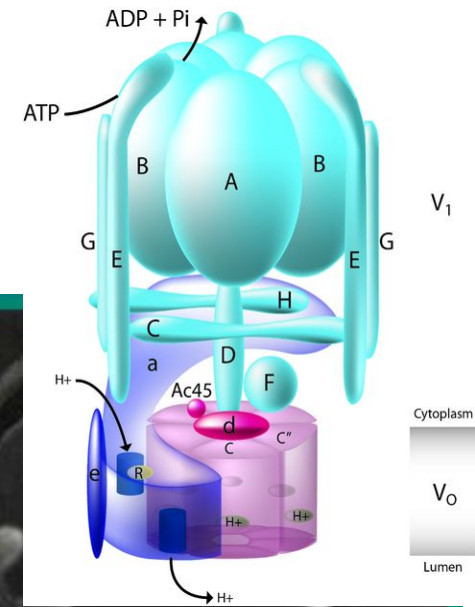


Физиология растений

растений

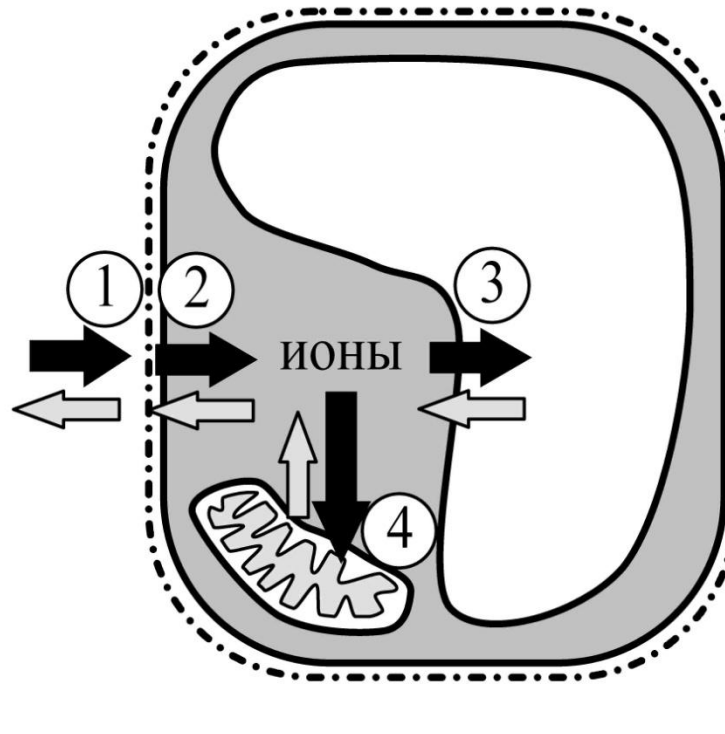
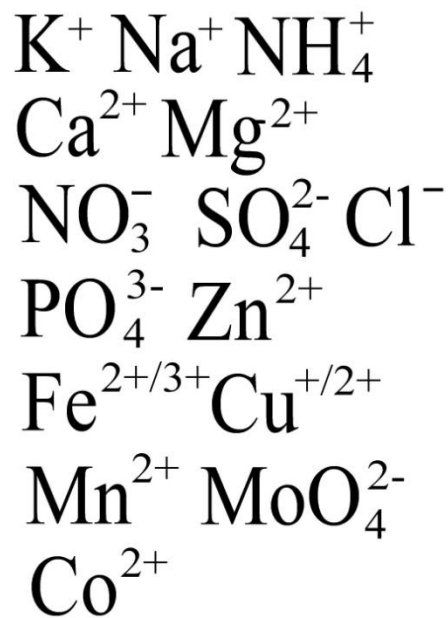
Механизмы поступления минеральных элементов в клетку



Вещества в виде ионов преодолевают мембраны растительной клетки несколькими способами, основные из которых:

- 1. Диффузия через липидную фазу.** Идет крайне медленно, так как липидный бислой очень плохо пропускает ионы (по градиенту электрохимического потенциала).
- 2. Облегченная диффузия при помощи ионных каналов.** Это быстрый процесс, так как ионы свободнее движутся через пору канала, имитирующую гидратную оболочку (происходит по градиенту электрохимического потенциала).
- 3. Перенос веществ с участием транспортеров и помп.** Использует энергию АТФ или энергизируется разницей электрохимических потенциалов H^+ , Na^+ , K^+ , других ионов. Идет медленнее, чем диффузия через ионные каналы, но значительно быстрее, чем диффузия через липидную фазу. Может происходить как по градиенту электрохимического потенциала, так и против него.
- 4. Эндоцитоз.** Представляет собой захват внешнего материала клеткой, осуществляемый путём инвагинации плазматической мембраны и формирования везикул, в дальнейшем утилизируемых внутри клетки. Является малоизученным в плане ионного транспорта процессом.

Ионы:



Транспорт ионов в растительную клетку:

- 1 - взаимодействие с анионными локусами в клеточной стенке
- 2 - переход через плазматическую мембрану в цитоплазму
- 3 - переход через тонопласт в вакуоль
- 4 - переход через эндомембраны внутрь органелл



Две движущие силы мембранного транспорта.

Пассивный транспорт – перемещение веществ путем диффузии по градиенту электрохимического потенциала без затраты метаболической энергии. *Активный транспорт* – перемещение веществ против градиента электрохимического потенциала с затратой метаболической энергии, как правило, в форме АТФ.

Транспортной системой при пассивном движении элементов минерального питания через мембраны растительных клеток являются ионные каналы, представляющие собой трансмембранные белковые макромолекулы, состоящие из 2-4 субъединиц и формирующие пору в липидном бислое мембраны.

В настоящее время в мембранах растительных клеток на физиологическом уровне идентифицировано несколько типов проводимостей, соответствующих Ca^{2+} - Na^{+} -каналам, K^{+} -каналам, неселективным катионным каналам и анионным каналам.

Расшифрованные геномы высших растений содержат примерно от **100 до 200 генов различных ионных каналов**. Практически все гены активно экспрессируются в различных типах клеточных мембран.

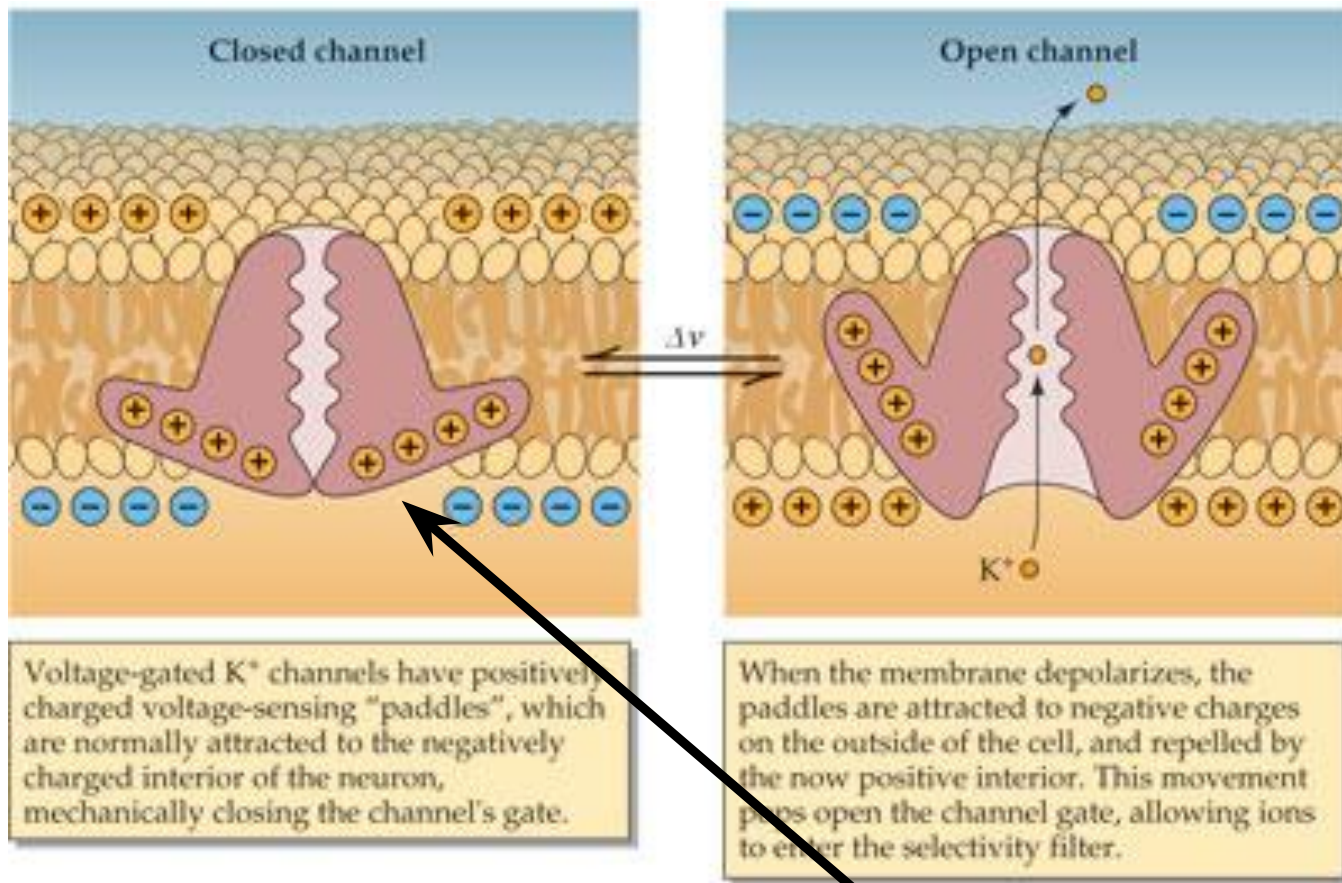
Около 80% данных генов кодируют катионные каналы. Это, вероятно, связано с тем, что отрицательный по величине мембранный потенциал на плазматической мембране способствует поступлению катионов по градиенту электрохимического потенциала, т.е. по ионным каналам, в отличие от анионов, входу которых он противодействует.

В этой связи для анионов более характерен активный способ поступления в клетку, при том что их выход практически всегда осуществляется пассивно (через анионные каналы) по градиенту электрохимического потенциала.

Выход анионов – важный процесс, необходимый для их перераспределения в организме, регуляции электрического потенциала мембраны и осмотического давления клетки. Тонопласт и другие эндомембраны также содержат значительное число катионных и анионных каналов, служащих для перераспределения минеральных элементов внутри клетки.

Геномы водорослей имеют отличные от высших растений семейства гены ионных каналов, более близкие эволюционно и структурно к ионным каналам животных.

Наиболее хорошо изучен на сегодняшний день K^+ -канал типа **Shaker**, вероятно, присутствующий у всех высших и низших растений и выполняющий важнейшую роль для транспорта ионов калия. В 2003 г. Фредерик Маккиннон получил Нобелевскую премию по химии за расшифровку структуры данного белка. Структура Shaker-канала представлена на рисунке 4.



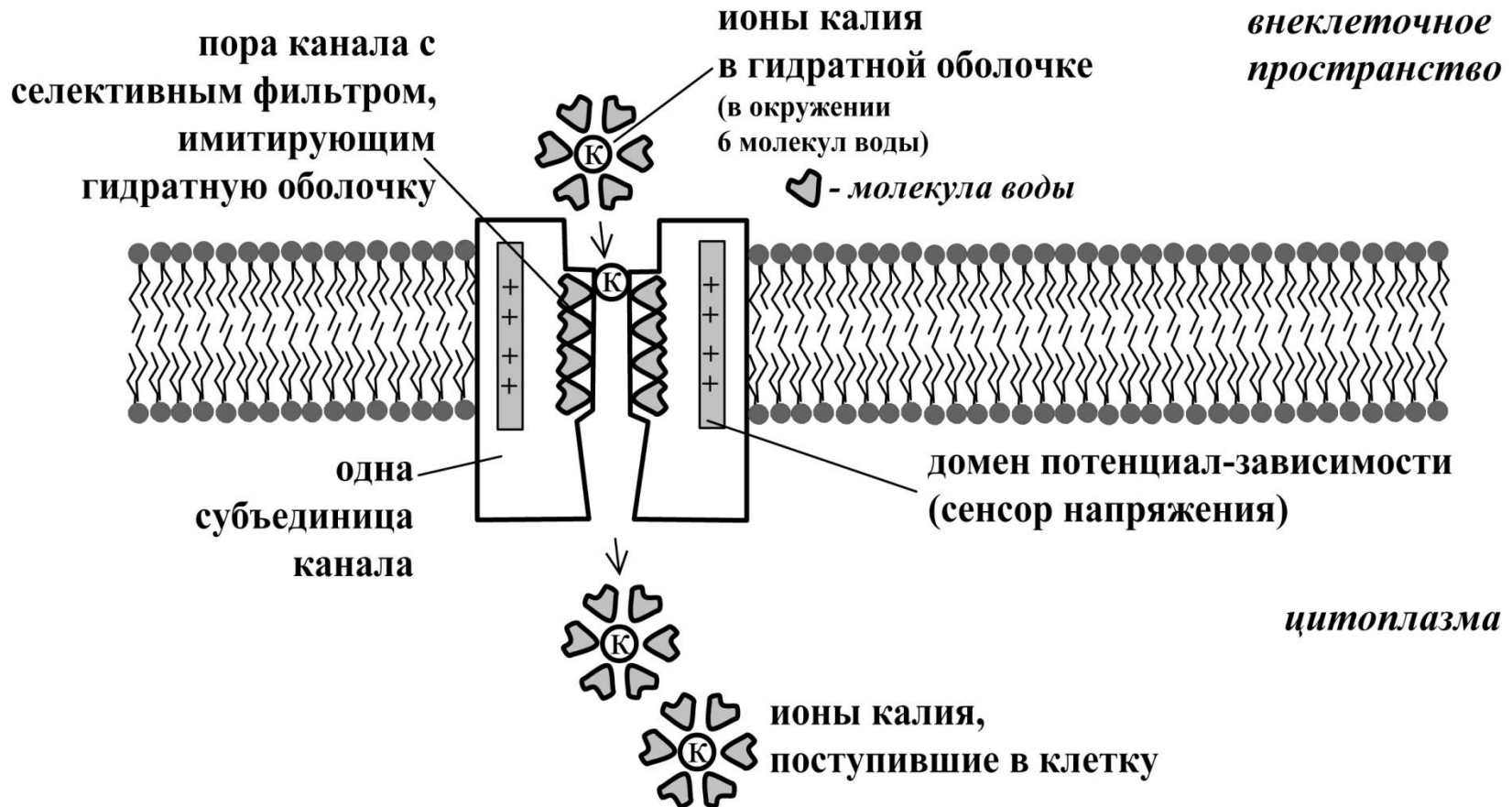
*Roderick
MacKinnon
2003 Nobel Prize
in Chemistry*

**Paddle – «весло», «затвор»,
«воротный механизм»
Если мембранный потенциал растет, то
«затвор» открывает канал**

Канал имеет водную пору, которая образуется специальным участком каждой из 4 субъединиц канала. Одна субъединица состоит из 6 трансмембранных доменов.

Пора имитирует гидратную оболочку иона калия, ближайший слой которой состоит из 6 молекул воды. Наличие домена из 3-4 аминокислот (**Глицин-Тирозин-Глицин-Аспартат: GYGD**) в поре канала определяет его K^+ -селективность, а специальный S4-домен в каждой из субъединиц (т.н. сенсор напряжения) поворачивается при изменении напряжения, обеспечивая активацию и инактивацию канала при изменении разности электрических потенциалов на мембране.

Схема строения катионного канала мембран растений, проницаемого для ионов K^+



Семейства генов катионных каналов *Arabidopsis thaliana* L. Heynh. и структурная организация их продуктов

№	Наименование семейства каналов (на основе схожести структуры и эволюционного происхождения)	Кол-во генов	Особенности структуры
K⁺-селективные катионные каналы (15 генов)			
1	K ⁺ -селективные Шейкеры	9	Тетрамер, 6 трансмембранных доменов, один поровый сайт, K ⁺ -селективный фильтр (GYGD-домен), домен потенциал-зависимости.
2	K ⁺ -селективные каналы с тандемной порой	6	Димер, 4 трансмембранных домена, два поровых сайта, K ⁺ -селективный фильтр (GYGD-домен), домен потенциал-зависимости отсутствует.
Неселективные катионные каналы (41 ген)			
1	Ионотропные глутаматные рецепторы	20	Тетрамер, 3 трансмембранных домена, один поровый сайт, один наружный сайт активации аминокислотами, селективный фильтр неизвестной структуры, домен потенциал-зависимости не определен.
2	Каналы, активирующиеся циклическими нуклеотидами	20	Тетрамер, 6 трансмембранных доменов, один поровый сайт, селективный фильтр неизвестной структуры, домен потенциал-зависимости.
3	Двухпоровый канал	1	Димер, 12 трансмембранных доменов, два поровых сайта, селективный фильтр, проницаемый для Ca ²⁺ и Na ⁺ , домен потенциал-зависимости.
Механочувствительные катионные каналы (13 генов)			
1	Механочувствительно-подобные каналы	10	Тример или тетрамер, 2 трансмембранных домена.
2	Механочувствительные МСА-каналы	2	Тример или тетрамер, 1 трансмембранный домен.
3	Механочувствительные Пьезо-каналы	1	Олигомер, 30 трансмембранных доменов.
Аннексины (8 генов)			
1	Аннексины	8	Встраиваемые в мембрану цитоплазматические белки, формирующие неселективный катионный канал.

Анионные каналы

Поток анионов через плазматическую мембрану растительной клетки реализуется посредством работы анион-селективных ионных каналов (анионных каналов).

Данные системы облегчают диффузию различных неорганических и органических анионов через липидную фазу мембраны. Даже достаточно крупные анионы, такие как аскорбат способны проходить через пору анионных каналов.

Движущей силой переноса при этом выступает градиент электрохимических потенциалов анионов.

Анионные каналы

Анализ генома высших растений и электрофизиологические исследования выявили три семейства генов, которые кодируют многообразие анионных проводимостей мембран растительной клетки:

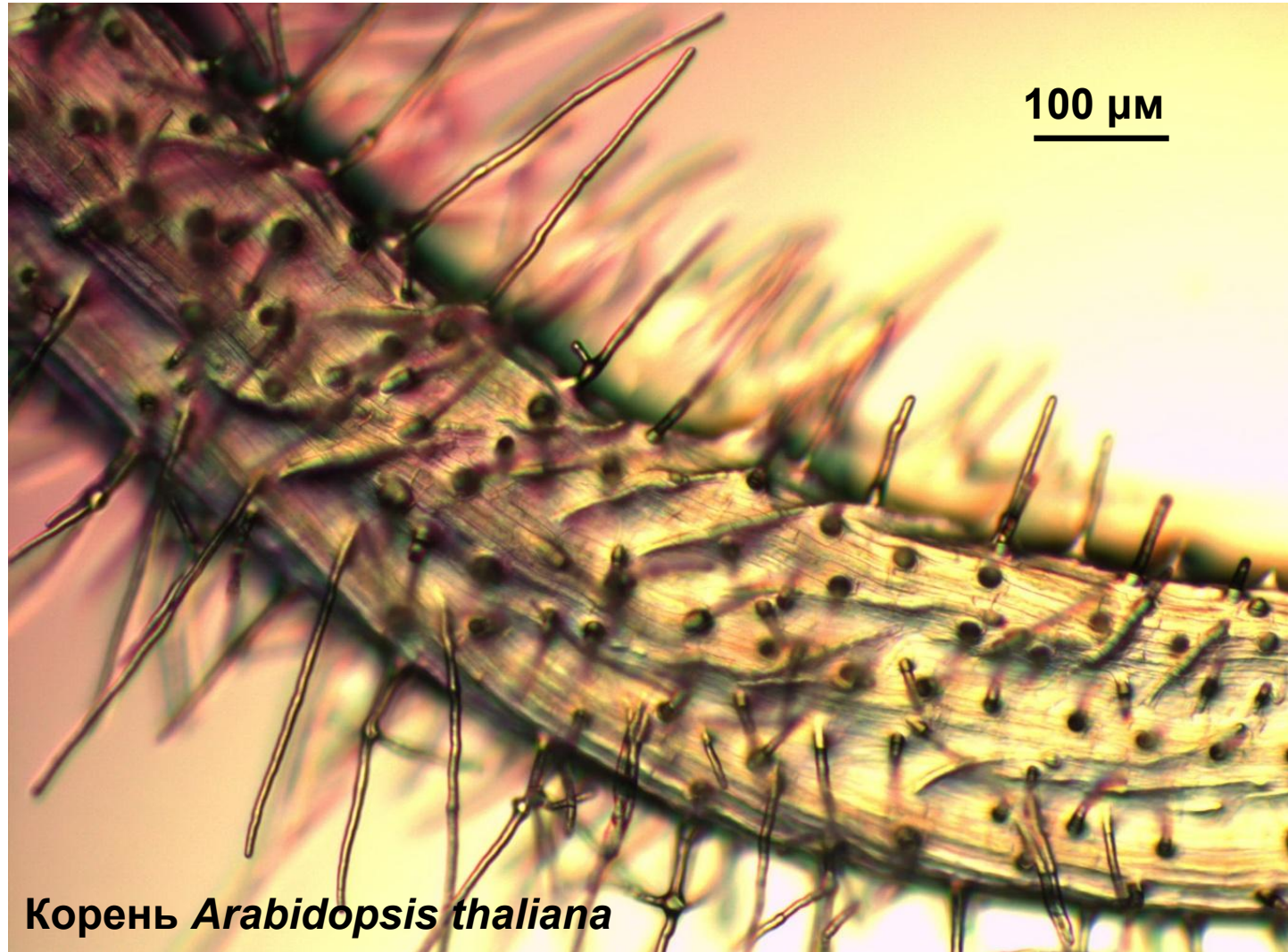
1 - CLC (“chloride channel”, в пер. с англ. «хлорный канал»),

2 - SLAC (“slow anion channel”, в пер. с англ. «медленный анионный канал»),

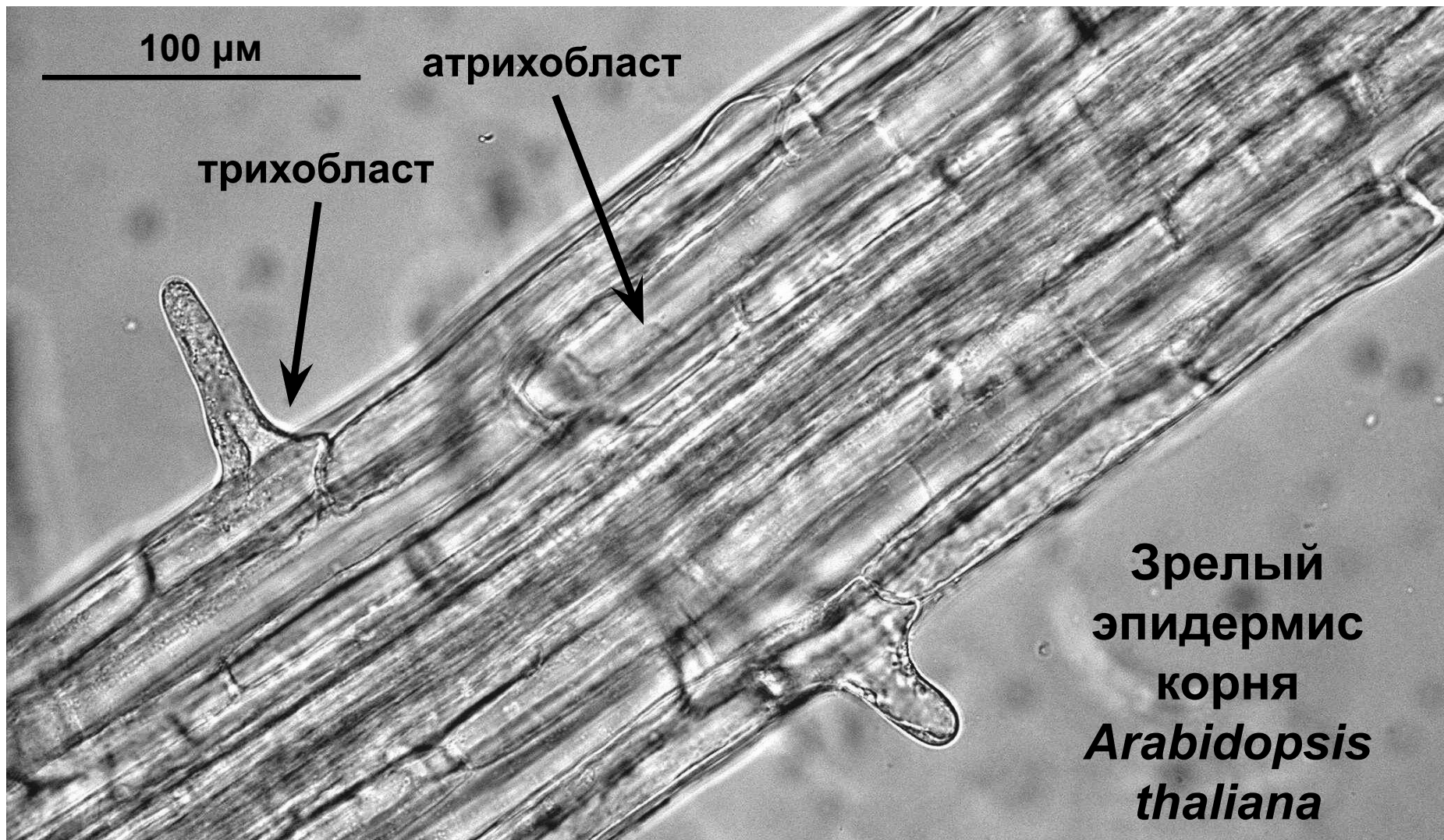
3 - ALMT (“aluminum-activated malate transporter”, в пер. с англ. «активируемый алюминием малатный транспортер») 1 [Barbier-Brygoo H, et al. 2011].

У арабидопсиса, тополя и риса семейство CLC представлено 5, 8 и 5 генами, SLAC - 5, 4 и 7 генами, ALMT – 13, 22 и 8 генами, соответственно. Многие представители SLAC и ALMT экспрессируются в плазматической мембране. Каналы семейства CLC, вероятно, выполняют функцию анионных каналов эндомембран. Высокая проницаемость к крупным органическим анионам отмечена для семейства ALMT [Kollist H, et al. 2011].

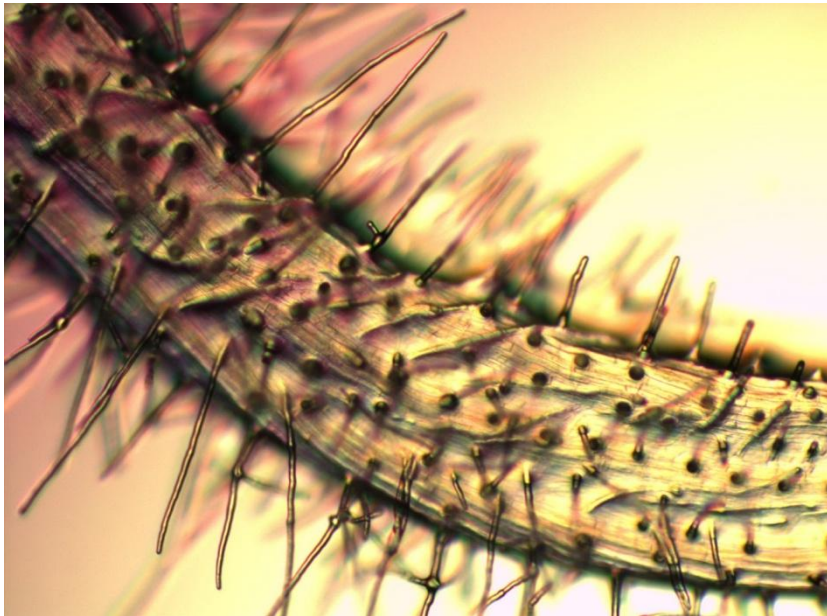
Транспорт через плазматическую мембрану эпидермальных клеток корня является началом пути ионов до места их назначения в растении.



Эпидермальные клетки представлены (примерно 1:1) трихобластами (образующими корневые волоски) и атрихобластами (необразующими корневые волоски)



Все эпидермальные клетки корня участвуют в поглощении минеральных элементов из почвы, но наиболее активны зона роста растяжением (ЗРР) и кончики корневых волосков (КВ). В этих клетках измерена наибольшая плотность ионных токов (до 5-10 раз выше, чем в зрелых клетках).



300 μm

Балджи –
зачаточные
корневые
волоски

Эпидермис зоны
роста растяжением
корня *Arabidopsis
thaliana*

Плотность ионных токов определяется количеством активных транспортных систем на единицу площади поверхности мембраны.

Она регулируется:

- размерами клетки (в крупных клетках, вероятно, происходит «разбавление» мембранных белков)
- присутствием минеральных элементов (их больше в новых, еще неистощенных участках почвы, куда первыми проникают кончики КВ и клетки ЗРР)
- синтезом регуляторов (эндо: малые G-белки, фасилитаторы, кальций; экзо: АФК)
- уровнем экспрессии транспортных белков (недостаток элементов – стресс)



Транспорт веществ из почвенного раствора в цитоплазму через плазматическую мембрану эпидермальных клеток корня:

1) Mg^{2+} , Ca^{2+} - только через катионные каналы

2) K^+ , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{+2+} , $Fe^{2+/3+}$, NH_4^+ , NO_3^- , PO_4^{3-} , SO_4^{2-} - через каналы (если C выше $10^{-4} M$), или специализированными транспортёрами (если C ниже $10^{-4} M$)

3) H^+ - только специализированными транспортёрами – H^+ -АТФазами, H^+ / анион-котранспортерами и H^+ / катион-антипортерами.

Гены ионных каналов растений:

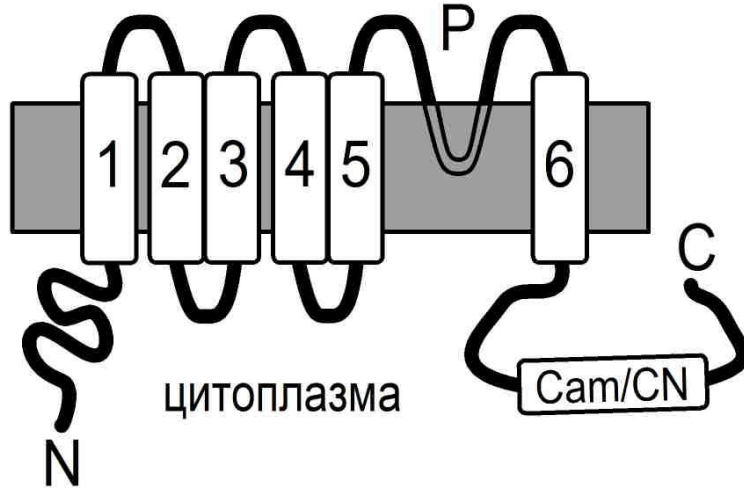
Table 1 Number of predicted transporter genes in the genomes of *Arabidopsis*, poplar, rice, and *Chlamydomonas*^a

	<i>A. thaliana</i>	<i>P. trichocarpa</i>	<i>O. sativa</i>	<i>C. reinhardtii</i>
Predicted proteome size	31,711	58,036	26,841	14,598
Cation transporters				
KcsA type	1	0	0	0
Shaker type	9	11	6	0
TPK/KCO	5	10	4/3	0
Unclassified 6TM1P	0	0	0	9
CNGC	20	12	10	0
TPC	1	1	1	0
HKT	1	2	6	0
KUP/HAK	13	28	25	3
Anion channels				
CLC	7	8	5	5
SLAC	5	4	7	1
ALMT	13	22	8	0
Calcium channels				
VDCC	0	0	0	9
Ins-3P-R	0	0	0	1
GluR (plant type)	20	61	13	0

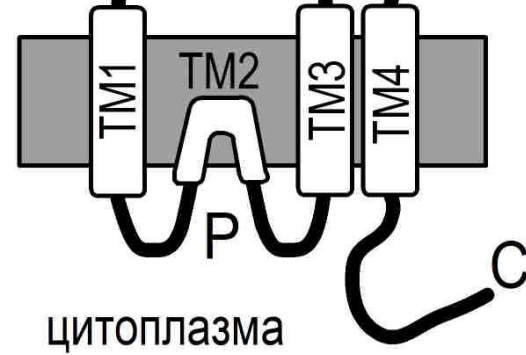
^aThe predicted proteomes were screened with HMMer profiles (188) made from homology-reduced sets of representative proteins of each family. See text for abbreviations of family names. The results are affected by differences in sequence

Примеры структуры субъединиц катионных каналов:

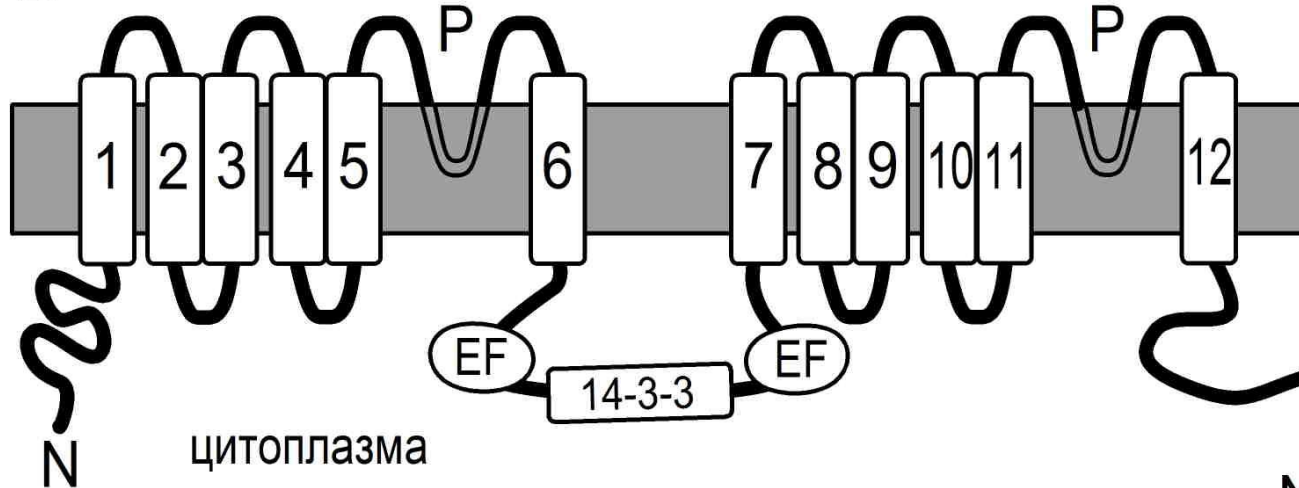
А канал, активирующийся циклическими нуклеотидами



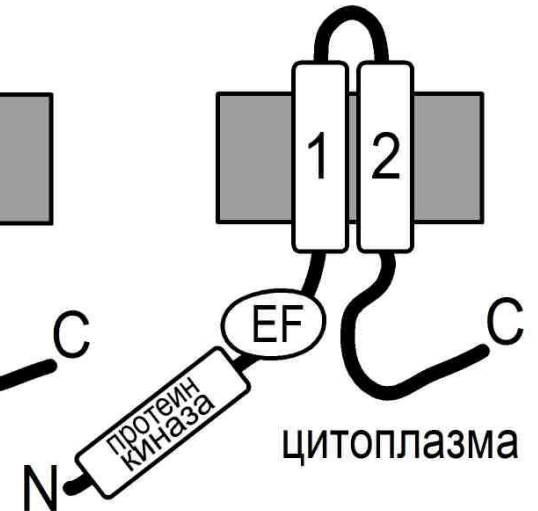
Б ионотропный глутаматный рецептор



В двухпорный канал



Г механочувствительный канал

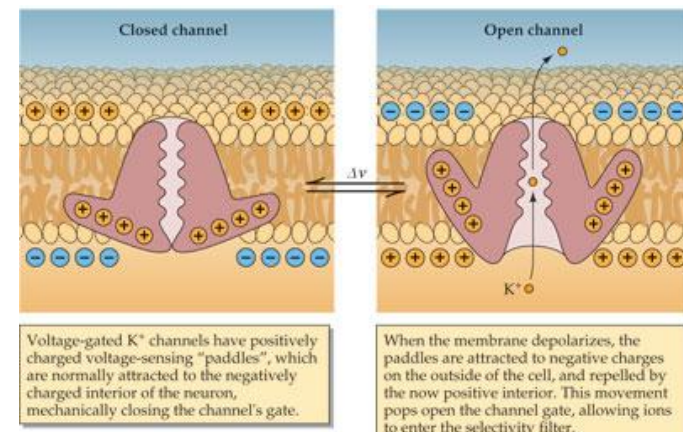


Примеры молекулярно-биологических свойств катионных каналов:

- структура и расположение генов, субъединиц, функциональных доменов
- влияние факторов транскрипции и посттрансляционная модификация
- уровень и пространственное распределение экспрессии (go to Genevestigator website)

Физиологические свойства катионных каналов:

- величина проводимости (соотношение с др. системами)
- потенциал-зависимость
- селективность
- кинетика активации
- фармакологически профиль
- регуляция



Изучение ионных каналов:

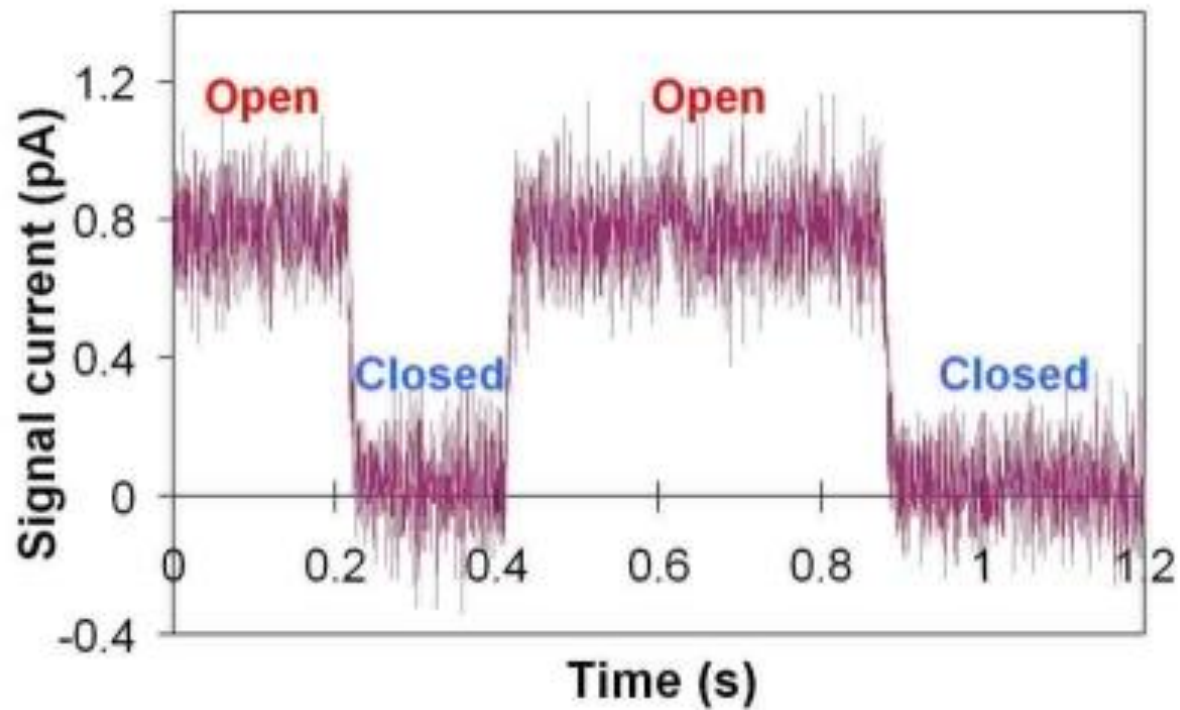
- на уровне популяции каналов целой клетки**
- на уровне одиночных каналов**

- двухэлектродная фиксация напряжения
- пэтч-кламп
- Ca^{2+} -люминометрия, флуоресцентные зонды
- внешние сканирующие ион-селективные электроды
- внутриклеточное измерение при помощи «острых» ион-селективных электродов»
- позитронная томография
- многие другие методы!

Пэтч-кламп:



Регистрация одиночных каналов:



напряжение на мембране, мВ

-180 -150 -120 -90 -60 -30 0 30 60 90 120

гиперполяризация **потенциал покоя** *деполяризация*

Ток, пА

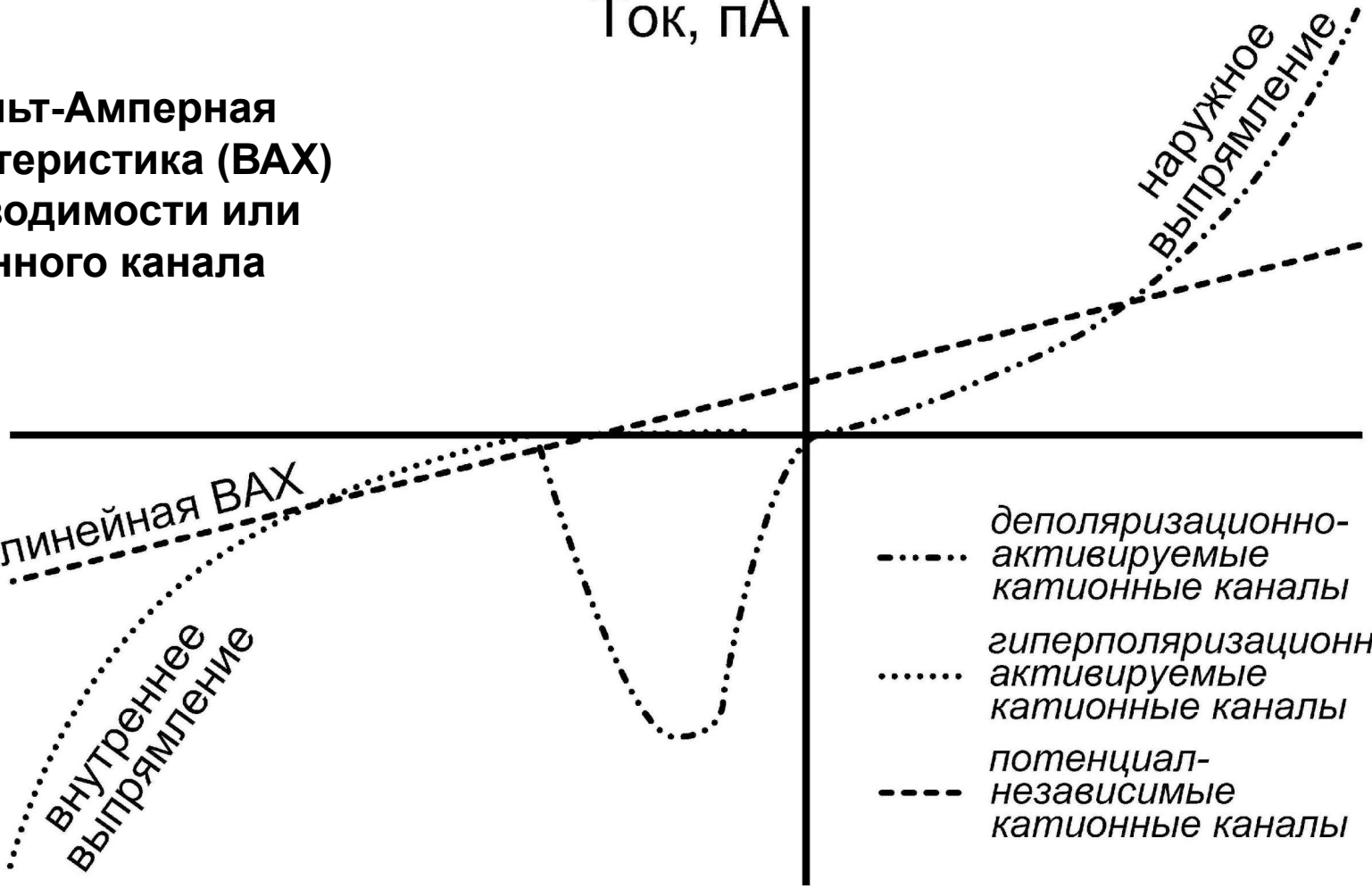
**Вольт-Амперная
Характеристика (ВАХ)
проводимости или
ионного канала**

линейная ВАХ

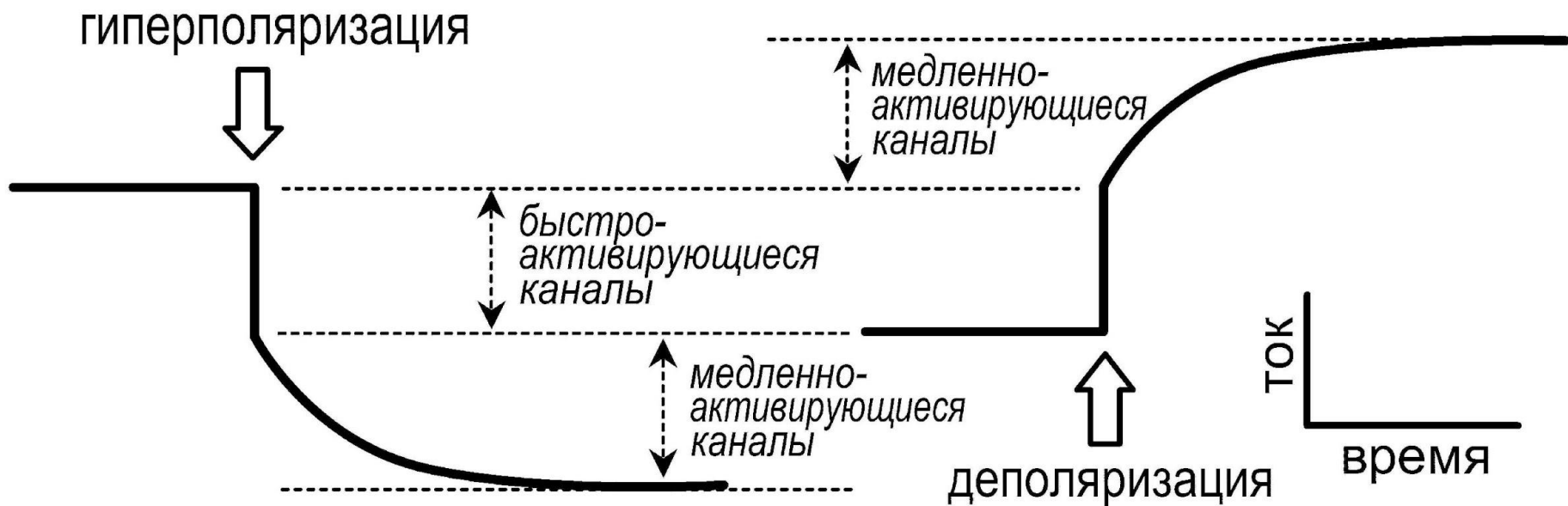
*внутреннее
выпрямление*

*наружное
выпрямление*

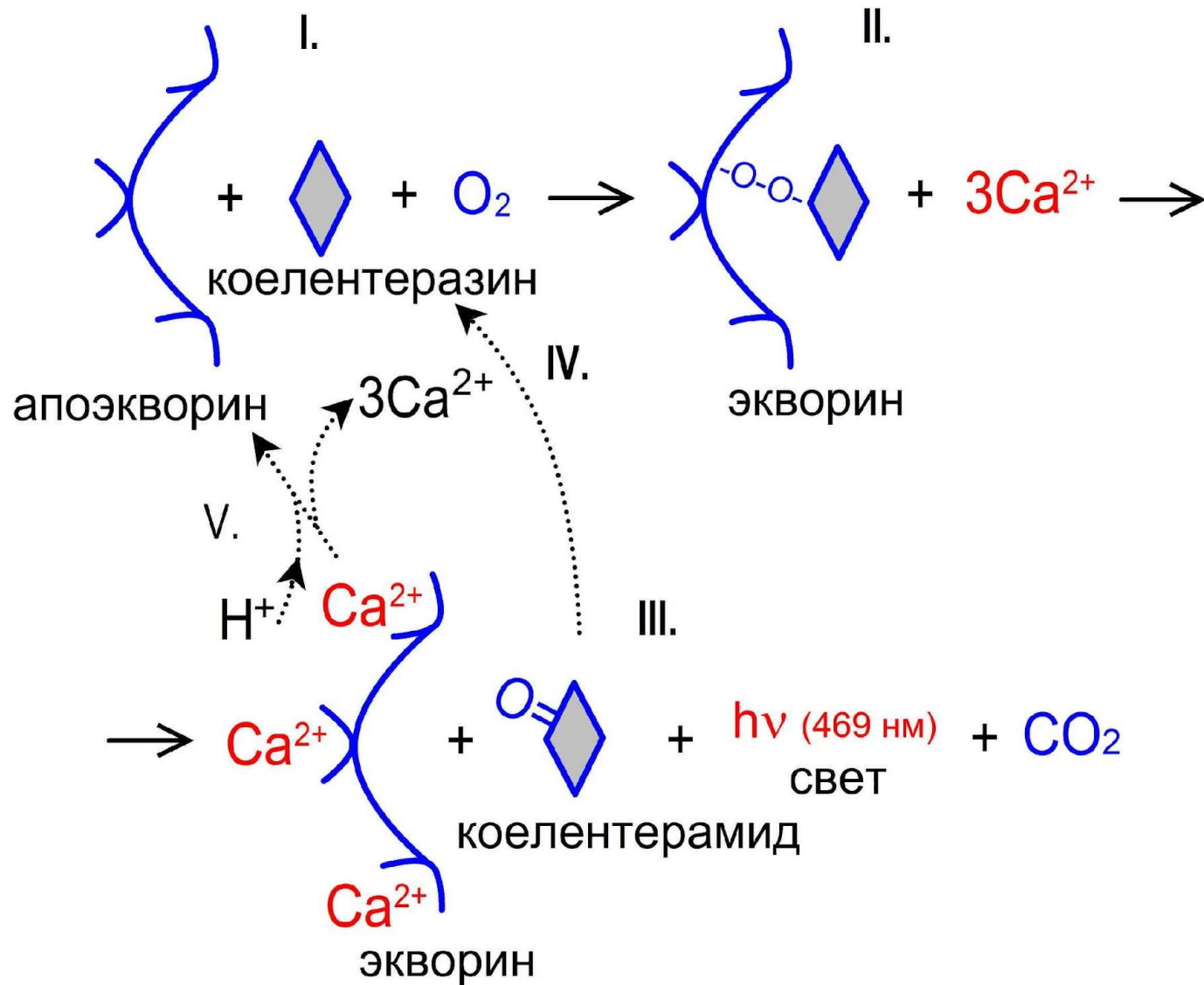
-* деполяриционно-активируемые катионные каналы
-* гиперполяриционно-активируемые катионные каналы
- потенциал-независимые катионные каналы



Кривые временного хода (кинетика) изменения токов через мембрану в ответ на изменение напряжения

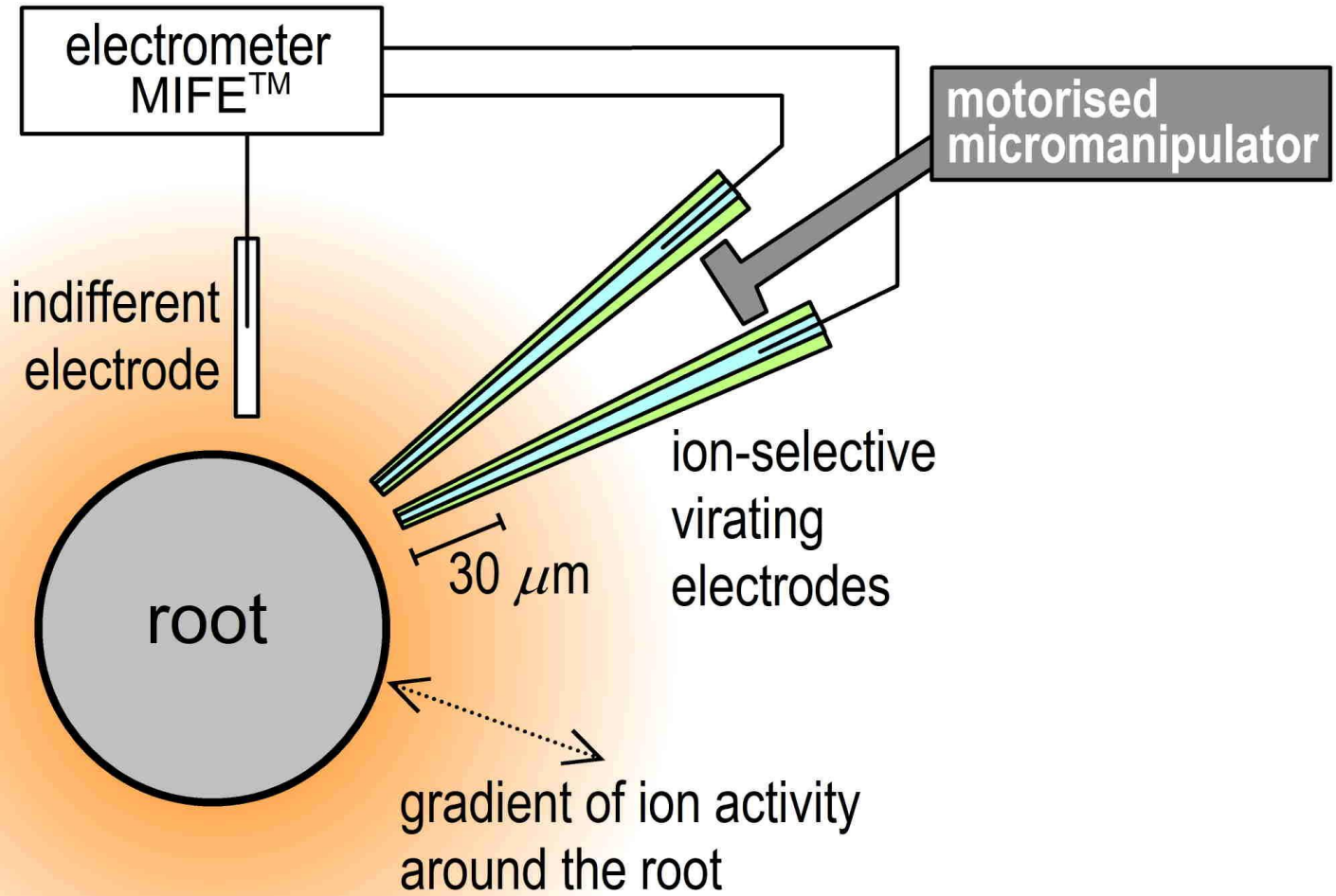


Ca²⁺-люцинометрия



MIFE – microelectrode ion flux estimation

внешние сканирующие ион-селективные электроды
вибрирующие ион-селективные электроды



Различают следующие типы активного транспорта минеральных веществ:

1) **первичный активный транспорт** – трансмембранный векторный перенос иона происходит непосредственно в ходе энергетического превращения в АТФазных системах:

а) *электрогенный активный транспорт* – первичный активный трансмембранный перенос ионов во время АТФазной реакции, который сопровождается генерацией электрического потенциала;

б) *электронейтральный активный транспорт* – первичный активный трансмембранный перенос ионов во время АТФазной реакции, который не сопровождается генерацией электрического потенциала;

2) **вторичный активный транспорт** происходит, когда в качестве энергетического источника используются градиенты других ионов, например, электрохимический градиент H^+ для транспорта K^+ через K^+-H^+ -симпортер. Основными структурами, осуществляющими активный транспорт ионов, являются АТФазные помпы и ряд ион-специфичных транспортеров, работающих по разным механизмам. В частности, H^+ -АТФаза осуществляет активную секрецию протонов из клеток корневой системы – фундаментальный процесс, важный для всех трансмембранных потоков в растениях и известный как **ацидофицирующая активность** корневой системы. Возникающая при этом разность электрических потенциалов по обе стороны мембраны (отрицательный мембранный потенциал) приводит к поглощению клеткой катионов против их электрохимического потенциала на мембране. Кроме того, H^+ -АТФаза (протонная помпа) создает на плазматической мембране градиент H^+ : 10^{-5} – 10^{-6} М в клеточной стенке против 10^{-7} М в цитоплазме, необходимый для энергизации симпортеров.

АТФазы – обширная группа ферментов, имеющих схожую структурную организацию (различают пять классов: F-, V-, A-, E-, и P-АТФазы). Для транспорта протонов и элементов минерального питания особую роль играют P-АТФазы.

Всего на сегодняшний день известно 159 генов P-АТФаз. Все данные ферменты имеют сайт связывания и гидролиза АТФ (фосфорилирования) и сайт связывания транспортируемого иона.

После гидролиза АТФ внутримолекулярная перестройка АТФазы приводит к транспорту иона против градиента его электрохимического потенциала с одной стороны мембраны на другую. АТФазы участвуют в транспорте катионов одно- и двухвалентных металлов. Их экспрессия усиливается при дефиците металлов из группы макро- и микроэлементов.

Наиболее важные АТФазы:

F-АТФазы (F1-F0) – АТФ-синтазы – митох., хлоропл.

V-АТФазы (V1-V0) – эндомембранные (H^+)

P-АТФазы (E1-E2) – плазматической мембраны (катионы)

Малоизвестные типы – А-АТФазы (А) и Е-АТФазы (что они катализируют?)

P-АТФазы (всего 159 у всех организмов).

5 типов

Тип I - переносят калий, переходные металлы, тяжелые металлы.

Тип IA - K^+ - нетипичные. 2 комплекса – один для протонов, другой для калия.

Тип IB транспортируют Cu^+ , Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} и Co^{2+} .

Тип II - 4 группы:

Типы IIA и IIB транспортируют Ca^{2+} .

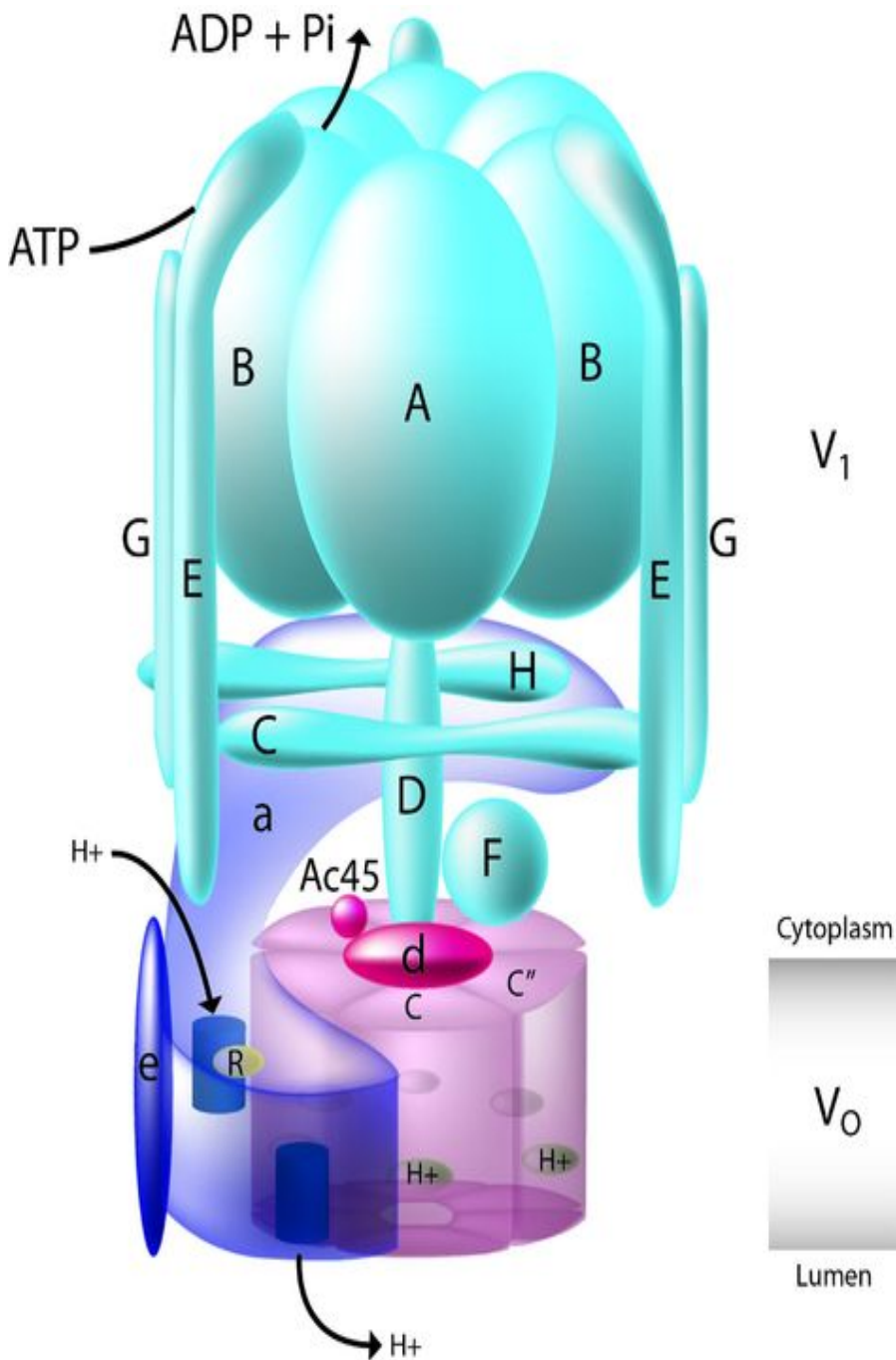
Тип IIC – Na^+/K^+ и H^+/K^+ только у животных.

Тип IID – у грибов – функция не известна.

Тип III - H^+ -АТФазы плазматической мембраны растений (10 генов) и грибов (IIIA) + Mg^{2+} -АТФазы бактерий (IIIB).

Тип IV - фосфолипидные АТФазы.

Тип V - у всех эукариот – функция не известна – предположительно транспорт катионов.

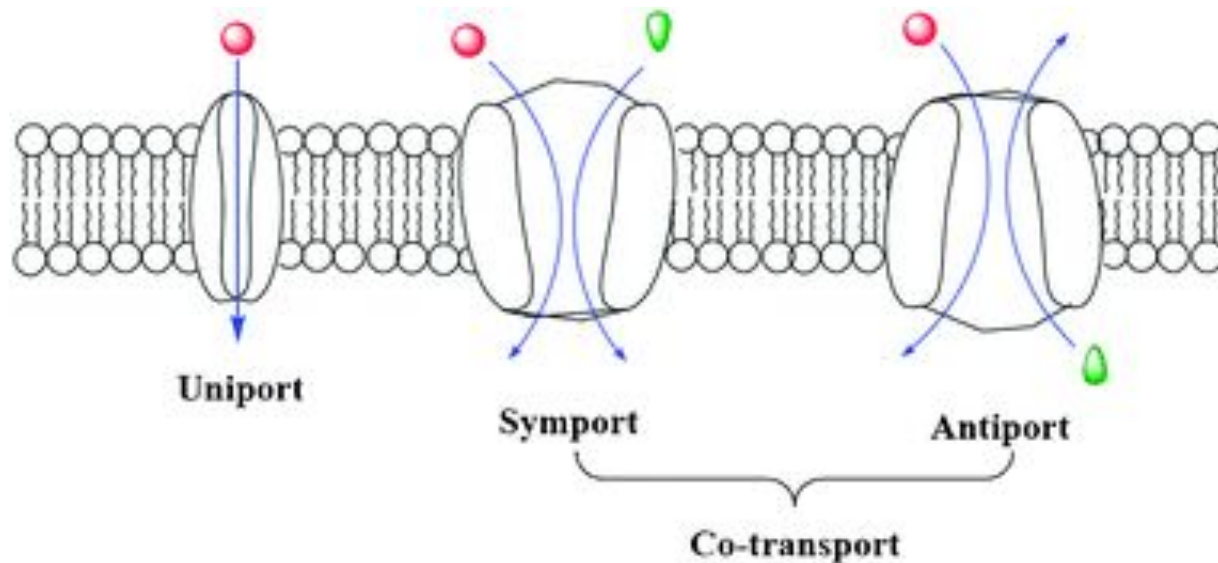


Пример структуры - V-типа АТФаз растений: V₁ - цитоплазматический гидрофильный домен, состоит из 8 субъединиц (A-H), среди которых три копии каталитических субъединиц A и B, три копии статорных субъединиц E и G, и одна копия регуляторных субъединиц C и H. Кроме того, V₁-домен также содержит субъединицы D и F, выполняющие роль центрального роторного механизма. V₁-домен содержит тканеспецифичные изоформы субъединиц B, C, E и G. Мутации в B1 изоформе вызывают ацидоз. V₀-домен содержит 6 различных субъединиц: a, d, c, c', c'' и e. Стехиометрия для c-кольца – все еще вопрос – для табака показано, что это декамер.

Более подробно об вакуолярных АТФазах
<http://jeb.biologists.org/content/209/4/577.full.pdf>

Ион-специфичные активные транспортеры участвуют в транспорте практически всех макро- и микроэлементов минерального питания и представляют собой сложные макромолекулярные интегральные мембранные комплексы (6-18 трансмембранных доменов), имеющие сайт связывания элемента и сайт связывания для иона, который транспортируется в обратном (антипорт) или том же (симпорт) направлении.

Движущей силой выступает градиент концентрации (химической активности) ионов калия или протонов.



Движущей силой ион-специфичных транспортеров является разность электрохимических потенциалов ионов H^+ , Na^+ или K^+ . Всего выделено на сегодняшний день около 10 классов данных транспортеров. У растений насчитывается до 100 генов, кодирующих несколько семейств симпортеров и антипортеров. Например, в симпорте с ионом H^+ в растительную клетку переносятся анионы (нитрат, фосфат, сульфат). В антипорте с H^+ из клеток выкачивается Na^+ .

Такие транспортные процессы суммарно не изменяют разности электрических потенциалов на мембране (электронейтральные процессы). В то же время, значительно большее количество транспортеров работает как котранспортеры ионов одного знака (H^+ и K^+ , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} и др.).

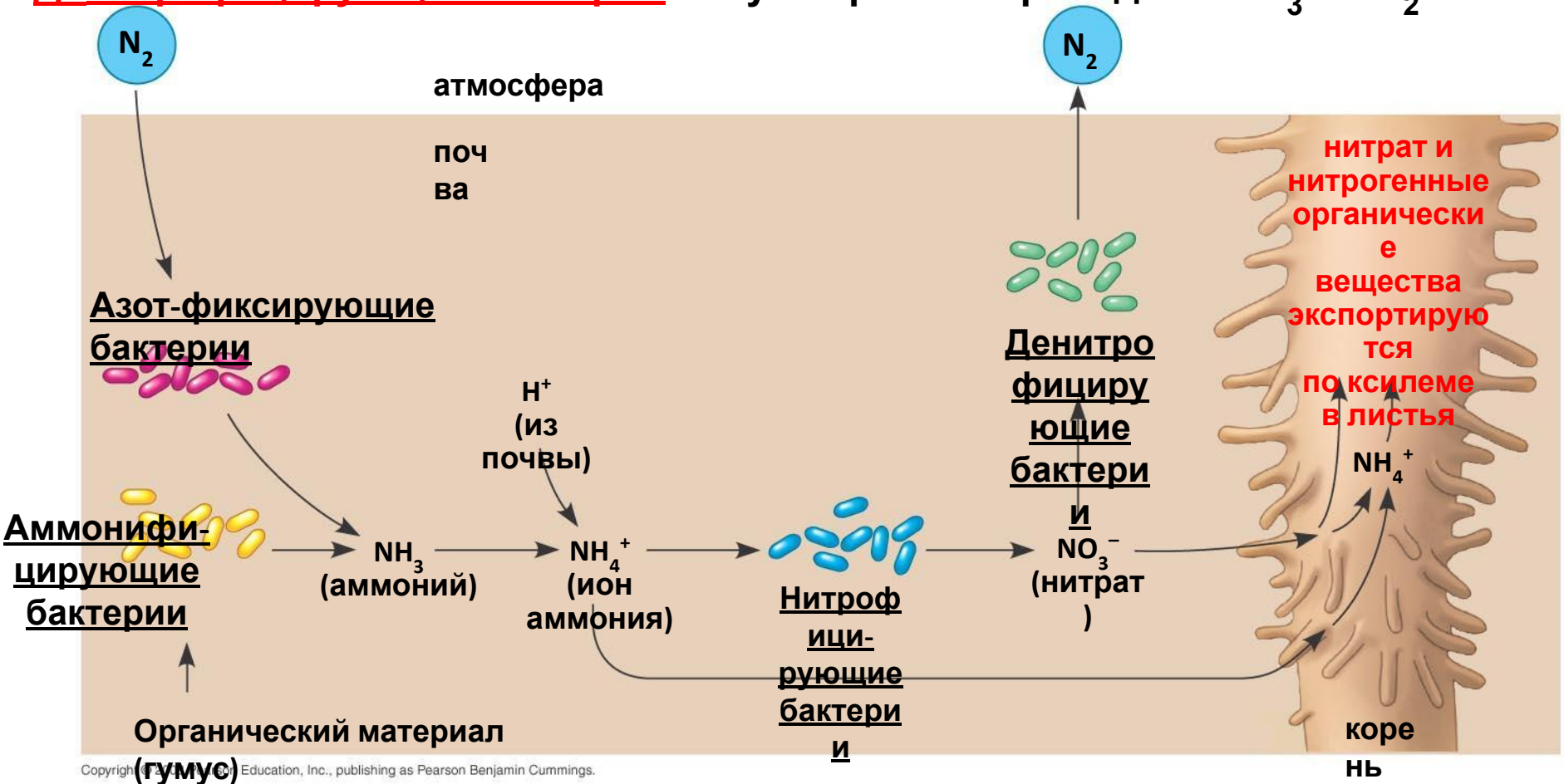
Разность электрохимических потенциалов протонов при этом служит движущей силой котранспорта других ионов. Это пример электрогенного переноса, так как происходит изменение мембранного электрического потенциала.

Азотное питание

- N – критически-важный компонент аминокислот и белков (18% от массы белка), а также ДНК, РНК, НАД и НАДФ
- атмосферный азот (N_2) не ассимилируется растениями; он должен быть конвертирован в доступную для растений форму NH_4^+ или NO_3^-
- в растении аммонийный и нитратный азот ассимилируется в виде аминокислот и нуклеиновых кислот
- азот не образуется в результате эрозии горной породы, как, например, могут образовываться в почве P, S и Ca
- важнейшую роль в утилизации азота растением играют микроорганизмы почвы и симбиотические микроорганизмы

Метаболизм

Почвенные аммонифицирующие бактерии расщепляют органическое вещество почвы, выделяя NH_3 , почвенные азот-фиксирующие бактерии производят NH_3 , из N_2 . Почвенные нитрифицирующие бактерии конвертируют NH_3 в NO_3^- . Почвенные денитрифицирующие бактерии могут обратно переводить NO_3^- в N_2 .



Фиксация

азота

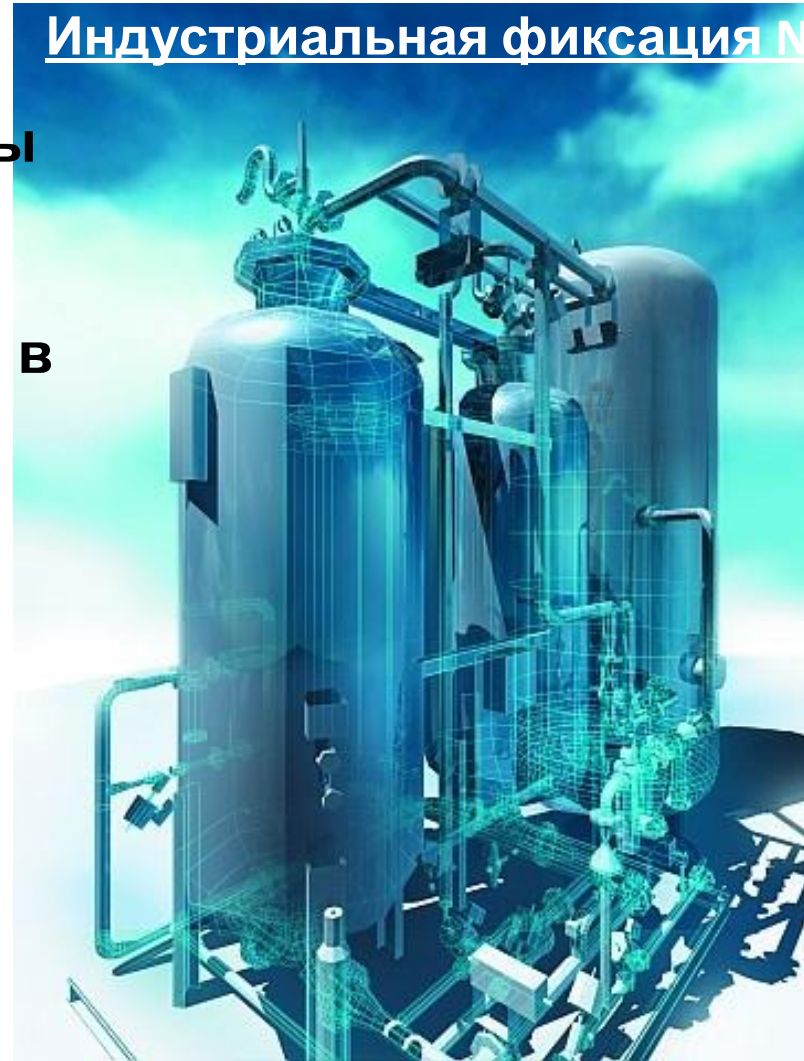
N_2 – самый обильный газ атмосферы (70%), но он не доступен растениям.

При фиксации азота N_2 переводится в NH_3

Симбиотические взаимоотношения растений с азотфиксирующими бактериями позволяют растениям получить «встроенный» источник азота, т.е. Производить фиксацию азота в своем «организме».

Наиболее важные симбиозы с азотфиксирующими бактериями образуют бобовые (горох, бобы и др.).

Индустриальная фиксация N



Корни **бобовых**
разбухают,
образуя так-
называемые
клубеньки или
«**нодулы**»,
состоящие из
клеток растения
и N_2 -
фиксирующих
бактерий рода
Rhizobium



клубеньки
(нодулы)

корни

Корни гороха с
клубеньками.

Внутри корневых клубеньков *Rhizobium* живут в специальных **везикулах** и называются **бактероидами**.

Rhizobium – **грам-отрицательные, подвижные палочки**.



Бактероиды
в пределах везикулы

5 μm

бактероиды в клубеньках сои

Бактерии получают из корня сахара и все необходимое для жизнедеятельности, растение получает фиксированный азот в виде аммиака ($\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+$).

NH_4^+ транспортируется через **неселективные катионные каналы** перибактероидной мембраны (она окружает бактериоид) в клетку растения.

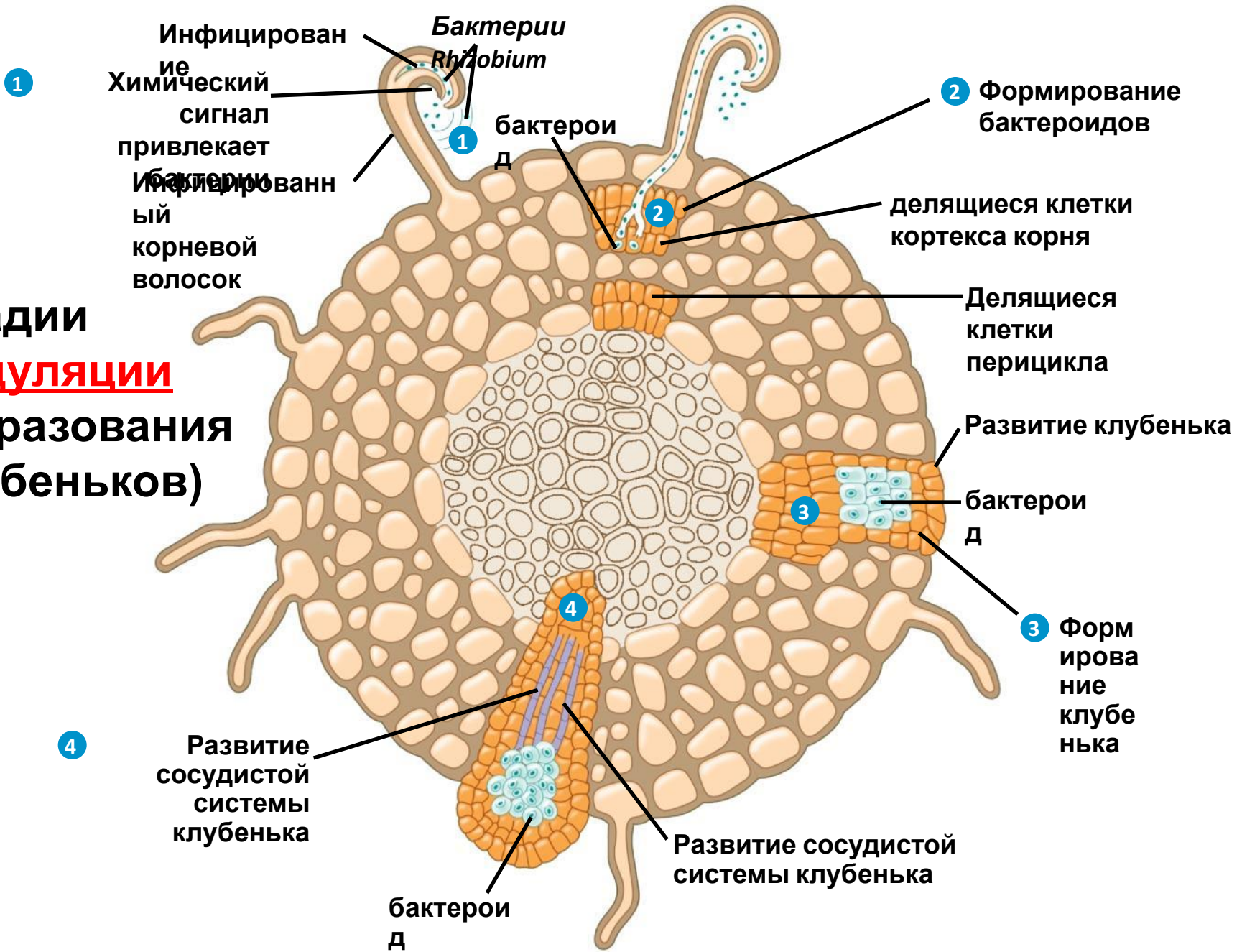


Бактериоиды в пределах везикулы

5 μm

бактериоиды в клубеньках сои

Стадии нодуляции (образования клубеньков)



Нитрат, попадая в корневые клетки, восстанавливается до аммония, который затем включается в аминокислоты.

Аммоний, «синтезированный» из нитрата клетками быстро переходит в аминокислоты, которые даже в больших количествах не токсичны для растения.

В клетках существует совершенная система метаболической регуляции, набор согласованно работающих ферментов, обеспечивающих утилизацию азота.

Одни из них также не позволяют накапливаться избыточному аммонии, ограничивая восстановление нитратов.

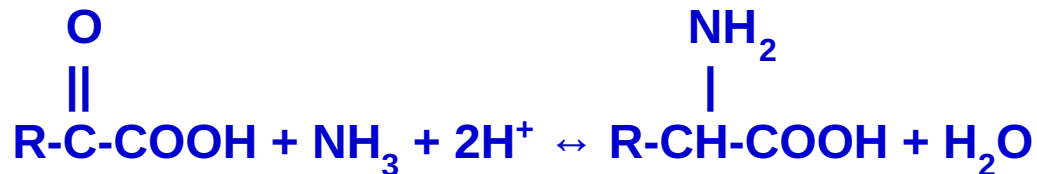
Если же по каким либо причинам он всё же появляется, другие ферменты связывают его в форме обогащённых азотом запасных соединений (высокоазотные аминокислоты, амиды или мочевины).

Цепочка превращений нитрата к аммиаку начинается на внешней поверхности корня и разворачивается внутри корневых тканей.

Другая группа событий происходит навстречу образующемуся аммиаку, в глубине корня - в ситовидных трубках флоэмы. Ситовидные трубки доставляют в корень сахара, появляющиеся в листьях при фотосинтезе.

В паренхимных (неспециализированных) клетках коры корня сахара используются для дыхания и, окисляясь, превращаются в разнообразные органические кислоты. В их числе образуются **кетокислоты**, имеющие кроме характерной для всех органических кислот карбоксильной группы **COOH**, ещё и карбонильную группу **C=O**.

Карбонильные группы кетокислот являются **первичными акцепторами аммиака**. Замещая кислородный атом карбонила, аммиак образует аминогруппу NH₂ и, таким образом, кетокислота превращается в аминокислоту:

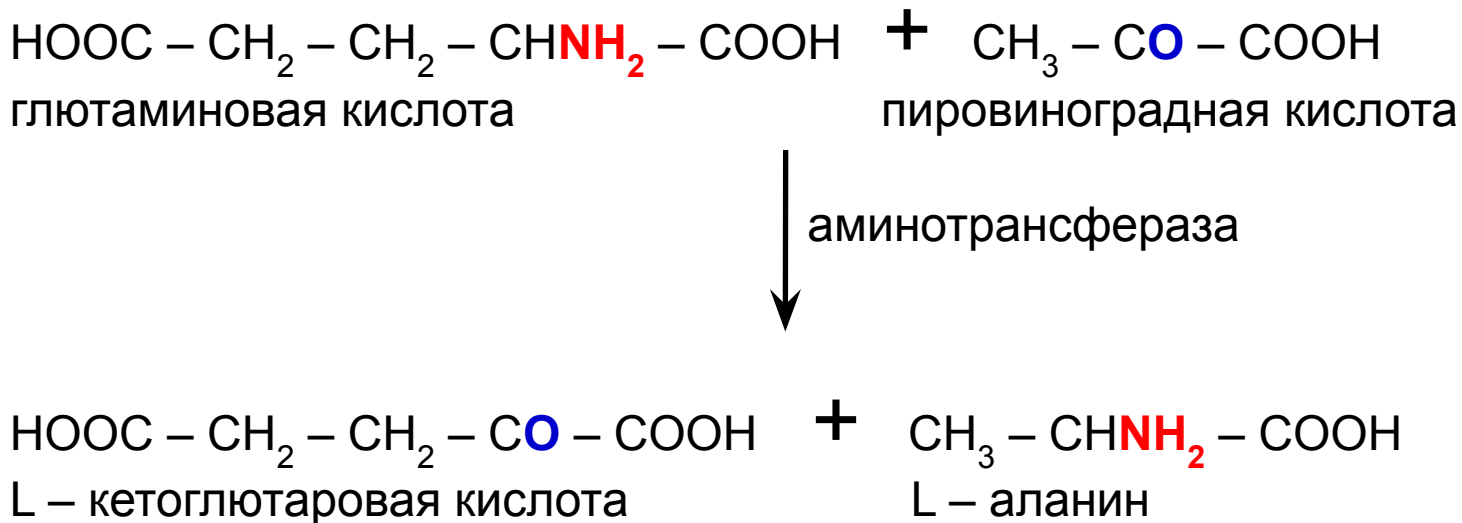


Большую роль в обмене веществ играет реакция переаминирования, открытая в 1937 г. биохимиками А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман.

Реакция заключается в межмолекулярном переносе аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту и катализируется ферментами, называемыми аминотрансферазами.

Наиболее интенсивно протекают следующие реакции переаминирования:

2.

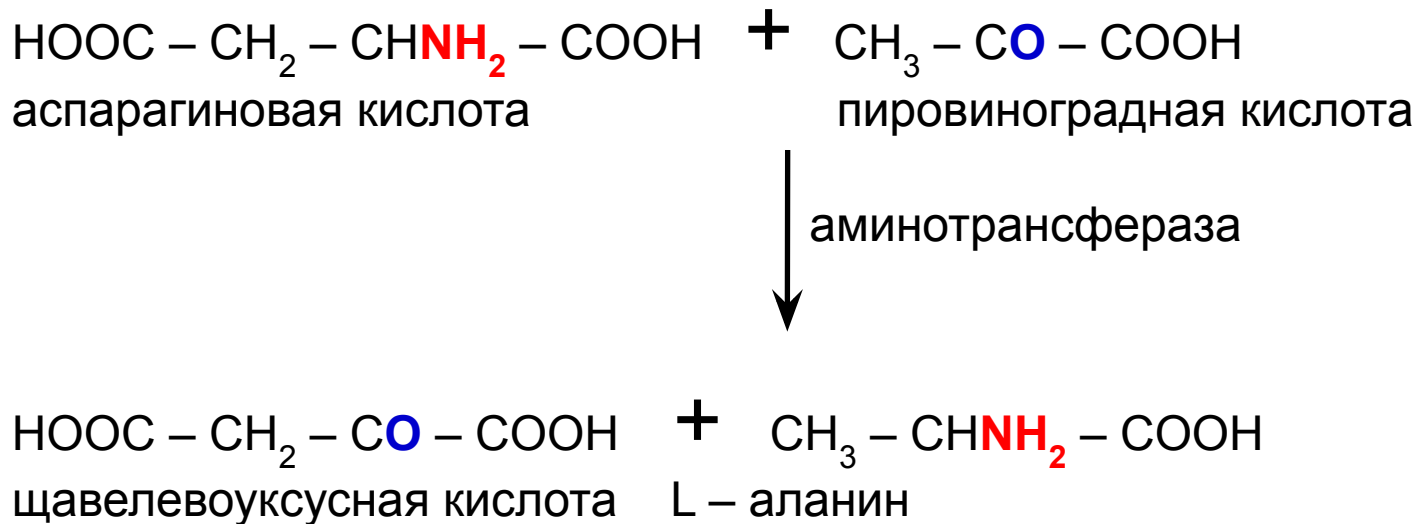


Большую роль в обмене веществ играет реакция переаминирования, открытая в 1937 г. биохимиками А. Е. Браунштейном и М. Г. Крицман.

Реакция заключается в межмолекулярном переносе аминогруппы с аминокислоты на кетокислоту и катализируется ферментами, называемыми аминотрансферазами.

Наиболее интенсивно протекают следующие реакции переаминирования:

3.

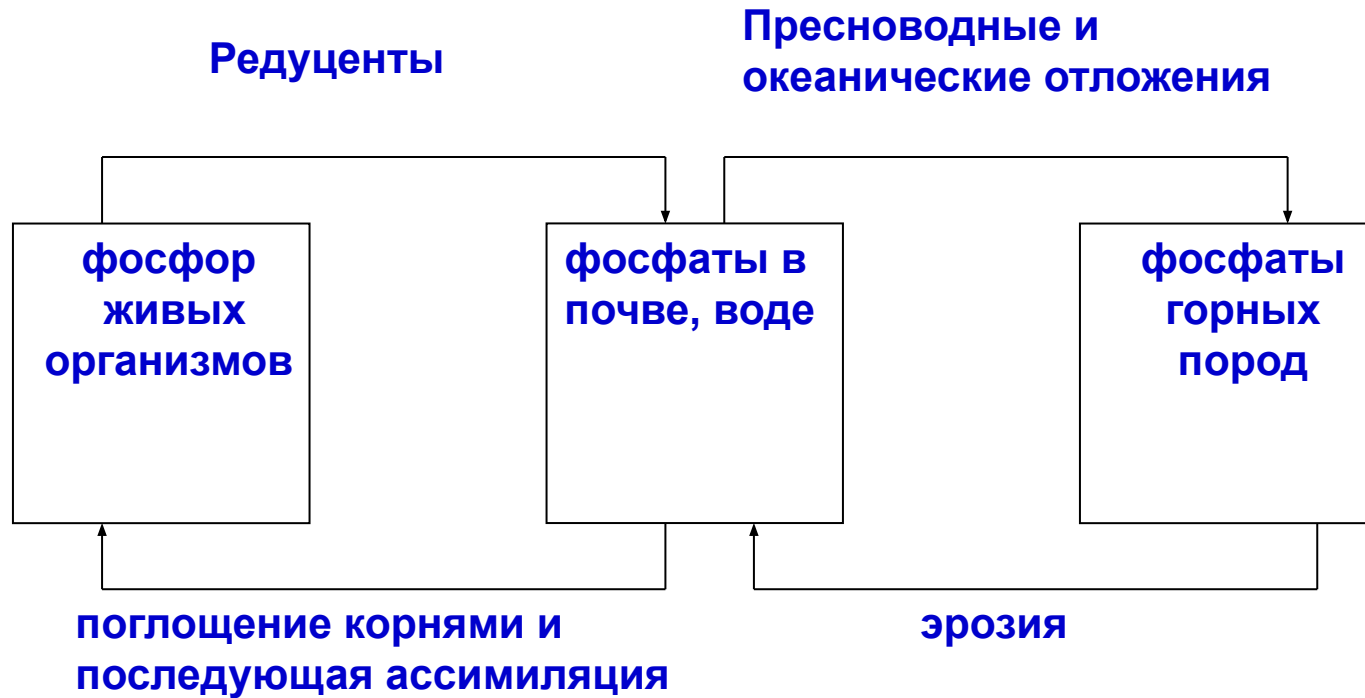


Показано также, что под влиянием соответствующих аминотрансфераз аспарагин и глутамин также могут передавать свои аминные группы кетокислотам.

Реакция переаминирования идет в несколько этапов:

- 1. Образование комплекса между реагирующей аминокислотой и фосфопиридоксалем аминотрансферазы.**
- 2. Внутримолекулярная перегруппировка образовавшегося комплекса, распадающегося далее на соответствующую аминокислоте кетокислоту и фосфопиридоксаминовую форму аминотрансферазы, в которой кофермент представляет собой фосфопиридоксамин.**
- 3. Фосфопиридоксаминовая форма аминотрансферазы затем реагирует с участвующей в переаминировании кетокислотой, образуя новый комплекс.**
- 4. Образовавшееся комплексное соединение также подвергается внутримолекулярной перегруппировке, после чего оно распадается на новую аминокислоту и исходную пиридоксальевую форму аминотрансферазы.**

Цикл фосфора



Цикл серы:

