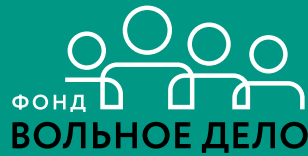




БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА



teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ

ЧАСТЬ I

НОСОВ
АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ

БИОФАК МГУ

КОНСПЕКТ ПОДГОТОВЛЕН
СТУДЕНТАМИ, НЕ ПРОХОДИЛ
ПРОФ. РЕДАКТУРУ И МОЖЕТ
СОДЕРЖАТЬ ОШИБКИ.
СЛЕДИТЕ ЗА ОБНОВЛЕНИЯМИ
НА [VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).

ЕСЛИ ВЫ ОБНАРУЖИЛИ
ОШИБКИ ИЛИ ОПЕЧАТКИ,
ТО СООБЩИТЕ ОБ ЭТОМ,
НАПИСАВ СООБЩЕСТВУ
[VK.COM/TEACHINMSU](https://vk.com/teachinmsu).



БЛАГОДАРИМ ЗА ПОДГОТОВКУ КОНСПЕКТА
СТУДЕНТКУ БИОФАКА МГУ
ГУСЬКОВУ НАТАЛЬЮ ИГОРЕВНУ

Оглавление

Лекция 1.	8
Этимология термина «Физиология растений».	8
Иерархия познавательных исследований. Методы и подходы.	8
Экологические, политические и этические аспекты растений	9
Биоэнергетика	9
Энергетическая система клетки – дыхание.....	10
Лекция 2.	11
Биоэнергетика	11
Хиноны (убихиноны и пластохиноны).....	11
Флавинадениндинуклеотид (FAD) и флавиномононуклеотид (FMN)	12
Железосерные белки	12
Общая схема дыхательной ЭТЦ.....	13
NADH-дегидрогеназный комплекс. (Комплекс I).....	13
Цитохром В6С-комплекс (Комплекс III).....	15
Цитохром С оксидаза (Комплекс IV).	16
Предполагаемый механизм восстановления кислорода цитохромом а-а3.	17
Сукцинат дегидрогеназа (Комплекс II).	18
АТФ-синтаза.	18
Доказательство вращения γ -субъединицы в каталитическом центре.	20
Особенности гликолиза у растений.	21
Лекция 3.	23
Специфика энергетических систем растительной клетки.	23
Основные стадии гликолиза и их «шунты» в растительной клетке.....	23
Шунт №1.	24
Гликолиз в растительной клетке.	24
Глюконеогенез.....	24
Глиоксилатный цикл.....	25
Регулирование гликолиза у животных и растений.	26
Специфика энергетических систем растительной клетки II.	28
Транспорт веществ через мембрану митохондрий.	29
Особенности ЦТК у растений.	30
Альтернативная оксидаза (цианидрезистентное дыхание).	31
Электрон-транспортная цепь дыхания растений.....	31
Образование суперкомплексов.....	32

Альтернативные пути дыхания растений.....	33
Лекция 4.	35
Фотосинтез.	35
Хлорофилл.	35
Многообразие хлорофиллов.....	36
Основные структурные особенности молекулы хлорофилла:.....	36
Биосинтез порфиринов.	36
Спектры поглощения хлорофиллов а и b.....	38
Энергетические уровни хлорофилла.	38
Первичные процессы фотосинтеза.	39
Простейшие схемы фотосинтеза.....	39
Z-схема фотосинтеза.	41
Организация фотосинтетического аппарата.....	42
Фотосистема II.....	43
Кинетика работы водоокисляющего комплекса.	44
Фотосистема I.	45
Лекция 5.	47
Электрон-транспортная цепь хлоропластов.	47
Варианты электронного транспорта в ЭТЦ хлоропластов.....	47
Циклический транспорт электронов.	48
Псевдоциклический транспорт электронов.....	49
Хлоропластное дыхание.	50
Антенны: пигмент-белковые комплексы фотосинтезирующих организмов.....	51
Фикобилисомы.	52
Каротиноиды: каротины и ксантофиллы.	53
Светособирающие комплексы фотосистемы I и II.	54
Функции каротиноидов.	55
Лекция 6.	56
Механизмы регулирования и защиты фотосистемы от фотодеструкции.	56
Изменение состояний – перемещение ССКII.....	56
Виолксантиновый цикл.....	57
Фотозащита. «Переключение» виолксантиновой системы.....	58

Цикл Кальвина	58
Стадия карбоксилирования	59
Стадия восстановления ФГК.....	59
Стадия регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата (РубФ).	60
Стадия синтеза углеводов продуктов фотосинтеза.....	60
Рибулозо-бисфосфат-карбоксилаза-оксигеназа (Rubisco).	60
Конечные продукты фиксации CO ₂	61
Лекция 7.	63
Фотодыхание.....	63
Соотношения карбоксилазной и оксигеназной функции Rubisco.....	64
Кранц-анатомия C ₄ -растений.	65
C ₄ -фотосинтез.	65
Варианты C ₄ -фотосинтеза.	66
САМ-метаболизм.	67
Минеральное питание.	68
Восстановление нитратов.....	68
Лекция 8.	70
Минеральный обмен растений.....	70
Азот.	70
Структура нитрогеназы.	71
Включение азота в органические соединения.....	72
Транспорт азота.....	73
Сера.....	73
Метаболизм серы.....	73
Варианты транспорта через мембрану.	74
Лекция 9.	76
Транспортные процессы в растительной клетке.	76
Типы АТФ-аз растительной клетки.....	77
АВС-транспортеры.....	78
Вторично-активный транспорт	78
Стратегии поглощения железа растениями	78
Пассивный транспорт: ионные каналы.	79

Системы транспорта калия в растительных клетках.	79
Лекция 10.	80
Водный обмен растений.....	80
Термодинамические показатели воды.	80
Динамические характеристики потока воды в клетку.....	80
Аквапорины.	81
Поглощение воды корнем.	81
Устьица – особые клетки эпидермиса.	83
Лекция 11.	84
Транспорт воды по растению.	84
Симпластная и апопластная загрузка флоэмы.	84
Растительная клетка.	84
Органеллы эукариотической клетки:	84
Сигнальные последовательности транспорта белков в растительной клетке.....	85
Лекция 12.	86
Клеточная стенка	86
Строение микрофибрилл целлюлозы.	86
Пектины.....	87
Структурные белки клеточной стенки.	88
Лигнины.	88
Плазмалеммы.	88
Особенности плазмалемм:.....	88
Лекция 13.	89
Функции плазмалеммы	89
Структура растительного аппарата Гольджи.....	89
Функциональные участки ЭПР.....	89
Роль растительного ЭР в формировании «экспортных» белков	89
Везикулярный транспорт.....	89
Вакуоли	90
Пероксисомы	91
Ядро	91

Факторы транскрипции растений	91
Некоторые особенности ядерного генома растений	91
Лекция 14.	92
Пластиды.	92
Гены хлоропластов.....	93
Функции пластид.....	93
Митохондрии.	93
Гены митохондрий	93
Каллусогенез и дедифференцировка.	94
Характеристика каллусных культур.....	94
Получение суспензионных культур клеток	94
Лекция 15.	95
Культура клеток высших растений.....	95
Основные свойства культуры клеток высших растений.....	95
Гетерогенность популяций культур клеток высших растений.....	95
Протопласты	96
Культура клеток высших растений как модель изучения фотосинтеза.....	96
Лекция 16.	97
Культура клеток высших растений.....	97
Соматоклональная вариабельность.....	97
Практическое применение культуры клеток.	97
Коллекции растительных объектов.	97
Коллекции «пробирочных» растений	98
Коллекции тканей и органов растений	99
Коллекции культур клеток высших растений	99
Сельскохозяйственная биотехнология.....	99
Рынок лекарственных препаратов	99

Лекция 1.

Этимология термина «Физиология растений».

Термин «физиология растений» состоит из двух слов – «физиология» и «растения». Физиология (от греч. *physis* – природа и ...*логия*), наука о жизнедеятельности организма и его отдельных частей – клеток, органов, функциональных систем. Она изучает механизмы различных функций живого организма (рост, размножение, дыхание и др.), их связь между собой, регуляцию и приспособление к внешней среде, происхождение и становление в процессе эволюции и индивидуального развития особи. (*Определение из БЭС*).

Учебник ФР (Либберт): Физиология – учение о протекающих в живой материи процессах. Предмет физиологии – функции живых существ, их органов.

Учебник ФР (Полевой): Физиология – наука о функциональной активности организмов. В китайском языке – жизнь, логика, познание.

Иерархия познавательных исследований. Методы и подходы.

Иерархия познавательных исследований: на вопрос «Что происходит?» отвечают классическая ботаника, зоология, фитохимия. На вопрос «Как?» – теория эволюции, генетика, биохимия. И только физиология может ответить на вопрос «Зачем все это?». Таким образом, физиология – интегральная наука, которая выстраивает логику жизни, объединяя под собой базовые и классические науки.

Специфика методов данной науки – оставить объект живым.

Методы:

- спектральные (в том числе с использованием витальных красителей)
- генетические (исследование мутантов, дефектных по определенному признаку; весьма эффективны генно-инженерные подходы – например, «нокаут» гена)
- модели (культура клеток, математическое моделирование)
- использование достижений наук «ниже лежащих уровней иерархии»

Происхождение растений, место в систематике. Отличия высших растений от других организмов

Традиционно считается, что растения вообще – это высшие растения и зеленые эукариотические водоросли. У высших растений 2 принципиальных свойства – автотрофность (фотосинтез и минеральное питание) и прикрепленное существование. Эти аспекты обуславливают всю логику существования растений:

- метамерное строение (нельзя предсказать, каким будет растение во взрослом состоянии, глядя на росток)
- стадийность развития, зависимость от внешних условий (например, закладка репродуктивных органов)
- постоянный рост

- особенности эмбрионального развития
- расселение зачатками (семя – особая структура – растение в миниатюре и упаковке)
- специфичная стратегия устойчивости (дублирование функций, мультифункциональность)
- механизмы устойчивости – на морфологическом или биохимическом уровне (вторичный метаболизм)

Экологические, политические и этические аспекты растений

«Космическая роль зеленого растения»: биомасса – основа жизни всех других живых организмов. Растения занимают всего лишь 1/3 площади континентов, образуя при этом 80-90% всей биомассы Земли (биомасса животных – 1,5-2% от биомассы растений).

Рамочная конвенция ООН, Киотский протокол (1992г.) – мониторинг соотношения поглощения и выброса CO₂ в разных странах. При коэффициенте меньше единицы страна должна платить, если больше единицы – зарабатывать. По мнению ряда ученых, Россию лишили потенциальных доходов от использования ее «поглощающего ресурса» (41 млн. т. углерода в год – 1.23 млрд. долларов США за 2008-2012гг.)

Биоэнергетика

Основывается на законах термодинамики.

Первый закон термодинамики: энергия Вселенной не может ни создаваться, ни исчезать. Энергия Вселенной постоянна.

Второй закон термодинамики: энтропия Вселенной всегда возрастает. Существует общая тенденция к увеличению хаоса и беспорядка.

Третий закон термодинамики: энтропия равна нулю только для совершенного кристалла при температуре абсолютного нуля.

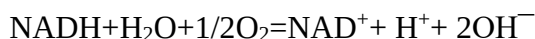
По второму закону:

$$\Delta E = \Delta H = \Delta G + T\Delta S,$$

где E – полная энергия системы, H – свободная энтальпия, G – свободная энергия Гиббса, T – абсолютная температура, S – энтропия.

Для самопроизвольных реакций $\Delta G < 0$, для синтеза упорядоченных структур $\Delta G > 0$.

Для того чтобы «оплатить» реакции синтеза своих структур, растения обзавелись универсальной монетой – АТФ. При гидролизе АТФ выделяется около 29,4 кДж/моль или 7 ккал/моль. Но АТФ тоже нужно откуда-то брать, поэтому растения стали использовать для синтеза АТФ окислительно-восстановительные реакции:



Когда NADH заканчивается, его запас можно пополнить за счет окисления восстановленных соединений – сахарозы (гликолиз в цитозоле), пирувата и ацетил-СоА (в митохондриях).

Для сопряжения окисления NADH с синтезом АТР необходима особая форма запасаения энергии – $\Delta\mu\text{H}$ электрохимический градиент протонов на мембране:

$$\Delta\mu\text{H} = F\Delta\phi + RT \ln \frac{[\text{H}^+]_o}{[\text{H}^+]_n}$$

$$\Delta\mu\text{H} = F\Delta\phi - RT\Delta p\text{H}$$

Энергетическая система клетки – дыхание

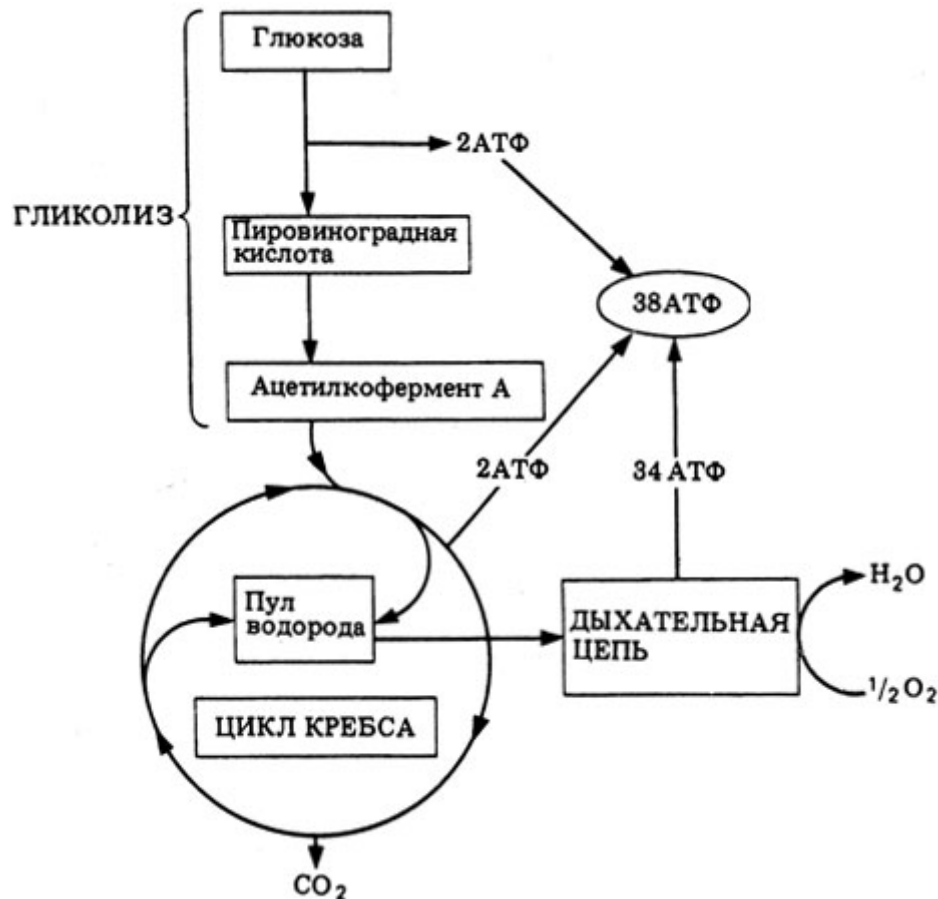


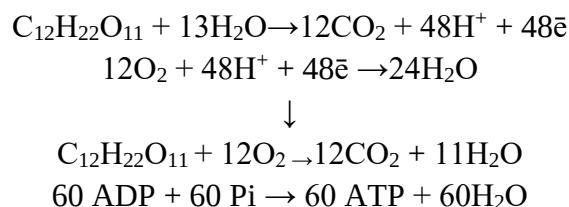
Рис 1. Общая энергетическая система клетки

- 1 блок. Гликолиз – формирование некоторого количества NADH
- 2 блок. Цикл Кребса – окисление восстановленных соединений до углекислого газа.
- 3 блок. ЭТЦ митохондрий – передача электронов от NADH.

Лекция 2.

Биоэнергетика

Исходя из Рис.1, который был в прошлой лекции, можно вывести общий энергетический итог:



Окисление NADH сопровождается перекачкой протонов через мембрану и созданием электрохимического потенциала, который впоследствии разрешается через АТФ-синтазу, поставляя новые молекулы АТФ в клетку. Все эти процессы происходят в митохондриях.

Хиноны (убихиноны и пластохиноны)

Хинон – полностью окисленное соединение, хинол – восстановленное. Участвуют в дыхательной цепи растительной клетки.

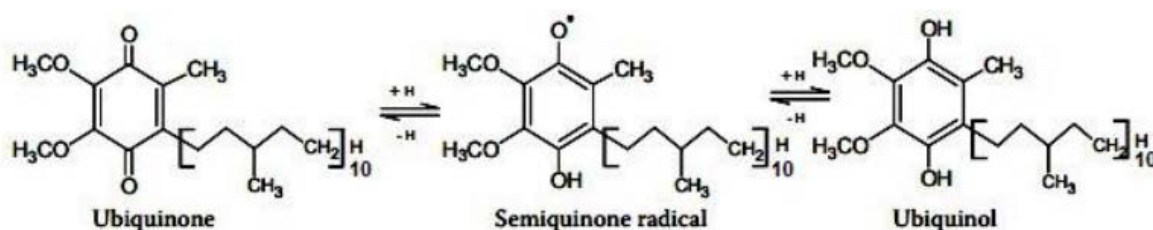


Рис.2. Строение убихинона, семихинона и убихинола (слева направо).

У хинонов (уби- или пластохинонов) есть длинная изопреноидная цепочка, которая обеспечивает гидрофобность, позволяя им располагаться на мембране. Окислительный потенциал – от 0 до +0,1V.

Флавинадениндинуклеотид (FAD) и флавиномононуклеотид (FMN)

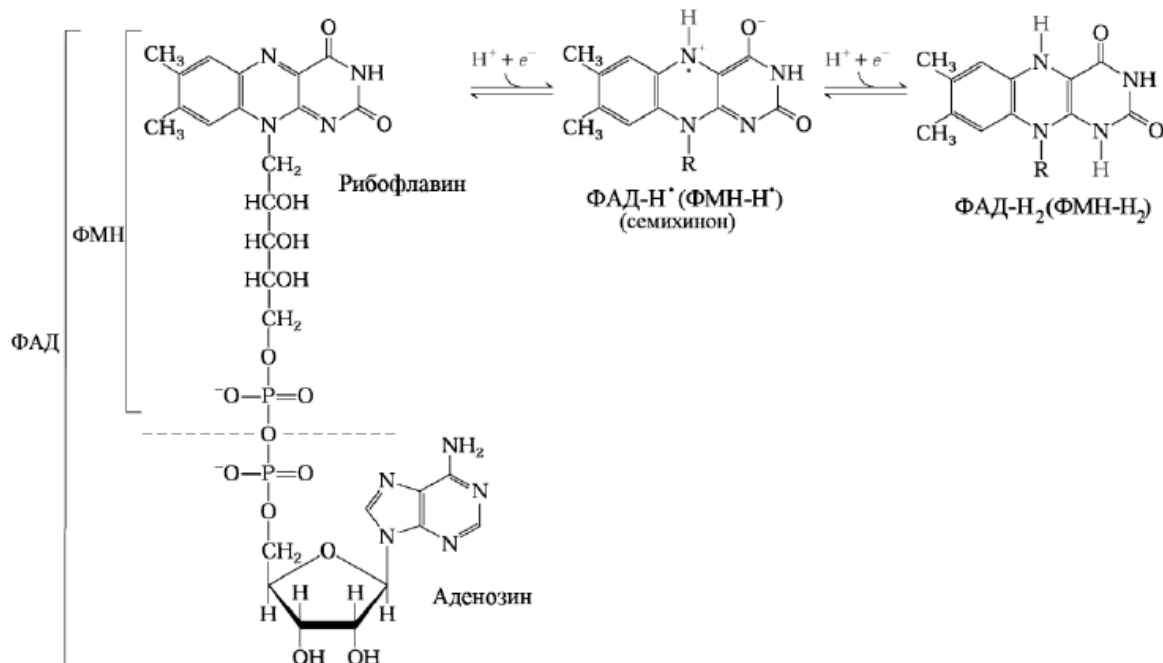


Рис 3. Строение FAD и FMN.

Являются кофакторами белков, переносят $2e^-$ и $2H^+$. В зависимости от белка их окислительный потенциал может меняться от $-0,5V$ до $+0,2V$.

Железосерные белки

Одни из самых древних участников энергетических процессов в клетке. Существует 2 основных кластера – $2Fe-2S$ и $4Fe-4S$. В них всегда работает только 1 атом железа, который переносит 1 электрон. Окислительно-восстановительный потенциал варьирует от $-0,42V$ до $+0,35V$.

Гемы – коферменты фитохромов.

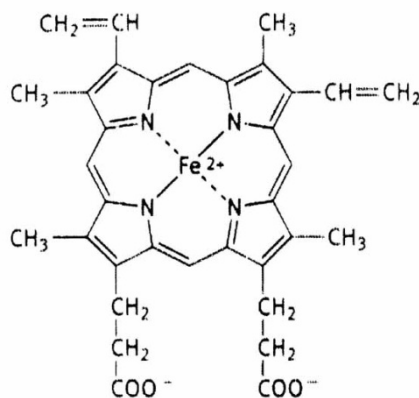


Рис.4. Строение гема.

Имеет тетрапиррольное строение с ионом железа в центре молекулы, является центральным кофактором фитохромов. В цитохроме С гемм связан с белком ковалентной связью, а в А и В – координационными связями. Окислительно-восстановительный потенциал также зависит от белка, с которым связана молекула гемма, и колеблется от $-0,18V$ до $+0,55V$.

Общая схема дыхательной ЭТЦ

Блочная система ЭТЦ позволяет не только сбрасывать электроны с NADH, но и обеспечивает подвижность и вариабельность энергетической системы клетки.

Располагается ЭТЦ на внутренней мембране митохондрий. Первым окисляется NADH, электрон переходит по системе переносчиков на убихинон. Протоны приходят из матрикса, а при окислении убихинона уходят в межмембранное пространство. Цитохром С отдает электроны на цитохром-а₃ комплекс, здесь же из матрикса забираются протоны и образуется вода. (см. рис.5).

Каждый комплекс на мембране качает протоны, в результате чего образуется градиент электрохимического потенциала.

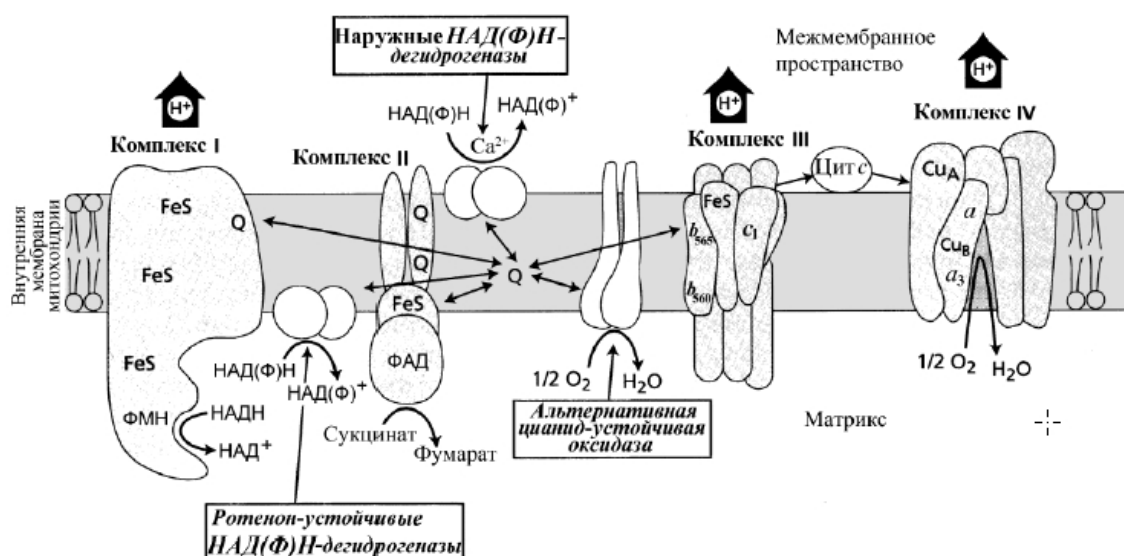


Рис. 5. Общая схема ЭТЦ.

NADH-дегидрогеназный комплекс. (Комплекс I).

Молекулярная масса 600-900кДа. Состоит из 40 белков (min-14). Эволюционно возник, скорее всего, в результате объединения двух комплексов из неродственных семей белков: NADH-дегидрогеназный и убихинон-связывающий модули («голенище») произошли из растворимой NiFe-гидрогеназы, которая окисляла NADH и

восстанавливала водород, а гидрофобная мембранная «подошва» комплекса, перекачивающая протоны, возникла из Na^+/H^+ -антипортов Mgr. Следовательно, часть белка кодируется в ядре, а часть – в митохондриальном геноме.

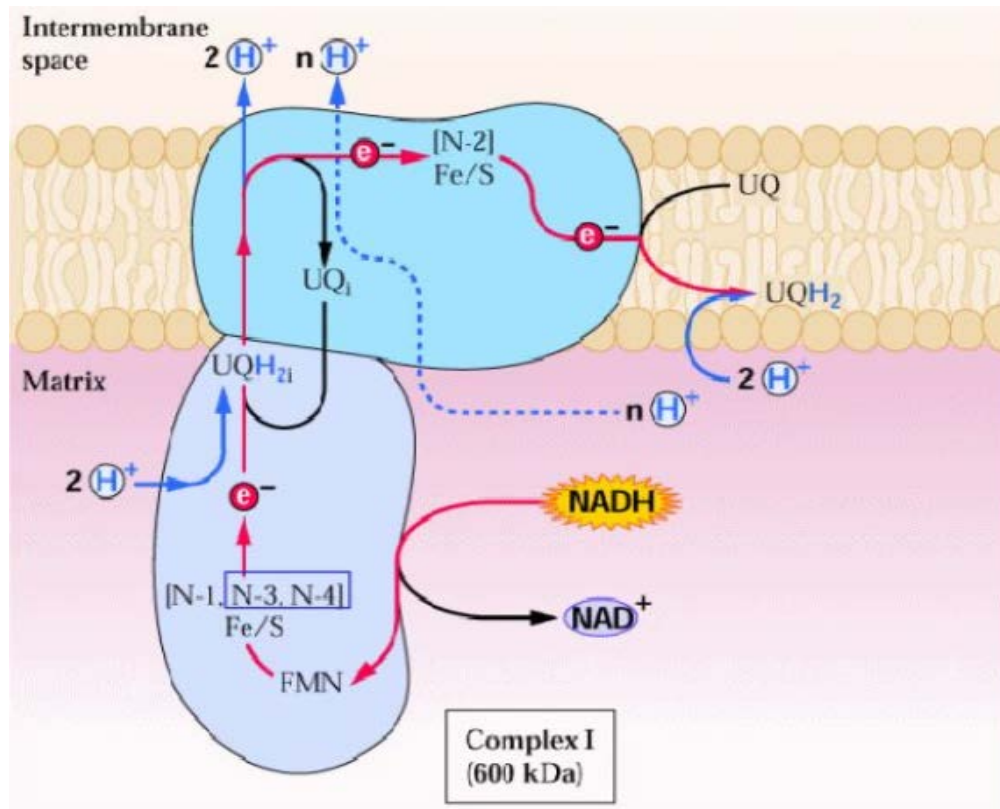


Рис.6. Схематичное строение Комплекса I.

В «голеньице» находятся:

- флавопротеин – 3 белка, содержат FMN и два 2Fe2S-центра (N1)
- железопро테인 – 6 белков и 3 4Fe4S-центра (N3, N4)

Субкомплекс «подошва» содержит 4Fe4S-центр (N2).

NADH-деhydroгеназный комплекс имеет уникальный механизм транспорта протонов за счет конформационных изменений самого фермента.

У растений Комплекс I имеет некоторые особенности (см.Рис7) - связь комплекса с галактонолактондеhydroгеназой (синтез аскорбинки) и карбоангидразой (растворение CO_2).

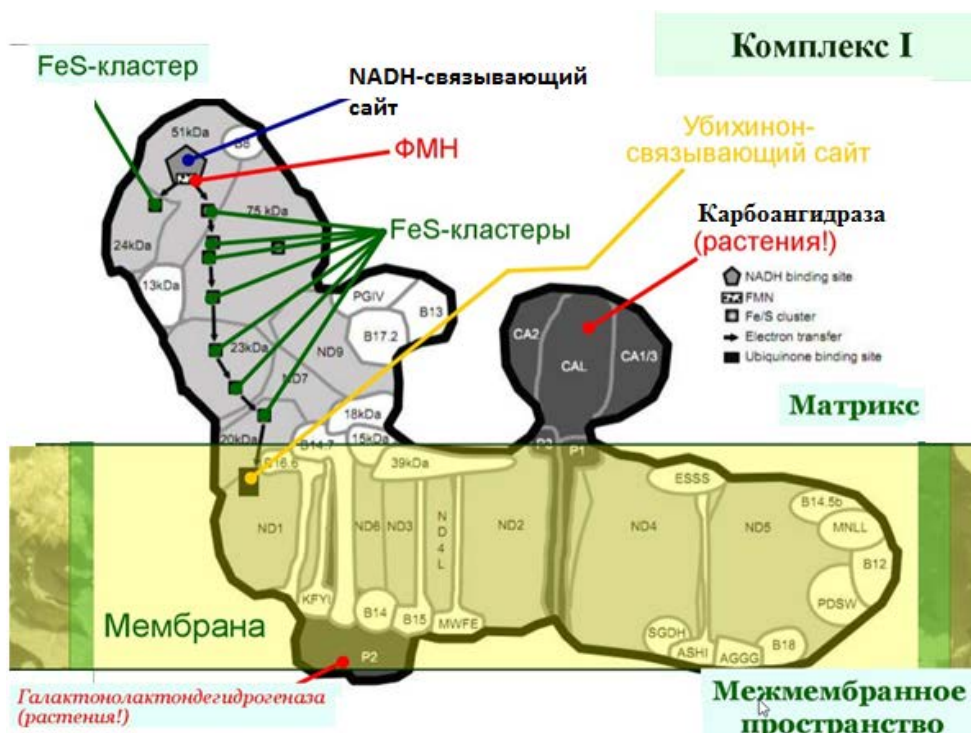


Рис.7. Особенности NADH-дегидрогеназного комплекса растений.

Цитохром В6С-комплекс (Комплекс III).

Состоит из 11 белков (min-3):

- Цит b (2 гема b_L и b_H), молекулярная масса 45 кДа
- FeS-белок ($2Fe_2S$), $M_r=21,5$ кДа
- Цит c_1 ($M_r=27$ кДа, состоит из 240 аминокислот)

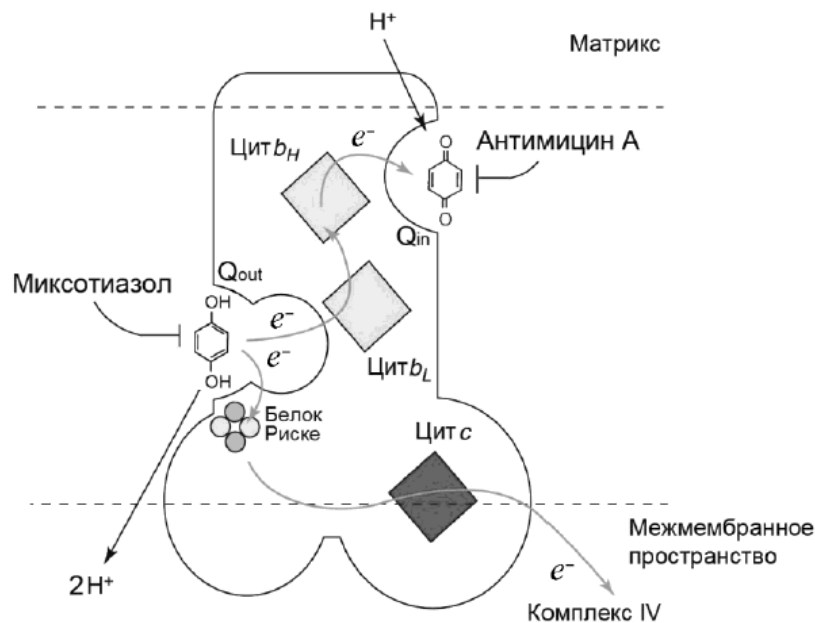


Рис.8. Схематическое изображение Комплекса III.

Отличительной особенностью комплекса III является то, что одновременно с переносом электронов через внутреннюю мембрану митохондрий с помощью хинонов транспортируются протоны. Хиноны свободно диффундируют в липидной фазе мембран, что позволяет им не только переносить электроны между мембранными комплексами, но также выполнять функции протонофоров — трансмембранных переносчиков ионов H^+ . Механизм транспорта электронов и протонов в комплексе цитохромов b_6/c_1 был постулирован еще в 1976 г. П. Митчелом, в дальнейшем он получил название *Q-цикла* (система повышения эффективности).

Цитохром С оксидаза (Комплекс IV).

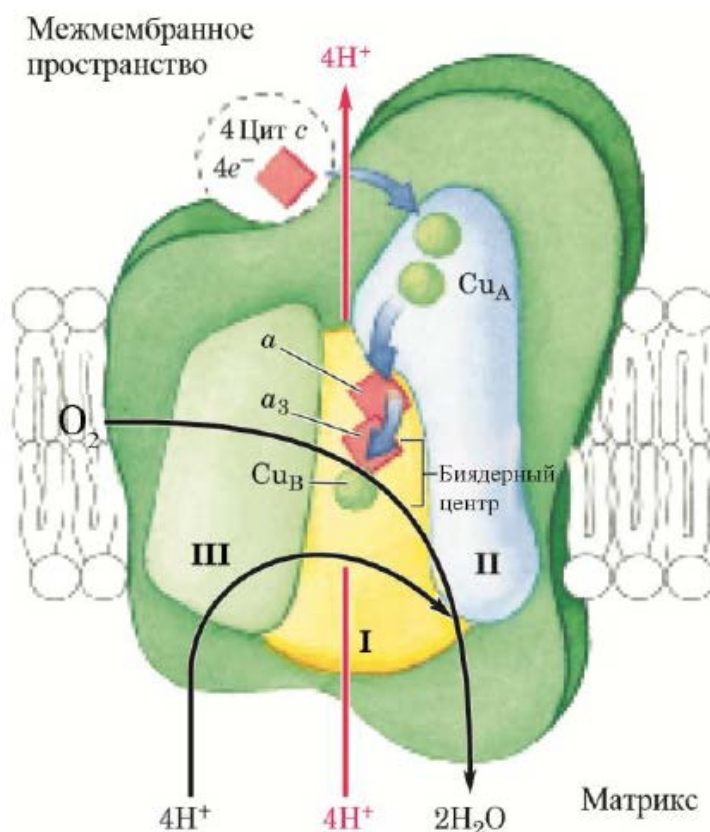


Рис.9. Строение Комплекса IV.

В мембране димер. Мономер у эукариот – от 10 до 13-14 полипептидов. Из них 3 больших полипептида с каталитической активностью кодируются в митохондриальном геноме. Остальные 9-10 имеют множество изоформ и кодируются ядерным геномом, обладают регуляторной активностью. У растений данный комплекс состоит из 8 субъединиц, схожих с таковыми у других эукариот, и 6 специфических для растений субъединиц. Основной кофактор – медь (2 центра – Cu_A и Cu_B , и еще 2 гема – a и a_3).

Предполагаемый механизм восстановления кислорода цитохромом а-а3.

Восстановление идет за счет попарного переноса электронов, что исключает образование активных форм кислорода. (см. Рис.10 – против часовой стрелки).

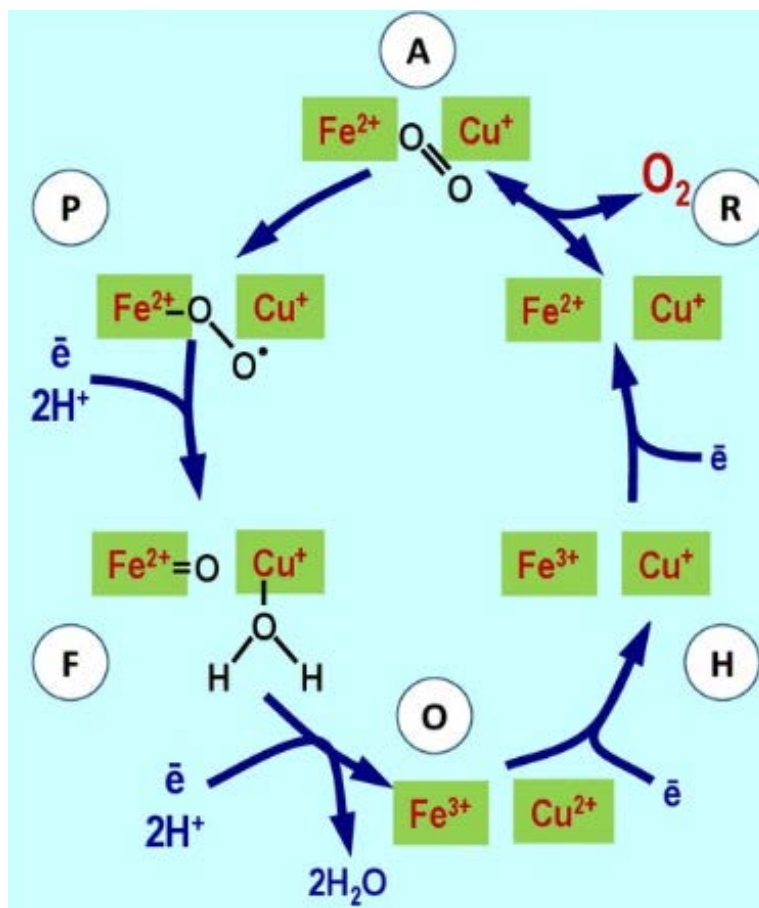


Рис.10. Предполагаема схема работы цитохрома а-а3.

А. Полностью восстановленный биядерный центр связывает кислород.

Р. Перенос 4 электронов на кислород: 2 от железа гемма аз, один от Cu_B, четвертый – от Tyr244, который отдает протон для разрыва двойной связи между атомами кислорода и Тург-радикал восстанавливается до аниона цитохромом с. Далее – протонирование Cu(II)-OH⁻ с образованием воды.

Е. Образовавшаяся вода связывается с Cu_B. Железо Fe(IV)=O²⁻ восстанавливается до Fe^{III}, а связанный с ним кислород протонируется. Высвобождается первая молекула воды.

О. Тург-244-анион протонируется, Cu_B восстанавливается до Cu^I за счет электрона от цит с.

Н. Fe^{III} восстанавливается до Fe^{II}, связанная с ним OH группа протонируется с образованием второй молекулы воды.

R. Биядерный центр полностью восстановлен.

Сукцинат дегидрогеназа (Комплекс II).

Единственный фермент цикла Кребса, встроенный в мембрану митохондрий. Состоит из 4 полипептидов: SDH A, B, C и D (SDH1-4). (см.Рис.11).

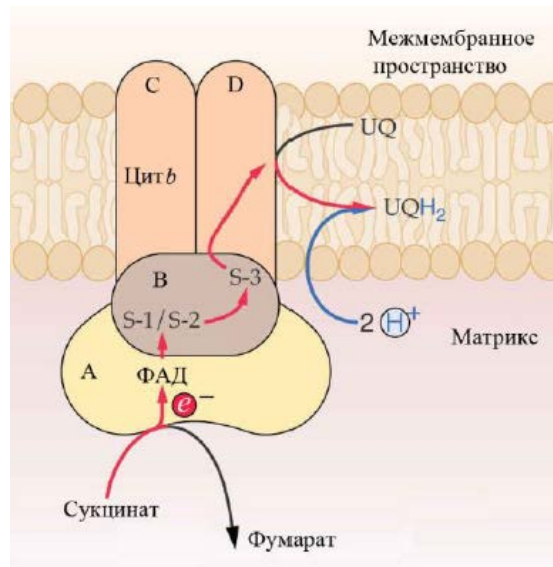


Рис.11. Схематическое строение Комплекса II.

АТР-синтаза.

Итогом электронтранспортной цепи митохондрий является градиент электрохимического потенциала протонов, который впоследствии потратится на синтез АТР. Этот процесс осуществляется с помощью АТР-синтазы. (см.Рис.12)

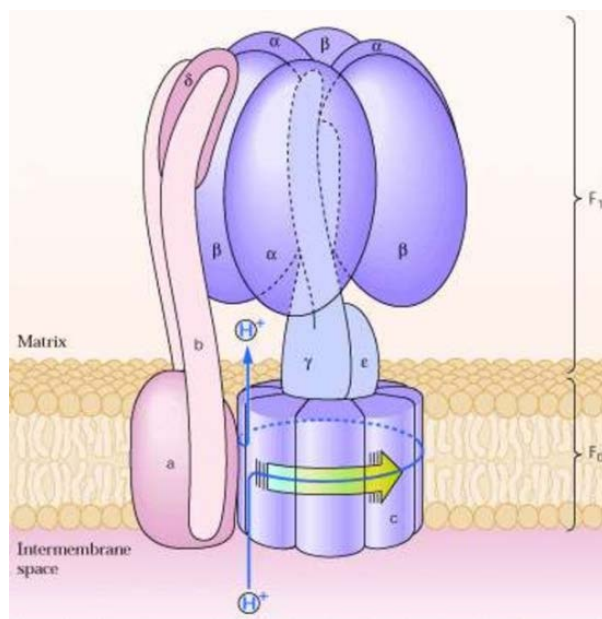


Рис.12. Схематическое строение АТФ-синтазы.

Состоит из двух субъединиц: F₀ и F₁. Субъединичный состав домена F₁ очень консервативен и включает пять различных белков — три α-субъединицы, три β-субъединицы и по одной γ- и ε-субъединице. В состав F₀-комплекса входит одна a-субъединица, две b-субъединицы и "кольцо" из 9—12 c-субъединиц. Это "c-кольцо" жестко связано с γ-субъединицей через ε-субъединицу.

Внутри c-субъединицы находится аспарагиновая кислота, к которой по специальному каналу доставляются протоны из матрикса. Присоединение протона к карбоксильной группе аминокислоты вызывает поворот субъединицы на определенный угол. Этот поворот освобождает следующую часть c-субъединицы, что обеспечивает ее постоянное вращение.

Вращение комплекса F₁ обеспечивается энергией γ-субъединицы (см.Рис.13).

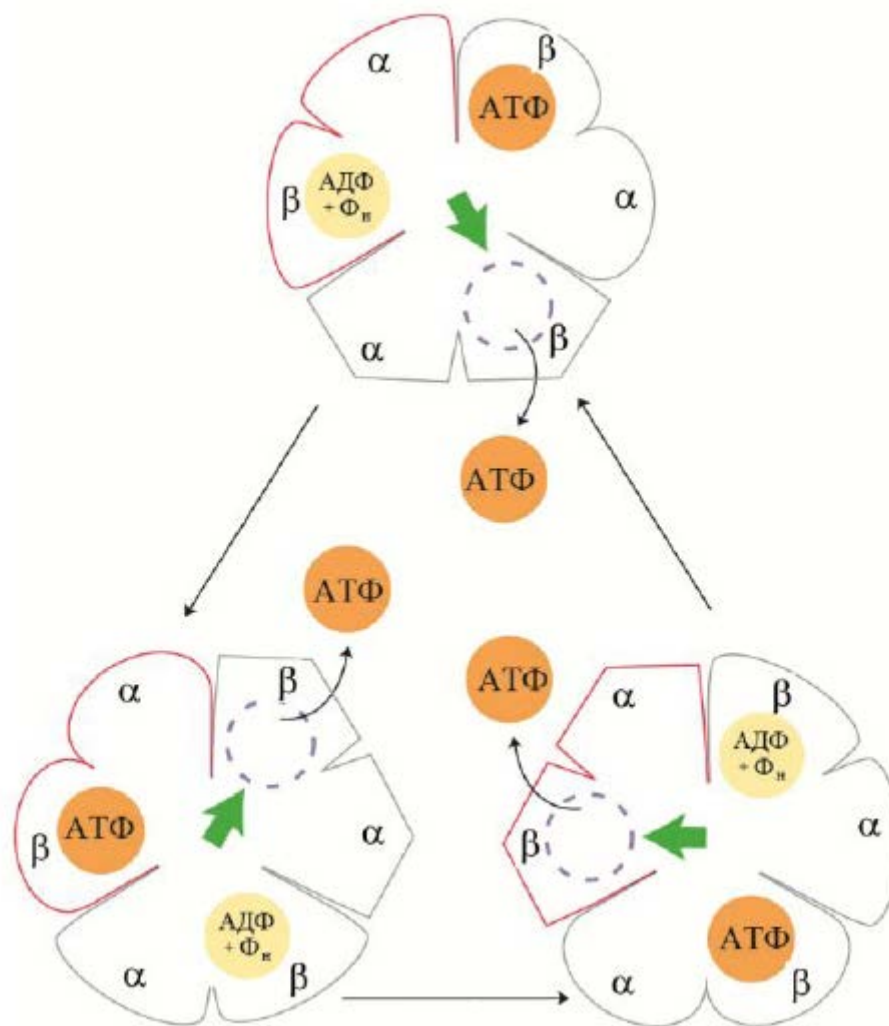


Рис.13. Обменно-связывающий механизм синтеза АТФ.

Доказательство вращения γ -субъединицы в каталитическом центре.

В 1997 г. М. Ешида (Masasuke Yoshida) и К. Киносита (Kazuhiko Kinoshita) провели следующий эксперимент (см.Рис.14). Они метили флуоресцентным зондом актиновый филамент и "пришивали" его белком авидином к γ -субъединице (или к одной из с-субъединиц F0 -комплекса). Затем комплекс F1 был прикреплен к специально обработанной стеклянной поверхности, по которой невозможно скольжение. Исследователи предположили, что если γ -субъединица действительно способна вращаться под действием АТФ, то будет вращаться комплекс из с-субъединиц и прикрепленный к нему актиновый филамент. Поскольку размеры филамента составляли около 1 мкм, его вращение должно быть видно во флуоресцентный микроскоп.



Как только к модифицированному комплексу F1 была добавлена АТФ, актиновый филамент начинал вращаться по кругу со средней скоростью 4 оборота в секунду. Поскольку размеры актинового филамента значительно превышали размеры ферментативного комплекса, реальная скорость вращения γ -субъединицы гораздо выше (до 100 оборотов в секунду). Демонстрация вращательного движения γ -субъединицы позволила окончательно решить вопрос о механизме синтеза АТФ в АТФ-синтазном комплексе. За свой вклад в установление механизма синтеза АТФ П. Бойер и Д. Уокер в 1997 г. получили Нобелевскую премию по химии.

Самый древний энергетический путь. Исходное соединение – сахароза, а не глюкоза, как у животных. Процесс идет в двух компартментах – в цитозоле и пластидах. Конечный продукт – не только пируват, но и малат. Фермент сахарозосинтаза локализована в цитозоле, обеспечивает синтез и распад сахарозы. Инвертаза – только гидролиз, щелочная форма локализована в цитозоле, а кислая – в вакуоле и клеточной стенке.

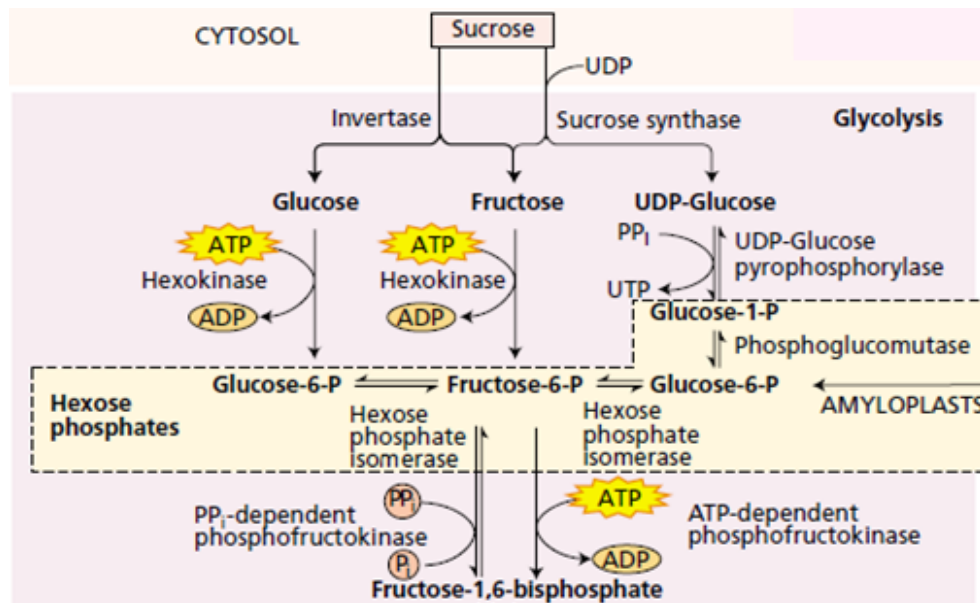


Рис.15. Особенности гликолиза в растительной клетке.

Лекция 3.

Специфика энергетических систем растительной клетки.

Основные стадии гликолиза и их «шунты» в растительной клетке.

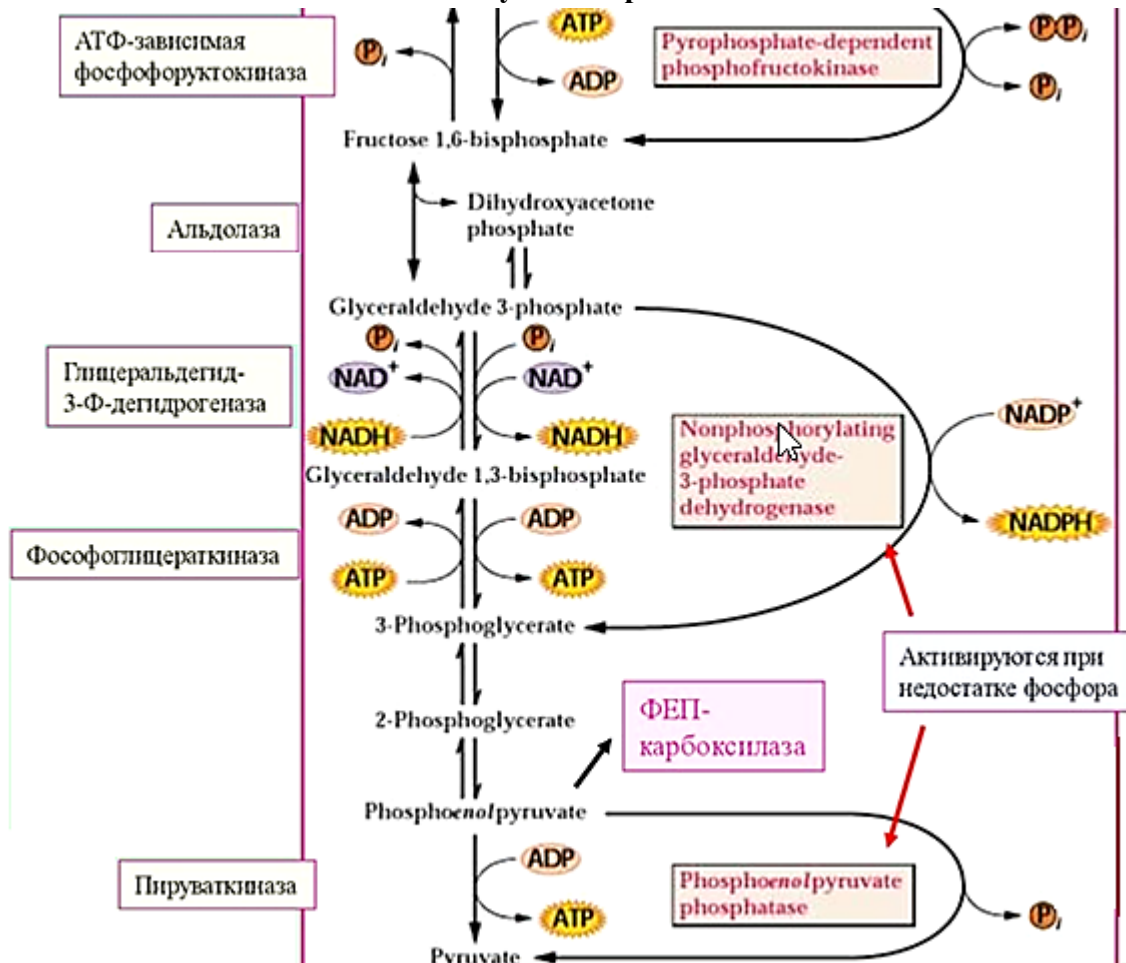


Рис.16. Основные стадии гликолиза и их «шунты» в растительной клетке.

Каждый этап образования веществ в гликолизе имеет дополнительный «шунт»: (см.Рис.16)

- 1) В образовании фруктозы-1,6-бисфосфата участвует не только АТФ-зависимая фосфофруктокиназа, но и пиродифосфатзависимая, которая использует в качестве источника энергию дифосфат;
- 2) Окисление альдегида до кислоты при нехватке фосфора идет с затратой энергии и образованием NADPH ;
- 3) При образовании пирувата в отсутствие пируваткиназы (что смертельно для человека) работает фосфатаза также с затратой энергии.

Шунт №1.

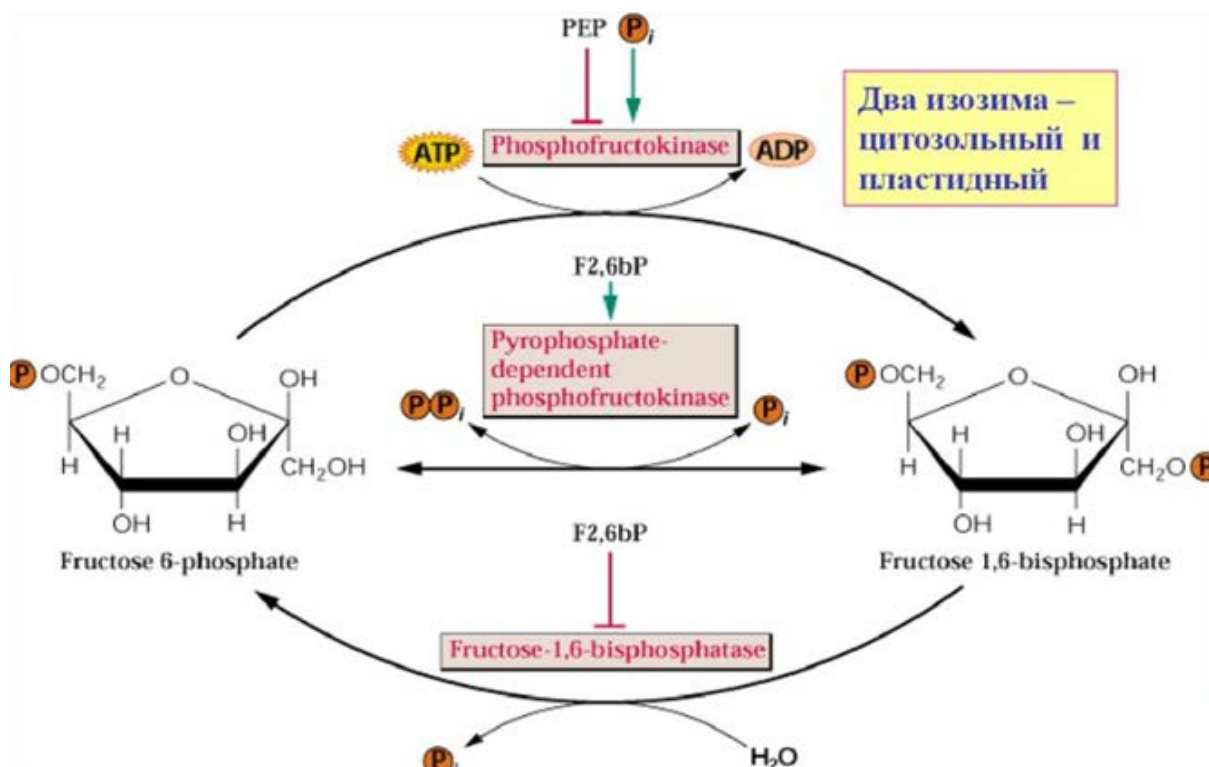


Рис.17. Два пути образования фруктозо-1,6-бисфосфата

Реакция с пирофосфатзависимой фосфофруктокиназой может идти в две стороны. Таким образом фруктозо-1,6-бисфосфосфат включается в пул гексоз гликолиза.

Дифосфатзависимая фосфофруктокиназа активируется в условиях стресса, при дефиците АТФ (например, при аноксии, при фосфорном голодании).

Гликолиз в растительной клетке.

Глюконеогенез.

Большинство реакций гликолиза легко обратимы, и поэтому из пирувата могут быть синтезированы углеводы. Такой "обращенный" гликолиз называют глюконеогенезом. Наиболее активно глюконеогенез идет в прорастающих семенах. В гликолизе необратимыми являются только три реакции, которые катализируются киназами — гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой. Поэтому в ходе глюконеогенеза на этих участках работают обходные пути, которые осуществляются с помощью других ферментов.

Процесс глюконеогенеза начинается с того, что пируват поступает в митохондрии, где с помощью пируваткарбоксилазы превращается в оксалоацетат. Затем оксалоацетат

при участии НАДН-зависимой малатдегидрогеназы восстанавливается до малата. После этого малат выходит в цитоплазму и окисляется до оксалоацетата.

И, наконец, оксалоацетат под действием ФЕП-карбоксикиназы декарбоксилируется с образованием ФЕП. Далее ФЕП за счет обратимых реакций гликолиза легко превращается в фруктозо-1,6-бисфосфат. Обращение необратимых реакций гликолиза, катализируемых фосфофруктокиназой и гексокиназой, осуществляется за счет соответствующих фосфатаз.

Глиоксилатный цикл.

Процесс превращения жиров в углеводы у семян масличных видов растений начинается в *олеосомах* или *жировых телах*, содержащих запасные липиды (обычно это триацилглицеролы). В ходе прорастания семян жиры гидролизуются липазами до жирных кислот и глицерола (см. Рис. 18). Глицерол может превращаться в триозофосфат и участвовать в гликолизе. Жирные кислоты поступают в *глиоксисому* (которые находятся с олеосомами в тесном контакте) и окисляются в системе β -окисления. В этом процессе от жирных кислот последовательно отщепляются фрагменты с образованием ацетил-СоА. При этом происходит восстановление и образование пероксида водорода. НАДН поступает в цитоплазму, а разлагается до воды каталазой.

Глиоксилатный цикл является модификацией цикла Кребса. Три фермента — цитратсинтаза, аконитаза и малатдегидрогеназа — являются общими и для цикла Кребса и для глиоксилатного цикла, а два фермента — *изоцитратлиаза* и *малатсинтаза* — работают только в *глиоксисомах*. Глиоксилатный цикл удобнее разбить на два этапа, в которых последовательно участвуют вначале одна, затем вторая молекулы ацетил-СоА (см. Рис. 18).

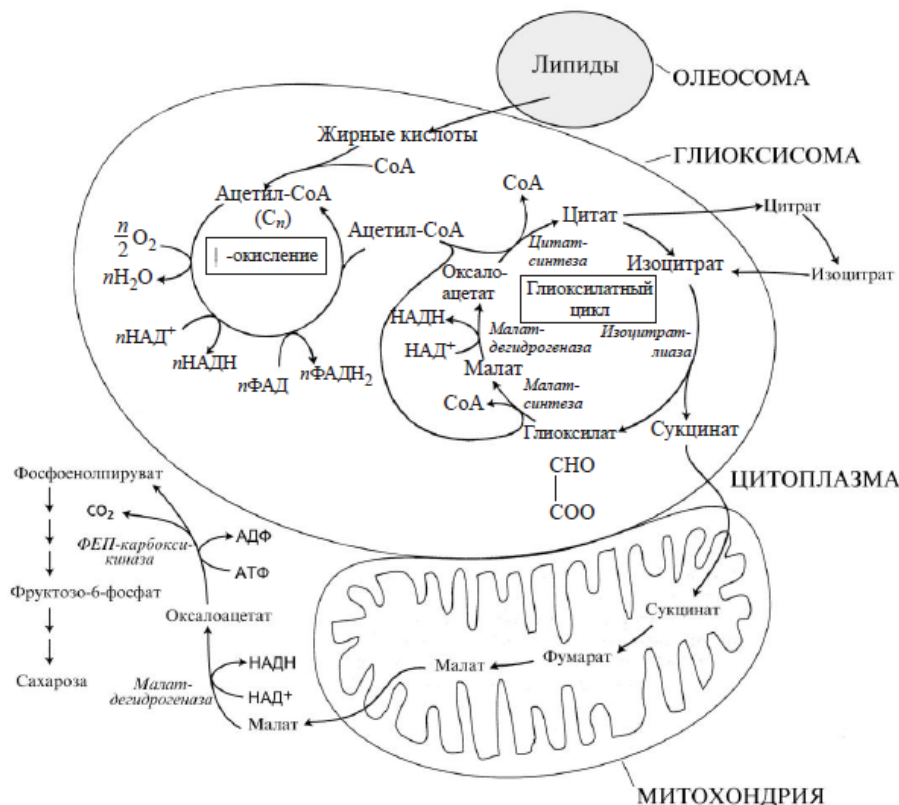


Рис.18. Глиоксилатный цикл в растительной клетке.

На первом этапе одна из молекул ацетил-СоА при участии цитратсинтазы связывается с оксалоацетатом и образуется лимонная кислота. Затем цитрат с помощью аконитазы превращается в изолимонную кислоту. После этого изоцитрат под действием фермента *изоцитратлиазы* расщепляется на янтарную кислоту и *глиоксилевую (глиоксилат)*. Янтарная кислота выходит в цитоплазму и идет на синтез углеводов. Вначале сукцинат поступает в *митохондрии*, где превращается в фумаровую, а затем в яблочную кислоту. Мала-т выходит из митохондрий и окисляется мала-дегидрогеназой до оксалоацетата. Далее оксалоацетат декарбоксилируется с образованием ФЕП, который может использоваться на синтез углеводов в процессе *глюконеогенеза*.

Регулирование гликолиза у животных и растений.

У животных при недостатке АТФ гликолиз активируется, а при избытке – тормозится. У растений гликолиз активируется не ADP, а фосфатом (см.Рис.19).

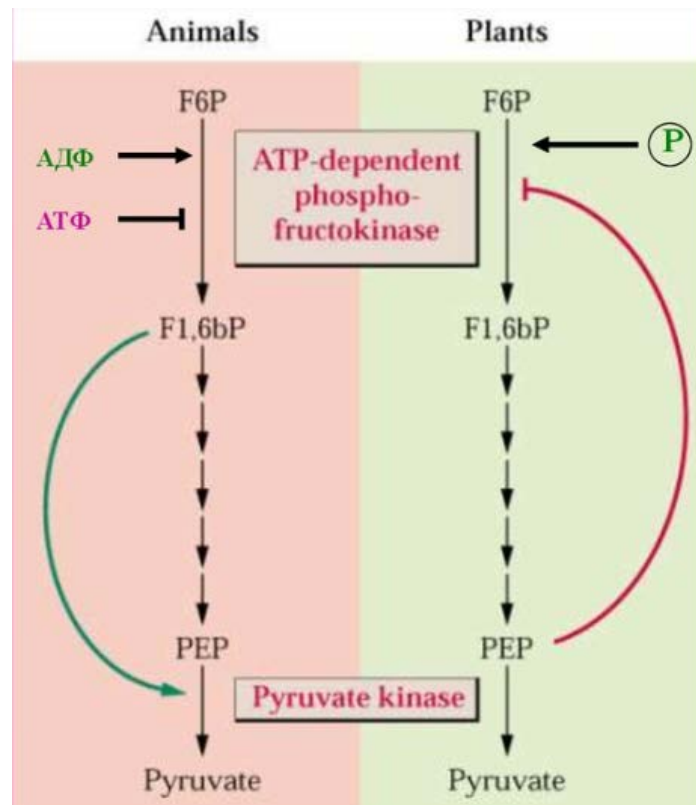


Рис.19. Регулирование гликолиза у животных и растений.

Помимо прочего, у растений имеется 2 формы фосфофруктокиназы – цитозольная и пластидная.

Специфика энергетических систем растительной клетки II.

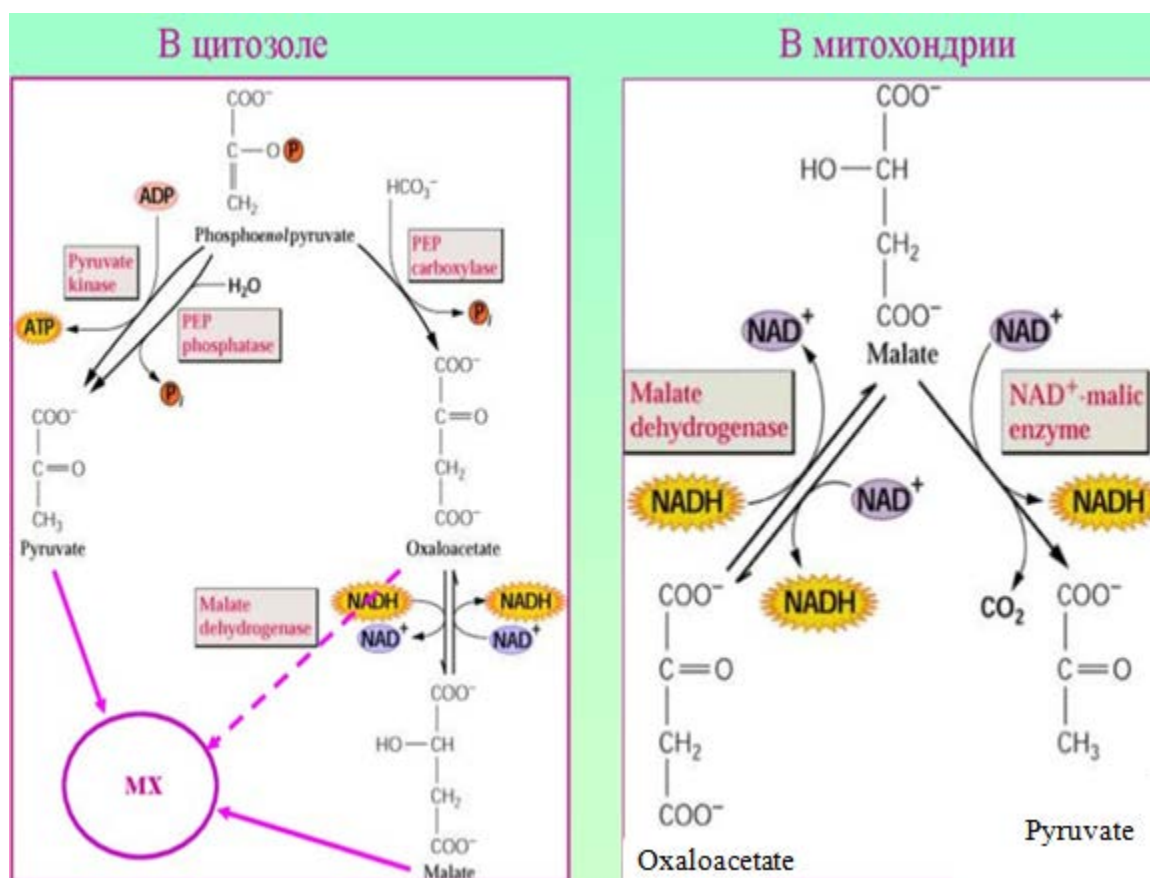


Рис.20. Важные метаболические «шунты» в дыхании растительной клетки.

Конечным продуктом гликолиза у растений является не только пируват, но и малат. Молекула малата более энергизована, т.к. имеет в своем составе гидроксил, а не карбонил, как у оксалоацетата (см.Рис.20 слева).

Оба соединения могут поступать в митохондрии, но имеется особый малик-энзим, который преобразует малат в пируват (см.Рис.20 справа).

Транспорт веществ через мембрану митохондрий.

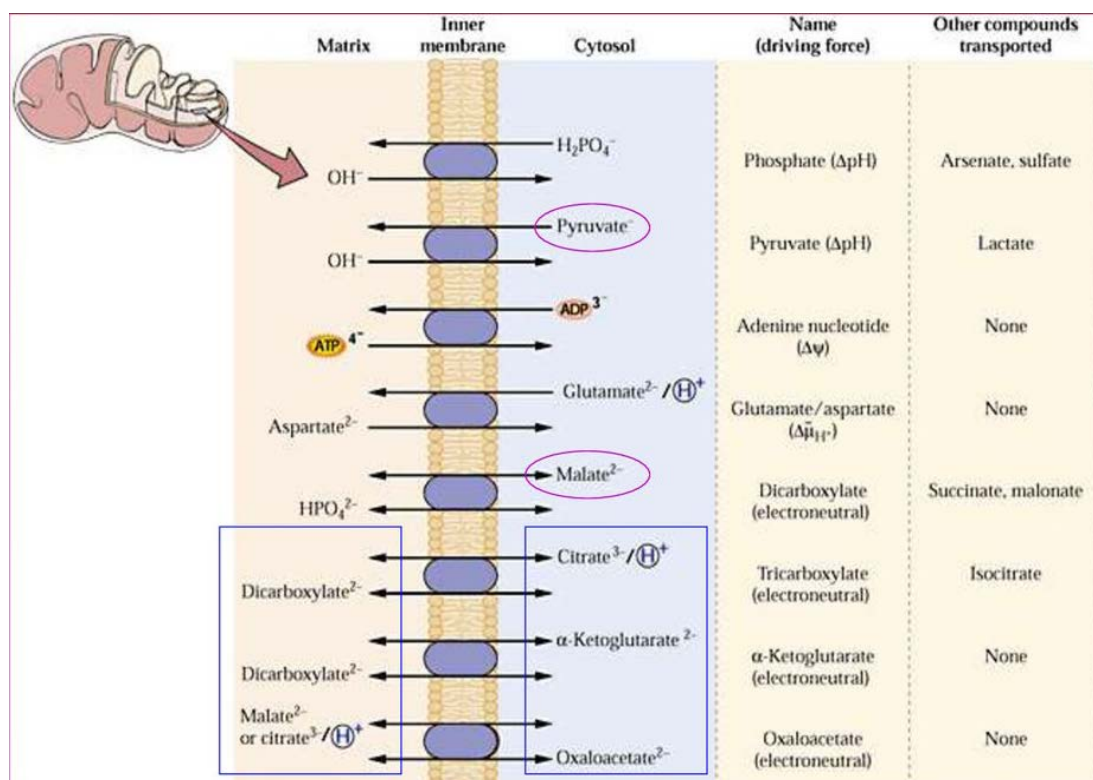
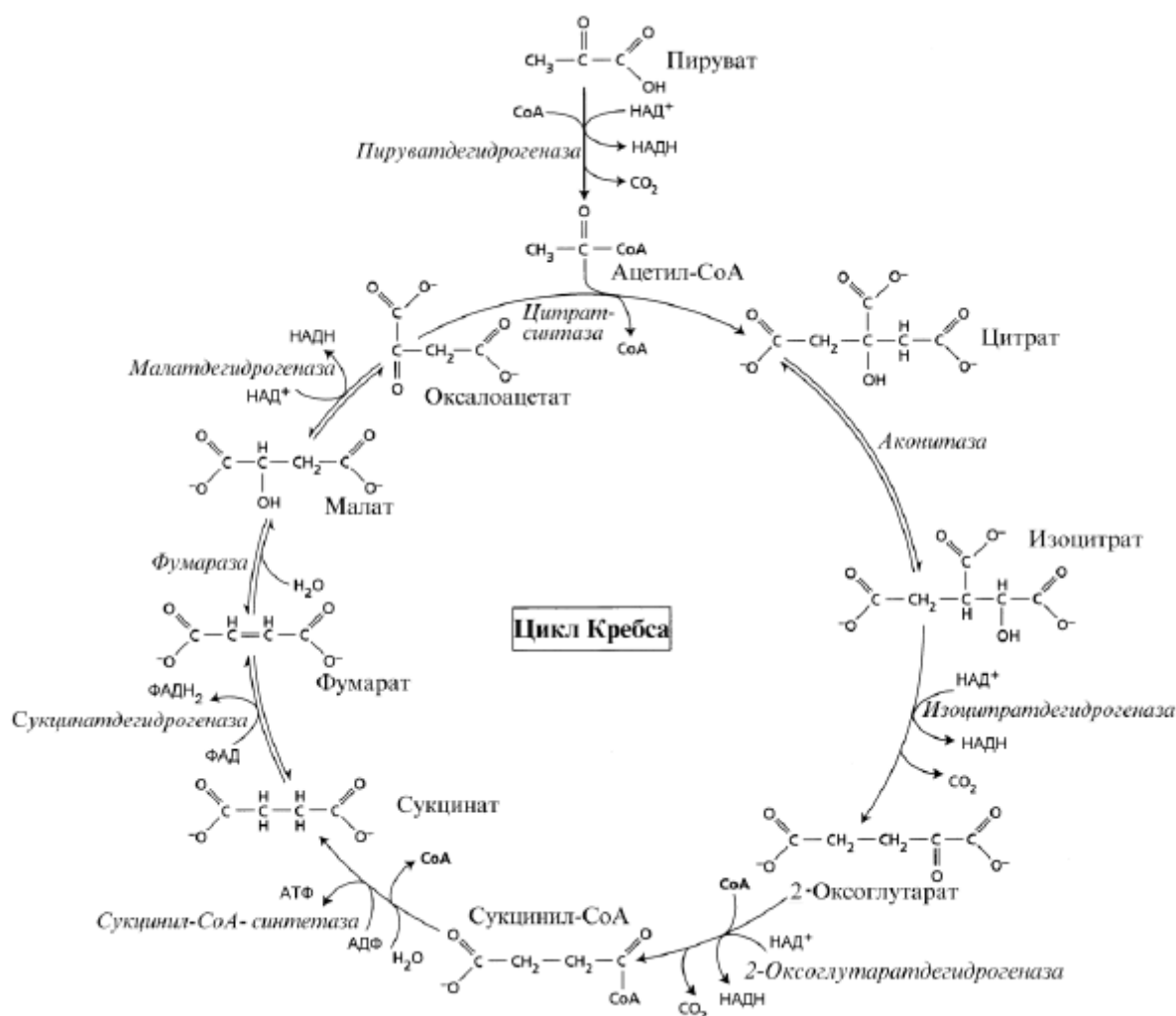


Рис.21. Транспорт веществ через мембрану митохондрии.

Продукты гликолиза поступают в митохондрию униполярно, за счет импорта с гидроксидом или фосфатом (см.Рис.21). Транспорт идет только в одну сторону, в отличие от транспорта оксалоацетата и других кислот (на рисунке 21 - в квадратиках).

Таким образом, оксалоацетат обменивается на малат, а пируват поступает в митохондрию прямым способом.



Гомодимер молекулярной массой около 37кДа. Имеет 2 формы – конститутивную и индуцибельную. Основная функция – передача электронов от убихинона на кислород (дополнительный «шунт»).

- 1) для шунтирования ЭТЦ – модели «перелива» и «распределения»;
- 2) для снижения уровня АФК (активных форм кислорода);
- 3) для быстрого генерирования энергии (например, при стрессе).

The diagram illustrates the mitochondrial electron transport chain. It shows the flow of electrons from NADH and succinate through Complexes I, II, III, and IV, and the alternative oxidase. Protons are pumped from the matrix to the intermembrane space. The diagram also shows rotenone-inhibitable NADH dehydrogenase and an alternative cyanide-resistant oxidase.

Complex I: NADH dehydrogenase (NADH → NAD⁺ + H⁺). It contains FeS clusters and ubiquinone (Q).

Complex II: Succinate dehydrogenase (Succinate → Fumarate). It contains FeS clusters and ubiquinone (Q).

Complex III: Cytochrome bc₁ complex. It contains FeS clusters, h₅₀₆, h₅₀₉, and cytochromes c₁ and c.

Complex IV: Cytochrome c oxidase. It contains Cu_A, Cu_B, and cytochromes a and a₃. It reduces 1/2 O₂ to H₂O.

Alternative oxidase: A cyanide-resistant oxidase that bypasses Complex III and IV, reducing 1/2 O₂ to H₂O.

Proton pumping: Protons (H⁺) are pumped from the matrix to the intermembrane space by Complexes I, III, and IV.

Labels: Внутренняя мембрана митохондрии (Inner mitochondrial membrane), Межмембранное пространство (Intermembrane space), Матрикс (Matrix), Наружные НАД(Ф)Н-дегидрогеназы (Outer NAD(F)H dehydrogenases), Ротенол-устойчивые НАД(Ф)Н-дегидрогеназы (Rotenone-resistant NAD(F)H dehydrogenases), Альтернативная цианид-устойчивая оксидаза (Alternative cyanide-resistant oxidase).

Каждый этап шунтирован. Имеются 4 NADPH-дегидрогеназы, которые не качают протоны при окислении NADH до убихинона; сброс электронов с убихинона на кислород шунтируется альтернативной оксидазой, которая тоже протоны не качает.

Во всех процессах (например, синтез пиримидинов) электроны сбрасываются на убухинон (см.Рис.24). С него далее электроны идут на цитохром с (при брожении сброс электронов идет сразу на цитохром). Цитохром с через Комплекс IV сбрасывает электроны на кислород.

На мембране все собрано в суперкомплексы – респирасому, в которые не входят *альтернативная оксидаза и сукцинатдегидрогеназа*.

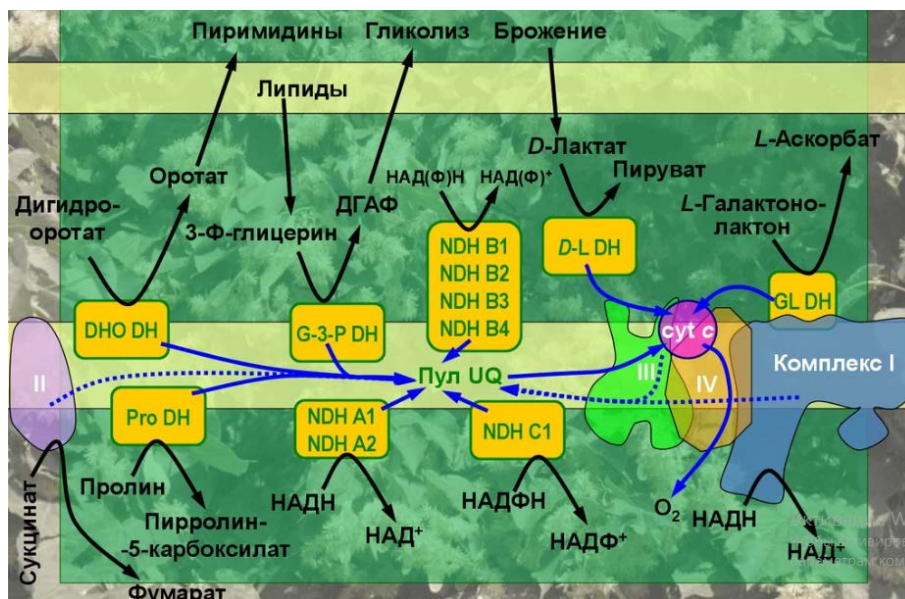


Рис.24. Интеграция метаболических путей.

Образование суперкомплексов.

В суперкомплекс можно собрать комплексы I и III, III и IV; I, III и IV – самый эффективный.

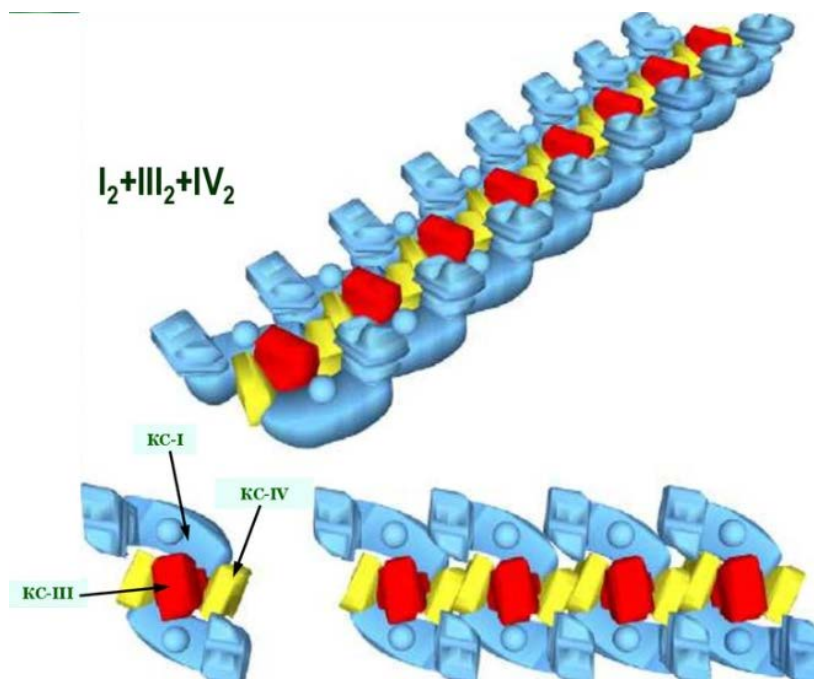


Рис.25. Моделирование суперкомплекса.

(голубые субъединицы – NADH-дегидрогеназы, красные – цитохром b_6 , желтые – цитохром-оксидазы).

Альтернативные пути дыхания растений.

Как и гликолиз, ПФП у растений идет не только в цитозоле, но и в пластидах (причем, в хлоропластах – в темноте).



Первый *окислительный* этап пентозофосфатного пути начинается с окисления глюкозо-6-фосфата до 6-фосфоглюконо-δ-лактона с образованием NADPH. Фосфоглюконо-δ-лактон — соединение нестабильное и быстро превращается либо спонтанно, либо с помощью 6-глюконолактонгидратазы в 6-фосфоглюконовую кислоту. Затем идет процесс окислительного декарбоксилирования 6-фосфоглюконовой кислоты, в ходе которого образуется рибулозо-5-фосфат, CO₂ и NADPH (см. Рис.26).

В ходе *неокислительного* этапа пентозофосфатного пути происходит регенерация фруктозо-6-фосфата из пентоз. Этот циклический процесс удобнее понять, если принять, что в регенерации участвует шесть пентоз. Регенерация начинается с того, что происходит эпимеризация или изомеризация рибулозо-5-фосфата, соответственно, в ксилулозо-5-фосфат или в рибозо-5-фосфат.

В результате превращений трех пентоз образуются две гексозы (два фруктозо-6-фосфата) и одна триоза — 3-ФГА. Если в цикл вступают еще три пентозы, то образуются еще два фруктозо-6-фосфата и один 3-ФГА. Образовавшийся 3-ФГА может изомеризоваться в фосфодиоксиацетон (ФДОА). В результате альдольной конденсации ФГА и ФДОА образуется пятая молекула фруктозо-6-фосфата.

Таким образом, 6 молекул глюкозо-6-фосфата, вступая в пентозофосфатный путь, образуют 6 молекул рибулозо-5-фосфата и 6 молекул CO₂, после чего из 6 молекул рибулозо-5-фосфата регенерируют 5 молекул глюкозо-6-фосфата. Однако это не означает, что молекула глюкозо-6-фосфата, вступающая в цикл, окисляется полностью. Все шесть молекул CO₂ образуются из первого углеродного атома каждой из шести молекул глюкозо-6-фосфата.

Функции пентозофосфатного шунта:

- поставка NADPH для восстановительных синтезов;
- поставка NADPH для дыхания;
- поставка субстратов для различных биосинтезов (цитозоль);
- поставка интермедиатов для цикла Кальвина (пластиды).

Кроме того, ПФШ является источником минимум еще двух важнейших метаболических путей: синтез ароматики – шикиматный путь (из эритрозо-4-фосфата) и формирование нуклеотидов (из рибозо-5-фосфата).

Лекция 4.

Фотосинтез.

Фотосинтез — процесс синтеза органических веществ из неорганических с использованием солнечной энергии.

Пигменты зеленого листа:

- хлорофилл а (см.Рис.27)
- хлорофилл b
- β -каротин (см.Рис.28)
- ксантофиллы (виолксантин, лютеин, зеаксантин, антероксантин, неоксантин)

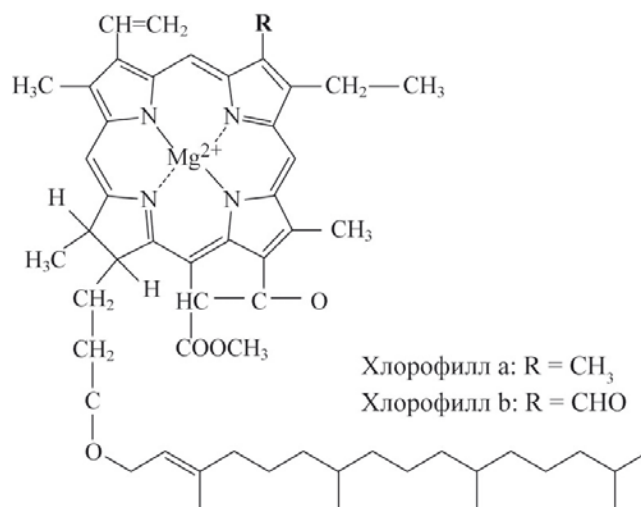


Рис.27. Структура хлорофиллов а и b.

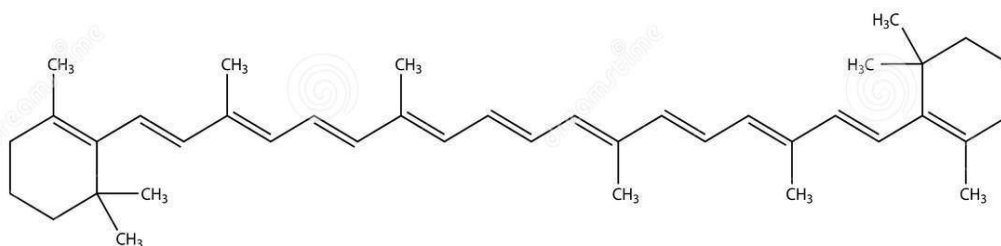


Рис.28. Структура β -каротина.

Хлорофилл.

Единственная молекула, которая может поглощать солнечный свет и трансформировать его в энергию электронов, а также обратимо окисляться благодаря системе сопряженных π -связей. Имеет высокий коэффициент молярной экстинкции ($4 \cdot 10^5$ л/моль*см).

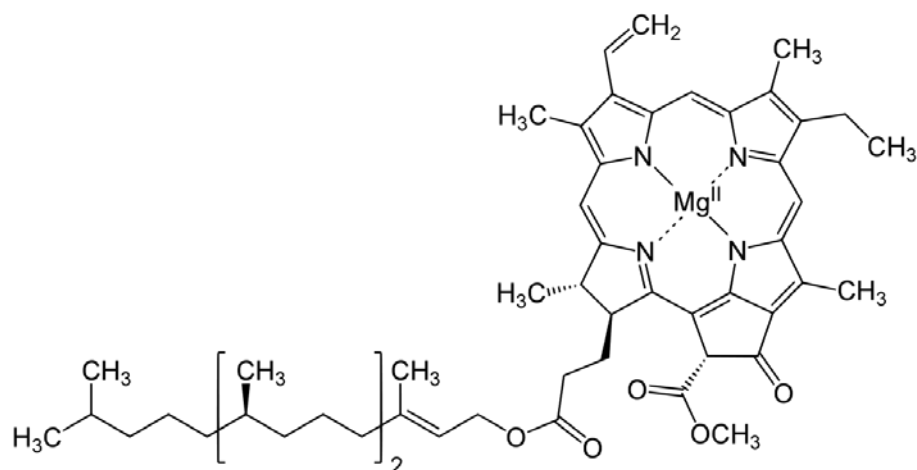


Рис.29. Строение хлорофилла *a*.

Многообразие хлорофиллов.

Хлорофиллы делятся на две основные группы – собственно хлорофиллы и бактериохлорофиллы. Первые встречаются у всех фотосинтезирующих эукариот, а бактериохлорофиллы, как уже видно из названия, у бактерий (пурпурных, зеленых и гелиобактерий). Общее строение – порфириновая (гидрофильная) головка и фитольный (гидрофобный) хвост (см.Рис.29).

Основные структурные особенности молекулы хлорофилла:

- конъюгированная система двойных связей: основная 18-членная π -система + дополнительные в I, II и V кольцах (возбуждается даже низкоэнергетическими электронами из оптического диапазона).
- Mg – минимум электроотрицательности; изменяет симметрию молекулы, «активирует» электроны пиррольных азотов; имеет координационные связи, перпендикулярные плоскости молекулы.
- V кольцо – «форбиновая структура»: две важных группы: карбонильная при C₉ участвует в $n \rightarrow \pi^*$ переходах и кетокэфирная при C₁₀.
- гидрофобный «хвост»; структурная роль – закрепление молекулы в липофильной области белков.

Биосинтез порфиринов.

Биосинтез порфиринов у растений происходит в пластидах. Начинается с глутаминовой кислоты (см. Рис.30). Если в протопорфирин вместо иона магния попадет железо, то молекула превратится в гем b. Хлорофилл b образуется путем окисления альдегидной группы из хлорофилла a.

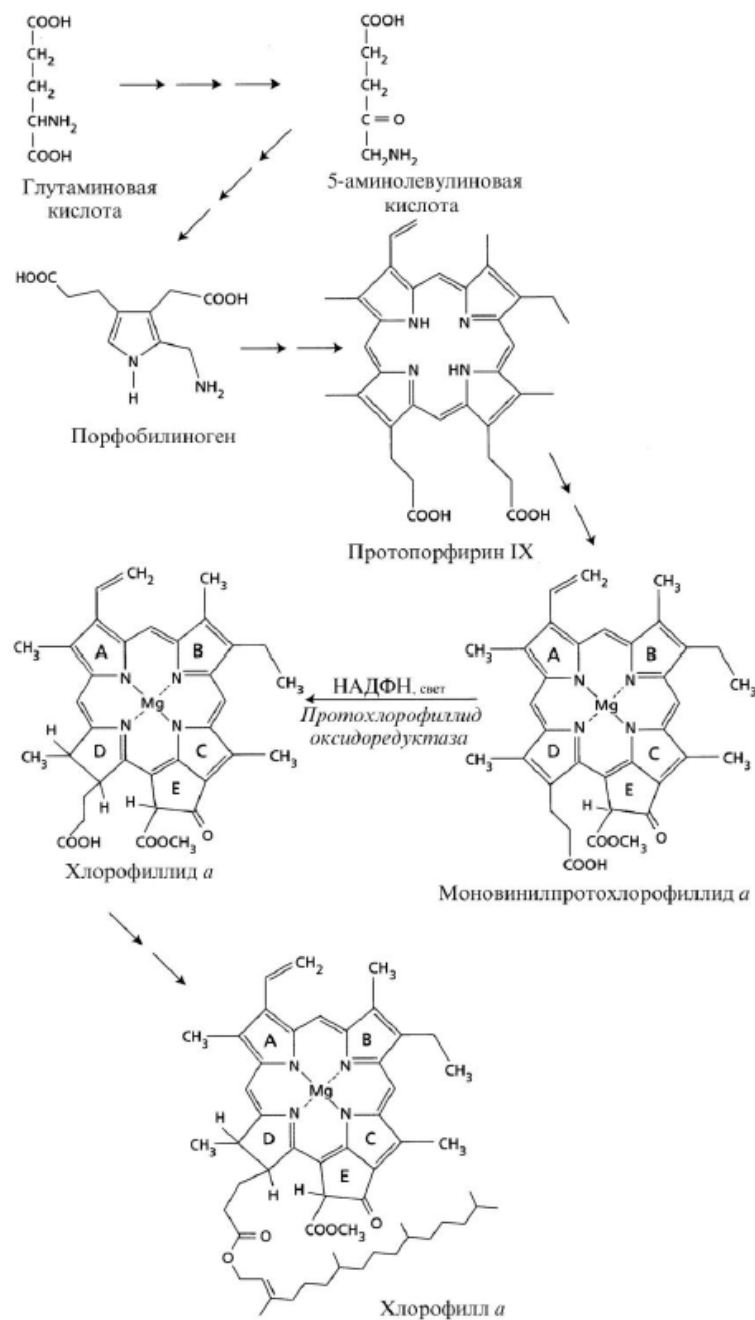


Рис.30. Биосинтез хлорофилла.

Спектры поглощения хлорофиллов а и b.

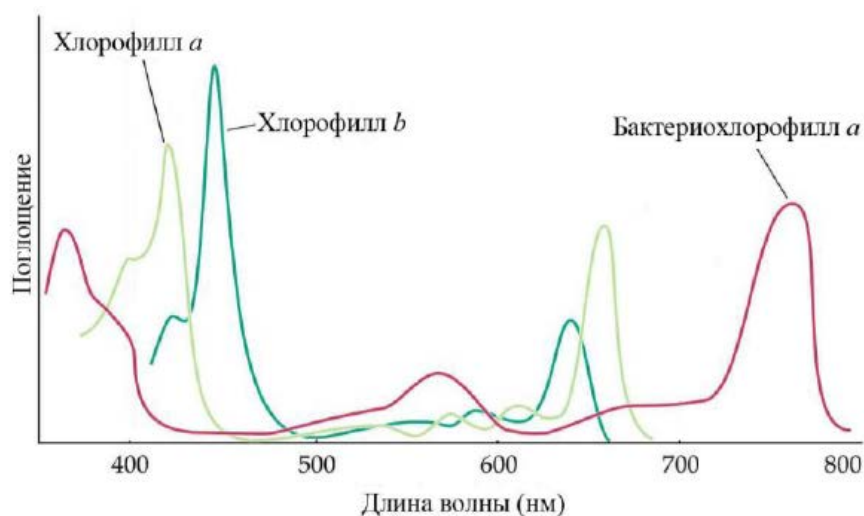


Рис.31. Спектры поглощения хлорофиллов.

Два основных максимума поглощения – в области синего (400-450нм) и красного (640-700нм) света. Каротиноиды поглощают свет в области 400-550нм, фикобилипротеины – 450-680нм.

Энергетические уровни хлорофилла.

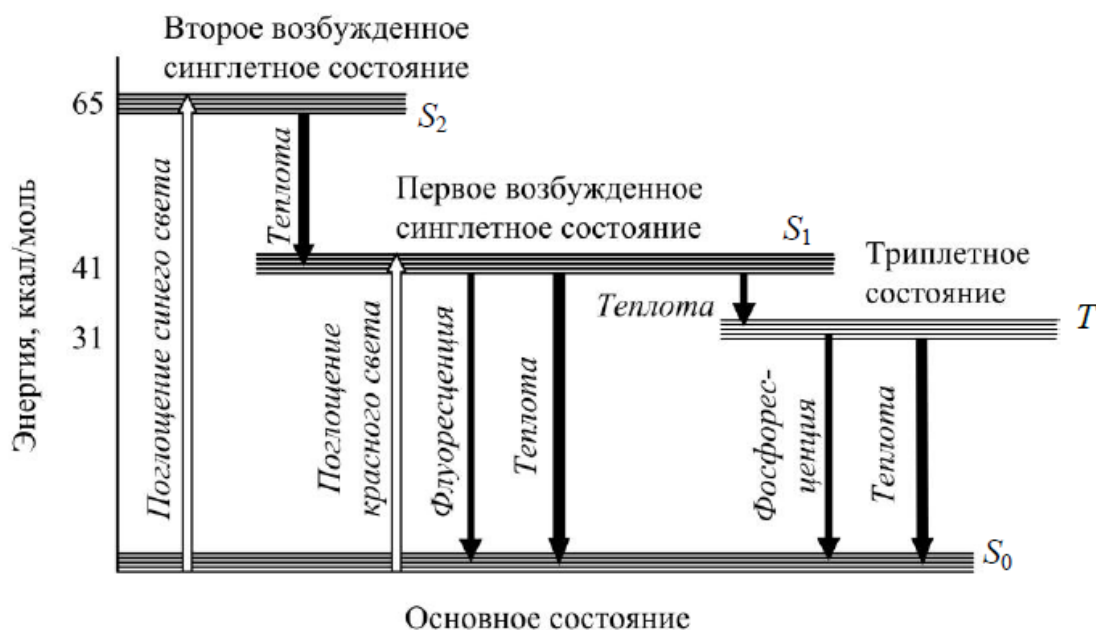


Рис.32. Энергетические состояния молекулы хлорофилла.

При поглощении кванта света электрон поднимается на более высокий уровень. Для перехода на S_1 достаточно кванта света из длинноволновой (красной) области, а для

перехода на S_2 – из синей (квант с большей энергией). На уровне S_2 электрон существует всего 10^{-12} с, после чего спускается на S_1 (10^{-9} с). Электроны с S_1 могут использоваться в фотохимических реакциях, либо возможен перенос энергии на соседнюю молекулу.

Первичные процессы фотосинтеза.

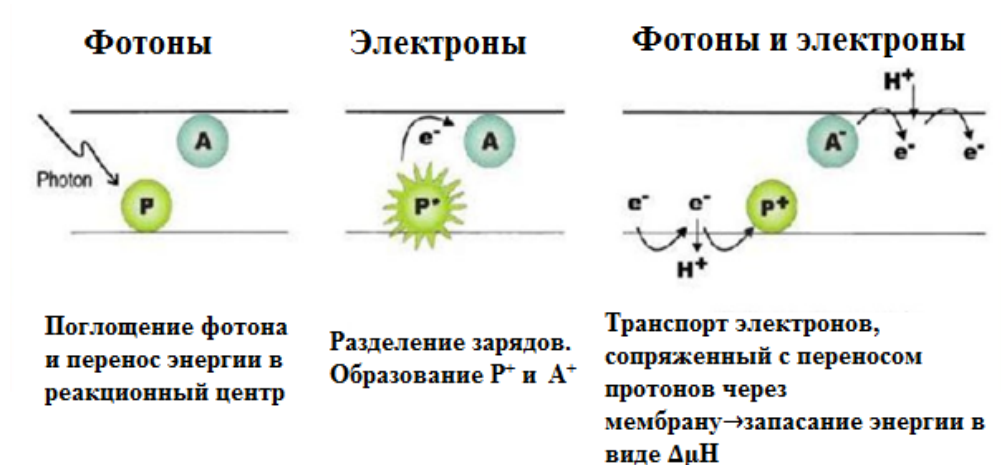


Рис.33. Фотофизика первичных процессов.

При оптимальном освещении разделение зарядов в РЦ происходит 100-200 раз в секунду. При попадании в РЦ молекула хлорофилла окисляется – отдает свой электрон молекуле-акцептору (см.Рис.33). Далее электрон идет по цепи переносчиков в составе ЭТЦ, при этом идет запасание энергии в виде протонного градиента.

Простейшие схемы фотосинтеза.

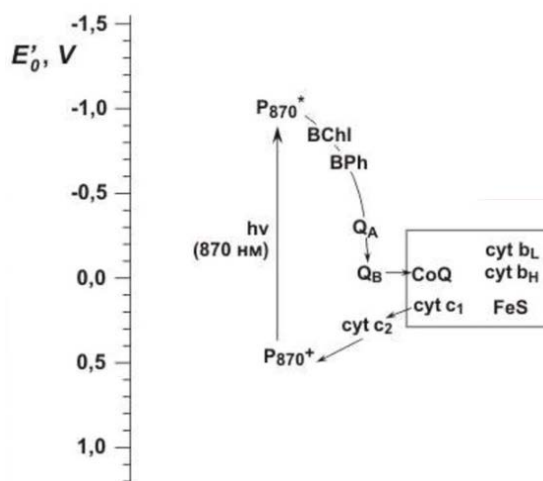


Рис.34. Фотосинтез у пурпурных бактерий.

Это предковая форма фотосинтеза, встречающаяся у пурпурных бактерий. Процесс начинается с реакционного центра типа II, в котором присутствует димер бактериохлорофилла а (см. Рис.34). Далее электрон идет на феофитин, затем хиноны Q_a и Q_b, подвижные хиноны и цитохромный комплекс bc₁, в котором работает Q-цикл. В итоге образуется протонный градиент, который запасается в виде АТФ, но никакого синтеза восстановленных соединений не происходит.

У зеленых серных бактерий появляется реакционный центр типа I (см. Рис.35).

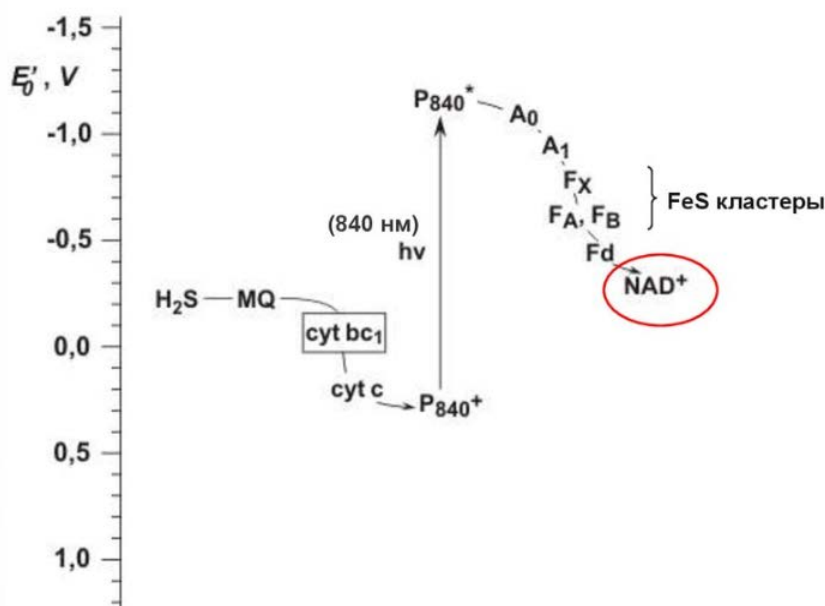


Рис.35.Схема фотосинтеза зеленых серных бактерий.

Бактериохлорофилл передает электрон на последовательные переносчики: A_0 – бактериохлорофилл а, A_1 – филлохинон, F_x - F_B – железосерные кластеры, подвижный переносчик ферредоксин – F_d и восстанавливается NAD . Восполняется электрон через окисление сульфидов. Таким образом, появляется восстановленное соединение – $NADH$, но появилась потребность в постоянном пополнении запаса сульфида.

Следовательно, необходим постоянный донор электронов.

Требования к донору электронов:

- его должно быть много;
- он должен обладать окислительно-восстановительным потенциалом меньшим, чем у хлорофилла, чтобы отдавать на него электроны;
- продукты окисления должны быть нетоксичны.

Сульфид хорош по всем параметрам, вода образует токсичный продукт – кислород, а H_2S –малое количество. Последний параметр оказался решающим, поэтому растения стали использовать воду в качестве донора электронов. Но энергии кванта света не хватает, чтобы окислить воду и восстановить $NADP$ одновременно.

2,5 млрд лет назад у протоцианобактерий появилась система, решающая проблемы воды как донора электронов. Объединились 2 реакционных центра – появились фотосистемы I и II (см. Рис.36). Связка между ними – цитохромный b_6f -комплекс (ЭТЦ), который образует протонный градиент, запасая некоторую часть энергии в виде АТФ.

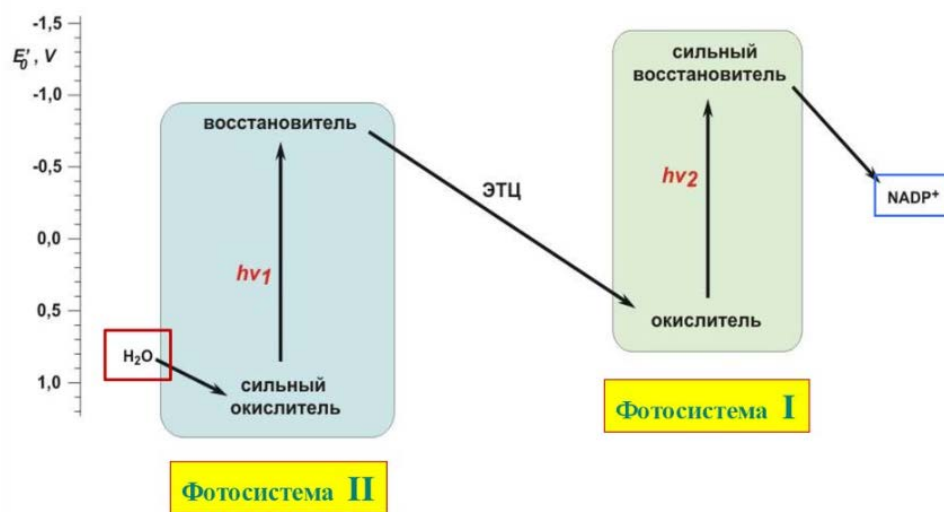


Рис.36. Упрощенная Z-схема фотосинтеза.

Таким образом, при окислении воды начал выделяться свободный кислород, который стал накапливаться в атмосфере – произошла «кислородная катастрофа». Какие-то организмы не смогли выжить в таких условиях, какие-то смогли обратить это себе на пользу – появилось дыхание, а некоторые стали занимать особую бескислородную нишу.

Z-схема фотосинтеза.

Последовательность расположения отдельных элементов электронтранспортной цепи (ЭТЦ) в тилакоидных мембранах хорошо иллюстрирует так называемая Z-схема фотосинтеза (см. Рис.37). На этой схеме представлена последовательность переноса электронов в ЭТЦ у фотосинтетических организмов. Вертикальными длинными стрелками показан процесс поглощения света в реакционном центре и переход молекул хлорофиллов P_{680} и P_{700} в возбужденное состояние (соответственно P_{680}^* и P_{700}^*). Сплошными стрелками отмечен нециклический перенос электронов по цепи. Стрелками с точками и пунктиром показан циклический путь электронов в фотосистеме I и реакция Мелера. При нециклическом транспорте электрона в фотосистемах I и II синтез АТФ сопряжен с образованием NADPH и выделением O₂. В случае циклического переноса электрона по замкнутому участку цепи в фотосистеме I в качестве единственного продукта образуется АТФ. Следует отметить также, что отдельные элементы электрон-транспортной цепи расположены в соответствии с величиной их окислительно-восстановительного (редокс) потенциала. При фотосинтезе

окислительно-восстановительные потенциалы реакций переноса электронов обычно лежат в диапазоне от +0,82 В ($\text{H}_2\text{O}/\text{O}_2$) до -0,42 В (ферредоксин).

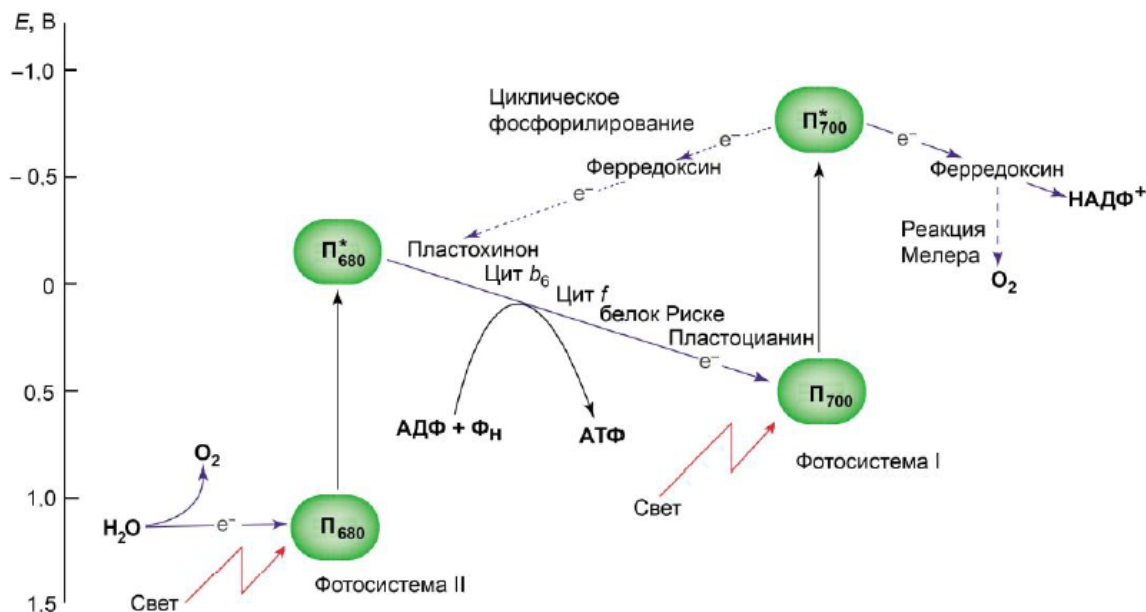


Рис.37. Z-схема переноса электронов в фотохимических реакциях.

Организация фотосинтетического аппарата.

В отличие от других типов пластид, хлоропласты, отличаются наличием сложно организованной системы внутренних мембран (см. Рис. 38). Это позволяет строго упорядочить компоненты реакционного центра, пространственно разделить восстановленные и окисленные продукты фотосинтеза и отделить фотофизические процессы, протекающие со скоростями 10^{-9} — 10^{-12} с, от более медленных химических процессов (10^{-4} — 10^{-2} с).

Оболочка хлоропласта состоит из двух мембран. Наружная мембрана хлоропласта проницаема для большинства органических молекул. Внутренняя мембрана оболочки хлоропласта сходна с плазмалеммой, обладает избирательной проницаемостью и контролирует передвижение белков, липидов, углеводов и органических кислот между хлоропластом и цитоплазмой.

Внутренняя система мембран хлоропластов включает тилакоиды гран и тилакоиды стромы. Они пронизывают весь хлоропласт и соединяют отдельные граны в единую мембранную систему пластиды (см.Рис.38). Во внутренних мембранах обоих типов тилакоидов локализованы фотосинтетические пигменты, компоненты электронтранспортной цепи и синтеза АТФ.

Хлоропласты большинства растений способны перемещаться в клетке в зависимости от интенсивности освещения и его направления. Сильный свет вызывает отрицательный фототаксис хлоропластов, обуславливая их перемещение к боковым стенкам клеток палисадной паренхимы. При ослаблении светового потока хлоропласты

распределяются по клетке равномерно. У светолюбивых растений пластиды значительно мельче, чем у теневыносливых. Функционально активные хлоропласты присутствуют также в стеблях и черешках листьев, осях и чешуях колоса и даже в освещаемых корнях некоторых растений.

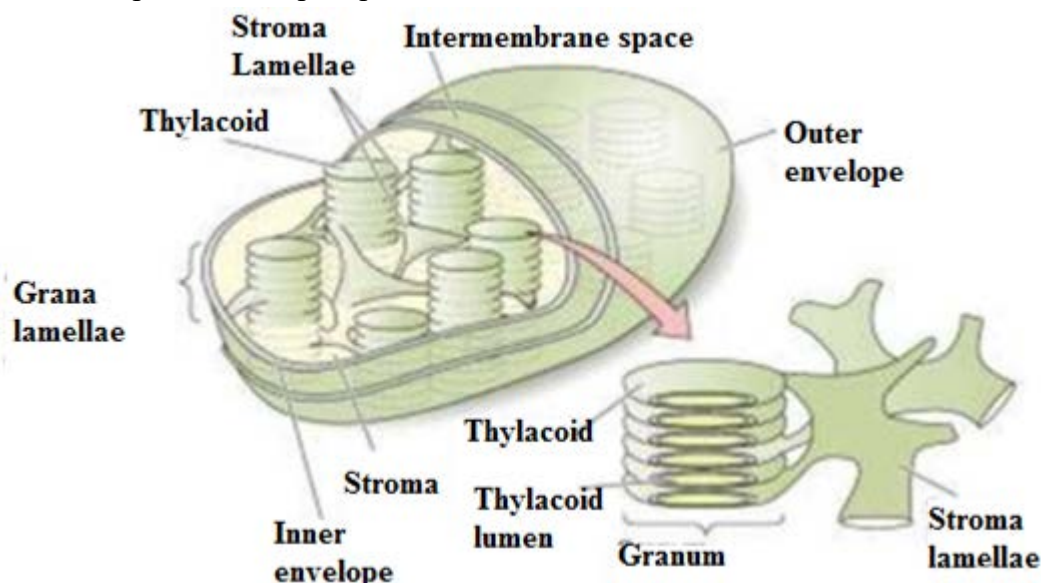


Рис.38. Организация фотосинтетического аппарата.

Тилакоиды образовались, по-видимому, за счет инвагинации внутренней мембраны с последующим «отшнуровыванием». Таким образом, люмен топологически эквивалентен межмембранному пространству.

Фотосистема II.

Реакционный центр фотосистемы II включает первичный донор электронов — димер хлорофилла а с максимумом поглощения 680 нм (P_{680}); два первичных акцептора электронов феофитина а (Phe); вторичные акцепторы — молекулы пластохинона (Q_A и Q_B) (см.Рис.39). Ядро реакционного центра фотосистемы II составляют два мембранных белка, известных как D_1 и D_2 . Оба этих белка служат основой для связывания большинства простетических групп реакционного центра, выполняющих функции переносчиков электронов. Другие белки формируют внутренний светособирающий комплекс (43 и 47 кДа), участвуют в выделении кислорода при фотоокислении воды (33, 23 и 16 кДа) или выполняют иные функции. В кислород-выделяющий центр входят Mn-содержащий кластер и, как кофакторы, — кальций и хлор. Посредником между кислород-выделяющим центром и хлорофиллом P_{680} является остаток аминокислоты тирозина (Y_Z) белка D_1 .

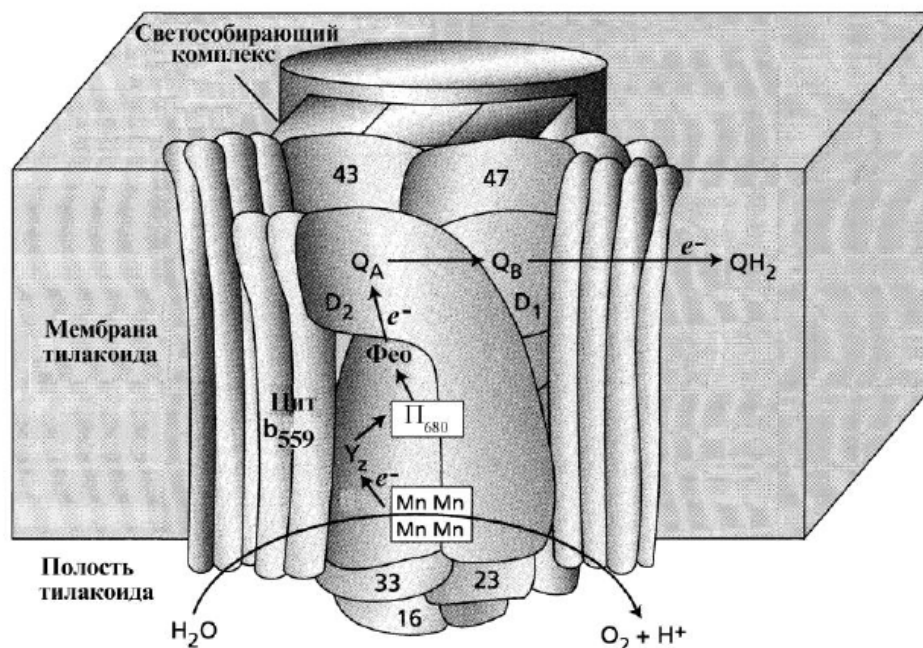


Рис.39. Схематическое строение фотосистемы II.

Кинетика работы водоокисляющего комплекса.

Комплекс цитохромов b_6/f состоит из цитохрома b_6 (цит b_6), цитохрома f (цит f), железосерного белка Риска (Fe_2S_2)_R и субъединицы IV (см.Рис.40).

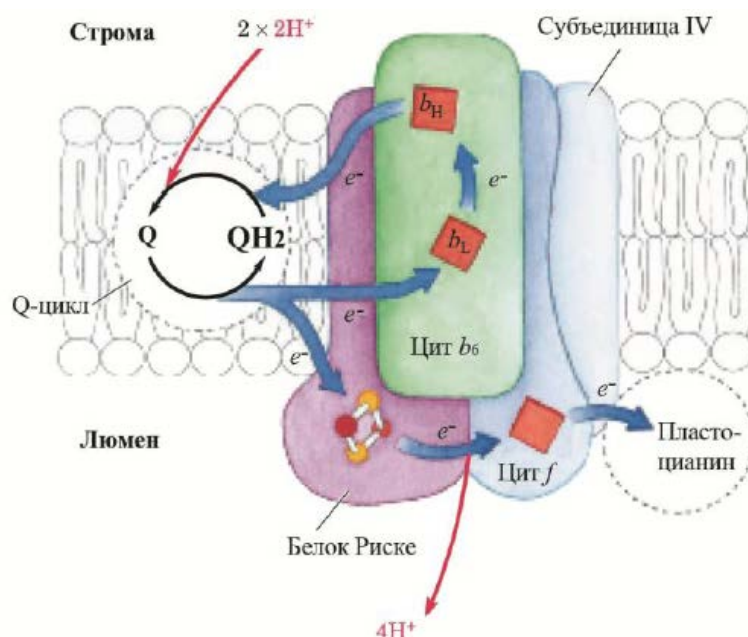


Рис.40. Транспорт электронов через комплекс цитохромов.

Цитохром b_6 и субъединица IV являются наиболее гидрофобными элементами комплекса. Основная часть молекулы цитохрома f расположена в полости тилакоида, в то время как ее С-концевой участок находится на его поверхности. Простетическая

группа цитохрома *f* представлена гемом с-типа. Простетическую группу цитохрома *b*₆ составляют два гема *b*-типа, ковалентно связанные с остатками гистидина. Эти два гема называют низкопотенциальным (L) и высокопотенциальным (H) (соответственно от англ. low и high potential). От комплекса цитохромов *b*₆ /*f* электроны передаются на пластоцианин (Пц) — водорастворимый белок, содержащий два атома меди, который восстанавливает окисленную форму хлорофилла P_{700} . Комплекс цитохромов *b*₆ /*f* функционирует в тилакоидной мембране в виде димера.

Фотосистема I.

Фотосистема I высших растений и водорослей представляет собой интегральный пигмент-белковый комплекс молекулярной массой около 340 кДа, состоящий из 13 пептидов. В структуре комплекса выделяют центральную часть из двух крупных белков (A и B) и два периферийных домена — со стороны стромы (белки C, D и E) и стороны люмена (белки F и N) (см.Рис. 41).

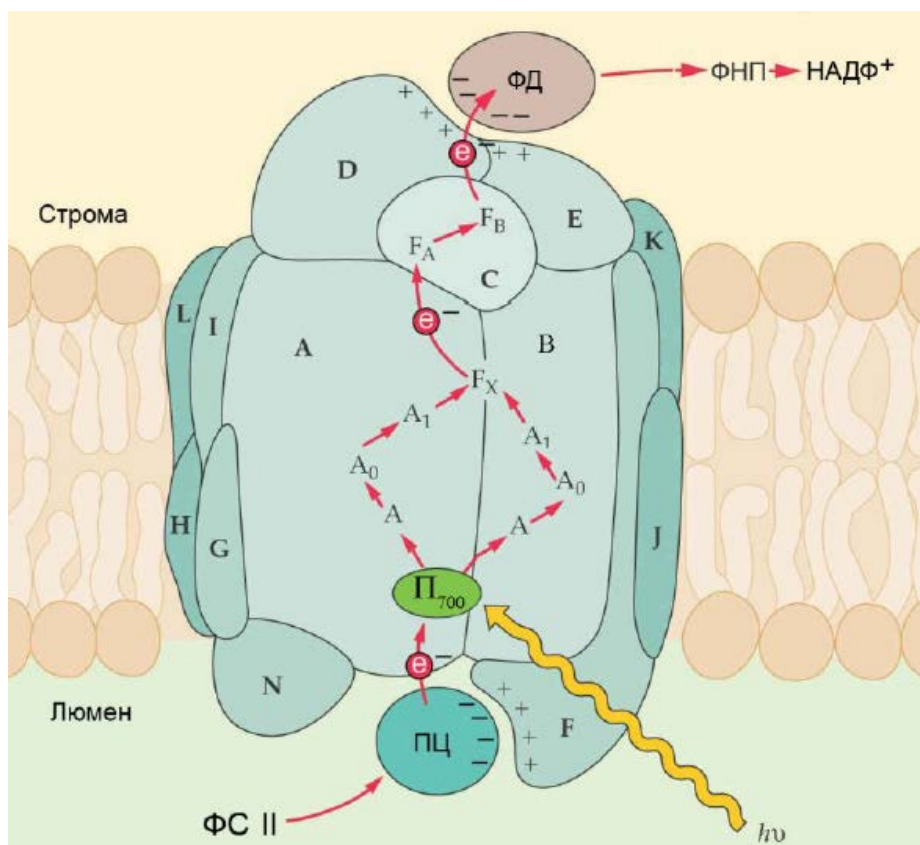


Рис.41. Схематическое строение фотосистемы I.

К комплексу белков фотосистемы I примыкают белки внешней антенны ССК I. Белки A, B и C включают первичный донор электронов — димер хлорофиллов а с максимумом поглощения 700 нм (P_{700}); по одному дополнительному хлорофиллу а (A); по одной молекуле первичного акцептора — мономера хлорофилла а (A_0); по одной

молекуле вторичного акцептора — витамина K1 , филлохинона (A1); терминальные акцепторы — белки, содержащие железосерные (Fe_4S_4) кластеры — F_X , F_A , F_B . От терминальных акцепторов электроны поступают на водорастворимый железосерный (Fe_2S_2) белок ферредоксин (ФД), а затем на растворимый флавопротеин — ферредоксин-НАДФ-редуктазу (ФНП). Двойной набор дополнительных хлорофиллов (A), первичных акцепторов (A0) и филлохинонов (A0) формируют две практически симметричные ветви транспорта электронов от P_{700} к F_X .

Лекция 5.

Электрон-транспортная цепь хлоропластов.

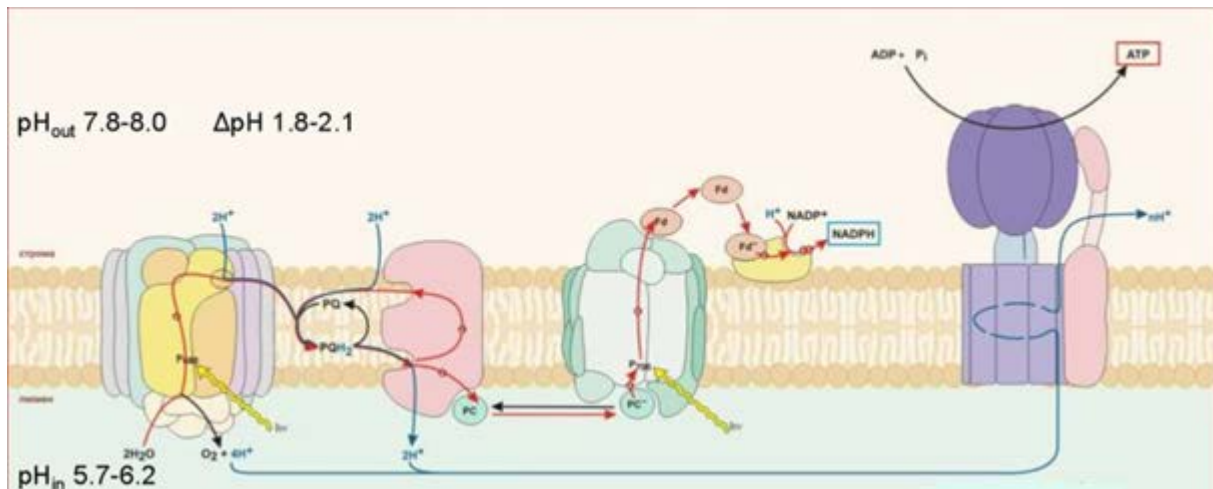


Рис.42. Устройство ЭТЦ хлоропластов.

На рисунке красным показан транспорт электрона, а синим – протона, эти процессы сопряжены. Электрон идет от воды до ферредоксина, а далее – на восстановление NADPH. Протоны переносятся из стромы в люмен (см.Рис.42). Протоны образовались вследствие окисления воды, а также окисления пластохинона в цитохромном комплексе. Итого, в темноте концентрация протонов в строме и люмене была примерно одинакова (рН 7), то на свету строма защелачивается (рН 7,8-8), а люмен закисляется (рН 5,7-6,2). Таким образом, создается протонный градиент, который АТФ-синтаза использует для синтеза АТФ.

Варианты электронного транспорта в ЭТЦ хлоропластов.

Варианты транспорта электронов:

- нециклический (основной путь);
- циклический у ФС I;
- циклический транспорт у ФС II;
- псевдоциклический (реакция Мелера);
- хлоропластное дыхание. (см.Ри.43).

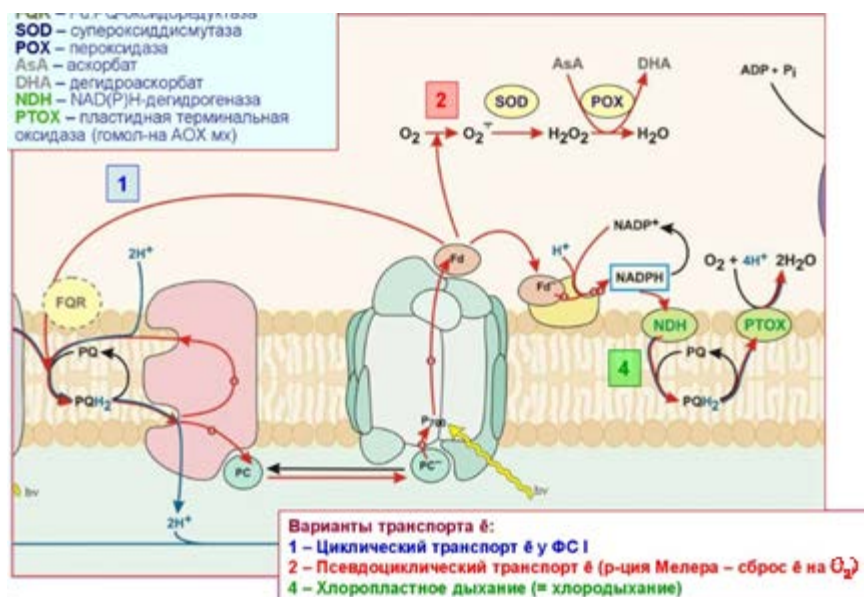


Рис.43. Варианты электронного транспорта в ЭТЦ хлоропластов.

Циклический транспорт электронов.

Циклический поток электронов в фотосистеме II связан с транспортом электронов от восстановленных пластохинонов (Q_A и Q_B) обратно в реакционный центр к окисленному пигменту P_{680} (см.Рис.44). В этом процессе участвуют цитохром b_{559} , β -каротин и сопровождающие молекулы хлорофиллов ($ChlZ$ или $ChlD$). Циклический поток электронов в фотосистеме II является защитным механизмом, который включается, когда электронтранспортная цепь тилакоидов не справляется с утилизацией световой энергии или при повреждении системы фотоллиза воды.

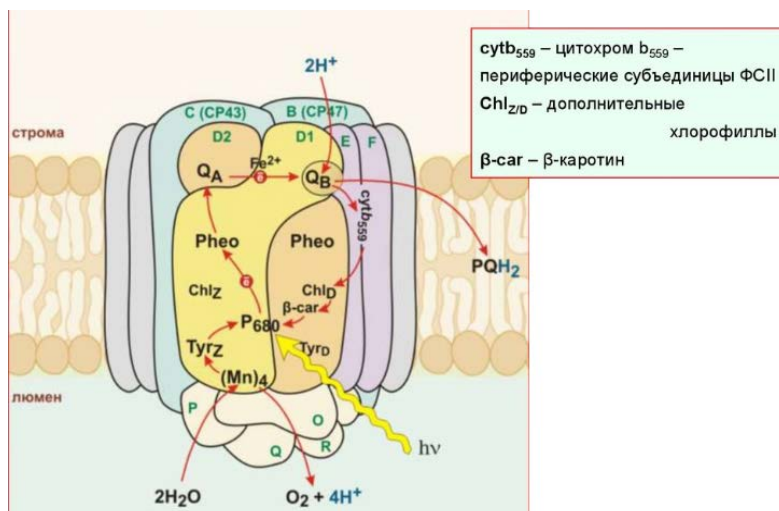


Рис.44а. Циклический транспорт электронов вокруг фотосистемы II.

В циклическом транспорте электронов фотосистемы I участвуют комплекс цитохромов b_6/f , пул пластохинонов и фермент ферредоксин-хиноноксидоредуктаза (см.Рис.44). В

этом случае электроны от восстановленного ферредоксина идут не на восстановление NADP, а переносятся на пластохиноны (с помощью ферредоксин-хиноноксидоредуктазы), далее на комплекс цитохромов b_6/f , а затем к окисленному P_{700} . Единственным результатом такого циклического пути транспорта электрона является создание протонного градиента на тилакоидной мембране, который используется на синтез АТФ. Циклический поток электронов обычно незначителен, однако его активность, например, в клетках обкладки C_4 -растений, может существенно возрасти. Циклический поток электронов может быть альтернативным путем использования энергии света при его избытке.

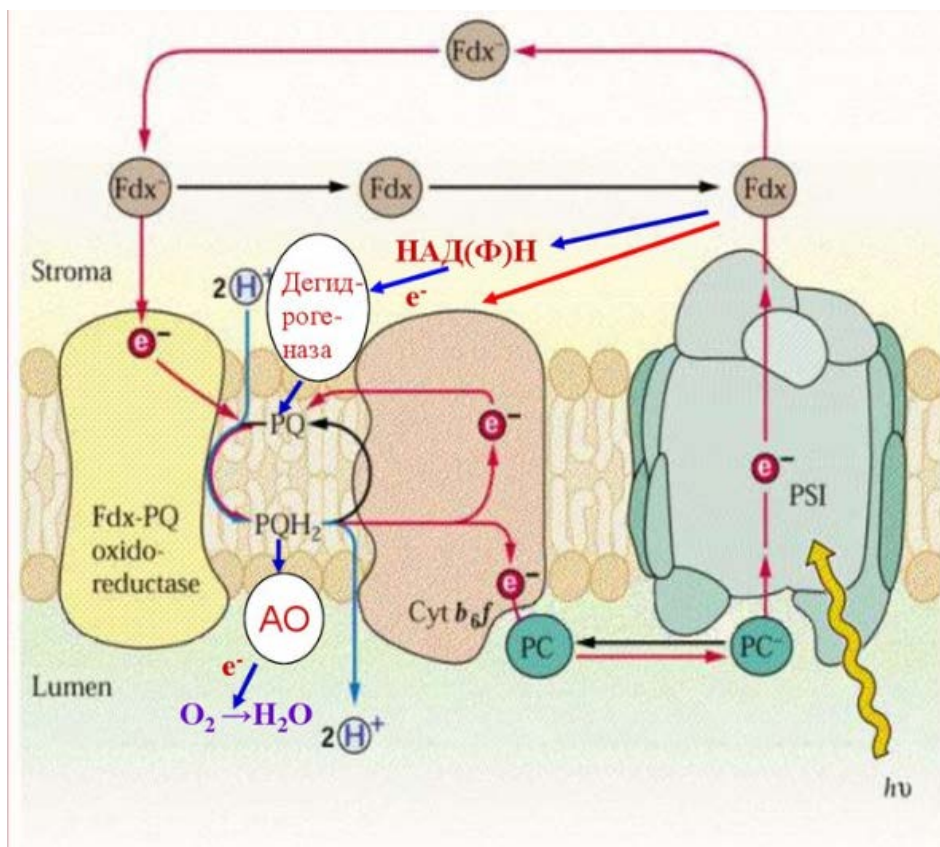
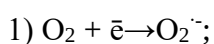


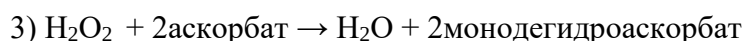
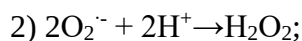
Рис.44б. Циклический транспорт электронов вокруг фотосистемы I.

Псевдоциклический транспорт электронов.

В реакции Мелера (Alan Mehler, 1951) высокий восстановительный потенциал, генерируемый на акцепторной стороне фотосистемы I, расходуется не на восстановление NADP, а используется для восстановления кислорода с образованием воды. Поэтому этот процесс называют также циклом "вода—вода" (см.Рис.44).

Перенос электронов на кислород может осуществляться как с ферредоксина, так и с железосерных кластеров белков F_A и F_B . Этот процесс идет в несколько этапов:





Вторую и третью реакции катализируют, соответственно, Cu-Zn-супероксид-дисмутаза и аскорбатпероксидаза. Поэтому этот процесс иногда называют (аскорбат) пероксидазный путь Мелера. Активные формы кислорода (O_2 , H_2O_2), образующиеся в пероксидажном пути Мелера, могут повреждать фотосинтетический аппарат, а также играть важную роль в процессах редокс-сигналикации. При наличии достаточного количества окисленного НАДФ практически весь поток электронов идет на его восстановление. При дефиците НАДФ происходит переключение потока электронов на кислород и запуск реакции Мелера.

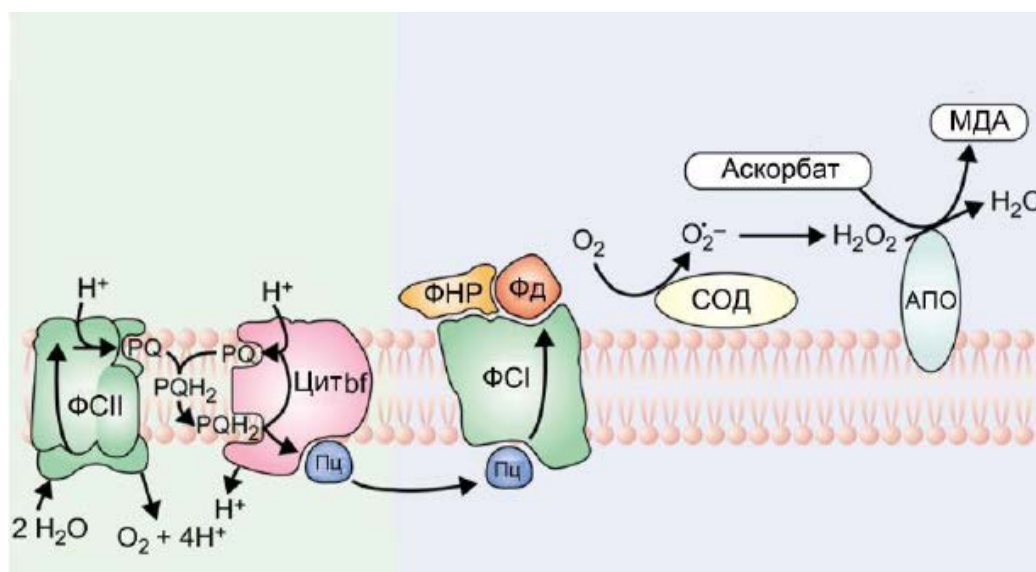


Рис.44. Реакция Мелера. (ФСII — фотосистема II; ФСI — фотосистема I; Q — пластохинон; QH₂ — пластохинол; Цит b₆/f — комплекс цитохромов b₆/f; Пц — пластоцианин; ФНР — ферредоксин-НАДФН редуктаза; Фд — ферредоксин; СОД — Cu-Zn-супероксиддисмутаза; МДА — монодегидроаскорбат; АПО — аскорбатпероксидаза).

Хлоропластное дыхание.

Начало пути аналогично циклическому транспорту, развилка начинается после NADPH (см.Рис.43, путь 4). NADPH не идет на биосинтетические пути (на цикл Кальвина), а может окислиться NADH/NADPH-дегидрогеназой, гомологичным первому комплексу дыхательной цепи митохондрий. Это минорный путь (1,5% от общего количества). NADPH-дегидрогеназа окисляет NADPH со стороны стромы и восстанавливает пластохиноны, которые потом могут окислиться на пластидной терминальной оксидазе. В итоге электрон пройдет от воды к воде, NADPH образуется временно, но протоны перекачаются, значит будет АТФ.

Антенны: пигмент-белковые комплексы фотосинтезирующих организмов.

Для повышения эффективности поглощения в клетке помимо хлорофиллов существуют дополнительные светособирающие комплексы (антенные комплексы). В основном присутствует хлорофилл b, лютеин и фикобилины (см.Рис.45).

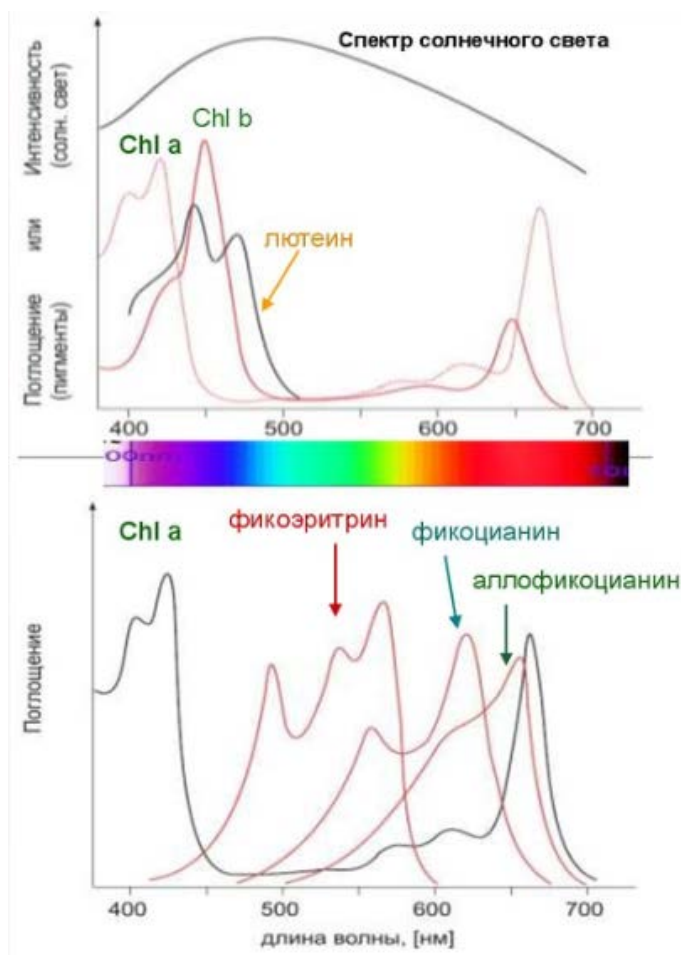


Рис.45. Спектры поглощения света антенных комплексов.

Размеры светособирающих комплексов у различных организмов могут широко варьировать. Один реакционный центр могут обслуживать десятки и сотни молекул пигментов, которые поглощают свет и передают энергию возбужденного состояния. У водорослей количество "обслуживающих" пигментов иногда достигает нескольких тысяч. Роль светособирающих комплексов у цианобактерий и красных водорослей выполняют фикобилисомы, в состав которых входят фикобилипротеины (см.Рис.46).

Во всех антенных комплексах эукариот хлорофиллы a и b, а также каротиноиды связаны с белками. Выделено 4 типа светособирающих комплексов (ССК) растений. Два из них локализованы в реакционных центрах (внутренние антенны фотосистем II и

Г) и связывают только молекулы хлорофилла α и β -каротина. Два других выполняют функции внешних светособирающих антенн и связывают хлорофиллы а и b, β -каротин и другие каротиноиды (лютеин, неоксантин, зеаксантин, антераксантин и виолаксантин).

	Внутренние антенны	Внешние антенны
Высшие растения	Chla + каротиноиды	Chla + Chlb + каротиноиды
Цианобактерии	Chla + каротиноиды	Chla + фикобилины

Рис.46. Состав антенн у разных групп организмов.

Фикобилисомы.

Фикобилисомы – светособирающие комплексы цианобактерий и красных водорослей. На поверхности тилакоидных мембран фикобилисомы образуют упорядоченные ансамбли, которые примыкают к элементам фотосистем. Фикобилисомы устроены таким образом, что до 90% энергии, поглощенной фикобилипротеинами, мигрирует на хлорофилл а и используется в фотохимических реакциях. На поверхности фикобилисомы расположены фикоэритрины, поглощающие свет в коротковолновой области (570 нм), затем следуют фикоцианины (максимум поглощения (630 нм), ближе к тилакоидной мембране расположены аллофикоцианины (650 нм) и аллофикоцианины В (670 нм). Известно, что вода хорошо поглощает красные лучи, которые, как правило, не проникают глубже 34 м. Желтая часть спектра задерживается на глубине 177 м, а зеленая — 322 м. Глубже 500 м уже не проникают даже синяя и фиолетовая части спектра. Поэтому у водной поверхности обитают преимущественно зеленые водоросли, глубже — цианобактерии, еще глубже — водоросли с красной окраской. У водорослей, имеющих различные формы фикобилипротеинов, это явление проявляется при изменении спектрального состава света: при выращивании на красном свете преобладает фикоцианин, а на зеленом — фикоэритрин (см.Рис.47).



Рис.47. Строение белков в фикобилисомах.

Каротиноиды: каротины и ксантофиллы.

Каротиноиды — это желтые, оранжевые или красные пигменты, найденные во всех фотосинтезирующих клетках растений. Они образуют 40-углеродную цепь, построенную из 8 остатков изопрена, которая у большинства из них замыкается в два иононовых кольца (см.Рис.48).

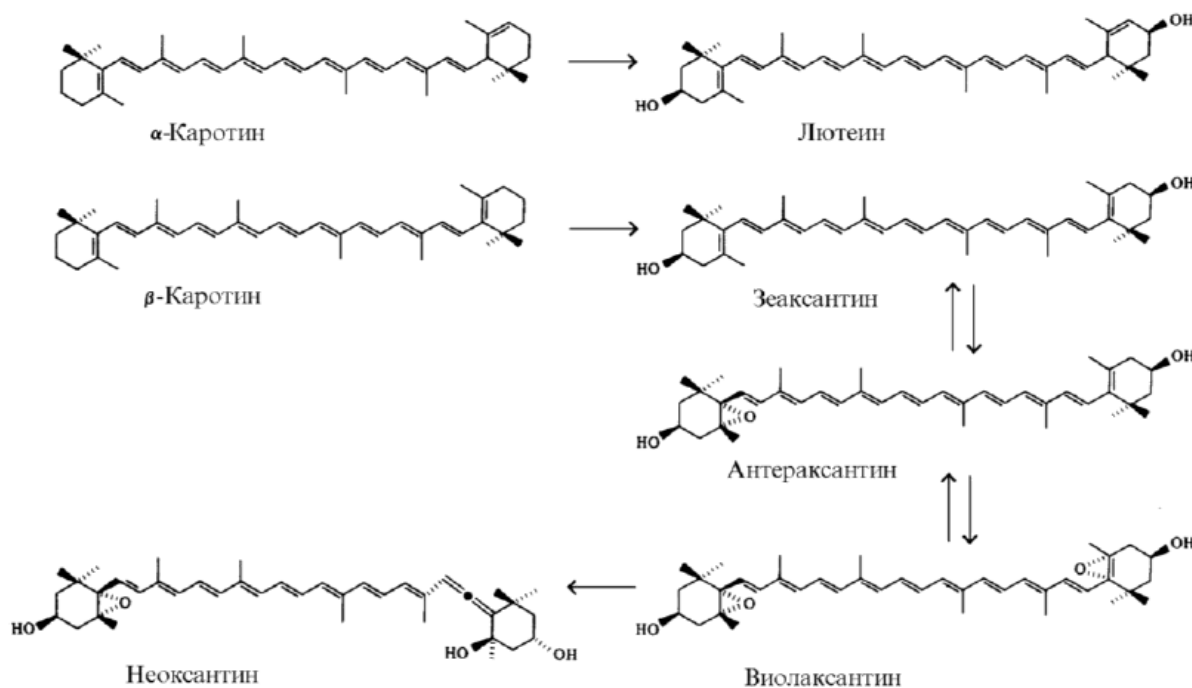


Рис.48. Структура каротиноидов.

Функции хромофора выполняет центральная часть молекулы, состоящая из 18 атомов углерода и формирующая систему сопряженных двойных связей. Спектр поглощения каротиноидов характеризуется наличием полос в области от 400 до 500 нм. Каротиноиды нековалентно связаны с белками и липидами внутри тилакоидной мембраны.

По содержанию кислорода каротиноиды делят на два класса: каротины ($C_{40}H_{56}$) — пигменты, не содержащие кислорода (α -, β - и γ -каротины), и ксантофиллы — пигменты, которые содержат кислород. Среди ксантофиллов выделяют гидроксильные производные $C_{40}H_{54}(OH)_2$ — лютеин и зеаксантин и эпоксидные производные, например виолаксантин и неоксантин ($C_{40}H_{56}O_4$), которые содержат и гидроксильные, и эпоксидные группы. Наиболее распространенными каротиноидами растений являются β -каротин и ксантофиллы: лютеин, виолаксантин и неоксантин. На ярком свете в хлоропластах накапливаются антероксантин и зеаксантин.

Антенная функция проявляется в светособирающих комплексах и обусловлена возможностью каротиноидов под действием света переходить в синглетное возбужденное состояние. Затем энергия возбуждения каротиноидов резонансным

путем передается на близлежащую молекулу хлорофилла. Обязательным условием для передачи энергии от возбужденных светом каротиноидов на хлорофилл является частичное перекрытие электронных облаков молекул пигментов. Это достигается близким расположением хлорофиллов и каротиноидов в светособирающем комплексе. Эффективность переноса энергии от возбужденных каротиноидов к хлорофиллу достигает 85%. Антенная функция каротиноидов особенно важна для водных экосистем, куда хорошо проникают кванты синего и зеленого света, но наблюдается дефицит квантов красного света, необходимых для возбуждения хлорофилла.

Светособирающие комплексы фотосистемы I и II.

Выделено 4 типа светособирающих комплексов (ССК) растений. Два из них локализованы в реакционных центрах (внутренние антенны фотосистем II и I) и связывают только молекулы хлорофилла а и β-каротина. Два других выполняют функции внешних светособирающих антенн и связывают хлорофиллы а и b, β-каротин и другие каротиноиды (лютеин, неоксантин, зеаксантин, антераксантин и виолаксантин).

Внутренняя антенна фотосистемы II организована на пигмент-содержащих белках CP43 и CP47, которые связывают около 30 молекул хлорофилла а и 2—3 молекулы β-каротина (см. Рис.49)

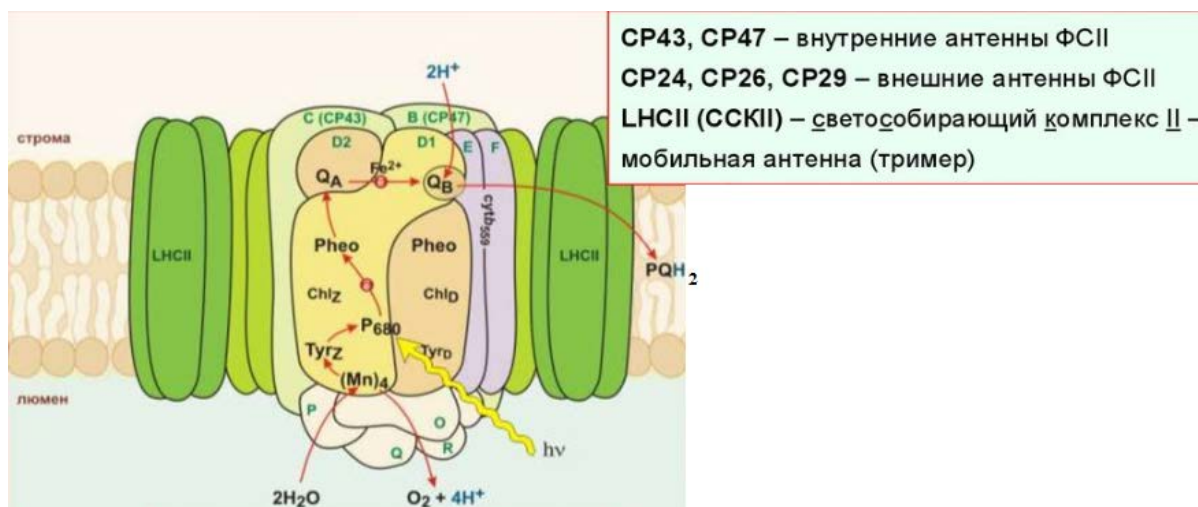


Рис.49. Схематическое изображение светособирающего комплекса ФС II.

В состав внешней светособирающей антенны фотосистемы II входят шесть типов полипептидов (Lhca1—Lhca6). Три из них (Lhca1, Lhca2 и Lhca3) образуют тример и формируют мобильную антенну — светособирающий комплекс II (ССК II). Каждый мономер ССК II содержит 14 молекул хлорофиллов и 4 молекулы каротиноидов (две молекулы лютеина, одну молекулу неоксантина и одну молекулу виолаксантина). Мобильная антенна ССК II способна "обслуживать" не только реакционные центры фотосистемы II, но и фотосистемы I. Остальные пептиды антенного комплекса,

называемые "минорными", занимают промежуточное положение между ядром фотосистем и ССК II.

В состав внутренней антенны фотосистемы I входят около 90 молекул хлорофилла а и 22 молекулы β -каротина. Светособирающий комплекс фотосистемы I (ССК I), образующий внешнюю антенну, содержит четыре типа пигмент-связывающих белков — Lhca1, Lhca2, Lhca3 и Lhca4 и включает 80—120 молекул хлорофиллов а и b и каротиноиды (см. Рис.50). Белки ССК I (в отличие от ССК II) менее подвижны и прочно связаны с ядром фотосистемы I.

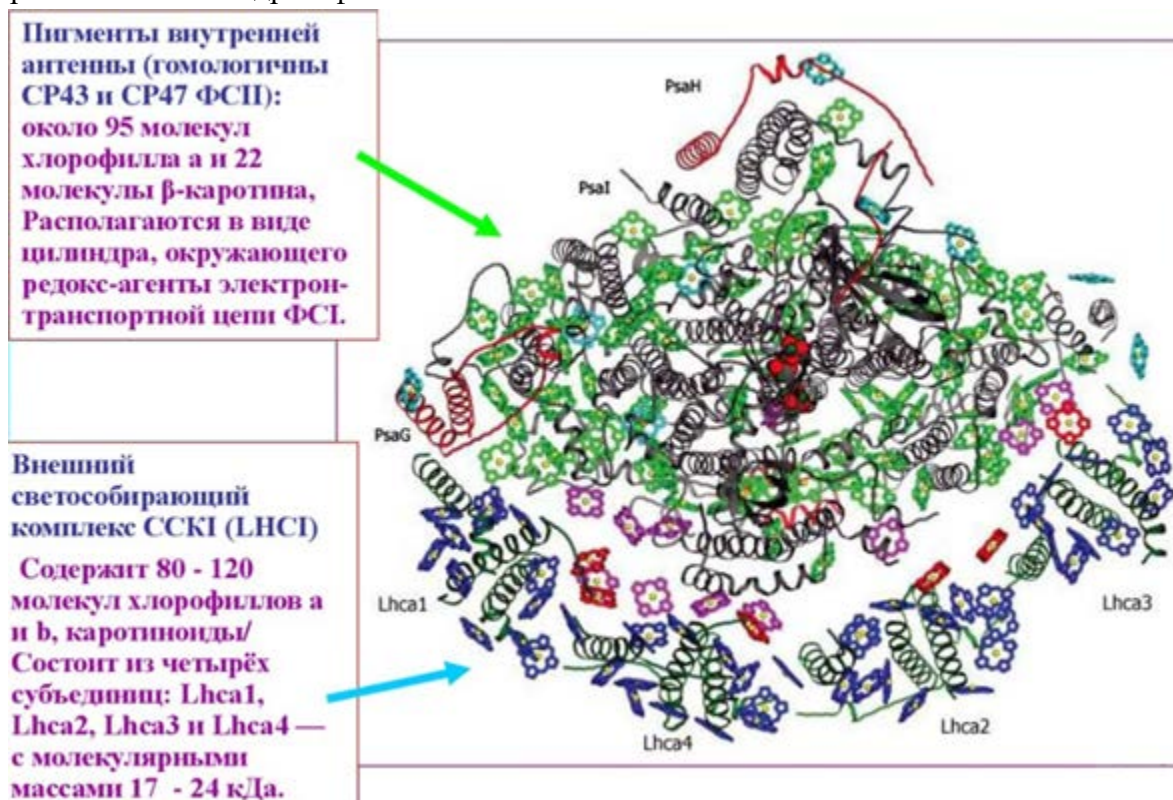


Рис.50. Фотосистема I и ее светособирающие комплексы.

Функции каротиноидов.

1. Антенны (400-500 нм);
2. Структурная (организации ССК);
3. Фотопротекторная (виолаксантиновый цикл);
4. Защита от УФ и высоких интенсивностей света; (на сильном свете виолаксантин превращается вначале в антераксантин, а затем в зеаксантин. Процесс происходит на внутренней стороне тилакоидной мембраны и катализируется виолаксантин-деэпоксидазой, активность которой при высокой освещенности возрастает за счет снижения pH в полости (люмене) тилакоида до 5,2. Именно зеаксантин способен рассеивать излишек световой энергии в форме тепла).
5. Антиоксидантная функция – обезвреживание АФК.

Лекция 6.

Механизмы регулирования и защиты фотосистемы от фотодеструкции.

Механизмы регулирования и защиты фотосистемы II от фотодеструкции:

- нециклический поток, регулирование мобильными антеннами;
- циклические потоки вокруг каждой фотосистемы;
- псевдоциклический транспорт электронов;
- хлоропластное дыхание;
- виолоксантиновый цикл;
- каротиноиды: «тушение» триплетного состояния хлорофилла, обезвреживание АФК;
- замена D1-белка

Изменение состояний – перемещение ССКП

Состояние 1 при низкой освещенности: ССКП у ФСII (см. Рис. 51).

Перевосстановление пула пластохинонов → активация redox-чувствительной тилакоидной протеинкиназы → фосфорилирование ССКП.

При повышении освещенности состояние 1 переходит в состояние 2 (см. Рис. 51).

Окисление пула пластохинонов → деактивация тилакоидной протеинкиназы → дефосфорилирование ССКП → ССКП отходит от ФСII → ССКП пристыковывается к ФСII → грани снова слипаются

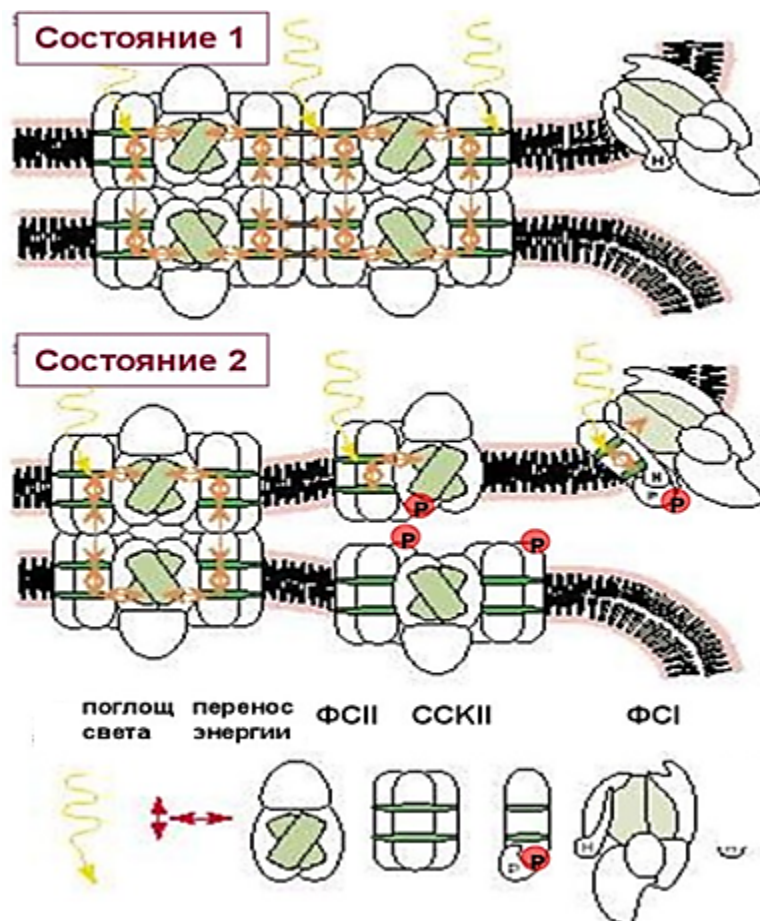
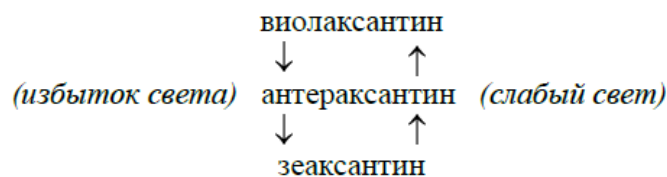


Рис. 51. Изменение состояний – перемещение ССКII.

Виолоксантиновый цикл.

На слишком ярком свете происходит переключение функций каротиноидов с аккумуляции энергии света на ее рассеивание



Обратное превращение зеаксантина в виолаксантин происходит на слабом свете или темноте с помощью фермента зеаксантин-эпоксидазы. Реакция эпоксидации осуществляется на внешней стороне мембраны тилакоида при pH 7,5 и требует присутствия NADPH и кислорода. Один из атомов кислорода включается в зеаксантин, а второй идет на образование H₂O. Взаимодействие со второй молекулой кислорода приводит к образованию виолаксантина. Таким образом, в виолоксантиновом цикле, в зависимости от интенсивности освещения, образуется или виолаксантин или зеаксантин, которые, соответственно, аккумулируют или рассеивают энергию света.

Фотозащита. «Переключение» виолоксантиновой системы.

При низкой освещенности виолоксантин поглощает свет и отдает энергию на хлорофилл (см. Рис.52). Когда света много, активируется эпоксидаза, отщепляет только один кислород, образуется антраксантин. Существуют специальные липиды в мембране - моногалактозил-диглицериды, которые обеспечивают тонкое регулирование процессов переключения функций виолоксантина: если их не более 5% - цикл не работает, если концентрация повышается до 30% - эффективность реакции эпоксидации возрастает до 100%.

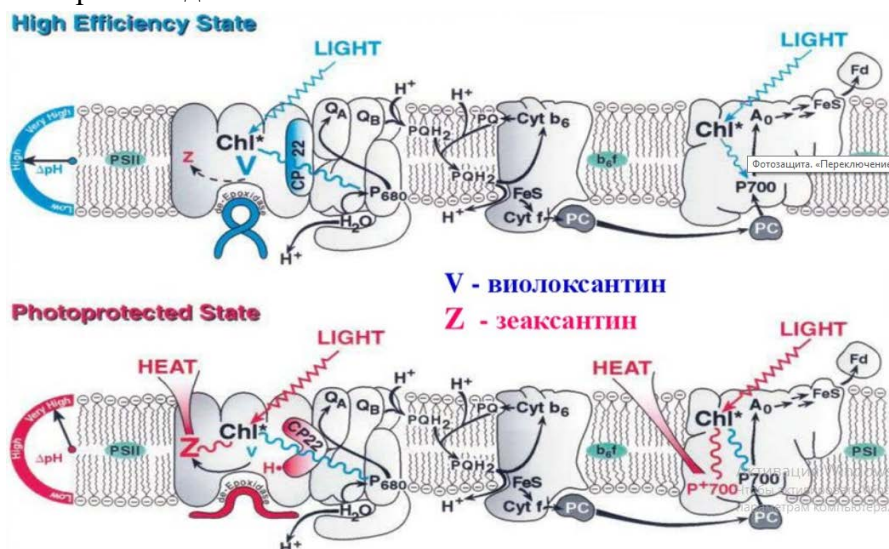


Рис.52.Переключение виолоксантиновой системы.

Если все вышеперечисленные системы защиты от фотодеструкции не работают, то разрушается D1-белок. Его время полужизни на ярком свете – около 30 минут. Он составляет 0,1% от всех белков хлоропласта, причем интенсивность его синтеза очень большая (50% от синтеза всех белков).

Цикл Кальвина.

Один из важнейших процессов, происходящих в растениях. Именно с помощью цикла Кальвина можно из углекислого газа получить восстановленные органические соединения (см.Рис.53).

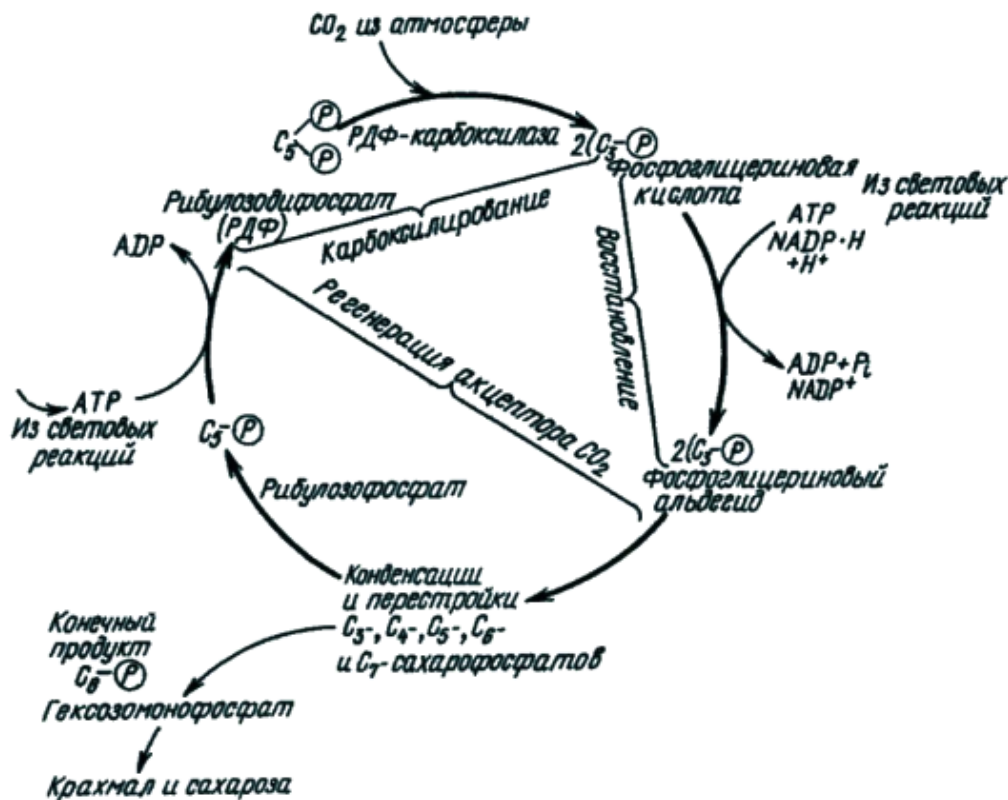


Рис.53. Схема цикла Кальвина.

Первичным акцептором углекислоты является 5-углеродный сахар — рибулозобисфосфат (РубФ). Процессы, осуществляющие фиксацию CO_2 и синтез углеводов в цикле Кальвина, условно делят на четыре стадии.

Стадия карбоксилирования.

На этой стадии происходит присоединение CO_2 к диенольной форме рибулозобисфосфата (РубФ) и образование двух молекул фосfogлицериновой кислоты. Эта реакция катализируется ферментом рибулозобисфосфат-карбоксилазой (РубФ-карбоксилазой). Помимо карбоксилазной активности этот фермент может проявлять также активность оксигеназы. Поэтому его полное название — рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа, сокращенно называемая РУБИСКО (RuBisCO).

Стадия восстановления ФГК.

На этой стадии 3-фосfogлицериновая кислота восстанавливается до 3-фосfogлицеринового альдегида. Процесс идет в два этапа. Вначале под действием фермента фосfogлицераткиназы от молекулы АТФ на 3-ФГК переносится еще одна фосфатная группа и образуется 1,3-дифосfogлицериновая кислота (1,3-ФГК). На втором этапе происходит восстановление 1,3-ФГК в 3-фосfogлицериновый альдегид (3-ФГА) за счет NADPH. Этот процесс катализируется ферментом триозофосфатдегидрогеназой. Восстановление 1,3-ФГК до 3-ФГА — единственный

восстановительный процесс цикла Кальвина, в котором используется НАДФН, образуемый в фотохимических реакциях фотосинтеза. Последующие процессы цикла Кальвина необходимы для того, чтобы регенерировать (синтезировать) первичный акцептор CO_2 — рибулозо-1,5-бисфосфат для того, чтобы он вновь участвовал в фиксации CO_2 .

Стадия регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата (РуБФ).

Основной итог этой стадии состоит в том, что пять молекул триозофосфата ФГА (что соответствует 15 атомам углерода) подвергаются перегруппировке, в результате которой образуются три молекулы 5-углеродного сахара — 1,5-рибулозобисфосфата. Этот процесс происходит в результате альдолазных и транскетолазных реакций с участием фосфатов трех-, четырех-, пяти-, шести- и семиуглеродных сахаров. В результате процессов альдольной конденсации, катализируемых соответствующими альдолазами, и транскетолазных реакций из 5 молекул 3-углеродных сахаров образуются 3 молекулы 5-углеродных сахаров, которые превращаются в РуБФ.

Стадия синтеза углеводных продуктов фотосинтеза.

Вовлечение шести молекул CO_2 в цикл Кальвина приводит к образованию шести молекул ФГА, из которых пять молекул используются для регенерации РуБФ, а одна покидает цикл и используется на синтез углеводных продуктов фотосинтеза. На этом этапе из фосфоглицеринового альдегида и фосфодиоксиацетона под действием альдолазы синтезируется фруктозо-1,6-дифосфат, который затем может превращаться в сахарозу или крахмал.

Рибулозо-бисфосфат-карбоксилаза-оксигеназа (Rubisco).

Главный фермент на планете Земля. Молекулярная масса около 560 кДа. Появилась, когда концентрация углекислого газа в атмосфере составляла около 2%. В современной атмосфере концентрация CO_2 упала до 0,03%, что заставило Rubisco менять свою чувствительность: модифицировался активный центр фермента таким образом, чтобы присоединить лизин и ион магния (активация фермента) (см. Рис.54).

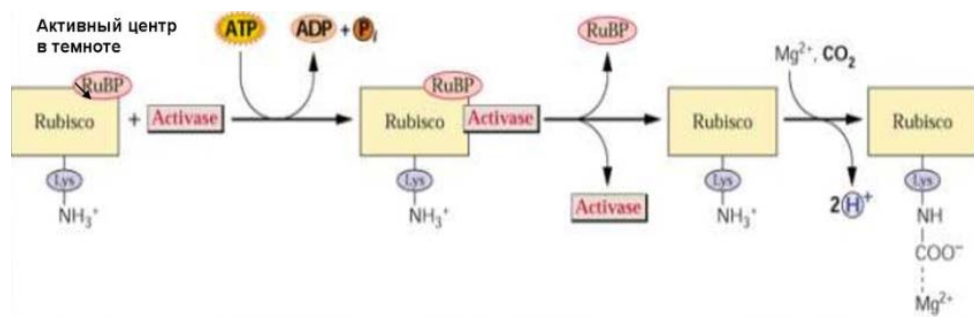


Рис.54. Активация Rubisco.

Данный фермент выполняет две взаимоисключающие функции – оксигеназную и карбоксилазную (см. Рис.55).

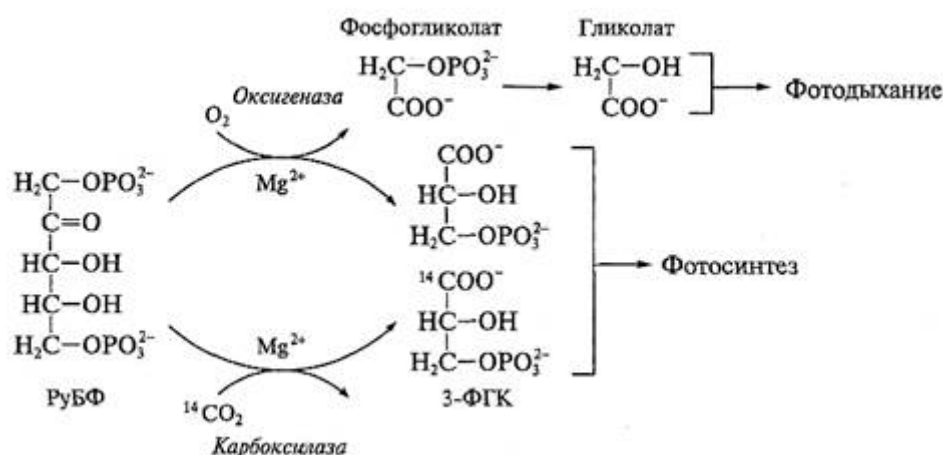


Рис.55. Схема работы Rubisco.

Чем выше температура, тем карбоксилазная функция меньше (для растений тропиков). Растения живут «впроголодь» (концентрация CO_2 всего 0,03%). Можно было бы использовать угольную кислоту, но она хуже проходит через мембрану, чем чистый углекислый газ. В цитозоле концентрация угольной кислоты в несколько раз выше, чем CO_2 . При помощи карбоангидразы HCO_3^- переводится в CO_2 при кислом pH (5,0) – в тилакоиде. Таким образом, на мембране «сидит» Rubisco осуществляет карбоксилазную функцию.

Конечные продукты фиксации CO_2 .

В хлоропластах при выходе из цикла Кальвина из фруктозо-1,6-бисфосфата могут образоваться фруктозо-6-фосфат, глюкозо-6-фосфат и глюкозо-1-фосфат. Все эти соединения, в свою очередь, образуют пул гексоз, о котором говорилось ранее.

В пластидах глюкозо-1-фосфат является субстратом при образовании ADP-глюкозы ферментом ADP-глюкозо-пирофосфорилазой. Именно ADP-глюкоза является субстратом для крахмала (расходуется ночью, а днем накапливается – транзитный крахмал – см. Рис.56).

В цитозоле из пула гексоз образуется уже UDP-глюкоза, которая является субстратом для синтеза сахарозы (через сахарозо-6-фосфат).

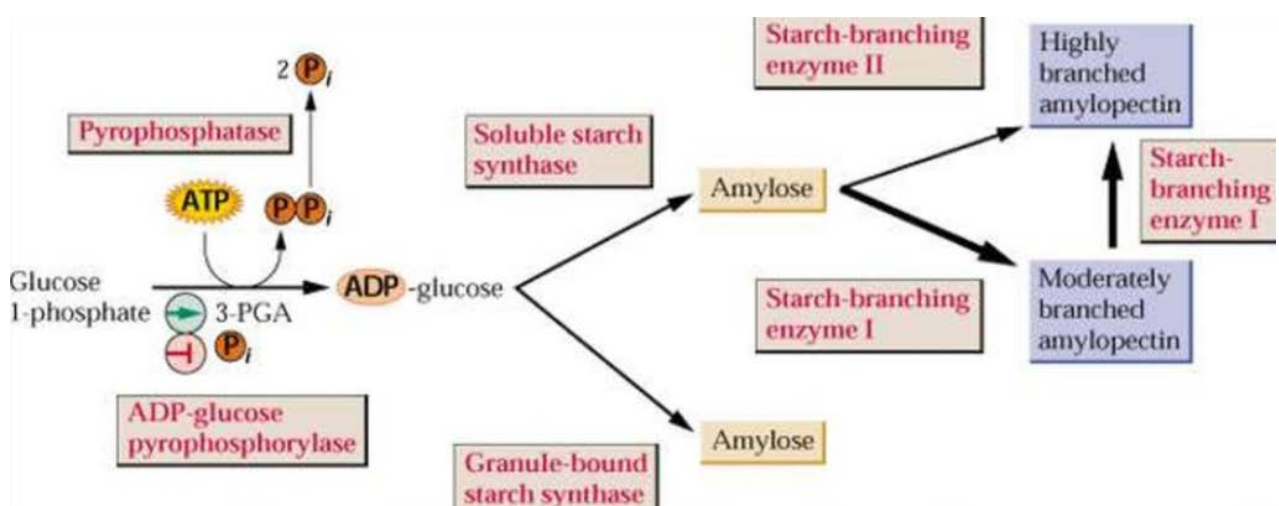


Рис.56. Образование транзитного крахмала.

Лекция 7.

Фотодыхание.

У растений обнаружена вот такая странная ассоциация органоидов (см.Рис.57):

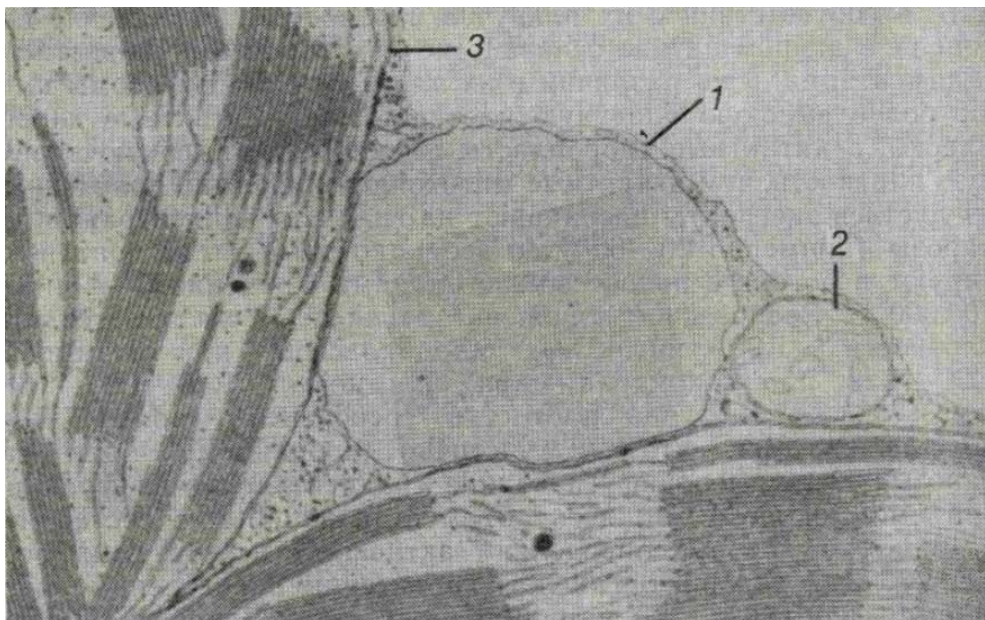


Рис.57. Клетка мезофилла молодого листа табака. (1-пероксисома, 2-митохондрия, 3-хлоропласт).

Они очень тесно контактируют между собой: в корпоративной работе этих органелл происходит фотодыхание (поглощается кислород, выделяется углекислый газ, энергии это не дает).

Общая схема дыхания представлена на рисунке 58. Если Rubisco выполняет свою оксигеназную функцию, то образуется 1 ФГК, которая идет в цикл Кальвина, и 1 гликолат. Этот гликолат далее транспортируется в пероксисому и окисляется до глиоксилата. При этом поглощается кислород, начинается переаминирование глиоксилата и образуется аминокислота глицин. Эта аминокислота транспортируется в митохондрию, там из двух молекул глицина образуется серин и выделяется CO_2 . Образовавшийся серин возвращается в пероксисому, там переаминированием из него образуется глицерин, который потом возвращается в хлоропласт, и из него образуется фосфоглицериновая кислота. По сути фотодыхание не имеет отношения к нормальному дыханию и нужно для того, чтобы из гликолата сделать ФГК (с потерей CO_2).

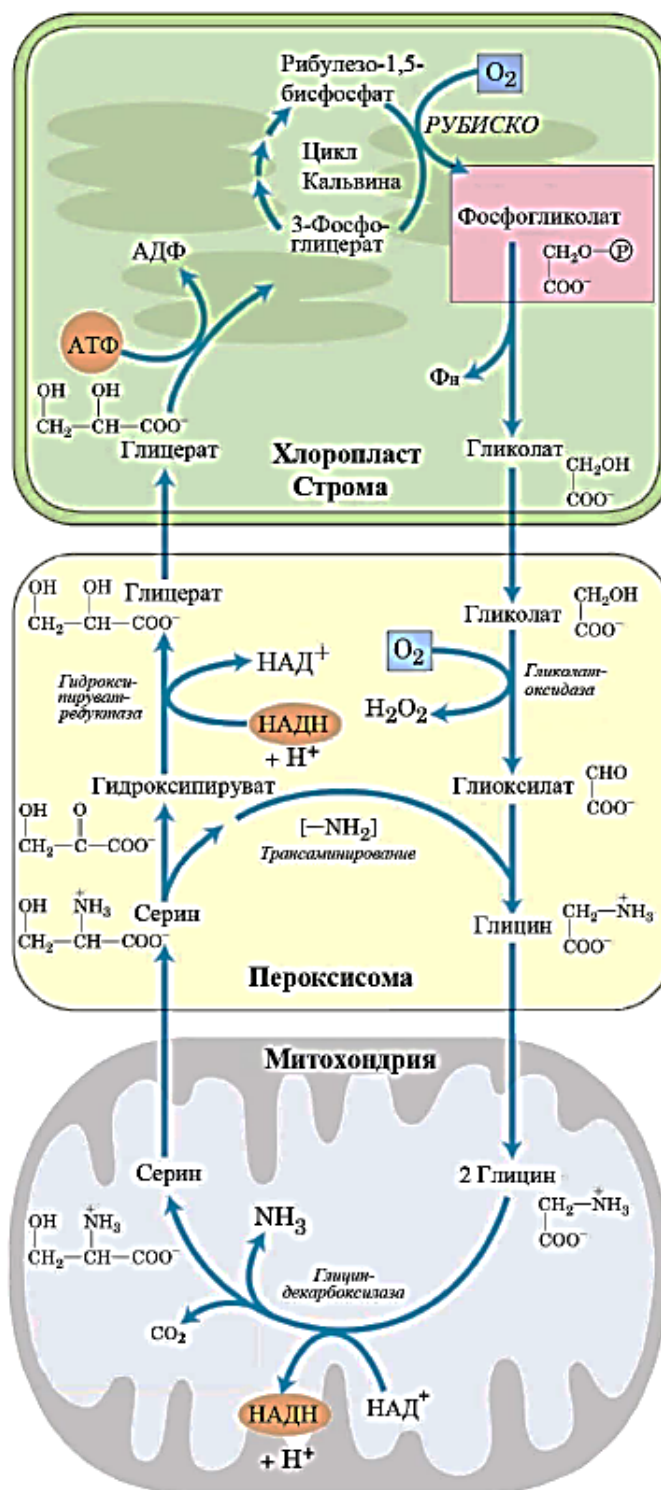


Рис.58. Общая схема фотодыхания.

Соотношения карбоксилазной и оксигеназной функции Rubisco.

В нормальном цикле Кальвина работает только карбоксилазная функция: полная загрузка Rubisco, из всего фиксированного CO_2 образуется триозофосфат.

Если соотношение карбоксилазной и оксигеназной функции будет равно 1:2 (компенсационная точка), то весь фиксированный CO_2 растрачивается в фотодыхании. Смысл его в том, что даже при недостатке углекислого газа циклы должны работать.

Кранц-анатомия C_4 -растений.

Ученым давно было известно, что у некоторых растений имеется особая анатомия листа (см. Рис.59).

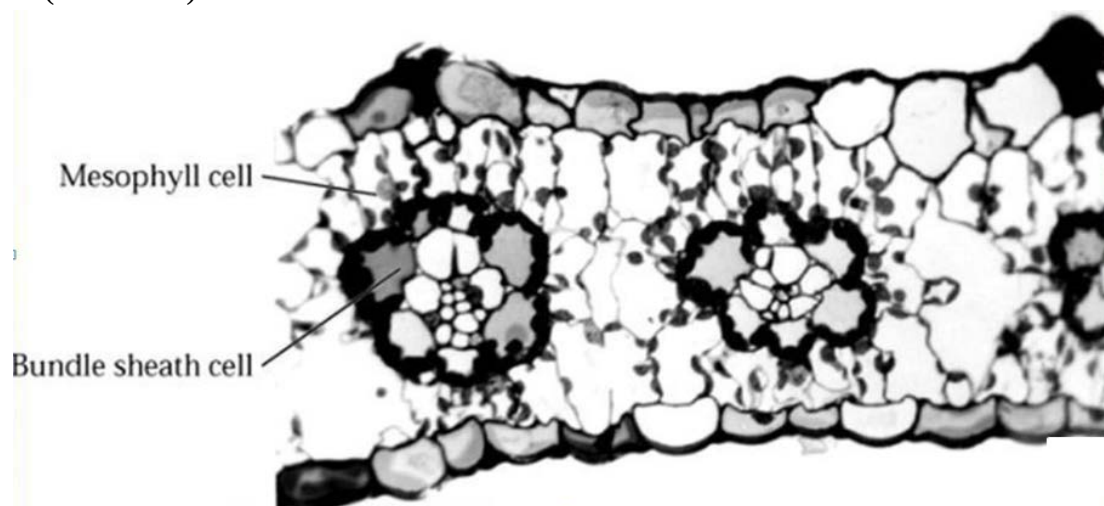


Рис.59. Кранц-анатомия листа.

Проводящий пучок окружен сосудистыми клетками, газонепроницаемой оболочкой (клетками обкладки). Главная особенность – фиксация углекислоты происходит с образованием C_4 -соединений.

Впервые о том, что в растениях имеется еще один, отличный от цикла Кальвина C_4 - путь связывания CO_2 , заявили в 1966 г. австралийцы М. Д. Хэтч и К. Р. Слэк. Поэтому нередко C_4 -путь фотосинтеза называют путем Хэтча и Слэка. При этом на тот момент уже существовали более ранние работы Ю. С. Карпилова. К настоящему времени C_4 - путь фотосинтеза выявлен более чем у 10 000 видов растений.

C_4 -фотосинтез.

Главная реакция – превращение ФЕП в щавелевоуксусную кислоту. Работает фермент ФЕП-карбоксилаза:

- использует HCO_3^- ;
- нечувствительна к кислороду;
- локализуется в цитозоле;
- $K_m = 0,2-0,4 \text{ mM}$.

Необходимо особо отметить, что ФЕП-карбоксилаза, в отличие от Rubisco (которая связывает только CO_2), ассимилирует HCO_3^- в условиях очень низкого парциального

давления CO_2 и высокого — O_2 . Затем C_4 -кислоты (малат или аспартат) транспортируются в клетки обкладки, где происходит их декарбоксилирование и образование C_3 -кислот. После этого C_3 -кислоты возвращаются в клетки мезофилла, а углекислота попадает в цикл Кальвина. C_4 -путь фотосинтеза иногда сравнивают с углекислотным насосом, поставляющим CO_2 в хлоропласты клеток обкладки для цикла Кальвина (см.Рис.60).



Рис.60. C_4 путь фиксации углекислоты.

Варианты C_4 -фотосинтеза.

Различают три варианта C_4 -пути фотосинтеза — NADP-маликэнзимный, NAD-маликэнзимный и ФЕП-карбоксикиназный (см.Рис.61). Эти варианты отличаются по типу C_4 -кислоты, которая транспортируется в клетки обкладки (аспартат или малат), по типу C_3 -кислоты (пируват или аланин), которая возвращается в клетки мезофилла для регенерации, и, наконец, по типу декарбоксилирования в клетках обкладки. У кукурузы, сорго и сахарного тростника функционирует NADP-маликэнзимный тип фотосинтеза, у иван-чая, мари и амаранта — NAD-маликэнзимный, а у баклажанов — ФЕП-карбоксикиназный.

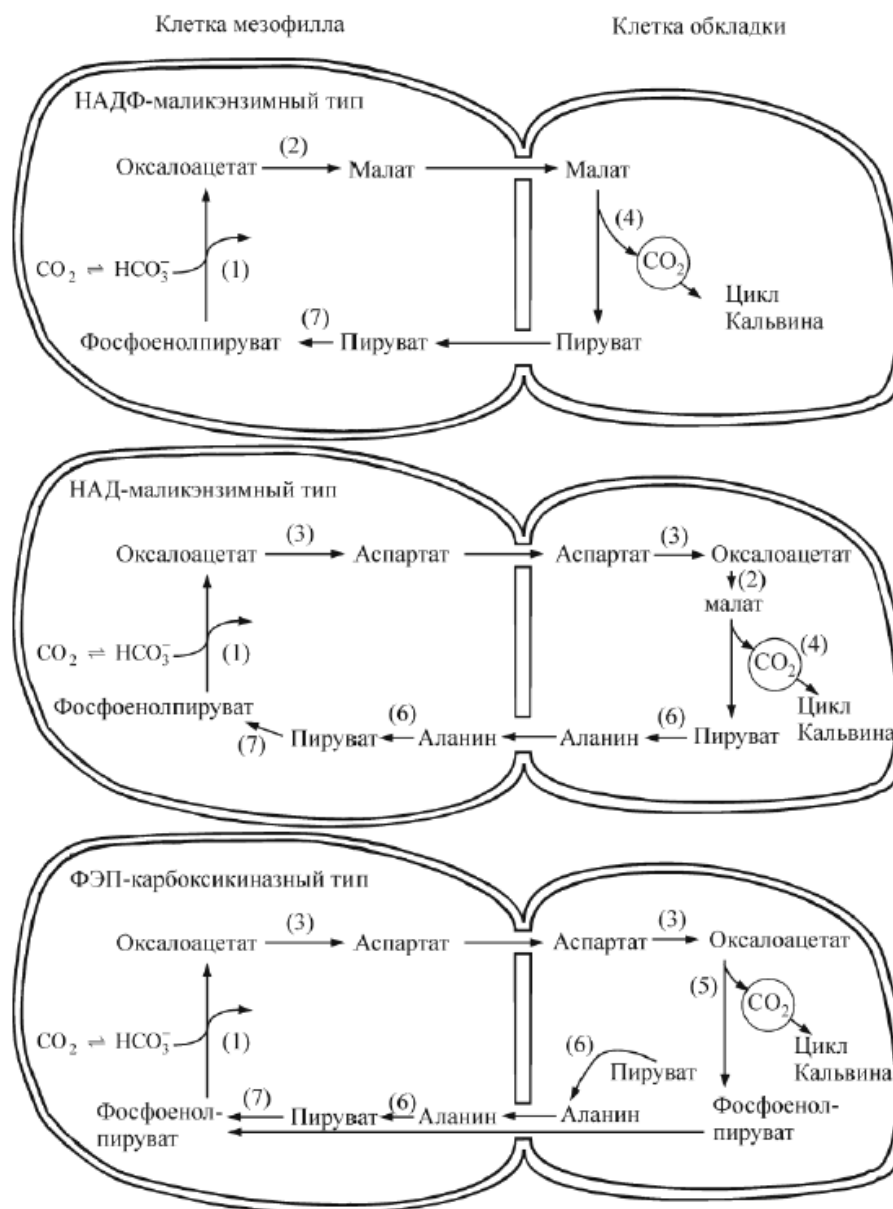


Рис.61. Варианты C4-фотосинтеза (1 — фосфоенолпируваткарбоксилаза; 2 — NADP-малатдегидрогеназа; 3 — аспаратаминотрансфераза; 4 — NAD(P)-маликэнзим; 5 — фосфоенолпируват-карбоксикиназа; 6 — аланинаминотрансфераза; 7 — пируватоторфосфатдикиназа).

CAM-метаболизм.

Устьица устроены таким образом, что когда они открыты, осуществляется не только транспирация, но и уходит большое количество воды. Тогда растения «придумали» еще и временное разделение карбоксилирования и фиксации CO_2 (см.Рис.62).

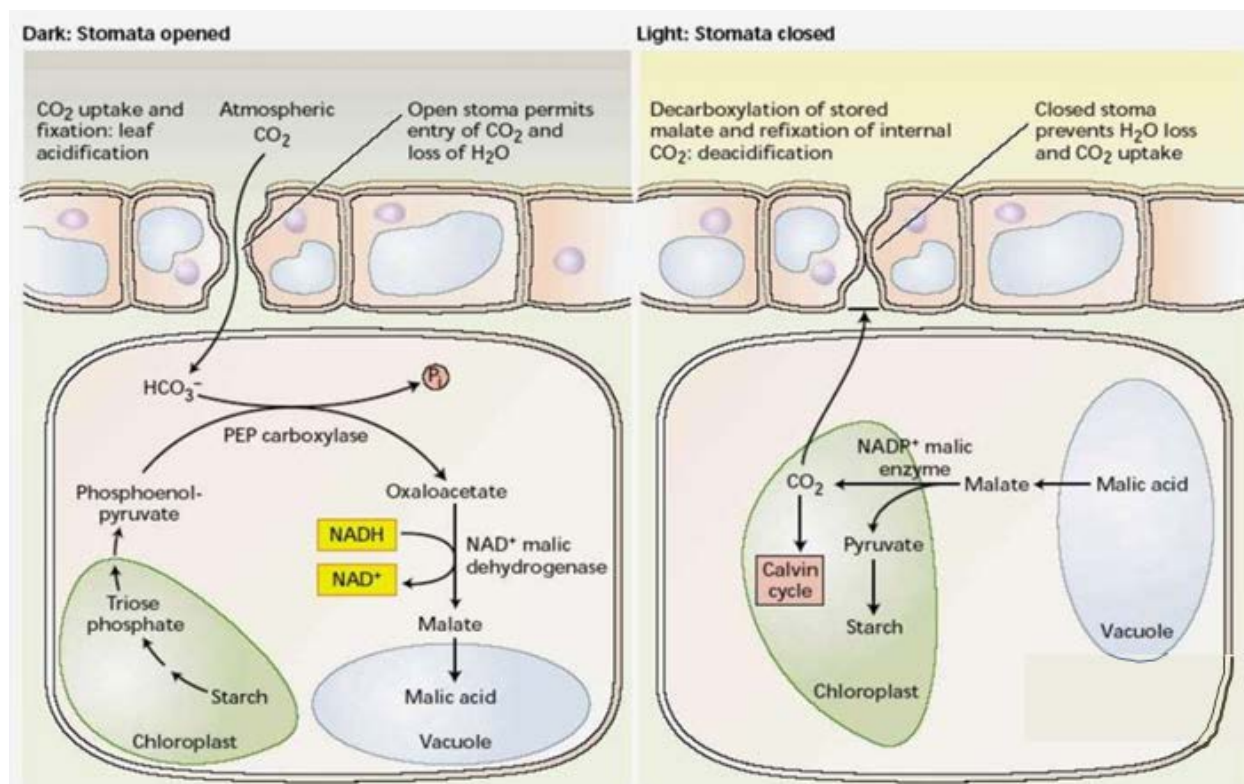


Рис.62. Разделение карбоксилирования и фиксации CO₂. (в темноте устьица открыты для газообмена, днем закрыты для предотвращения потери воды).

Такой путь характерен для толстянковых (отсюда его название- от *Crassulaceae Acid Metabolism*) – суккулентов, живущих в безводной среде.

Минеральное питание.

Макроэлементы: содержание более 0,1%.

Из них «органогены»: С ~45%, О~42%, Н~6,5%, N~1,5%.

А также S~0,1%, P~0,2%, K~1%, Ca~0,5%, Mg~0,2%, еще Na, Cl, Si. Железо занимает промежуточное положение. Микроэлементы: B, Mn, Cu, Zn, Mo.

Азот и сера участвуют в построении органических веществ; фосфор, кремний и бор – в запасании энергии и целостности структур клетки. Элементы, которые «работают» в ионной форме: K, Ca, Mg, Cl, Mn, Na; в red-ox реакциях – Fe, Cu, Zn, Ni, Mo.

Восстановление нитратов.

Самая большая проблема после фотосинтеза – это азот. Используется 2 основные формы: аммоний и нитрат. Аммоний не надо восстанавливать, но при прямом использовании токсичен (диссипатор мембранной энергии). Нитрат, попадая в растение, восстанавливается до аммония, который затем включается в аминокислоты. Процесс редукции нитрата в растениях осуществляется в два этапа. На первом этапе

происходит восстановление нитрата до нитрита, сопряженное с переносом двух электронов и катализируемое ферментом нитратредуктазой (см. Рис. 63):

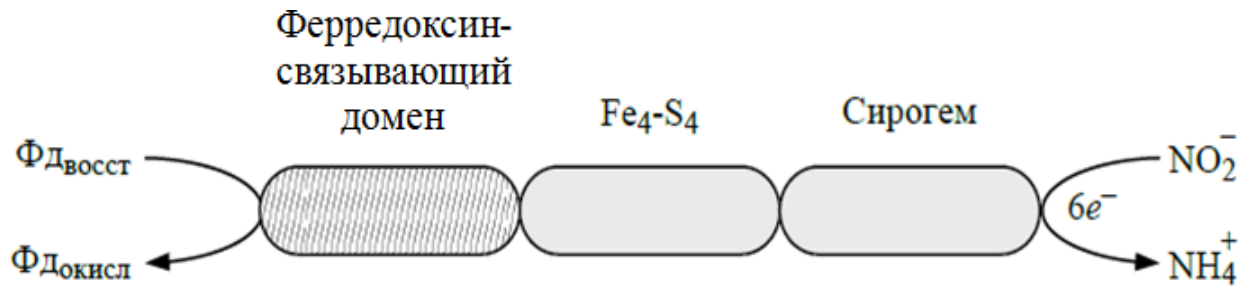
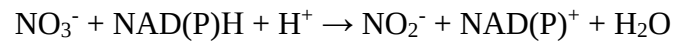


Рис. 63. Нитратредуктаза.

Лекция 8.

Минеральный обмен растений.

Азот.

Растения не могут использовать атмосферный азот. Это могут делать бактерии, а растения вступают с ними в симбиоз. Каждый вид растений выделяют специфический флавоноид, по которому бактерии их узнают.

Формирование клубеньков инициируется сигнальными молекулами липоолигосахаридной природы — Nod-факторами. Жирные кислоты, входящие в состав Nod-факторов, содержат 16—20 атомов углерода, а количество молекул ацетилглюкозамина составляет 3—5 (см. Рис.64).

Nod-факторы синтезируются клубеньковыми бактериями (ризобиями) в ответ на определенные виды флавоноидных соединений, выделяемых семенами и корнями бобовых растений. Флавоноиды активируют у ризобий гены вирулентности (их около 10), которые называются nod-генами (nodulation — клубенькообразование).

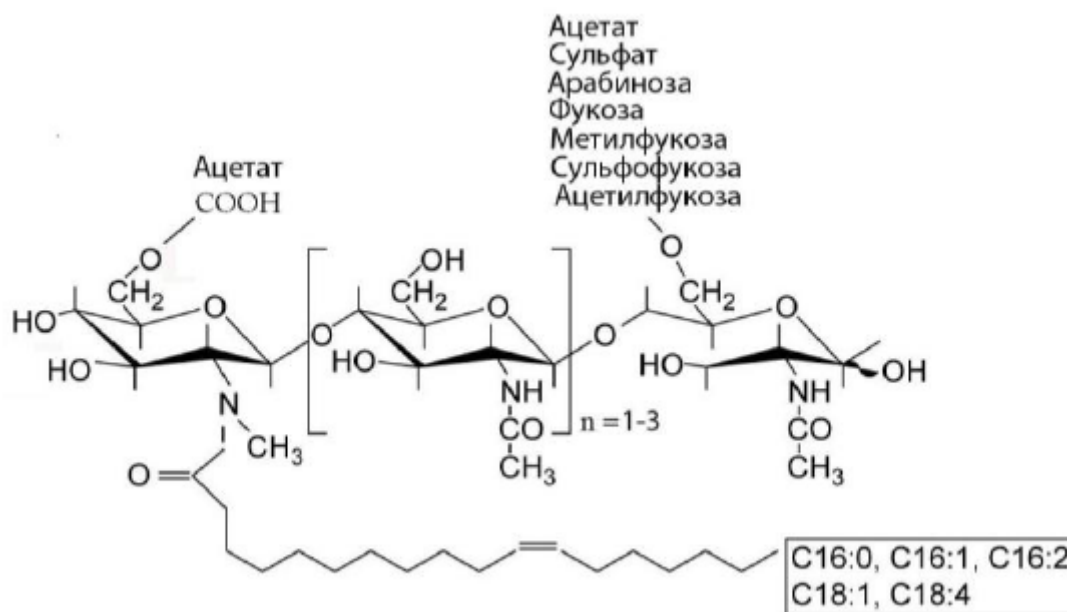


Рис.64.Строение Nod-фактора.

Nod-фактор способствует связыванию ризобий с клетками корневых волосков (см.Рис.65а), вызывает их искривление (см.Рис.65б) и локальное разрушение клеточной стенки в месте изгиба (см.Рис.65в). В процессе разрушения клеточной стенки участвуют гидролитические ферменты обоих партнеров формирующегося симбиоза. Затем происходит впячивание плазмалеммы в цитоплазму, и бактерии попадают внутрь

корневого волоска. Вокруг бактерий за счет секреции пузырьков аппарата Гольджи начинается формироваться особая полость, которая называется инфекционной нитью.

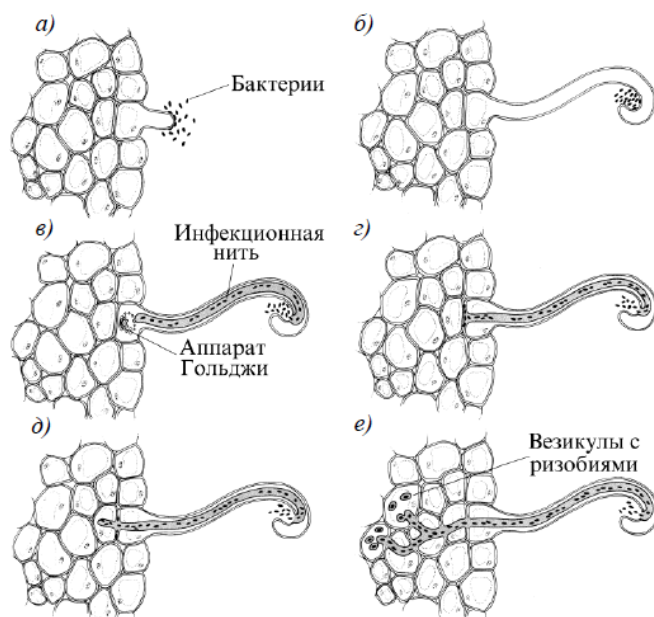


Рис.65. Процесс инфицирования ризобиями клеток коры корня бобовых растений.

Структура нитрогеназы.

Бактерии осуществляют процесс редукции N_2 до NH_3 нитрогеназой, за счет переноса 6 электронов, сопряженно с восстановлением H^+ до H_2 . В состав нитрогеназного комплекса входят два компонента — Fe-белок и Mo-Fe-белок. Азотфиксирующей способностью обладает только комплекс обоих компонентов (см. Рис.66).

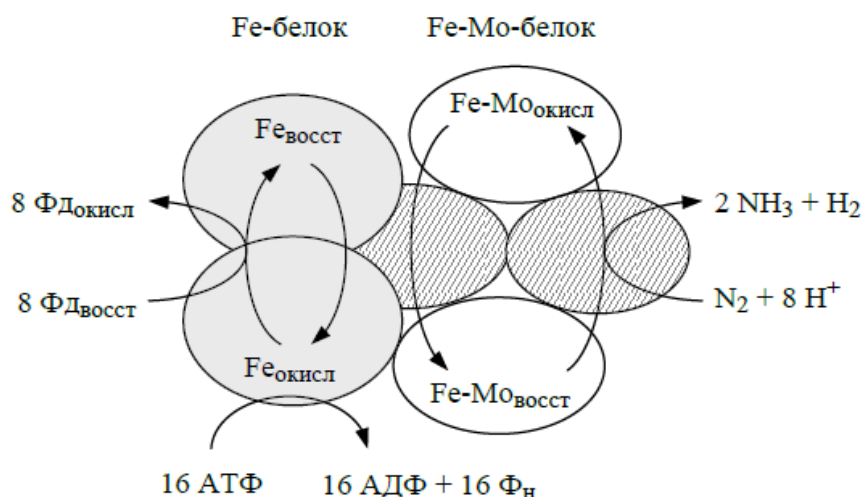


Рис.66. Схематическое строение и процессы, катализируемые нитрогеназой.

Fe-белок состоит из двух субъединиц, каждая из которых (в зависимости от организма-азотфиксатора) имеет молекулярную массу от 30 до 72 кДа. Fe-белок содержит один

железосерный кластер (Fe_4S_4), который очень чувствителен к кислороду. Мо-Fe-белок имеет 4 субъединицы общей молекулярной массой от 180 до 235 кДа. Два атома молибдена связаны в двух Мо-Fe-S-кластерах. Этот белок также содержит несколько железосерных кластеров и инактивируется кислородом.

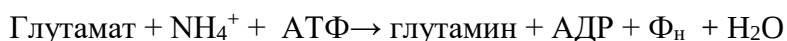
Поскольку нитрогеназа разрушается в присутствии кислорода, у азотфиксирующих микроорганизмов имеется ряд механизмов ее защиты. У ризобий эту функцию выполняет кислородсвязывающий гемопротеид леггемоглобин (легоглобин), придающий клубенькам розовую окраску. Леггемоглобин присутствует в цитоплазме клеток клубенька в очень высокой концентрации (0,7 мМ в клубеньках сои). Белок глобин синтезируется в клетках растения-хозяина, а гем — в клетках, содержащих бактериоды.

Леггемоглобин обладает очень высоким сродством к кислороду, он обеспечивает транспорт O_2 к бактериодам и защищает таким образом нитрогеназу от разрушения.

Включение азота в органические соединения.

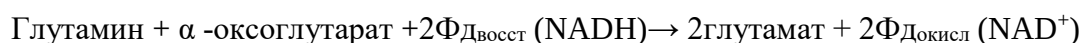
Ионы аммония, образовавшиеся при восстановлении нитратов, фиксации молекулярного азота или поступившие из почвы, усваиваются далее растениями путем образования различных аминокислот и амидов. Первичные пути этого процесса связаны, в первую очередь, с активностью двух ферментов — глутаминсинтетазы и глутаматсинтазы.

Глутаминсинтетаза (ГС) присоединяет ион аммония к глутаминовой кислоте (глутамат) с образованием амида глутамина. Эта реакция требует АТФ и ионов 2Mg :



Фермент глутаминсинтетаза состоит из 8 почти идентичных субъединиц, молекулярная масса всего комплекса достигает 350 кДа. В растениях имеются две формы глутаминсинтетазы, которые отличаются по структуре, свойствам и функциям. Одна из них локализована в цитоплазме, а вторая — в хлоропластах и пропластидах.

Активность глутаматсинтазы (называемой также ГОГАТ — глутамин-2-оксо-глутаратаминотрансфераза) стимулируется при увеличении содержания глутамина. Этот фермент осуществляет перенос одной аминокислотной группы глутамина на -оксо-глутаровую кислоту с образованием двух молекул глутаминовой кислоты:



В растениях встречается два типа ГОГАТ: донором электронов для первого типа фермента является НАДН, а для второго — восстановленный ферредоксин. НАДН-зависимая ГОГАТ функционирует в корнях (участвует в ассимиляции поглощенного аммиака) и в сосудах молодых листьев (обеспечивает реутилизацию азота глутамина,

поступающего из стареющих листьев). Ферредоксин-зависимый тип ГОГАТ синтезируется в цитоплазме и с помощью специального пептида переносится в хлоропласты, где принимает участие в образовании глутамата.

Помимо основного способа ассимиляции аммония, связанного с активностью глутаминсинтетазы и глутаматсинтазы, в растительном организме имеются и альтернативные пути, в которых участвуют другие ферменты. Глутаматдегидрогеназа катализирует реакцию, которая приводит к синтезу глутаминовой кислоты:



Транспорт азота.

Только у травянистых растений транспорт азота может осуществляться в виде NO_3^- . В остальных случаях:

Аминокислоты (глутаминовая и аспарагиновая и их амиды);

Небелковые аминокислоты: цитруллин (у березы), азетидин-2-карбоновая кислота (у лилейных);

Продукты окисления мочевой кислоты (уреиды): алантоин (бурачниковые), алантоиновая кислота (клен).

При симбиотической азотфиксации – амиды и уреиды. Причем, у растений умеренных широт (горох, клевер, кормовые бобы и др.) – амиды, у тропических (соя, фасоль, арахис) – уреиды.

Сера.

Этот элемент поглощается растениями только в окисленной форме — в виде сульфат-иона (SO_4^{2-}). Сера содержится в растениях в двух формах — окисленной (сульфат) и восстановленной. Основная часть поглощенного корнями сульфата перемещается в надземную часть растения по сосудам ксилемы к молодым тканям, где он интенсивно включается в обмен веществ. Работает в разных степенях окисления: -2, +4, +6.

Метаболизм серы.

Поглощение серы растением происходит в виде сульфата. Первое, что с ней произойдет – растение ее активирует, затем образуется сульфит (см. Рис.67), после него S^{2-} , которая включается в цистеин (превращение серина).

Основные ферменты:

- АФС-сурфурилаза;
- АФС-сульфотрансфераза=АФС-редуктаза;
- Сульфитредуктаза.

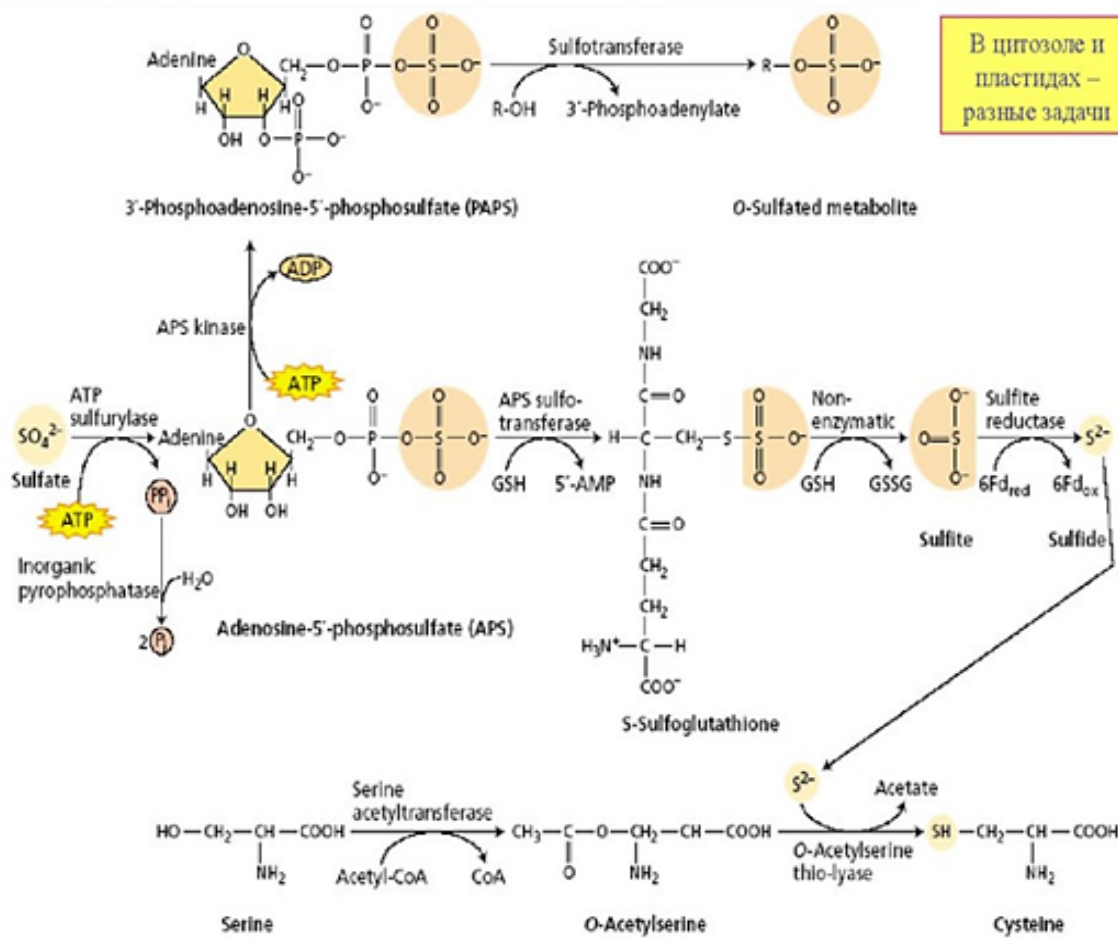


Рис.67.Метаболизм серы.

Варианты транспорта через мембрану.

Три класса мембранных транспортных белков: каналы, переносчики и насосы. Первично-активный транспорт осуществляется ионными насосами, источником энергии для которых служат АТФ, пирогосфат или субстраты, окисляемые в электрон-транспортных цепях митохондрий, хлоропластов и других мембранах.

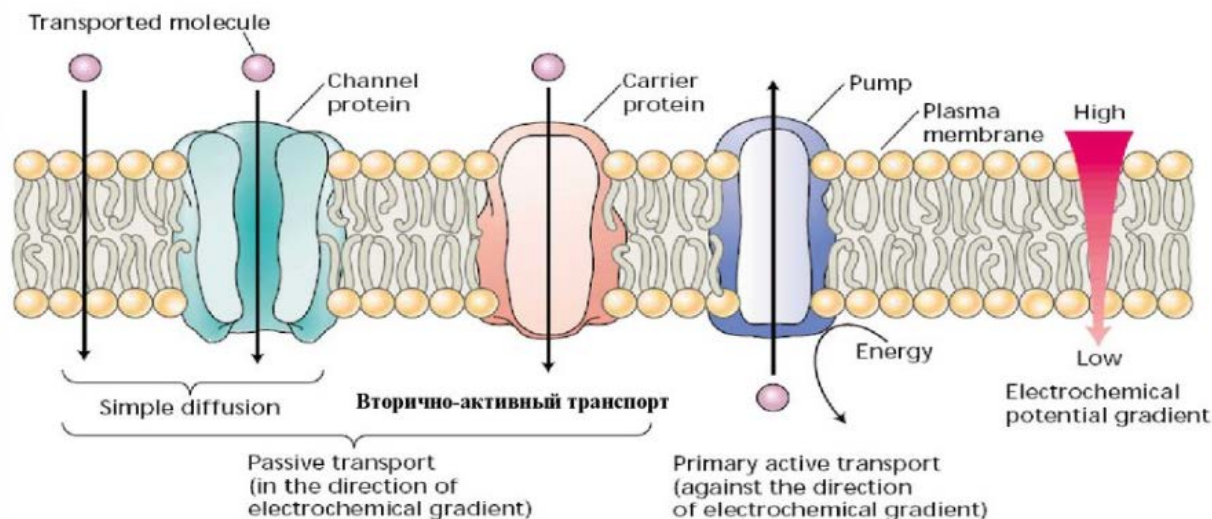


Рис.68. Варианты трансмембранного переноса.

В ходе вторично-активного транспорта процесс переноса веществ через мембрану против градиента его концентрации осуществляется за счет энергии электрохимического градиента протонов или других ионов (каналы и переносчики).

Пассивная (неспецифическая) диффузия ионов происходит при появлении в мембране различных гидрофильных пор или при нарушении целостности липидного бислоя. В нормальных условиях транспорт ионов путем простой диффузии — процесс маловероятный (см. Рис.68).

Лекция 9.

Транспортные процессы в растительной клетке.

Подводя итоги прошлой лекции, можно составить такую таблицу:

Пассивный (по градиенту электрохимического потенциала, без затраты энергии)	Активный (против градиента, с затратой энергии)
	Унипорт (первично активный; переносится одно вещество, используются макроэргические связи АТФ, пирофосфат и др.)
Диффузия (без специальных структур на мембране)	Симпорт (вторично активный; два вещества переносятся в одном направлении, используется электрохимический потенциал одного из веществ)
Каналы (специальные белковые комплексы на мембране, обладающие разной специфичностью к определенному веществу)	Антипорт (вторично активный; два вещества переносятся в разных направлениях, используется электрохимический потенциал одного из веществ)

Таблица 1. Виды транспорта растительной клетке.

Митохондрии и пластиды образуют АТФ для клетки. Все остальные системы используют АТФ. Есть помпы на плазмалемме (см. Рис. 69), которые выносят протон из клетки с расходом АТФ (следовательно, снаружи растительная клетка заряжена положительно, а с цитозольной стороны образуется отрицательный заряд). Вакуолярная система также поддерживает заряд на мембране (внутри вакуоль положительная).

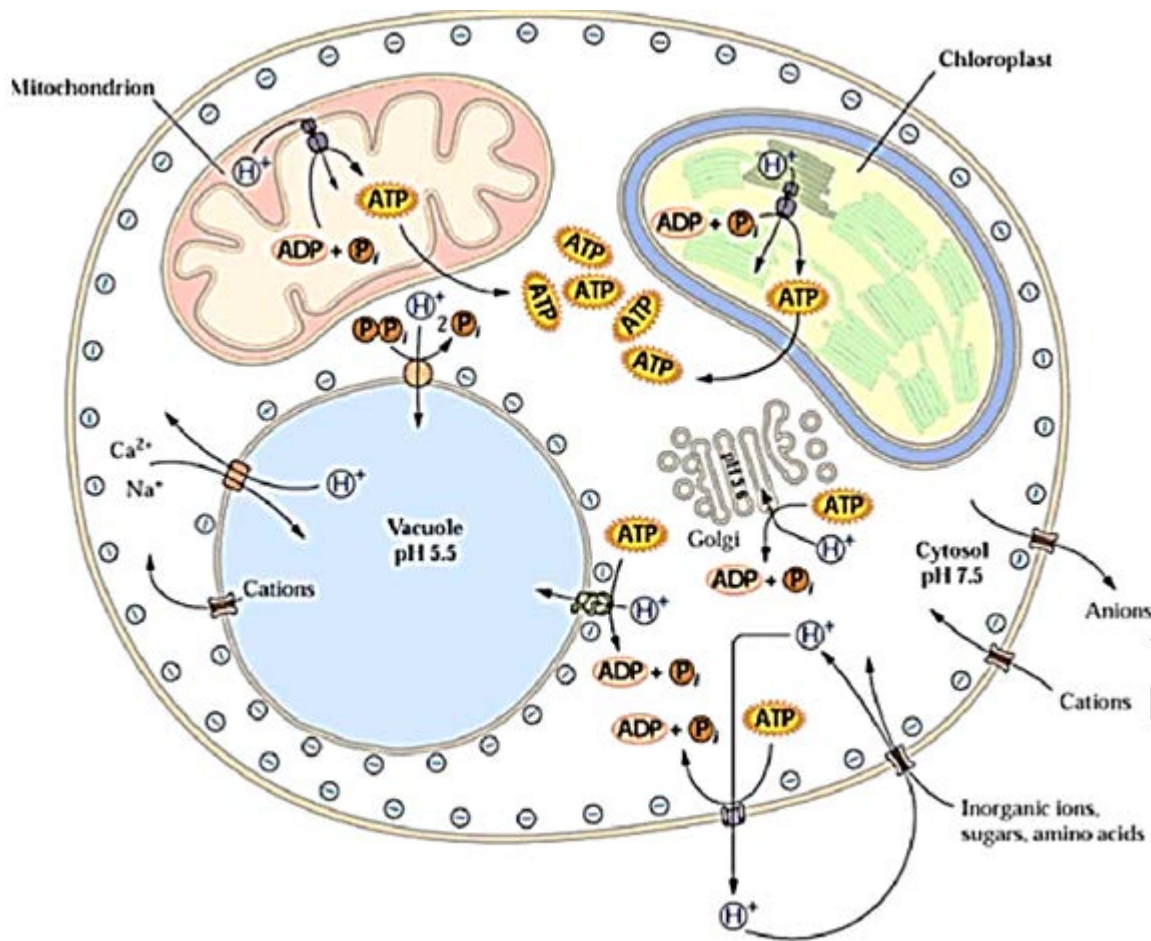


Рис.69. Принципиальная схема транспортных процессов в растительной клетке.

Типы АТФ-аз растительной клетки.

- АТФ-аза плазматической мембраны (*p-tin*);
- АТФ-аза митохондрий и хлоропластов (*F-tin*);
- АТФ-аза вакуолярная (*V-tin*).

Н-АТФ-аза плазмалеммы (*p-tin*): один полипептид (100-106 кДа), много раз пересекает мембрану, за 1 молекулу АТФ переносит 1 протон. Для ее работы необходимо автофосфорилирование (отсюда название «р-тип»). Ингибируется сульфгидрильными реагентами. Работа зависит от градиента и концентрации ионов калия.

Н-АТФ-аза тонопласта (*V-tin*): имеет 3 каталитических центра связывания АТФ, многомерная структура (7-10 субъединиц 70, 60 и 16 кДа), анионзависимая (нитрат ингибирует, хлорид стимулирует), зависит от градиента электрохимического потенциала; нечувствительна к ванадату, азиду, олигомицину.

АВС-транспортёры.

Транспортные белки, которые используют энергию гидролиза АТФ для транспорта различных химических агентов через мембраны. Часто обладают низкой субстратной специфичностью.

Функции:

- детоксификация опасных веществ и их конъюгатов: транспорт в вакуоли, транспорт из клетки. Устойчивость к антибиотикам;
- транспорт липидов: -из ЭПР в пластиды, субстратов β -окисления –в пероксисомы, предшественников кутина – из клетки;
- транспорт фолата в вакуоли;
- транспорт фитина (запас фосфата) в развивающиеся семена;
- транспорт малата в замыкающих клетках устьиц;
- транспорт фитогормонов по растению;
- секреция бактериальных вторичных метаболитов;
- секреция вторичных метаболитов для привлечения симбионтов.

Вторично-активный транспорт

1. энергия гидролиза АТФ (или пирогосфата) используется для создания электрохимического градиента на мембране;
2. градиент используется для транспорта интересующего иона/вещества.

Виды:

- MFS (Major Facilitator Superfamily – преимущественно транспорт ионов);
- MATE (Multidrug and Toxic Compound Extrusion – катионные антипортеры);
- PUP-like (Purin Uptake Permease-like);
- RND (Resistance Nodulation Division);
- SMR (Small Multidrug Resistance – транспорт липофильных соединений).

Стратегии поглощения железа растениями

1. Активация водородной аденозинтрифосфатазы плазмалеммы; железо восстанавливается и переносится через мембрану специфическим транспортером.
2. Обеспечивает поглощение трехвалентного железа за счет образования специальных хелатирующих соединений – фитосидерофоров (низкомолекулярные соединения, часто небелковые аминокислоты – никотинамин, синтезирующиеся из метионина и содержащие три карбоксила, за счет которых хелатируют железо).

Пассивный транспорт: ионные каналы.

Ионные каналы – интегральные мембранные белки, образующие «пору» в мембране. Транспорт иона по каналу зависит от:

- потенциала на мембране;
- концентрации иона по обе стороны мембраны;
- свойств канального белка;
- сигнала эндогенной природы.

Системы транспорта калия в растительных клетках.

Каналы: потенциал-зависимые (семейство Shaker-type) и потенциал-независимые (ТРК/КСО).

Транспортеры: семейство НАК/KUP/КТ (предположительно, относятся к MFS-транспортерам), семейство НКТ и катион-протон антипортеры СНХ.

Калий – основной катион, участвующий в поддержании гомеостаза растительных клеток.

Функции калия:

1. осморегуляция (ксилема, флоэма, замыкающие клетки устьиц);
2. нейтрализация зарядов минеральных и органических ионов (нитрат, малат);
3. поддержание мембранного потенциала;
4. обеспечивает правильное положение рибосомы и тРНК в пространстве (в процессе синтеза белка);
5. необходим для активации некоторых ферментов (пируваткиназа, крахмалсинтаза, пирофосфатаза тонопласта, пептидилтрансфераза);
6. необходим для фотосинтеза (участвует в поддержании электрохимического градиента на мембране тилакоидов);
7. повышает устойчивость к водному и солевому стрессам.

Лекция 10.

Водный обмен растений.

1. Водная среда объединяет все части организма. В теле растения водная фаза представляет собой непрерывную среду.
2. Вода – важнейший растворитель и среда для протекания биохимических реакций.
3. Вода участвует в упорядочивании структур в клетках.
4. Вода – метаболит и непосредственный компонент биохимических реакций.
5. Вода – главный компонент в транспортной системе высших растений.
6. Вода – терморегулирующий фактор.
7. Вода – амортизатор при механических воздействиях.
8. Вода обеспечивает упругость растительных тканей в рост растяжением.

В растительной клетке вода может существовать как в свободном, так и связанном виде. Связанная составляет 10-15% от общей массы воды в клетке и может быть конститутивной (химически связанной) и гидратационной (коллоидносвязанной и осмотически связанной).

По отношению к воде растения делятся на пойкилогидрические (полностью зависимы от воды) и гомойогидрические (гигрофиты, мезофиты и ксерофиты).

Термодинамические показатели воды.

a_w – активность воды. Эффективная (реальная) концентрация, соответственно которой вода участвует в различных процессах; для чистой воды $a_w=1$, в растворе или клетке <1 .
 μ_w – химический потенциал воды. Выражает максимальное количество энергии молекул воды, которая может быть превращена в работу.

ψ – водный потенциал. Выражает способность воды в данной системе совершить работу в сравнении с той работой, которую совершила бы чистая вода при тех же условиях. Водный потенциал клетки складывается из потенциала давления, матричного, гравитационного и осмотического потенциалов.

Динамические характеристики потока воды в клетку.

$$J_w = \Delta\psi * L_p = (\psi_{\text{среды}} - \psi_{\text{клетки}}) * L_p = \Delta\psi / R,$$

где J_w – объемный поток воды ($\text{см}^3 \cdot \text{с}^{-1}$), L_p – коэффициент гидравлической проводимости, $\Delta\psi$ – градиент водного потенциала, R – сопротивление потоку воды.

Коэффициент гидравлической проводимости (L_p) зависит от диффузии через липидный слой (повышение доли ненасыщенных жирных кислот, стероидов, изопреноидов и др. и проникновения через аквапорины (изменение числа аквапоринов и их активности)).

Аквапорины.

Молекулы воды преодолевают мембраны двумя путями: через липидный бислой и через поры, образуемые специальными белками – аквапоринами (см.Рис.70). В клеточных мембранах аквапорины образуют тетрамеры, при этом каждый мономер является независимым водным каналом. Каждый мономер аквапоринов содержит шесть трансмембранных α -спиралей, соединенных двумя цитоплазматическими (В и D) и тремя экстраклеточными (А, С и Е) петлями.

Регулирование:

- изменение числа каналов для осмотически активных веществ;
- изменение активности каналов (зависит от фосфорилирования, мембранного потенциала, сигналов и др.);
- изменение типа каналов;
- изменение расположения каналов на мембране.

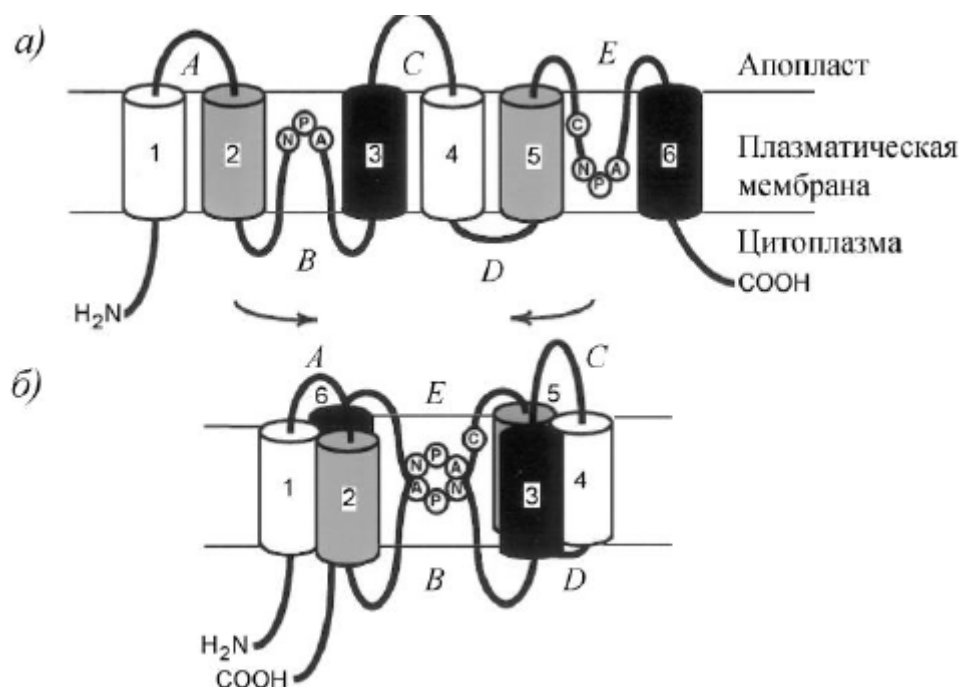


Рис.70.Строение мономера (а) и формирование водной поры (б) аквапоринов.

Поглощение воды корнем.

Почти вся поглощаемая растением вода поступает в него через корни. Лишь незначительное количество воды поглощают надземные части растения. Растения не могут транспортировать воду активно. Вода поглощается главным образом за счет осмотических сил, перемещаясь от участков с высоким водным потенциалом почвы к участкам с более низким водным потенциалом корня. В транспорте воды может также участвовать и микориза, особенно в старых частях корня. При недостатке влаги вода

становится основным фактором, определяющим скорость и направление роста корня. При недостатке воды рост корня ориентирован по градиенту влажности, а не силы тяжести. При этом происходит резкое возрастание поглощающей поверхности за счет увеличения количества корневых волосков.

Поглощение воды корнем из почвы возможно, если имеется соответствующий градиент водного потенциала. От поверхности корня до сосудов ксилемы вода должна пройти клетки эпидермы, коры, эндодермы и перицикла. Радиальное передвижение воды в корне возможно двумя путями: через цитоплазму по плазмодесмам (симпластный поток) и по клеточным стенкам (апопластный поток). По апопласту вода диффундирует по градиенту водного потенциала в направлении эндодермы. При *симпластном* транспорте вначале вода и ионы поглощаются клетками эпидермиса или коры, а затем перемещаются от клетки к клетке по плазмодесмам до сосудов ксилемы (см.Рис.71).

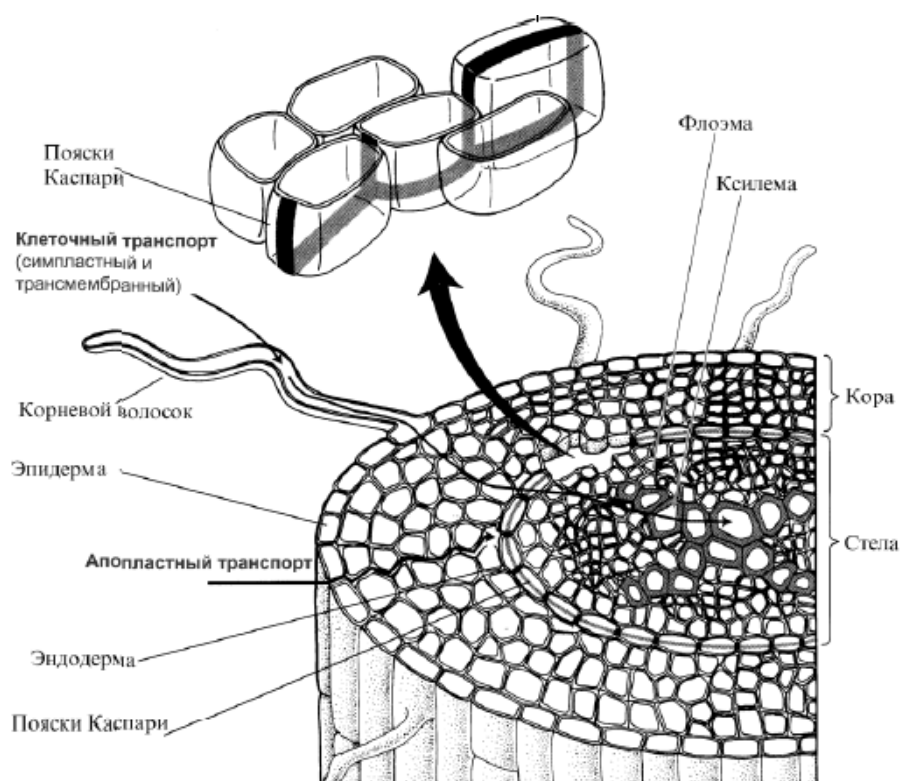


Рис.71. Радиальный транспорт воды в корне.

В сосуды ксилемы вода и растворенные в ней минеральные вещества попадают осмотическим путем из паренхимных клеток центрального цилиндра. *Апопластный* транспорт воды гораздо быстрее, поскольку сопротивление клеточных стенок для воды намного ниже, чем у цитоплазмы. Однако апопластный поток воды и растворенных в ней ионов обрывается на уровне эндодермы из-за непроницаемых для него поясков Каспари. Поэтому на уровне эндодермы вода и ионы должны войти в клетку через мембрану и далее передвигаться уже симпластным путем. Следует отметить, что клетки эндодермы не всегда непроницаемы для воды. Во-первых, в молодых растущих

клетках пояски Каспари еще не сформированы. Во-вторых, эндодерма прерывается в участках корня, где происходит заложение боковых корней. Тем не менее массовый поток воды по апопласту через клетки эндодермы резко ограничен. Это обстоятельство может эффективно использоваться для тонкого регулирования радиального транспорта воды в корне.

Устьица – особые клетки эпидермиса.

1. Содержат хлоропласты.
2. Нет плазмодесм.

Состояние устьиц зависит от:

- водного потенциала клеток листа;
- концентрации CO_2 в подъустьичной щели;
- циркадного (суточного) ритма;
- фоторецепторов (фототропины и фитохромы);
- абсцизовой кислоты (гормон растений, вызывающий быстрое закрытие устьиц).

Лекция 11.

Транспорт воды по растению.

Лист - верхний концевой двигатель:

1. Транспирация (контакт с атмосферой);
2. Фиксация CO_2 (образование органических осмотиков);
3. Гуттация;
4. Рециркуляция воды (активный отток по флоэме);
5. Рост молодого листа.

Корень – нижний концевой двигатель:

1. Создание корневого давления (загрузка ксилемы);
2. Рециркуляция воды (активный обмен ксилемы с флоэмой);
3. Рост молодого корня.

Симпластная и апопластная загрузка флоэмы.

Выход сахарозы в апопласт осуществляется особым семейством транспортеров SWEET (Sugar Will Eventually be Exported Transporter). Могут располагаться как на плазмалемме, так и на тонопласте. Транспортируют моно- и дисахариды в обоих направлениях по градиенту концентрации. Помимо загрузки флоэмы участвуют во многих процессах (секреция нектара, развитие пыльцы, семени, устойчивость к патогенам).

Симпластическая загрузка флоэмы предполагает наличие обильных плазмодесмных полей, толстой клеточной стенки, специфических ферментов синтеза, развитый единый хондриом, разнообразные продукты транспорта фотоассимилятов (смесь).

Роль промежуточных клеток в симпластной загрузке («полимеризационная модель»):

1. Синтез сахарозы и галактинола в мезофилле;
2. Передвижение сахарозы и галактинола в промежуточные клетки через плазмодесмы;
3. Синтез стахиозы и раффинозы в промежуточных стенках;
4. Невозможность обратного перемещения стахиозы и раффинозы в мезофилл (из-за размера молекул и особенностей плазмодесм).

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

Растительная клетка.

Органеллы эукариотической клетки:

- ядро (содержит основную часть генома и является местом синтеза ДНК и РНК);

- эндоплазматический ретикулум (место синтеза большинства липидов клетки, а также большинства белков, предназначенных для других органелл или секреции);
- аппарат Гольджи (место сортировки и модификации белков и липидов, получаемых от ЭПР);
- митохондрии (энергетические станции клетки, места синтеза АТФ);
- пероксисомы (место многих окислительных процессов);
- лизосомы (место компартментации литических ферментов);
- пластиды;
- вакуоли.

Сигнальные последовательности транспорта белков в растительной клетке

Целевая органелла	Сигнальная последовательность	Характеристика
Хлоропласты: строма	N-концевой лидерный пептид («стромальный»)	Последовательность из 40-50 аминокислот
Хлоропласты: ломен и мембраны тилакоидов	Два последовательных N-концевых лидерных пептида	Первый пептид - «стромальный», второй – «ломенальный»
Митохондрии: матрикс	N-концевой пресиквенс	формирует положительно заряженную амфипатическую α -спираль.
Митохондрии: внутренняя мембрана, межмембранное пространство	Два последовательных N-концевых пресиквенса	Первый пресиквенс - как для белков матрикса, второй состоит из остатков гидрофобных аминокислот
Пероксисомы	Сигналы пероксисомальной локализации PTS1 и PTS2	PTS1 – C-концевой трипептид – Ser-Lys-Leu PTS2 локализован на N-конце.
Ядро	Сигналы ядерной локализации NLS. Не отщепляются после переноса белка в ядро	NLS типа 1: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys. NLS типа 2: две последовательности, разделенные спейсером NLS типа 3: Lys-Ile-Pro-Ile-Lys
Сигнальный пептид секреторного пути	N-концевой лидерный пептид	10-15 остатков гидрофобных аминокислот, формирующих α -спираль.
ЭР	Сигнал локализации в ЭР	C-концевой тетрапептид KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu)
Вакуоль.	Сигналы локализации в вакуолях: NTPP, CTPP, внутрибелковый сигнал.	NTPP - N-концевой сигнал: Asn-Pro-Ile-Arg CTPP – C-концевой сигнал.

Лекция 12.

Клеточная стенка

С помощью клеточной стенки клетка решает множество проблем:

- создание формы – внешний каркас;
- водный баланс;
- рост растяжением;
- защита;
- транспорт веществ;
- сигнальные функции

По современным представлениям, стенка растительной клетки – функциональная структура, тонко организованный сложный комплекс разнообразных полисахаридов, белков и ароматических веществ. Часто представляет собой три взаимодействующих, но независимых сети полимеров.

Структура и форма клеточной стенки варьируется у разных типов клеток. У разных видов растений клеточные стенки могут сильно различаться по химическому составу. В построении ее углеводных полимеров обычно участвует 10—11 разновидностей моносахаридов, которые обязательно находятся в циклической (фуранозной или пиранозной) форме. К их числу относятся α -D-глюкоза, α -D-манноза, α -L-рамноза, α -D-галактоза, α -D-апиоза, α -D-ксилоза, α -L-арабиноза, α -D-глюкуроновая кислота, α -D-галактуриновая кислота, α -L-фукоза.

Строение микрофибрилл целлюлозы.

Основным полисахаридом клеточной стенки является целлюлоза, представляющая собой линейную цепь остатков D-глюкозы, соединенных между собой $\beta(1\rightarrow4)$ -гликозидными связями. Уложенные параллельно друг другу полимерные цепи целлюлозы формируют микрофибриллу диаметром 4—10 нм и длиной 1—5 мкм. Особенностью организации микрофибриллы является наличие аморфных зон и паракристаллических доменов, в которых глюканы связаны между собой водородными и гидрофобными связями (см.Рис.72).

Фермент целлюлозосинтаза имеет два каталитических центра: в первом происходит образование целлобиозы (мономер дисахарида), а во втором молекула целлобиозы сшивается с растущей цепью целлюлозы. Поэтому для каждого каталитического цикла требуется наличие двух остатков UDP-глюкозы.

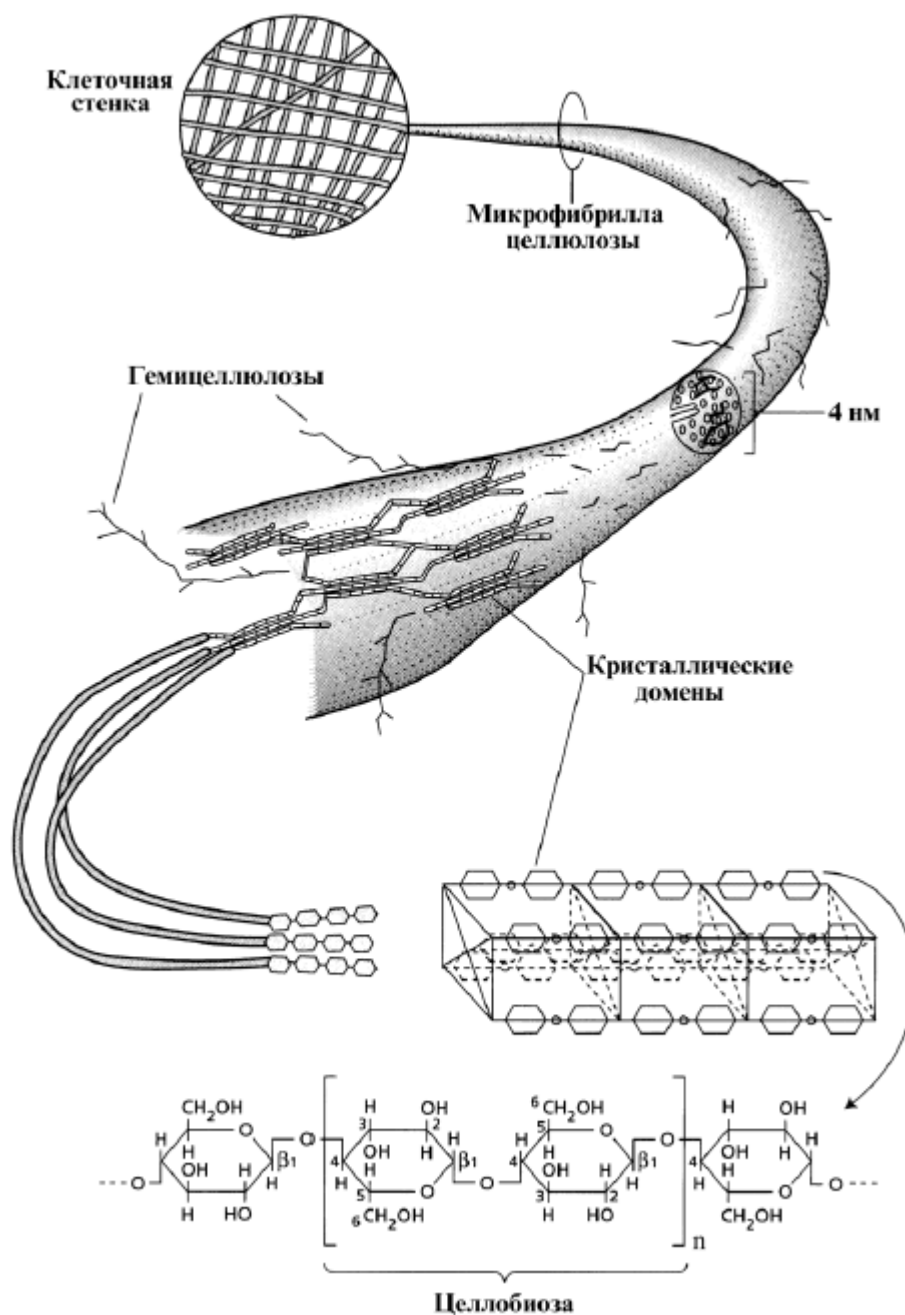


Рис.72.Строение микрофибриллы целлюлозы.

Пектины.

Все пектины можно разделить на галактуронаны (основная цепочка из остатков галактуроновой кислоты) и рамногалактуронаны (чередование галактуроновой кислоты с рамнозой). В свою очередь, среди галактуронанов выделяются гомогалактуронаны, ксилогалактуронаны и рамногалактуронаны II (рамногалактуронаны I относятся ко второй группе пектинов, так как у них рамноза находится в основной, а не боковой

цепи). Рамногалактуронаны II могут содержать необычные сахара (D-апиозу, L-галактозу и др.), что делает их менее подверженными ферментативной деградации и более стабильными.

Функции пектинов:

- определяют размер пор клеточной стенки;
- определяют поверхностный заряд клеточной стенки;
- адгезионные свойства КС;
- ионообменные свойства КС;
- формирование срединной пластинки;
- фиксирование ферментов КС;
- депо кальция;
- сигнальная функция;
- предположительно, участвуют в растяжении клетки.

Структурные белки клеточной стенки.

Экстенсины – богатые гидроксипролином белки клеточной стенки, гликозилированы. Арабино-галактановые белки – протеогликианы – обеспечивают связь плазмалеммы с клеточной стенкой.

Лигнины.

Фенилпропаниодная сеть вторичных клеточных стенок. Свойства: прочность, защита, гидрофобность. Образуются случайным образом окислительной конденсацией фенилпропаноидов.

Плазмалеммы.

Особенности плазмалемм:

1. Структурные – зависимость состава от типа клетки

основные ЖК: пальмитиновая, олеиновая, линолевая, линоленовая;
вместо холестерина – фитостерины, часто в виде гликозидов и ацилов;
наличие особых белков: контакты с КС, синтез и аранжировка КС.

2. Функциональные

формирование плазмодесм;

нахождение под постоянным «давлением» за счет тургора;

протонная энергетика;

$\Delta\psi \sim 100-250\text{ мВ}$ – выше, чем у животной клетки.

Лекция 13.

Функции плазмалеммы

1. Контроль поглощения и секреции веществ.
2. Запасание и использование энергии.
3. Размещение и обеспечение работы ферментов.
4. Рецепторные функции.
5. Сигнальные функции.

Структура растительного аппарата Гольджи.

Функциональные участки ЭПР

Помимо «классических» областей ЭР (гладкого (5) и шероховатого (6)) в растительных клетках выделяют:

- зону «шлюза» между ЭР и оболочкой ядра (3);
- область фиксации актиновых филаментов (11);
- области формирования белковых (8) и масляных (9) тел;
- область образования вакуолей (10);
- области контактов с плазмалеммой (13), вакуолью (12) и митохондриями (14);
- область рециркуляции липидов цистерн ЭР (15);
- область плазмодесм (16).

Роль растительного ЭР в формировании «экспортных» белков

1. Модификация некоторых аминокислот;
2. N-гликозилирование белков (при помощи шаперонов кальнексина и кальретикулина);
3. Правильное сворачивание белков (пептидилпролил изомераза при помощи Вир – иммуноглобулин связывающего белка);
4. Формирование «правильных» дисульфидных связей (глутатион и дисульфид-изомеразы);
5. Формирование олигомерных белков при помощи шаперонов;
6. Деградация белков или их возврат в цитозоль для деградации.

Везикулярный транспорт

До сих пор неясно, как работает аппарат Гольджи. Существует две основные модели (см.Рис.73):

1. «Везикулы-челноки». Цистерны неподвижны, обмен веществами – везикулами.(A)
2. «Корабли на параде». Цистерны передвигаются от цис- к транс- полюсу АГ, везикулы обеспечивают обмен ферментами в ретроградный транспорт.(B)

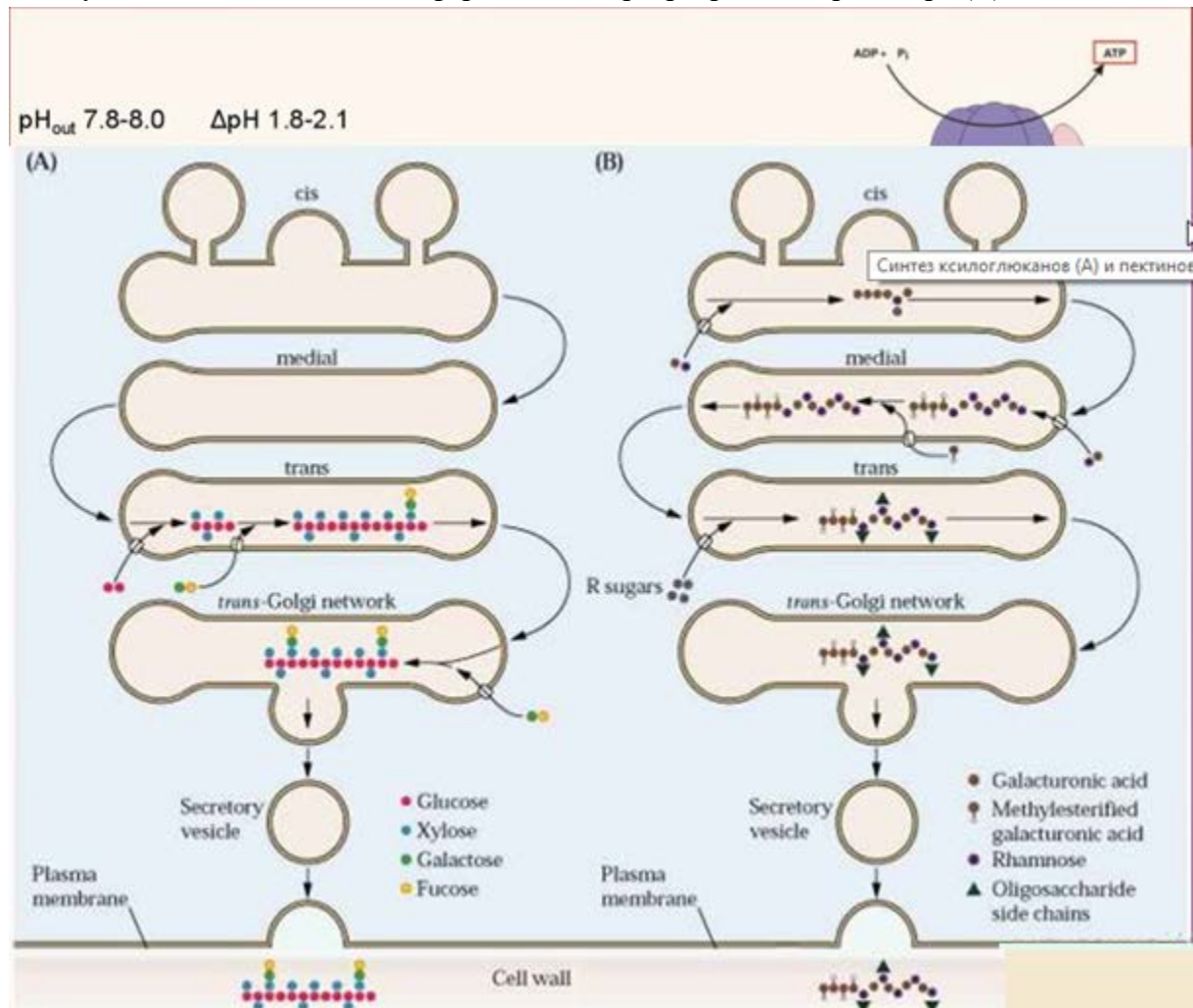


Рис.73. Модели транспорта в АГ.

Вакуоли

1. Цель «создания» вакуолей – «дешевый» способ увеличения клетки.
2. В клетке есть как минимум 2 типа вакуолей: запасующие (с нейтральным pH) и литические (с кислым pH).
3. Функции вакуолей:
 - хранение (ионы, сахара, полисахариды, ферменты, аминокислоты, белки, вторичные метаболиты);
 - лизис веществ (в литических вакуолях – кислые гидролазы: протеазы, нуклеазы, гликозидазы, липазы);
 - защита от патогенов и травоядных (токсичные вещества – цианогенные гликозиды, кумарины и др., ферменты – хитиназы, глюконазы);

- пигментация (водорастворимые ферменты – антоцианы, беталаины);
- изолирование и детоксикация токсичных веществ (наличие белков-переносчиков из семейства ABC-транспортеров);
- регулирование pH и ионный гомеостаз;
- регулирование тургорного давления.

Пероксисомы

Одномембранные органеллы диаметром 0,5-1,0 мкм, в которых локализованы различные окислительные реакции с участием и/или регенерацией АФК. Используются при катаболизме и биосинтезе.

Катаболизм: детоксикация АФК, β -окисление жирных кислот, катаболизм первичных и вторичных метаболитов (в т.ч. «защитных» соединений).

Биосинтез: генерация АФК, глиоксилатный цикл, фотодыхание, биосинтез фитогормонов, кофакторы биосинтезов, биосинтез вторичных метаболитов.

Неметаболические функции: процессинг и деградация белков, обратимое фосфорилирование, Са-сигналинг.

Ядро

Факторы транскрипции растений

bZip – «лейциновая молния» (у растений узнают участок ДНК, содержащий ACGT, три варианта: Hex, G или as1. Часто работают в виде димеров);

HD-гомеодомен-содержащие белки (узнают участок ДНК ACCT или GACT);

MADS-белки (узнают участок ДНК, содержащий 10-нуклеотидный фрагмент CC(A/T)₆GG. Работают в виде гомо- или гетеродимеров);

HD-Zip (узнают 9 нуклеотидов CAAT(A/T)ATTG).

(C/G)

Некоторые особенности ядерного генома растений

1. Размер (от 10^8 тпн до 10^{10} тпн).
2. Большое количество повторов – до 70% (горох).
3. Теломерная ДНК есть не всегда.
4. Большое количество генов с высокой гомологией бактериальным генам (до 50%).
5. Более высокий уровень метилирования.
6. Измененные сигналы полиаденилирования.
7. Codon usage: разная эффективность использования разных триплетов .
8. Два типа транспозонов: ретротранспозоны (вероятно, остатки ретровирусов) и ДНК-транспозоны (преимущественно, у с/х растений).

Лекция 14.

Пластиды.

К основным типам пластид относятся хлоропласты, хромопласты и лейкопласты. К непигментированным пластидам относят этиопласты, лейкопласты и пропластиды. Пропластиды, которые обычно имеются в меристематических клетках, содержат гомогенный матрикс с небольшими инвагинациями внутренней мембраны. Пропластиды могут дифференцироваться или в хлоропласты (на свету), или в этиопласты (в темноте) (см.Рис.74).

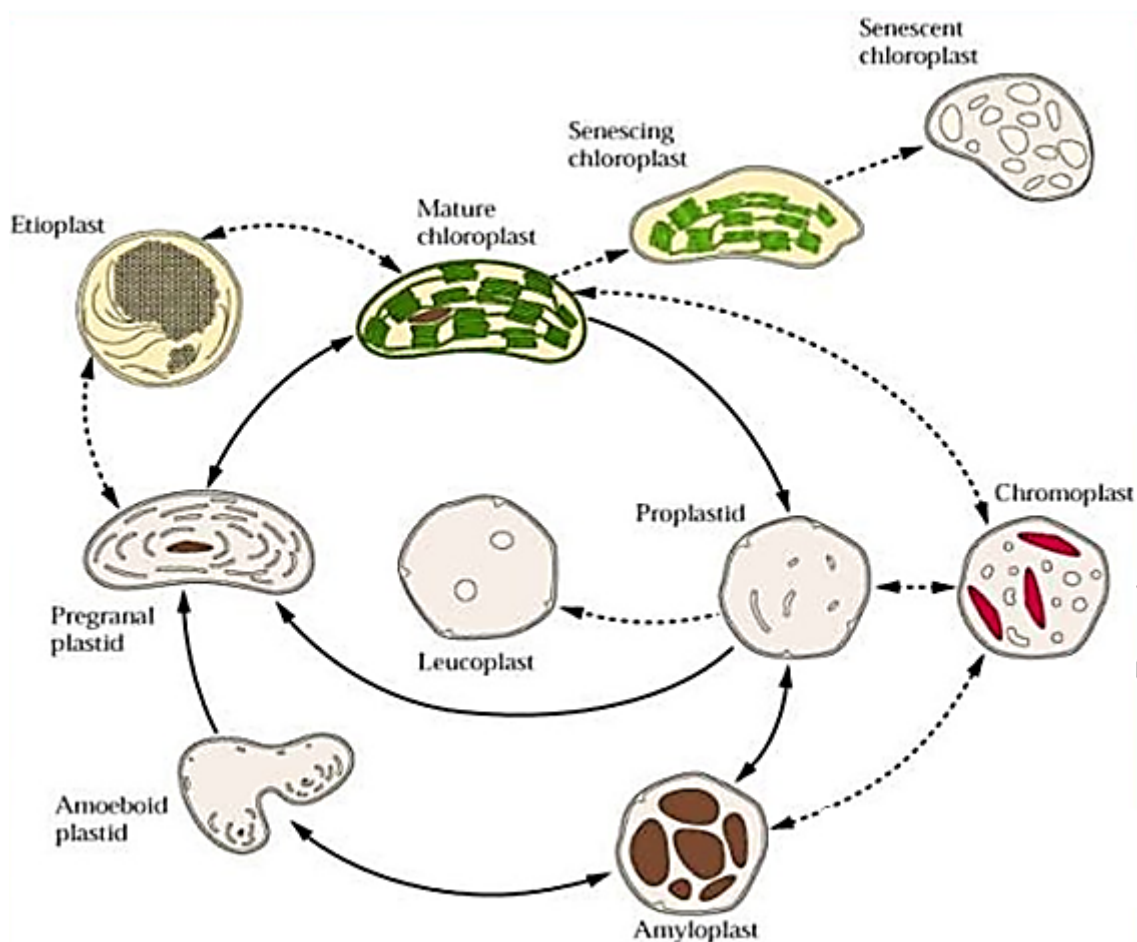


Рис.74. Взаимопревращение пластид.

В этиопластах содержится протохлорофиллид а и небольшое количество каротиноидов, которые придают им бледную желто-зеленую окраску; хлорофиллы а и b из-за отсутствия света не синтезируются. Особенностью строения этиопластов является наличие упорядоченной паракристаллической структуры (в форме решетки), которая состоит из мембранных везикул, известных как проламеллярные тела. Последние являются своеобразным резервом мембранного материала для формирования ламеллярной структуры хлоропластов. Уже после нескольких часов

экспозиции на свету проламеллярные тела превращаются в тилакоиды, протохлорофилл — в хлорофилл и, в итоге, этиопласты — в хлоропласты. Однако, если сформированные хлоропласты в течение длительного времени будут находиться в темноте, они трансформируются в этиопласты (см.Рис.75).

Лейкопластами называют сходные по структуре с пропластидами бесцветные пластиды тканей, в которых откладываются запасные соединения, такие, например, как крахмал (амилопласты), белки (протеинопласты), липиды (элайопласты). На свету амилопласты могут превращаться в хлоропласты.

Гены хлоропластов.

Всего 110-120 генов, из них около 40 «рабочих» и около 60 - «домашнего хозяйства».

- 1.Транскрипция: 4 гена субъединиц пластидной РНК-полимеразы (rpo);
- 2.Синтез белка: 4 гена рРНК (оперон rrr), около 20 генов белков пластидных рибосом (rpl/rps), около 30 генов тРНК (trn);
- 3.Фотосинтез: 6 генов белков фотосистемы I (psa), 14 генов белков фотосистемы II (psb), 6 генов ЭТЦ фотосинтеза (pet), 6 генов пластидной АТФ-азы (atp), ген большой субъединицы Rubisco (rbcL);
- 4.Около 20 генов с другими функциями: гены пластидной NADH Н-дегидрогеназа, гены биосинтеза жирных кислот и др.

Функции пластид

- Фотосинтез;
- Синтез всех жирных кислот, многих аминокислот, синтез пуринов и пиримидинов, альтернативный путь синтеза изопреноидов (в т.ч. в лейкопластах), шикиматный путь (параллельно цитозолю);
- Восстановление нитритов, сульфатов;
- Запас (крахмал) – временный (хлоропласты), долгосрочный (амилопласты);
- Экологические – окраска плодов, цветков (хромопласты – каротиноиды).

Митохондрии.

Митохондриальный геном растений имеет самый большой размер среди всех эукариотических клеток, но состоит в основном из неработающей ДНК. По структуре это набор кольцевых и линейных плазмид разного размера.

Гены митохондрий

Всего около 50 генов (у печеночных мхов более 100), из них - около 20 «рабочих» и около 30 - «домашнего хозяйства».

- 1.Синтез белка: 3 гена рРНК (оперон rrr), 10 генов белков пластидных рибосом (rpl/rps), 16 генов тРНК (trn);

2. Дыхание: 9 генов белков NADH-дегидрогеназы (nad), ген апоцитохрома b (cob), 5 генов белков биосинтеза цитохрома c (ccb), 3 гена субъединиц цитохромоксидазы (гены cox), 3 гена субъединиц сукцинатдегидрогеназы (sdh) у печеночников, 4 гена АТФ-синтазы (atp).

Каллусогенез и дедифференцировка.

Каллус – раневая ткань. Функции *in vivo* – закрыть рану, накопить питательные вещества, индуцировать морфогенез и сформировать дифференцированные структуры. Для одноклеточных не характерен. *In vitro* каллусная ткань может быть нормальной и опухолевой, ее источник – любая живая ткань растения. Стимулируют рост каллуса изолированность, травма и фитогормоны (ауксины и цитокинины). Далее следует дедифференцировка (изменение метаболизма – затрата запасных веществ, новые синтезы и др.; перестройка, разрушение клеточных структур – цитоскелет и др.).

Характеристика каллусных культур

- неорганизованный рост (нет плана деления);
- неограниченный рост;
- цикл выращивания 30-40 суток;
- клеточный цикл – не менее суток;
- пространственная гетерогенность (трехмерная);
- физиологическая и генетическая гетерогенность.

Получение суспензионных культур клеток

Получают либо из каллусной ткани, либо из первичного экспланта в жидкой среде. При плотном каллусе:

- 1) попробовать его «разрыхлить» (снизить или убрать соли кальция, повысить или заменить ауксины, снизить или исключить цитокинины);
- 2) фракционировать;
- 3) изменить условия культивирования – перемешивание;
- 4) обработать ферментами.

Мелкоагрегированная суспензия менее жизнеспособна.

Лекция 15.

Культура клеток высших растений.

Культура клеток – биологическая система, экспериментально созданная популяция соматических клеток. Она может быть инструментом сохранения генофонда, микрклонального размножения, клеточной селекции, создания трансгенных растений и производства веществ растительного происхождения.

Основные свойства культуры клеток высших растений

Снятие организменного контроля развития провоцирует переход к популяционным механизмам развития системы.

- Отбор клеток по максимальной и/или устойчивой пролиферации – основной принцип развития популяции;
- гетерогенность системы по различным признакам – основа адаптационных возможностей системы;
- узкие адаптивные возможности системы – следствие отсутствия длительной эволюции.

Гетерогенность популяций культур клеток высших растений

Это свойство популяций культуры клеток является основой адаптационных возможностей системы. Гетерогенность может быть морфологической (клетки табака в суспензии), биохимической (флуоресценция клеток диоскореи в культуре) и генетической (различное число хромосом в клетках женьшеня, перестройки хромосом в клетках пшеницы). Генетическая гетерогенность была открыта в 1964 году Р.Г.Бутенко, З.Б.Шаминой и Н.Загорска. Причинами гетерогенности могут быть:

- генетическая гетерогенность экспланта;
- дедифференцировка в необычных условиях;
- стрессы культивирования – условия *in vitro*;
- мутагенное действие экзогенных фитогормонов;
- длительное субкультивирование – накопление мутаций в популяции;
- популяционный контроль развития системы.

Генетическая гетерогенность может обнаруживаться на уровне целых хромосом (их число, набор), отдельных хромосом (перестройки), а также на уровне отдельных генов (точечные мутации).

У пшеницы возможны следующие перестройки: делеция, инсерция, изохромосомы, транслокация, не имеющая аналогов неидентифицированная хромосома, увеличение гетерохроматинового сегмента, дицентрическая хромосома.

Протопласты

Культуру протопластов можно получить двумя способами – механическим и энзиматическим. В последнем используются такие ферменты, как целлюлаза, пектиназа, драйселаза и пектолиаза. При этом должны присутствовать осмотики (метаболически активные сахароза, глюкоза и сорбит и неактивный манит; для стабилизации мембран – соли кальция, альбумин, полиамины, декстран, сульфат калия), т.к. нарушается целостность мембраны, а клетка находится под тургорным давлением. Следующий этап – очистка (фильтрование, центрифугирование, флотирование в гипертоническом растворе осмотика, центрифугирование в градиенте плотности). Далее – культивирование. Образование клеточной стенки происходит через 10-12 минут, а деления начинаются через 2-7- суток культивирования.

Протопласты можно получить только в лаборатории, отдельно в живой природе они не встречаются.

Культура клеток высших растений как модель изучения фотосинтеза

Даже из одного растения одинаковые культуры клеток получить невозможно. Для получения фотосинтезирующих клеток необходимо освещение и сахар, но не конечный продукт (сахароза), а глюкоза. Существуют две точки зрения на интенсивность фотосинтеза: она зависит от внешних условий и от внутренней потребности. Академик Нечипорович считал, что интенсивностью фотосинтеза зависит от внешних факторов: он установил датчик освещенности и влажности и наблюдал за изменениями в фотосинтезе растения. Мокроносов напротив считал, что интенсивность фотосинтеза зависит от потребности растения – донорно-акцепторные отношения. Он измерил интенсивность в каждом листочке, затем отрезал по половине от каждого и обнаружил, что интенсивность фотосинтеза увеличилась ровно в 2 раза. Это означает, что при тех же условиях потенциал растения гораздо больше, чем оно на самом деле выдает при жизни. Таким образом, Мокроносов оказался прав, и интенсивность фотосинтеза в большей степени зависит от внутренней потребности растительного организма.

Лекция 16.

Культура клеток высших растений.

Культура клеток высших растений – большой невостребованный генетический материал. Клетки *in vitro* имеют полную информацию об интактном растении. На такой модели можно изучать влияние невостребованных генов на развитие популяции, возникновение и скорость мутаций, соматоклональных вариаций, программы морфогенеза и соматического эмбриогенеза.

Соматоклональная вариабельность.

Причинами соматоклональной вариабельности могут быть:

- одиночные генные мутации, иногда с достаточно высокой частотой – до 4%. Это могут быть доминантные, семидоминантные и рецессивные ядерные мутации. При этом возможны мутации, которые не обнаружены при обычном мутагенезе. Часто моногенные признаки R1 расщепляются в соотношении 3:1, что указывает на клоновое происхождение вариантов.
- митотическая рекомбинация;
- мутации хлоропластной и митохондриальной ДНК;
- длительные модификации генома (прежде всего, метилирование ДНК).

Практическое применение культуры клеток.

1. «Экологическая» биотехнология: сохранение генофонда. Это могут быть коллекции клеточных штаммов, меристем, растений *in vitro* (в том числе криоколлекции).
2. Сельскохозяйственная биотехнология:
 - микроклональное размножение;
 - оздоровление;
 - клеточная селекция;
 - создание трансгенных растений.
3. Промышленная биотехнология (производство веществ растительного происхождения).

Коллекции растительных объектов.

Коллекции растений существуют более 500 лет с целью сохранить их генетические ресурсы как *in-situ*, так и *ex-situ*. По данным ФАО ООН, в настоящее время в мире существуют 1750 генетических банков, при этом только в 130 из них сохраняется более 10 000 000 образцов. В коллекциях растений *ex-situ* сохраняют около 7,4 млн образцов, причем 6,6 млн – в национальных генетических банках.

В 1951 году создана Глобальная Система международного наблюдения за Генетическими ресурсами растений. В систему входят 135 стран, в том числе Российская Федерация.

С 2002 года в рамках конвенции по биологическому разнообразию (CBD) существует Глобальная Стратегия для Сохранения Растений, разработанная для координации работ по сохранению мировых генетических ресурсов растений, причем не только семян, но и вегетативно размножаемого материала, в том числе культивируемого *in vitro*. Этот документ является основой для планирования работ по сохранению растительных объектов.

Биотехнологические коллекции *in vitro* обеспечивают возможность сохранения генофонда растений, для которых сохранение традиционными способами затруднено или невозможно (коллекции элитных экземпляров, коллекций расщепляющихся при скрещивании гетерозиготных генотипов и др.).

За время существования человечества уничтожено более 50% естественного растительного покрова Земли. По данным постоянной комиссии по исчезающим видам растений и животных МСОП, под угрозой исчезновения находятся более 10 000 видов растений. Биотехнологические коллекции растительных объектов *in vitro* – лучший способ сохранения видов, для которых размножение семенами затруднено или невозможно.

Коллекции «пробирочных» растений

Уникальные области применения коллекций *in vitro*:

- коллекции «элитных» экземпляров. Принципиально важно для взрослых лесных деревьев и их «плюсовых» форм, особенно хвойных, для которых технология до сих пор не разработана.
- коллекции гетерозиготных, расщепляющихся при скрещивании, растений (например, коллекции сортов с/х культур, размножающихся вегетативно).
- коллекции редких и исчезающих видов, трудно размножающихся семенами (например, орхидей), в том числе, для их последующей реинтродукции.

Недостатки коллекций *in vitro*:

- необходимость частых пересадок хранящегося растительного материала;
- возможность появления уклоняющихся форм при излишне интенсивном размножении, а также при возникновении каллуса.

Способы преодоления недостатков:

- депонирование в условиях низких положительных температур (1°C -10 °C);
- оптимизация сред, в том числе с использованием ингибиторов роста.

Коллекции тканей и органов растений

1. Коллекция изолированных меристем или апексов побегов
2. Коллекции корней *in vitro*
 - адвентивных;
 - трансформированных (hair roots);
3. Коллекции морфогенных каллусных и суспензионных культур
 - формирующие униполярные структуры (побеги);
 - формирующие биполярные структуры (эмбриониды).

Коллекции культур клеток высших растений

1. Коллекции каллусных культур клеток.
2. Коллекции суспензионных культур клеток.

Области применения: сохранение штаммов и линий – продуцентов биологически активных веществ для промышленной растительной биологии. Хранятся пересадочными культурами или криоконсервацией.

Сельскохозяйственная биотехнология

Методы:

- 1) микроклональное размножение (нельзя допускать появление каллуса);
- 2) клеточная селекция (получить максимальное разнообразие).

Рынок лекарственных препаратов

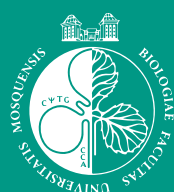
В настоящее время производство лекарственных препаратов для фармацевтики и ветеринарии представляет собой важнейшую и динамично развивающуюся часть мировой индустрии.

В 2013 году глобальный объем фармацевтического рынка составил около 970 млрд. долларов США с тенденцией к росту около 3-4% в год.

Объем биотехнологического сектора фармацевтического рынка оценивался в более чем 270 млрд. долларов США, доля производства различных биофармацевтических субстанций в общем объеме биотехнологического сектора превысила 62%, т.е. 167,4 млрд. долларов США.

Фармацевтический рынок России занимает 7 место среди фармрынков мира, в 2013 году его объем составил 21 млрд. долларов США в ценах конечного потребления. Приоритетной задачей является импортозамещение.

Источниками сырья могут служить сбор дикорастущих растений и плантационное выращивание.



БИОЛОГИЧЕСКИЙ
ФАКУЛЬТЕТ
МГУ ИМЕНИ
М.В. ЛОМОНОСОВА



teach-in
ЛЕКЦИИ УЧЕНЫХ МГУ

