типа органов



Эксперименты по выяснению пороговой концентрации флоэмных белков, необходимой для межклеточного транспорта

- Коинъекция постоянного количества FITC-декстранов 20kDa [fluorescein isothiocyanate – флуоресцентная метка прикреплена к молекуле полисахарида (декстрана)] и последовательного уменьшаемого количества PP2
- Учет разбавления PP2 в клетке и его перемещения в соседние клетки
- 20-100nM – пороговый уровень PP2 необходимый для взаимодействия с плазмодесмами

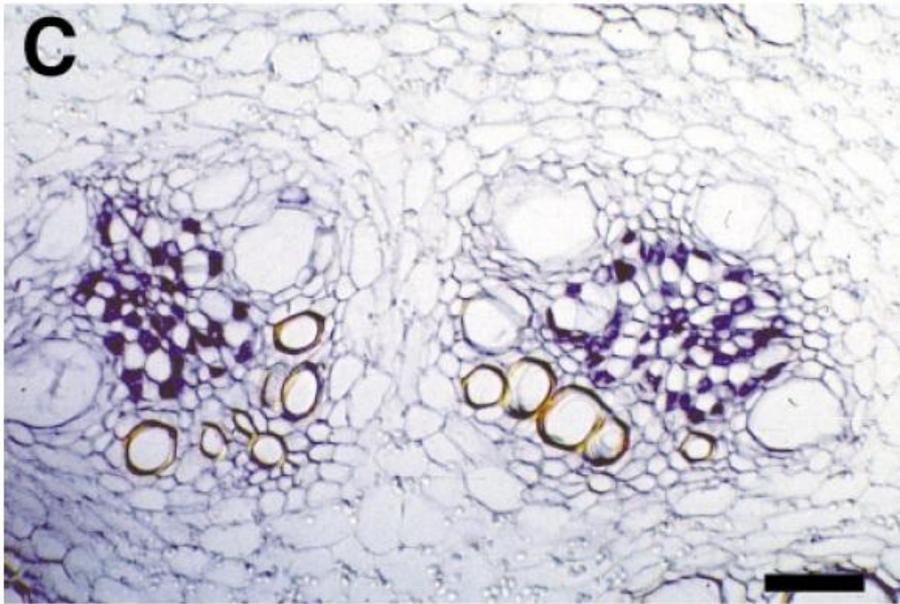


Microinjection experiments performed to determine the threshold level of the pumpkin phloem protein 2 (PP2) required to potentiate cell-to-cell movement of co-injected 20 kDa FITC-dextran. PP2 used in these experiments was purified from *C. maxima* phloem exudate. In each microinjection series, the level of FITC-dextran was held constant (1 mM) while the level of PP2 was serially reduced until fluorescence associated with the FITC-dextran did not move out from the injected cell (from Balachandran *et al.*, 1997).

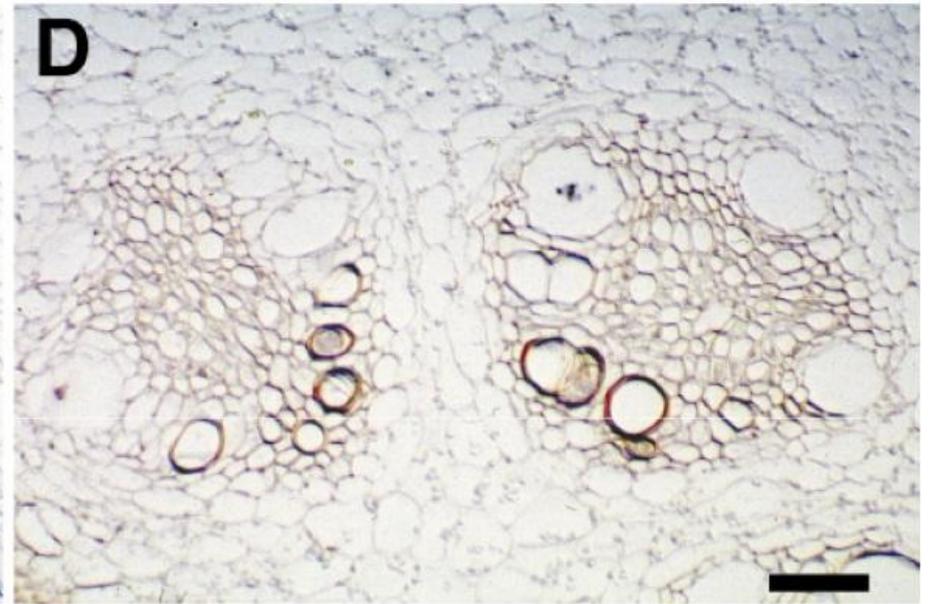
Rice Phloem Protein 13kDa (RPP13-1)

- Высококонсервативный белок флоэмного экссудата, принадлежащий к тиоредоксиновому семейству
- Экспрессируется только в клетках-спутницах (в листе и стебле риса) - показано с помощью метода *in situ* гибридизации мРНК

Проводящий пучок стебеля риса, in situ гибридизация мРНК

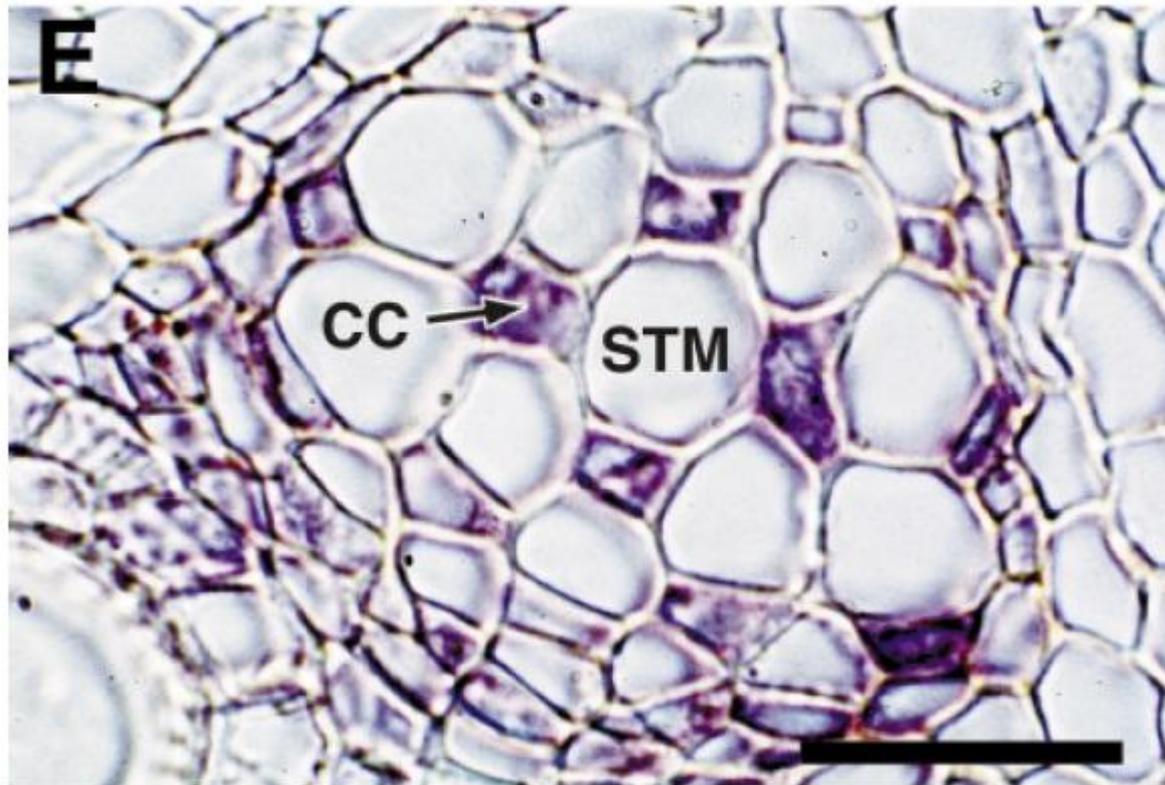


Опыт



Контроль

In situ гибридизация мРНК RPP13-1 в проводящем пучке листа риса (CC - companion cell, STM - sieve tube member)



Мутантный анализ RPP13-1

- Выявлено 2 участка, играющих важную роль в эффективном взаимодействии с плазмодесмами:
- ✓ 5 аминокислотная (1-5) последовательность на N-конце (MT1,2)
- ✓ и 4х аминокислотная последовательность остатков 101-104 (MT8)

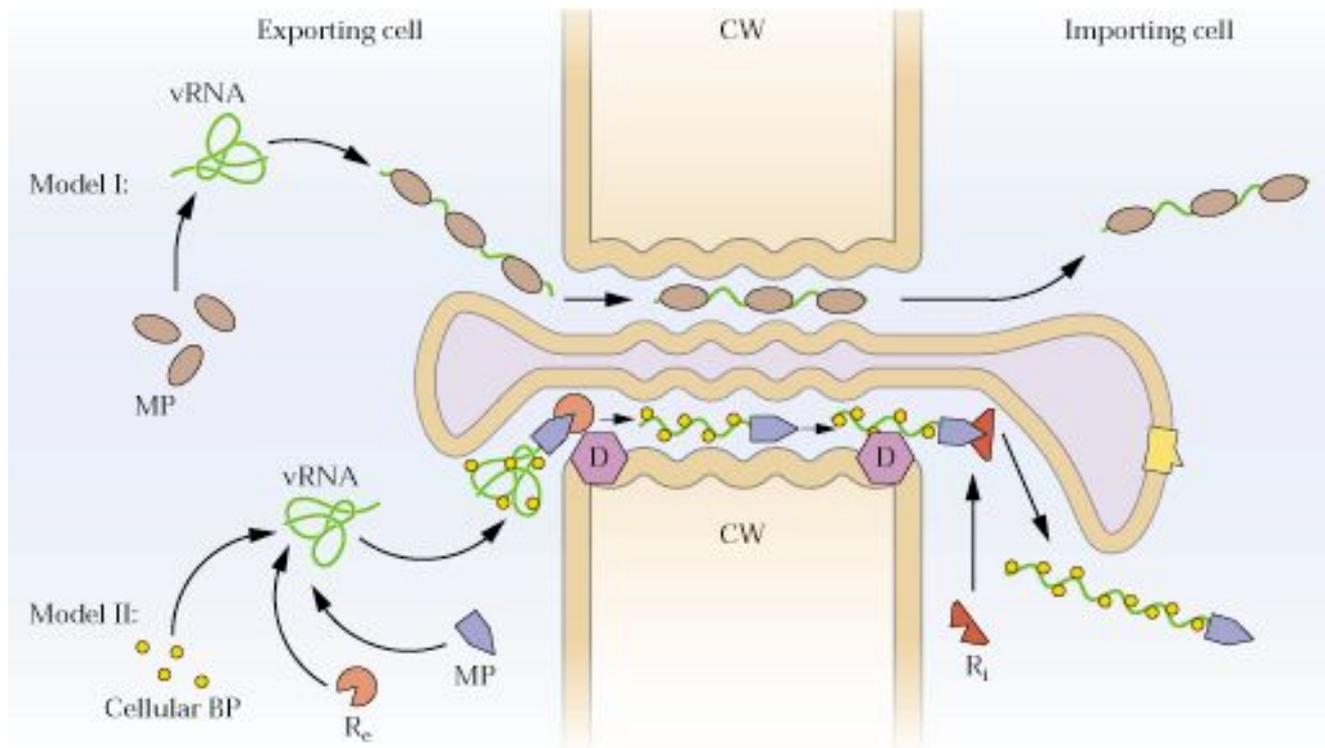
Транспорт вирусных белков: viral movement protein (MP)

- MP – неструктурные белки, кодируемые в вирусном геноме, основной функцией которых является – распространение вирусной инфекции в теле растения хозяина; некоторые вирусы имеют несколько различных MP
- MP вступают во взаимодействие с плазмодесмами клетки, в результате чего:
 - происходит увеличение SEL: 1kDa -> более 20kDa (не более 50kDa)
 - происходит распространение белка в соседнюю клетку
 - становится возможным межклеточный транспорт инфицирующих транскриптов вируса (РНК)

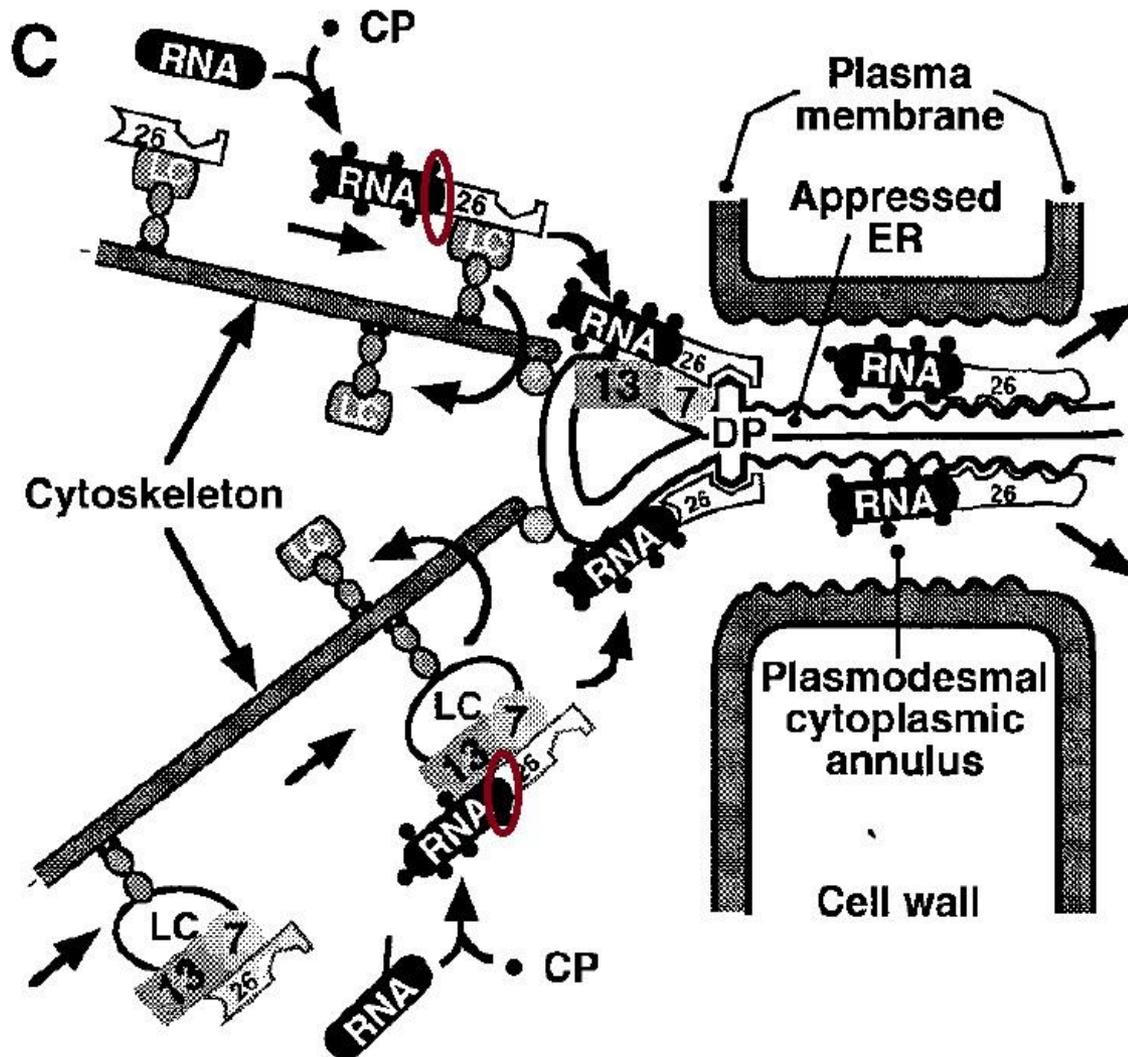
Одновременная инъекция flu.-labelled-MP и flu.-labelled-РНК – ведет к быстрому переносу протеонуклеинового комплекса в соседние клетки.

=>Предположение о том, что плазмодесмы могут опосредовать избирательный межклеточный транспорт эндогенных белок-РНК комплексов.

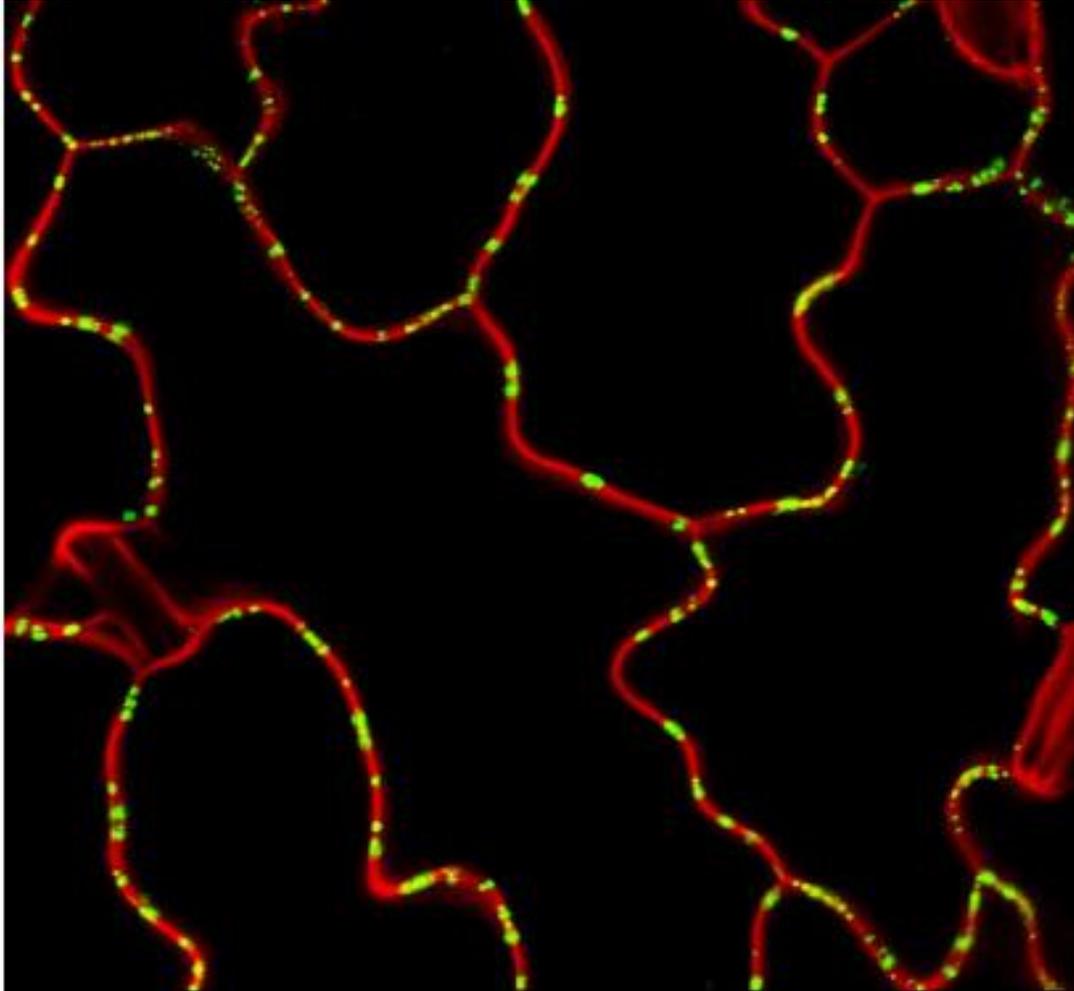
Модели распространения вирусной инфекции



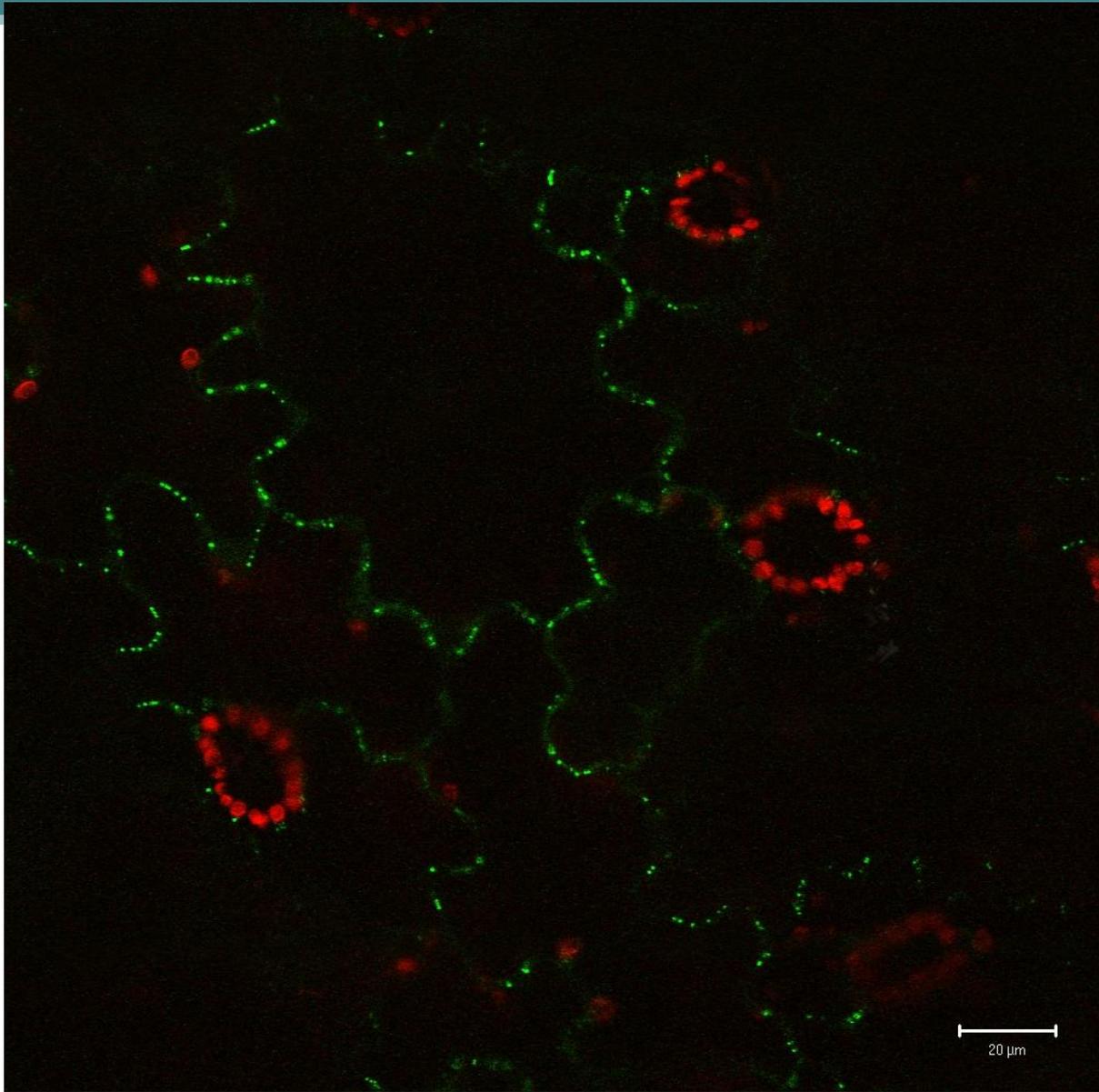
Модель распространения инфекции клевера **white clover mosaic virus - WCLMV**



- ✓ **LC** – linker complex (кодируется растением)
- ✓ **26** – virus MP 26kDa
- ✓ **137** – TGBp – вирусный белок (функции до конца не выяснены)
- ✓ **RNA** – одноцепочечная РНК вируса
- ✓ **CP** – coat protein
- ✓ **DP** – docking protein – **предполагаемый** белок-рецептор плазмодесм
- ✓ **Non-sequence-specific binding** of single-stranded RNA+CP to the anchored 26MP



- Эпидермальные клетки *Arabidopsis thaliana* экспрессирующей MP17-GFP (зеленый)
- Propidium iodide (окрашивание пектинов) маркирует клеточные стенки



- Другой белок - TMV MP30-GFP – тоже зеленый. Видна локализация в плазмодесмах

Транспорт собственных белков: KN1 (KNOTTED1)

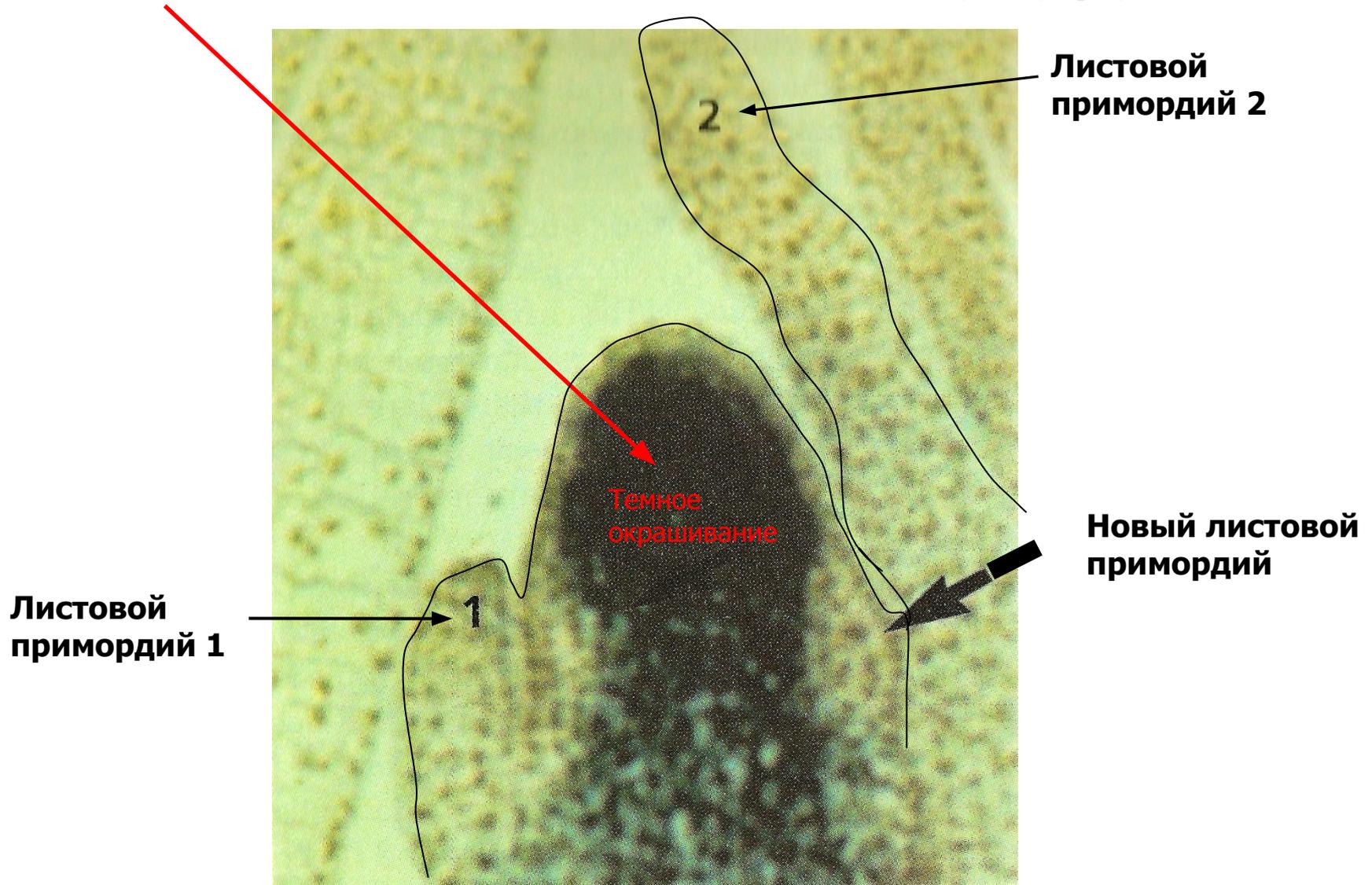
– фактор транскрипции, индуцирует дифференцировку клеток

Микроинъекция KN1 в клетки мезофилла растений кукурузы и табака вызывает эффекты, схожие с инъекцией МР:

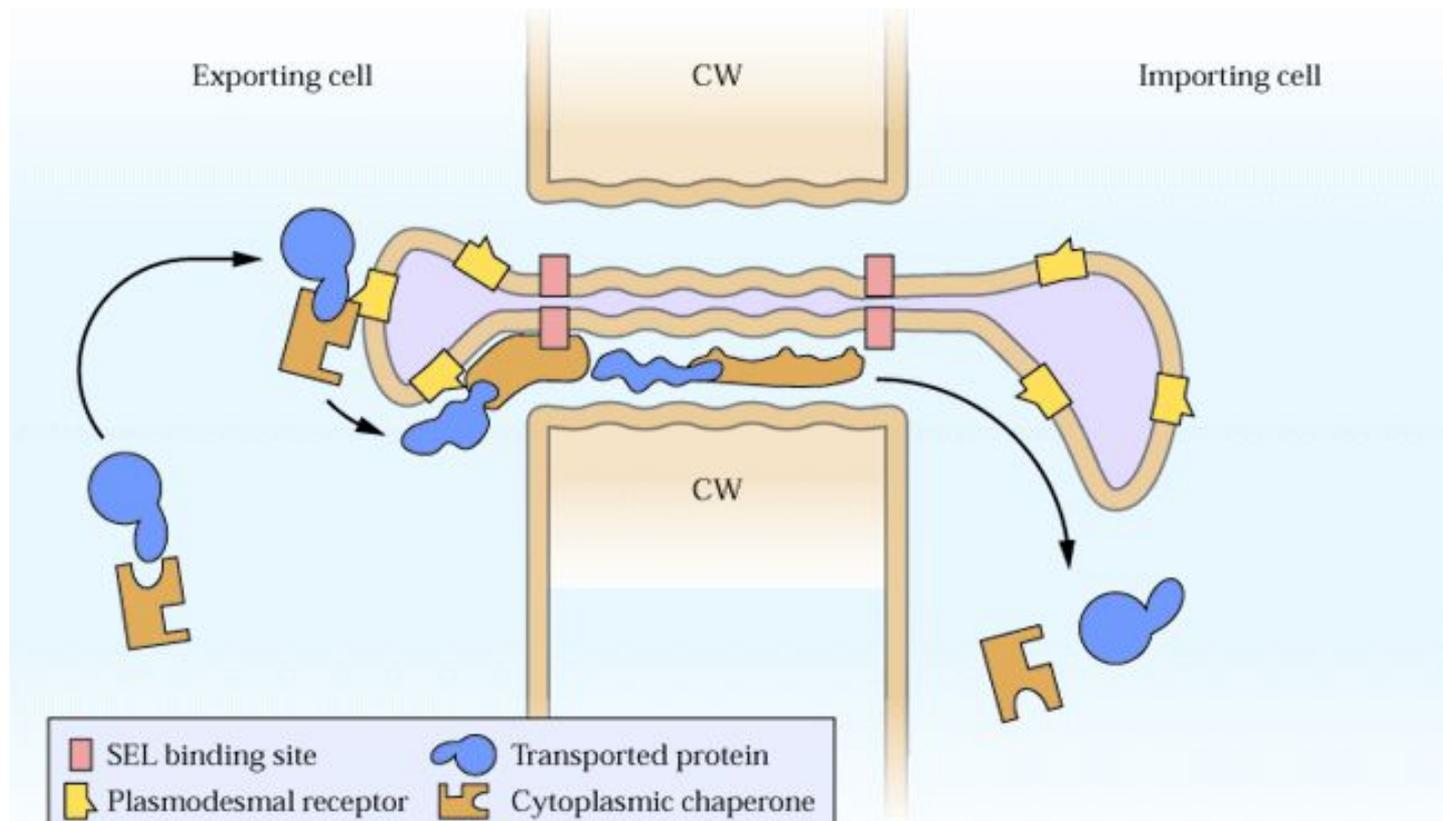
- a) Увеличение SEL 1.0kDa → 40kDa
- b) Быстрое распространение белка в соседние клетки

Также KN1 выступает посредником в межклеточном транспорте РНК, но в отличие от вирусного МР этот эндогенный фактор транскрипции успешно взаимодействует только с собственными последовательностями РНК (**sequence specificity**).

мРНК гена *KN1* в апексе кукурузы



Обобщенная модель транспорта больших молекул



Частичное разворачивание белковой молекулы - необходимо для транслокации через плазмодесму

Белки флоэмного экссудата различной массы (фракции I-VI) распространяются по плазмодесмам одинаково до 20kDa-40kDa (за SEL следят по транспорту FITC-dextran)

Table 1. Ability of cucurbit phloem sap proteins to increase plasmodesmal SEL and traffic cell to cell

Size-fractionated proteins and FITC-dextran were co-injected into mesophyll cells within the cotyledons of *Cucurbita maxima* plants. Control injections performed with LYCH established that the plasmodesmata, within the injection site, permitted rapid and extensive movement of this small membrane-impermeable probe (from Balachandran *et al.*, 1997).

Phloem exudate proteins			Microinjections ^a		
Fraction no.	Size range	Concentration ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) ^b	10 kDa FITC-dextran	20 kDa FITC-dextran	40 kDa FITC-dextran
I	10–20 kDa	0.05	11 (15; 73%)	11 (15; 73%)	0 (10; 0%)
II	21–26 kDa	0.05	13 (16; 81%)	12 (15; 80%)	0 (10; 0%)
III	27–50 kDa	0.05	11 (14; 79%)	10 (14; 71%)	0 (11; 0%)
IV	50–80 kDa	0.25	10 (14; 71%)	11 (14; 79%)	1 (10; 10%)
V	80–100 kDa	0.10	10 (15; 67%)	11 (14; 79%)	0 (12; 0%)
VI	≥ 100 kDa	0.05	11 (14; 79%)	10 (15; 67%)	2 (12; 17%)

^aNumber of injections in which the fluorescently labelled probe moved from the injected cell into the surrounding tissue (total number of injections in each experiment and percentage movement given in parentheses). Fluorescence associated with the injected FITC-dextran began to move into neighbouring cells upon delivery into the target cell and, within 1–2 min, it had spread to at least 10 cells.

^bRepresents phloem sap protein concentration back-loaded into the microinjection pipette.

Cross-linking experiments (препятствие разворачиванию белковой молекулы) и использование с наночастиц золота различных размеров: 1.4, 6, 15 nm (увеличивают общий размер молекулы) для выяснения механизма транслокации белков через плазмодесмы

- Cross-linking KN1 – не вызывает увеличения SEL и не распространяется в соседние клетки
- Конъюгаты: **KN1-1.4nm gold** – распространяется через плазмодесмы, но с меньшей эффективностью; **KN1-6nm gold** и **KN1-15nm gold** не распространяются и являются ингибиторами при транспорте KN1 wild type
- Микроинъекции проведенные с МР **CMV** (cucumber mosaic virus) дают такие же результаты

①

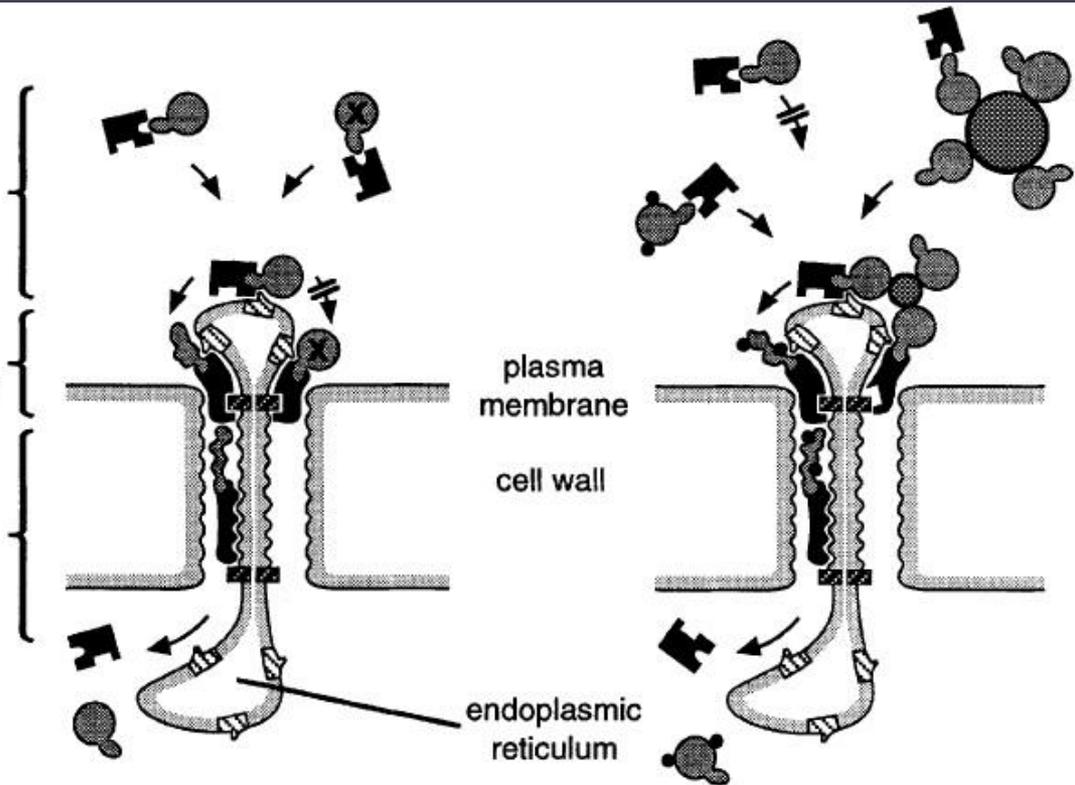
chaperone interaction and binding to the plasmodesmal receptor

②

conformational change and transfer to the SEL binding site

③

protein unfolding, translocation through the dilated microchannel, and release of components



cytoplasmic chaperone



plasmodesmal receptor



SEL binding site



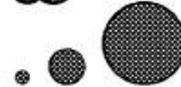
KN1



internally crosslinked KN1



1.4 nm, 6 nm, and 15 nm gold particles



Плазмодесмы как ворота для инфекции

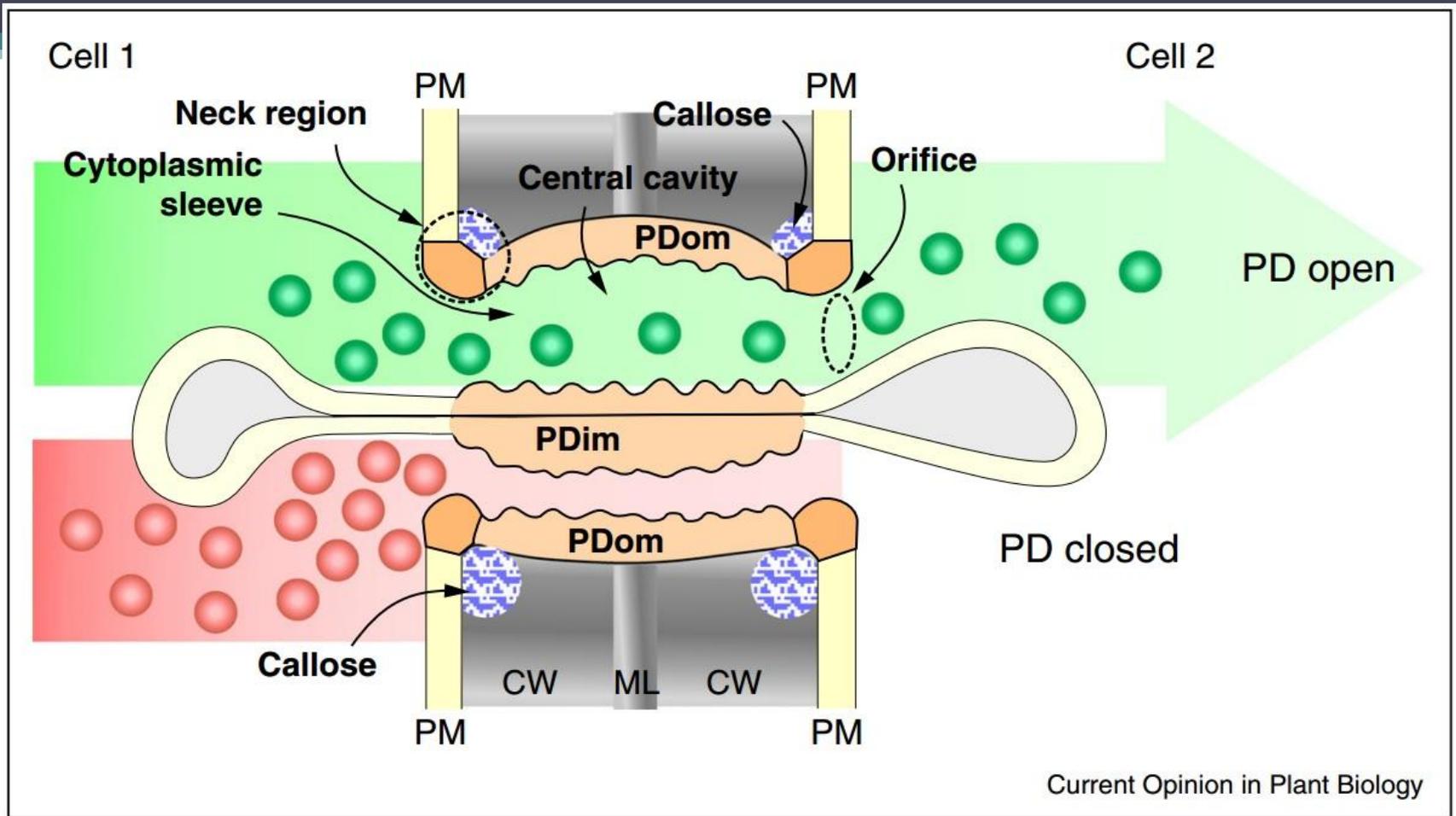
Плазмодесмы используются инфекционными агентами для распространения по организму растения (транспорт вирусных РНК, целых вирионов). В связи с этим у растений имеются механизмы врожденного иммунитета обеспечивающие ограничение симпластного транспорта по плазмодесмам при биотическом стрессе.

Биотический стресс → ↑ салицилаты →
↑транскрипция **PDL5** (**p**lasmodesmata-located
protein **5**) → накопление PDL5 в области
плазмодесм → интенсификация отложения
каллозы → ограничение транспорта по симпласту
(ограничение очага инфекции)

FLS2 (**FL**AGELLIN SENSING **2**) и **LYM2** (**LY**SIN
MOTIF DOMAINCONTAINING
GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED
PROTEIN **2**) – мембранные рецепторы
бактериальной инфекции локализованы в области
плазмодесм и обеспечивают ограничение
симпластного транспорта в случае инфекции

Вероятно плазмалемма выстилающая плазмодесму и мембрана ЭПР десмотрубочки отличаются по своим физико-химическим параметрам по сравнению с плазмалеммой подстилающей клеточную стенку и мембраны кортикального ЭПР, соответственно. На этом основании вводятся термины:

1. PDom (outer membrane) – участок плазмалеммы, выстилающей плазмодесму;
2. PDim (inner membrane) – участок мембраны ЭПР десмотрубочки (сжатый ЭПР = appressed ER)



Current Opinion in Plant Biology

Каллоза (β 1-3 глюкан) откладывается в области шейки. Содержание каллозы непостоянно и находится в обратной корреляции с пропускной способностью плазмодесм.

Белки ассоциированные с плазмодесмами

С центральной полостью ассоциированы: TMV MP (обеспечивает транспорт РНК ВТМ в виде нуклеопротеинового комплекса), At PDL5 (негативный регулятор транспорта). При этом TMV MP и At PDL5 конкурируют за центральную область плазмодесм.

At PDLP1 (негативный регулятор транспорта), Zm CRINKLY4 (функции неизвестны) – ассоциированы с PDom.

At PDCB1 (PD-callose binding protein 1, увеличивает накопление каллозы и ограничивает пропускную способность плазмодесм), PdBG2 (β 1-3 glucanase, обеспечивает деградацию каллозы и увеличивает пропускную способность плазмодесм) - ассоциированы с шейкой плазмодесм.

Недавно было показано, что целый ряд неклеточно-автономных сигнальных молекул, включая ARABIDOPSIS CRINKLY₄ (ACR₄), CLAVATA₁ (CLV₁), STRUBBELIG (SUB)/SCRAMBLED (SCM), и QUIRKY (QKY), ассоциированы с плазмодесмами.

CLAVATA₁ – RLK (receptor-like kinase) с LRR (leucine rich repeat) во внеклеточном домене, рецептирует CLE₄₀ (CLAVATA₃/EMBRYO SURROUNDING REGION₄₀), играет ключевую роль в поддержании меристем корня и побега. ACR₄ – RLK без LRR во внеклеточном домене, играет важную роль в пролиферации и дифференциации клеток корня.

Резюме

- Плазмодесмы обеспечивают непрерывность *симпласта*
- Через плазмодесмы идет диффузия ионов и малых молекул
- Через плазмодесмы может идти транспорт белков и НК
- Это могут быть как экзогенные(вирусные) белки/НК (MP, vRNA; такой транспорт лежит в основе распространения вирусов в организме растения)...
- ...так и эндогенные белки (факторы транскрипции KN1 и различные белки флоэмного экссудата PP, RPP13-1) и мРНК растения
- Наличие и особенности функционирования плазмодесм лежат в основе взгляда на растение как на *надклеточный организм*
- Регуляция транспорта по плазмодесмам может лежать в основе разделения симпласта на физиологические домены и developmental («домены развития») домены