

Минеральное питание (2)

Механизмы транспорта

Поступление в клетку.

Перенос через плазмалемму.

- 1. Электрофизиологический подход**
- 2. Кинетический подход**
- 3. Молекулярно биологический подход**

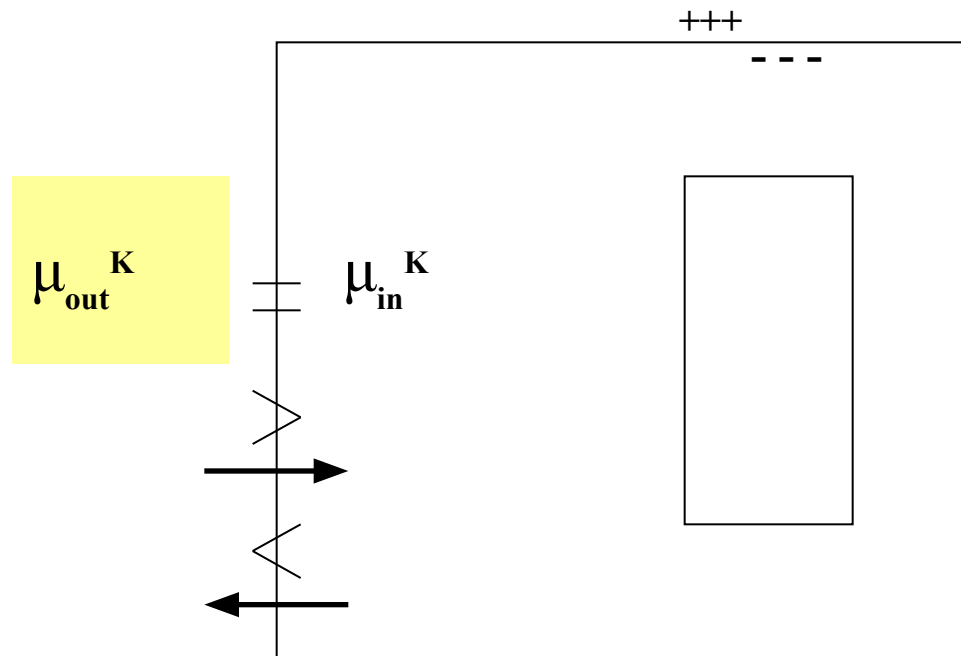
Электрофизиологический подход

Потенциал Нернста может быть использован, чтобы установить тип транспорта: активный или пассивный?

$$\mu = \mu_0 + RT \ln a + zFE$$

μ - электрохимический потенциал

Потенциал Нернста – градиент электрического потенциала на мембране, уравновешенный градиентом химического потенциала для данного иона по обе стороны мембраны



$$\mu_{\text{out}}^{\text{K}} = \mu_0^{\text{K}} + RT \ln a_{\text{out}}^{\text{K}} + zFE_{\text{out}}$$

$$\mu_{\text{in}}^{\text{K}} = \mu_0^{\text{K}} + RT \ln a_{\text{in}}^{\text{K}} + zFE_{\text{in}}$$

$$F(E_{\text{out}} - E_{\text{in}}) = RT \ln a_{\text{out}}^{\text{K}} / a_{\text{in}}^{\text{K}}$$

$$\Delta E = RT/F \ln a_{\text{out}}^{\text{K}} / a_{\text{in}}^{\text{K}}$$

$$\Delta E = E_{\text{N}}$$

Электрофизиологический подход позволяет предсказать тип транспорта

- Пассивный транспорт – движение иона через мембрану в сторону его меньшего электрохимического потенциала.
- Активный транспорт - перемещение иона через мембрану в сторону его более высокого электрохимического потенциала.

Сравнение наблюдаемых и предсказанных равновесных концентраций ионов в тканях корней гороха (мМ L-1), мембранный потенциал –110 mV (Plant Physiol (book), 1998, p. 130 из Higinbotham et al., 1967 г.).

Ион	Концентрация в среде (мМ , C_o)	Концентрация (C_i)	
		рассчитанная	измеренная
K^+	1	74	75
Na^+	1	74	8
Mg^{2+}	0,25	1340	3
Ca^{2+}	1	5360	2
NO_3^-	2	0,0272	28
Cl^-	1	0,0136	7
$H_2PO_4^-$	1	0,0136	21
SO_4^{2-}	0,25	0,00005	19

- **Пассивный транспорт** – движение иона через мембрану по градиенту его электрохимического потенциала.
- **Активный транспорт** - перемещение иона через мембрану против его электрохимического потенциала.

Пассивный ионный транспорт по каналу.

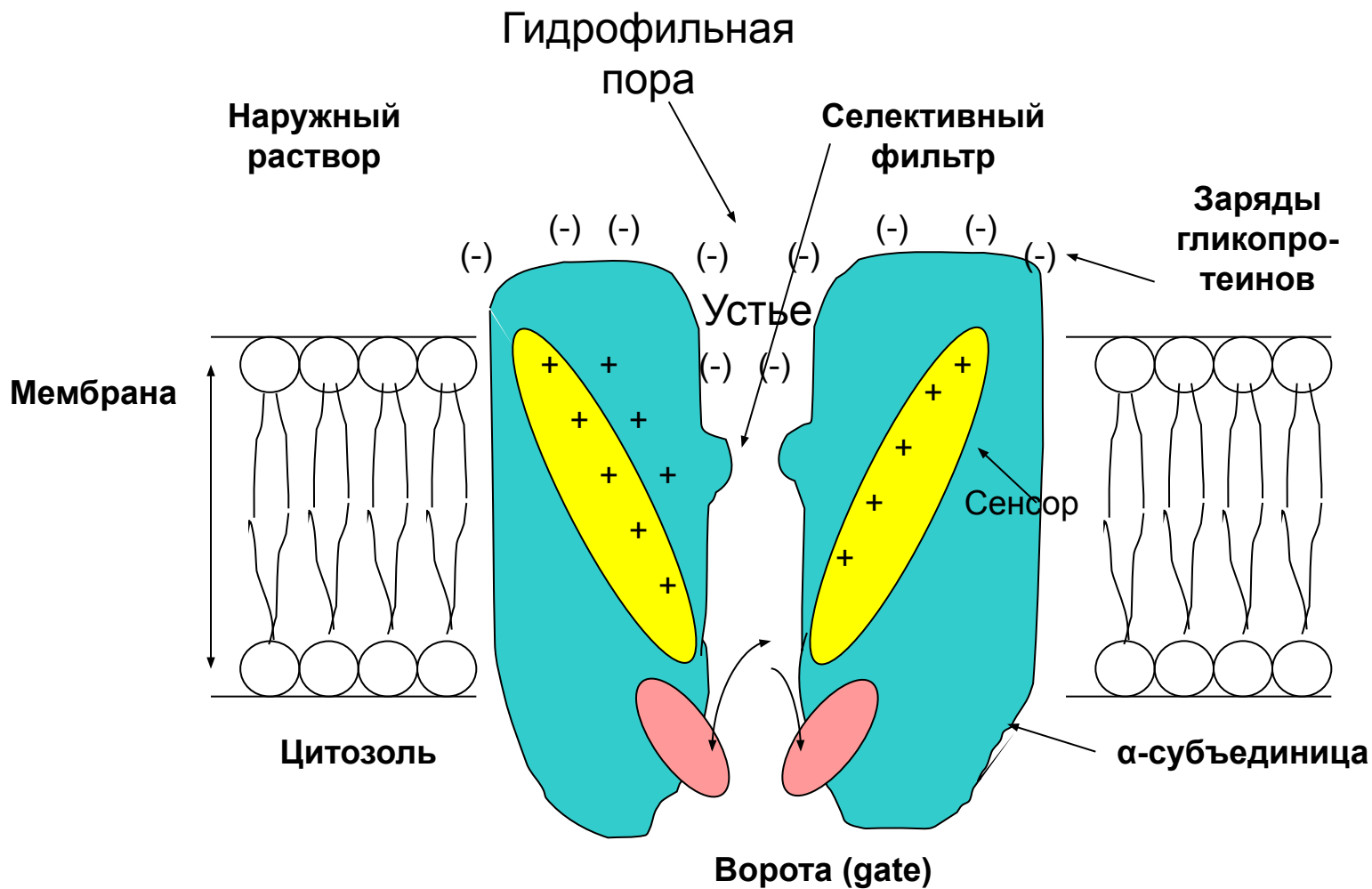
Ионные каналы – интегральные мембранные белки, образующие «пору» в мембране

ФР под ред. И.П. Ермакова, с. 330 - 334

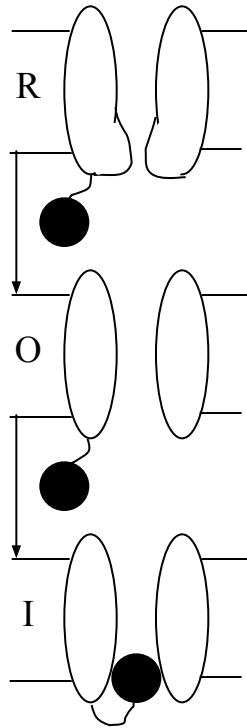
Транспорт иона по каналу зависит от

- потенциала на мембране
- концентрации иона по обе стороны мб
- свойств канального белка
- сигнала эндогенной природы

Модель потенциал - зависимого ионного канала.



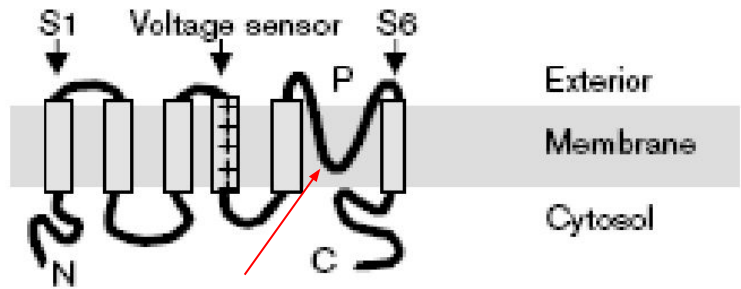
Воротный механизм «работы» канальных белков



Два дискретных состояния
канального белка:
канал открыт/канал закрыт

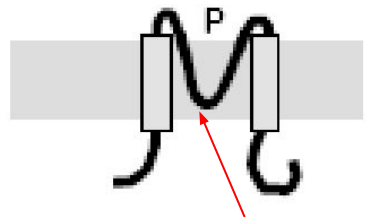
4 типа белков K⁺ каналов 1999

Shaker-type



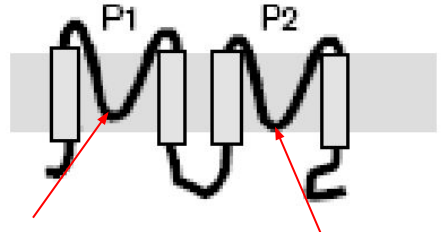
кл. ЖИВОТНЫХ И
растений (6)

IRK-type



кл. ЖИВОТНЫХ И
растений (2)

TWIK-type



кл. ЖИВОТНЫХ И
растений (4)

ТOK-type



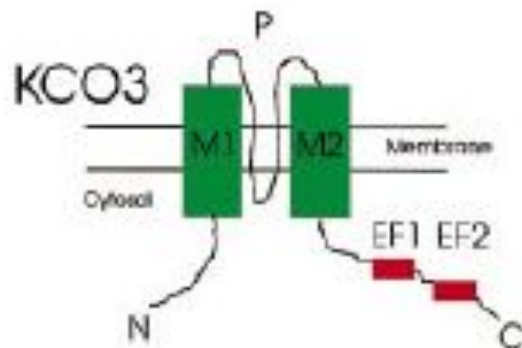
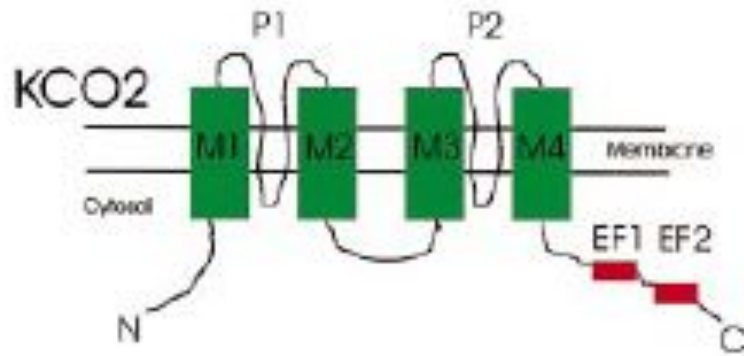
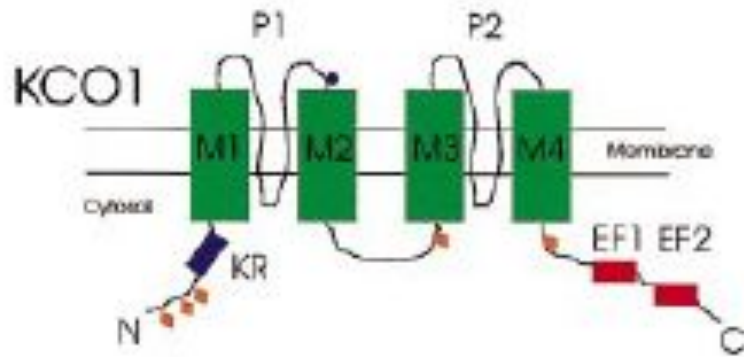
кл. дрожжей (8)

Sabine Zimmermann* and Herve Sentenac
«Plant ion channels: from molecular structures
to physiological functions»

Current Opinion in Plant Biology 1999,
2:477-482

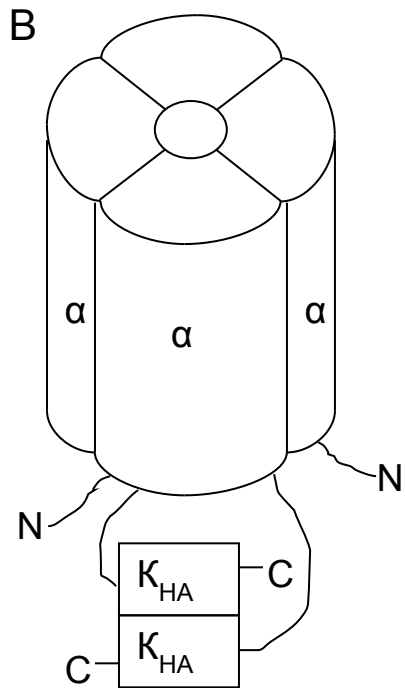
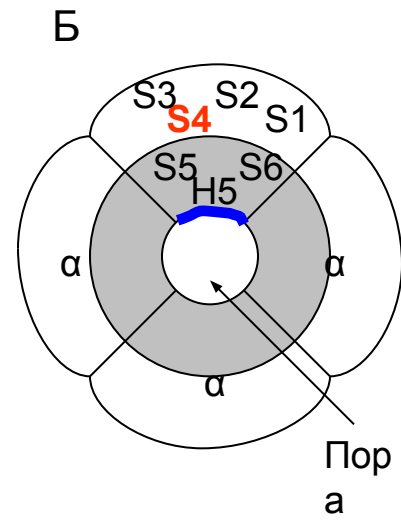
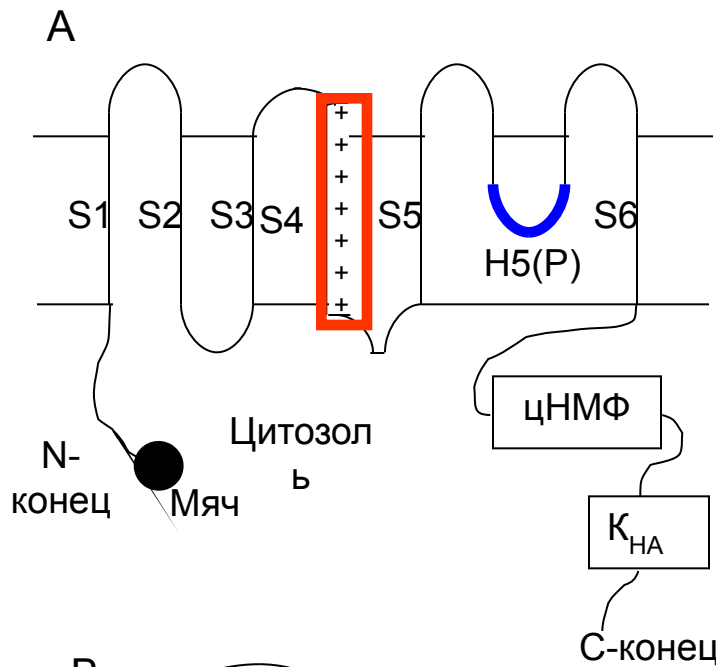
Czempinski et al.

A. thaliana



Новые типы белков K^+ каналов у растений июнь, 1999

Впервые о двупоровых K каналах у растений было сообщено в 1997 г.
(Czempinski et al., 1997)

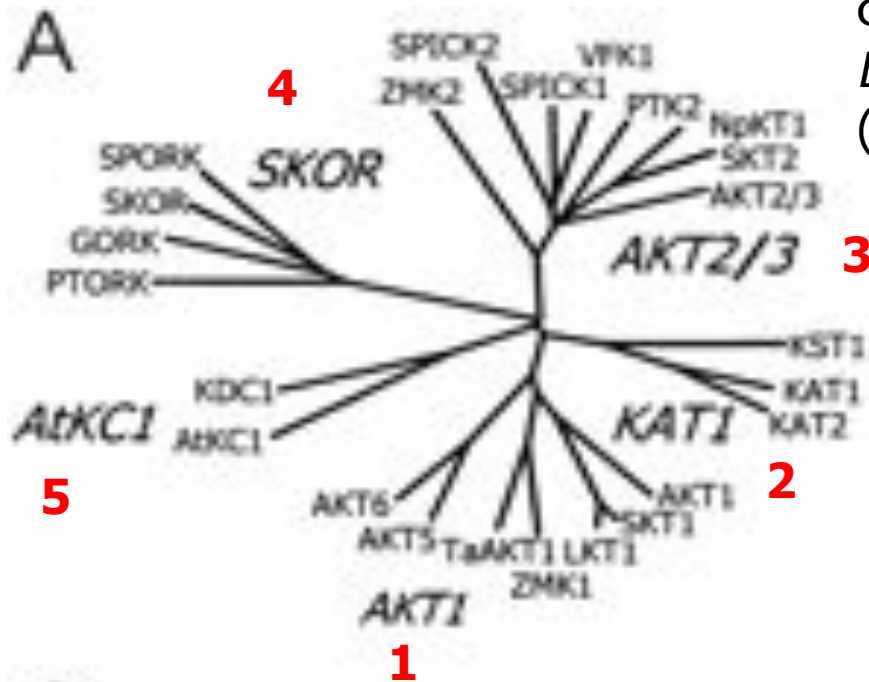


**Структура калиевого канала
Shaker-типа**

K⁺-каналы Шейкерного типа у растений:

5 семейств по гомологии аминокислотных последовательностей

Филогенетическое древо K-каналов Шейкерного типа у растений (модифицировано по Ache *et al.*, 2000).



AKT1 – *Arabidopsis thaliana* K⁺ transporters

KAT1 – K⁺ *Arabidopsis thaliana* transporters

AKT2/3 –

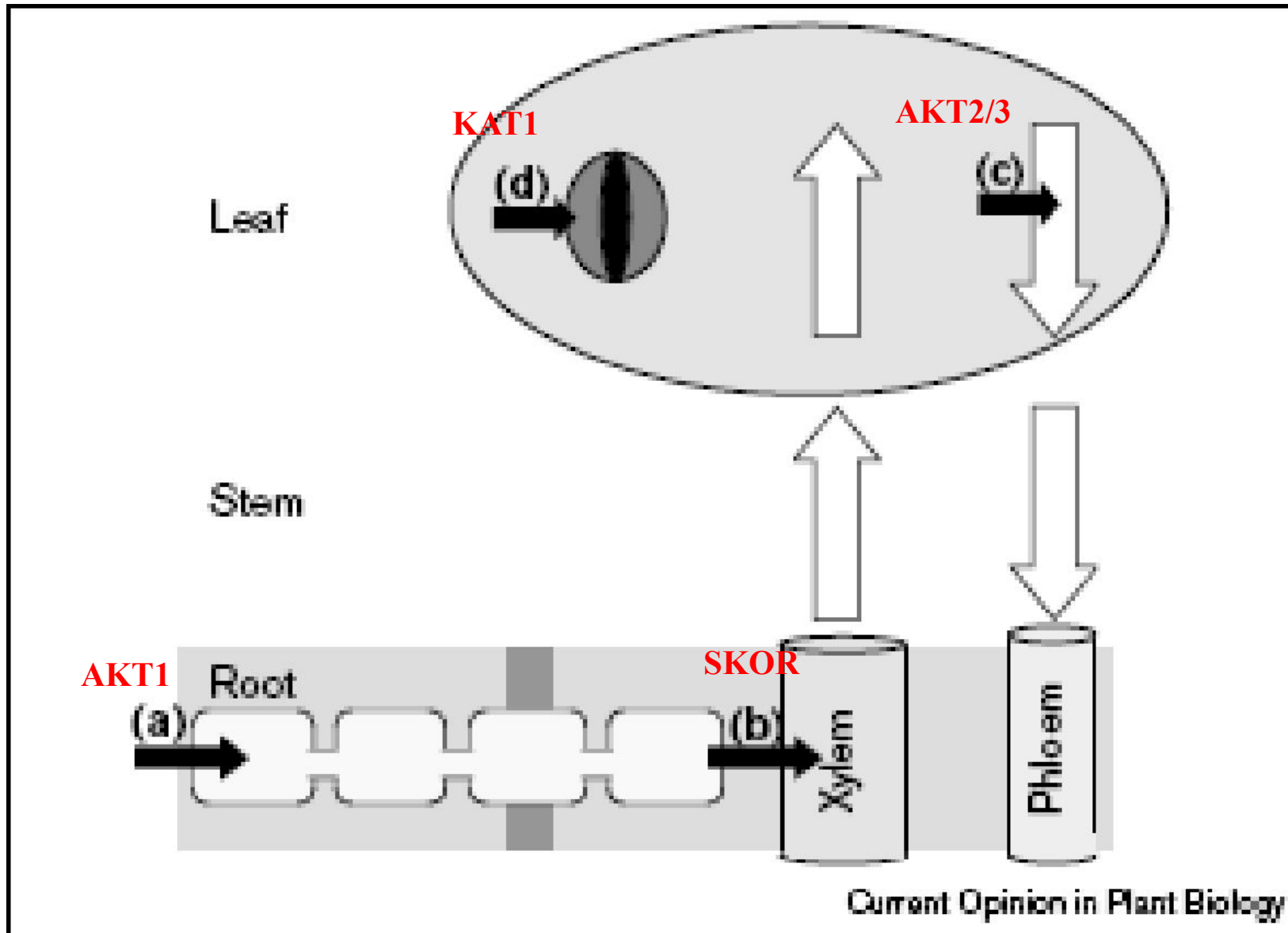
SKOR – stellar K⁺ outward rectifier

AtKC1 – *Arabidopsis thaliana* K⁺ channel



Расположение K^+ каналов разных типов у *Arabidopsis*

Sabine Zimmermann* and Herve Sentenac† «Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions», Current Opinion in Plant Biology 1999, 2:477–482



Ионные каналы в растительных клетках

- 1. Катионные и анионные**
- 2. “Входящие” (in) и “выходящие” (out)**
- 3. Селективность: специфические и неспецифические**
- 4. Потенциал-зависимые и рецептороуправляемые**
- 5. Быстрые и медленные**

Активный транспорт

Способы (или механизмы) активного поглощения различаются по формам потребляемой энергии.

Первичный активный транспорт

Вторичный активный транспорт

АТФ

ΔpH

PP_{HH}

Первичный активный транспорт

H^+	H^+ -АТФаза плазмалеммы (Р-типа)
	H^+ -АТФаза тонопласта (V-типа)
	Пирофосфатаза Тн
Ca^{2+}	Ca^{2+} АТФаза ПМ (Р-типа)
	Ca^{2+} АТФаза ЭР (Р-типа)
Na^+	Na^+ АТФаза плазмалеммы
Ионы тяжелых Ме Аминокислоты Органические кислоты Пептиды липиды	АВС транспортеры

H-помпы

отвечают за создание и поддержание
потенциала на мембране

$$E_{\text{мб}} = E_{\text{электрогенный}} + E_{\text{диффузионный}}$$

H⁺-АТФазы плазмалеммы

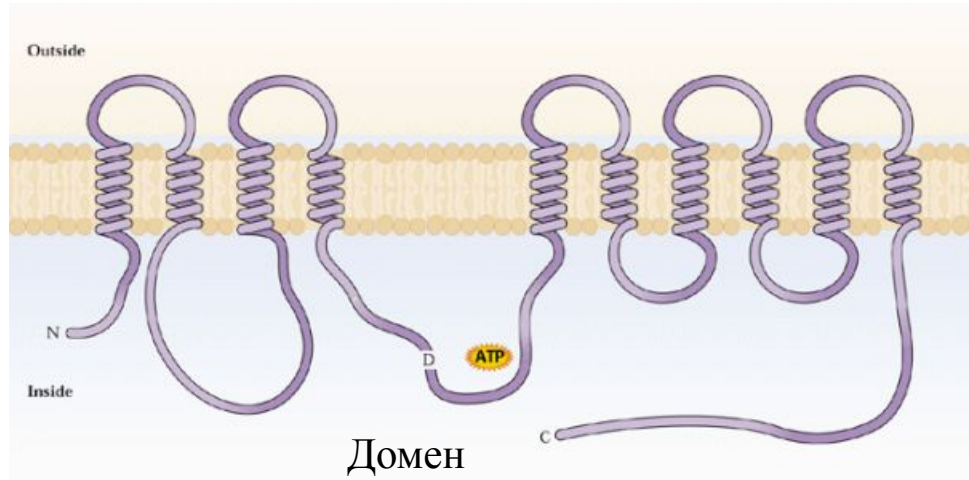
H⁺-АТФаза тонопласта

Пирофосфатаза тонопласта

H⁺-АТФаза плазмалеммы Р-типа

- **Один большой полипептид 100 - 106 кДа**
- **Регулируется по принципу «фосфорилирование/дефосфорилирование» по серину протенкиназами**
- **Образует промежуточный фосфорилированный интермедиат (по аспартиловому концу фермента)**
- **Ингибируется ванадатом (блокирует фосфорилирование по аспартиловому концу фермента)**
- **Ингибируется DES, DCCD, сульфгидрильными реагентами**
- **Сходна с АТФазами животных клеток: Na,K-АТФаза; H,K-АТФаза; Ca-АТФаза)**
- **Зависит от градиента $\Delta\mu\text{H}^+$**
- **K⁺-зависимая**

Структура белка H-АТФазы плазмалеммы

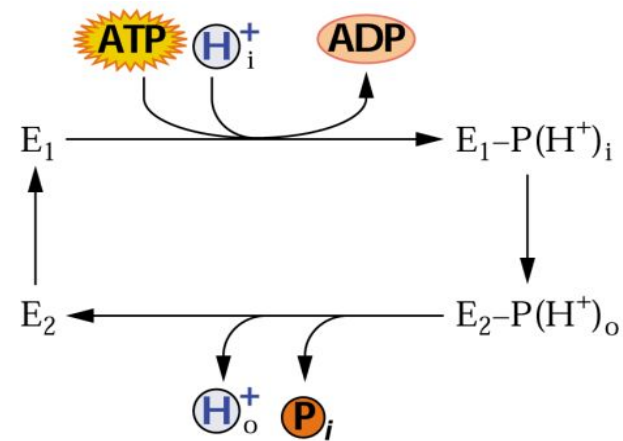


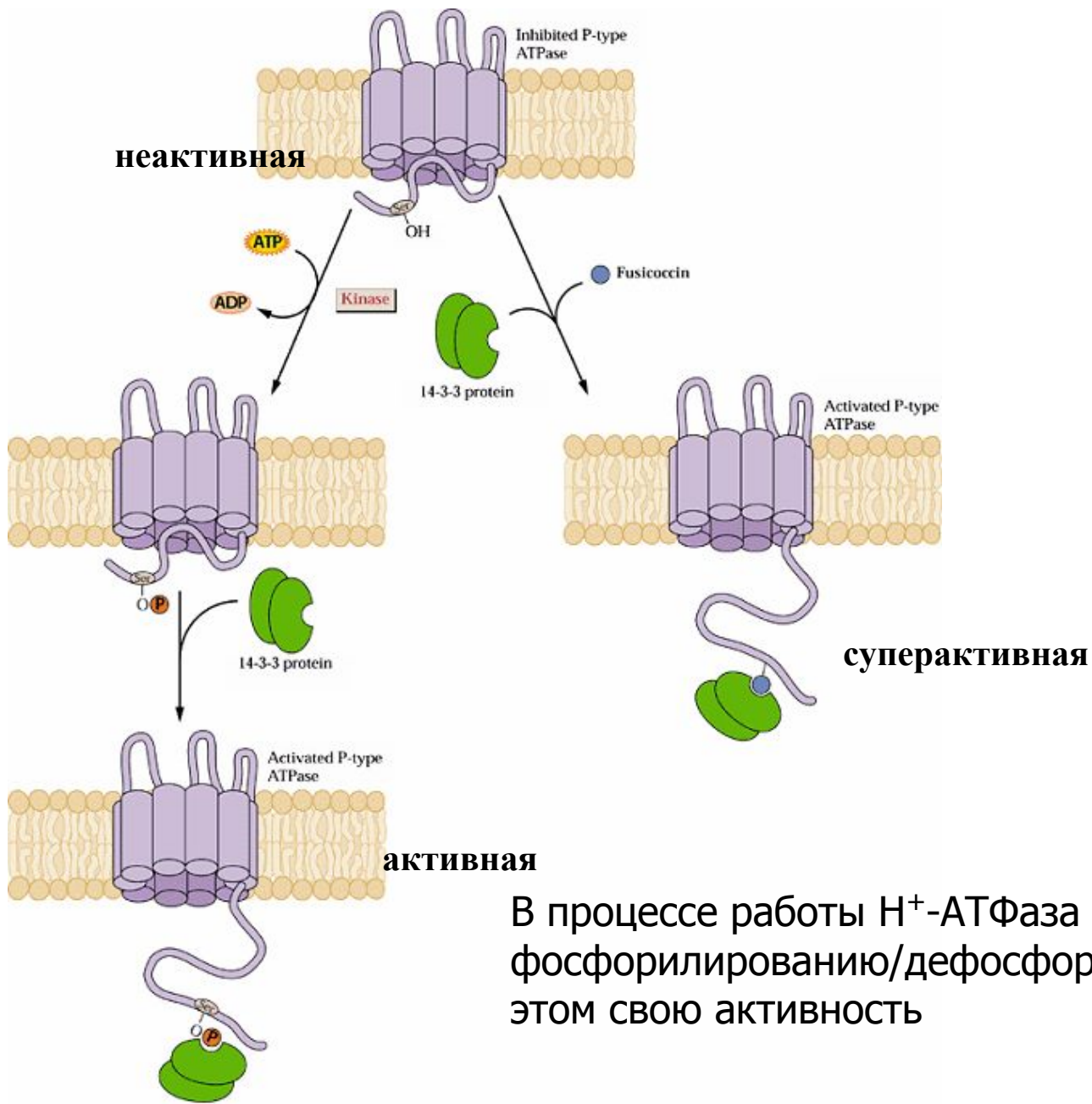
Домен
связывания
Mg-АТФ

Один полипептид
100 – 106 кДа

E1 связывает H (in)

E2 освобождает H (out)

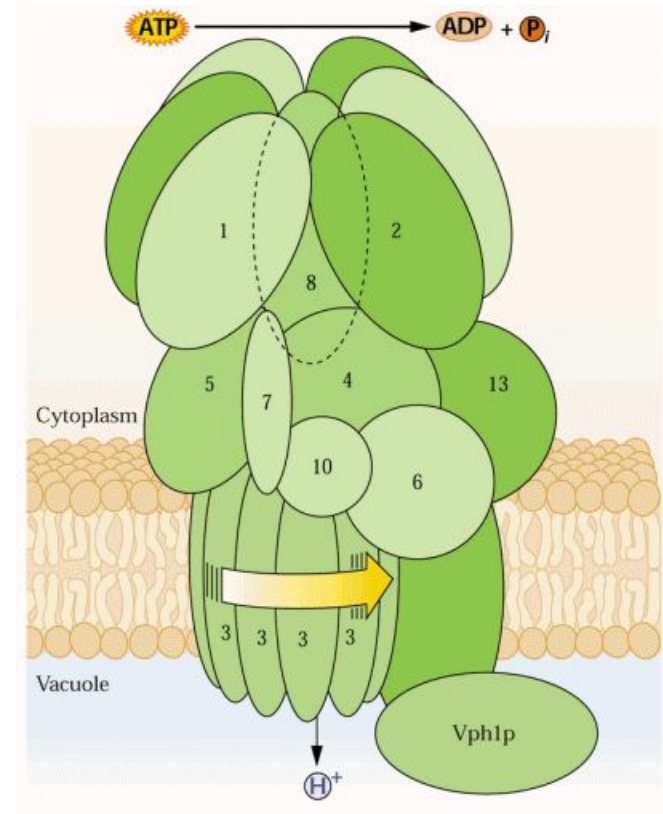




В процессе работы H^+ -АТФаза Р-типа подвергается фосфорилированию/дефосфорилированию, меняя при этом свою активность

Н-АТФаза тонопласта (V – типа)

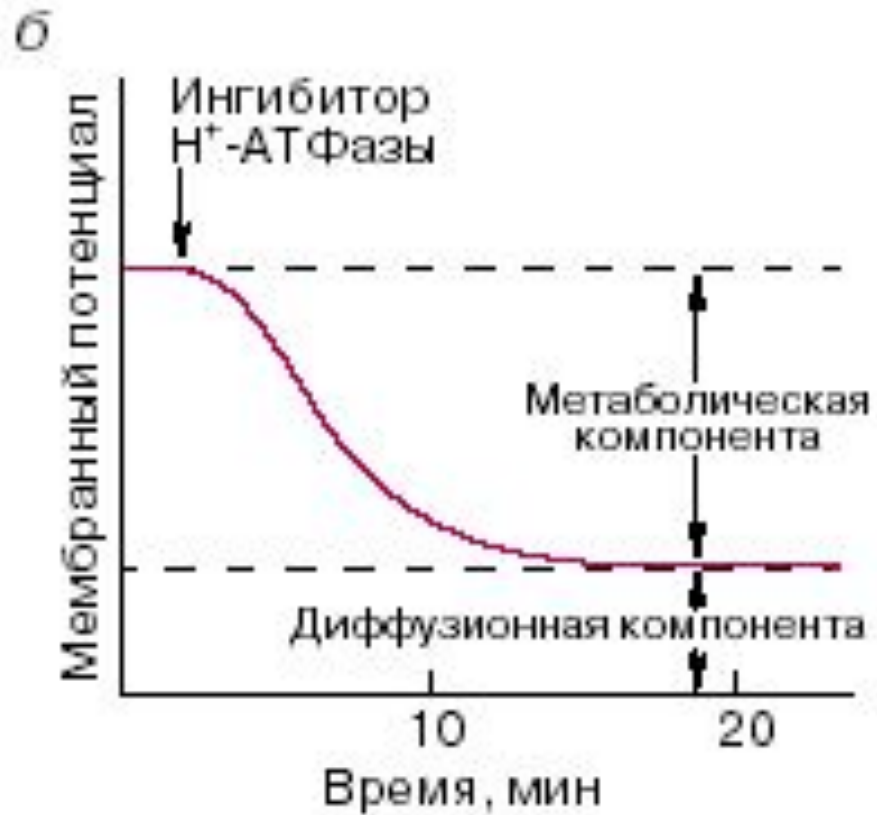
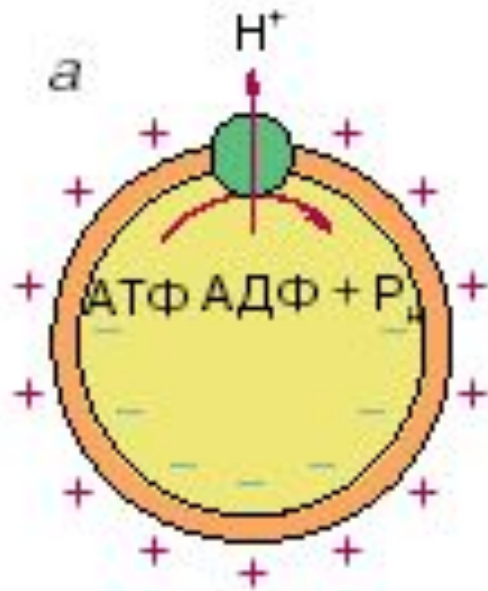
- Многомерная структура 70 кДа, 60 кДа, 16 кДа (7-10 субъединиц)
- Анионзависимая (нитрат ингибирует, хлорид стимулирует)
- Нечувствительна к ванадату, азиду, олигомицину
- Зависит от градиента $\Delta\mu\text{H}^+$



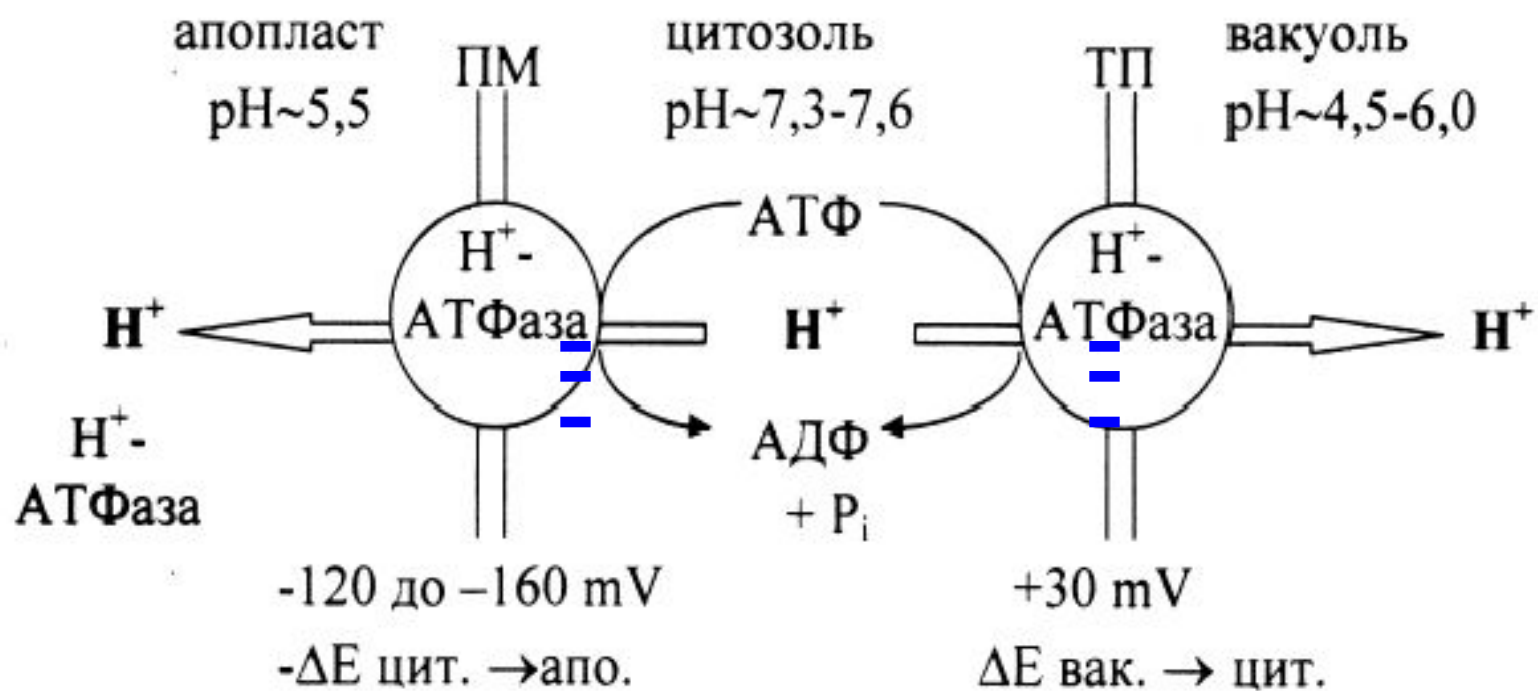
Пирофосфатаза тонопласта

- **64 – 67 кДа**
- **катионзависимая (стимулируется K^+ , ингибируется Na^+ , Ca^{2+})**
- **высокоспецифична к пирофосфату**
- **зависит от концентрации магния**
- **зависит от градиента $\Delta\mu H^+$**
- **ингибируется сульфгидрильными реагентами**

Метаболическая (электрогенная) и диффузионная компоненты E_{mb}



3. Электрогенный потенциал (E_p)



Ca^{2+} -АТФазы

Ca^{2+} АТФазы принадлежат к большому кругу АТФаз Р-типа

Ca^{2+} АТФазы ПМ

Ca^{2+} АТФазы ЭР

У растений в отличие от животных Ca^{2+} АТФазы ПМ типа локализованы не только на плазмалемме, но и на эндомембранах

ABC-транспортеры

Транспортные белки, которые используют энергию гидролиза АТФ для транспорта через мембраны самых разных химических агентов

Представлены у всех организмов

Очень многочисленное семейство

Арабидопсис : 131 различных белков

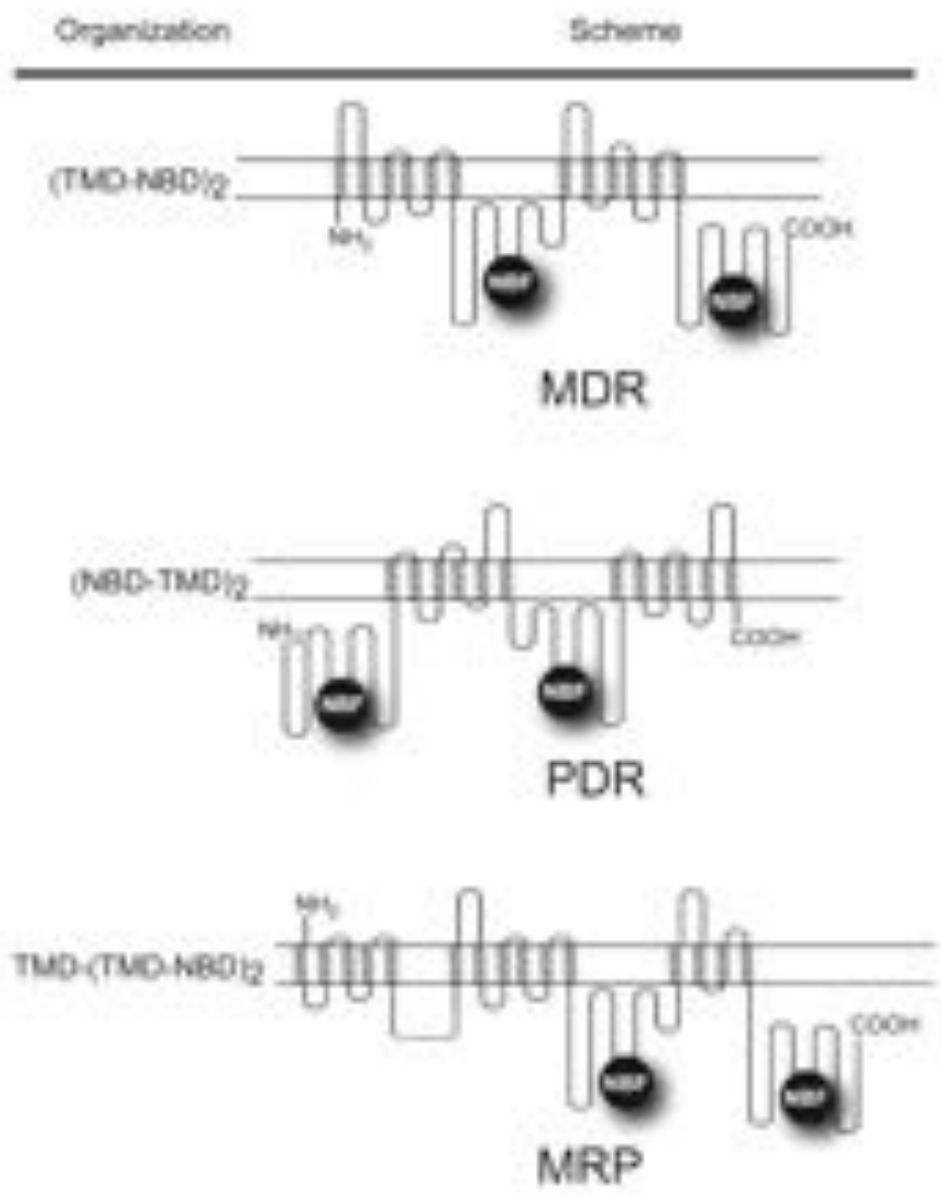
3 основных мультисемейства:

pleiotropic drug resistance (PDR),

multidrug resistance (MDR),

multidrug resistance-associated protein (MRP)

A



Plant Physiol, March 2003, Vol. 131, pp. 1169-1177

UPDATE ON ATP-BINDING CASSETTE TRANSPORTERS

The ATP-Binding Cassette Transporters: Structure, Function, and Gene Family Comparison between Rice and Arabidopsis¹

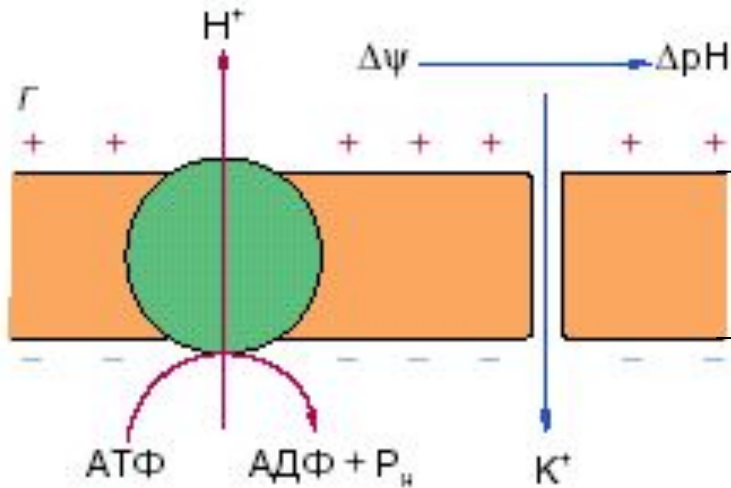
Michal Jasinski,² Michal Jasinski,² Eric Ducos,² Michal Jasinski,² Eric Ducos,² Enrico Martinoia, and Marc Boutry*

Unité de Biochimie Physiologique, Institut des Sciences de la Vie, Université catholique de Louvain, Croix du Sud 2-20, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium (M.J., E.D., M.B.); and Laboratory of Molecular Plant Physiology, Institute of Plant Biology, Zurich University, CH-8008 Zurich, Switzerland (M.J., E.M.)

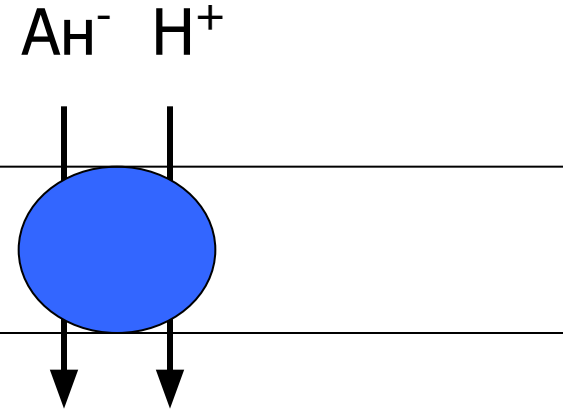
Функции H⁺-помп

- 1. Вклад в поддержание ΔE на мембране.**
- 2. Обеспечение движущей силы для пассивного и активного транспорта веществ.**
- 3. Поддержание pH в компартментах клетки.**

$$\Delta E = \Delta \psi + \Delta p\text{H}$$



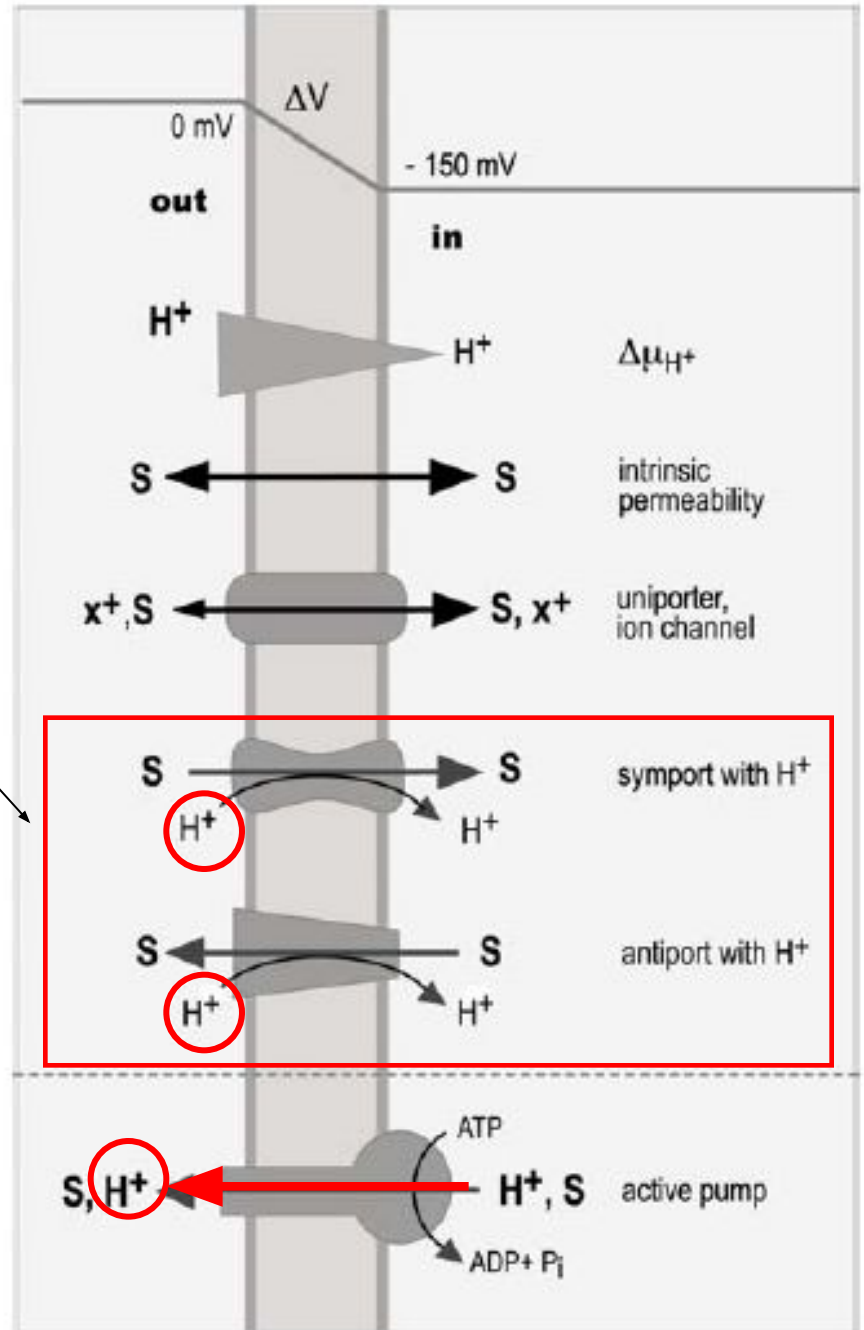
Размен $\Delta\psi$ на $\Delta p\text{H}$

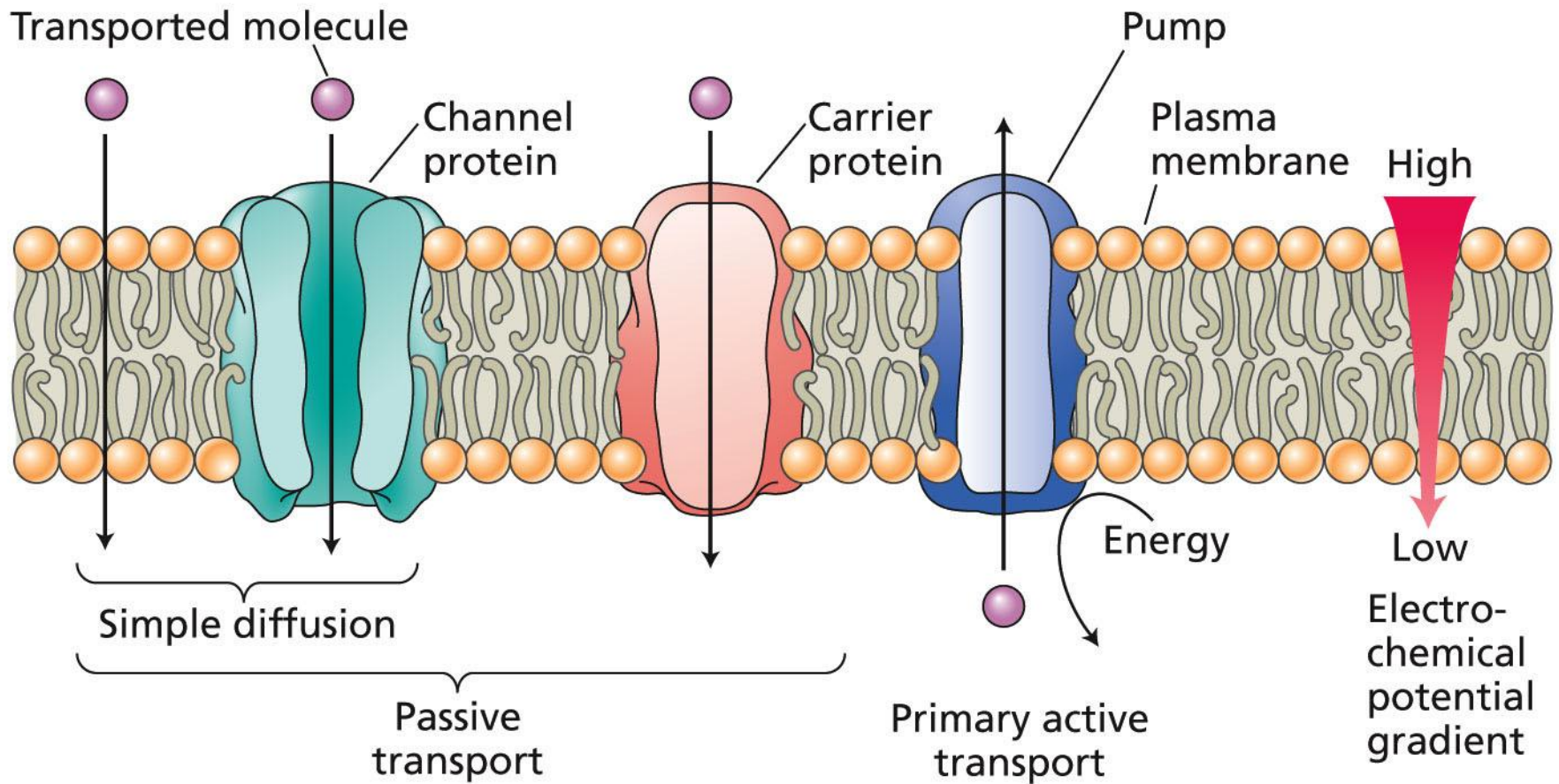


**Вторичный активный транспорт
(симпорт)**

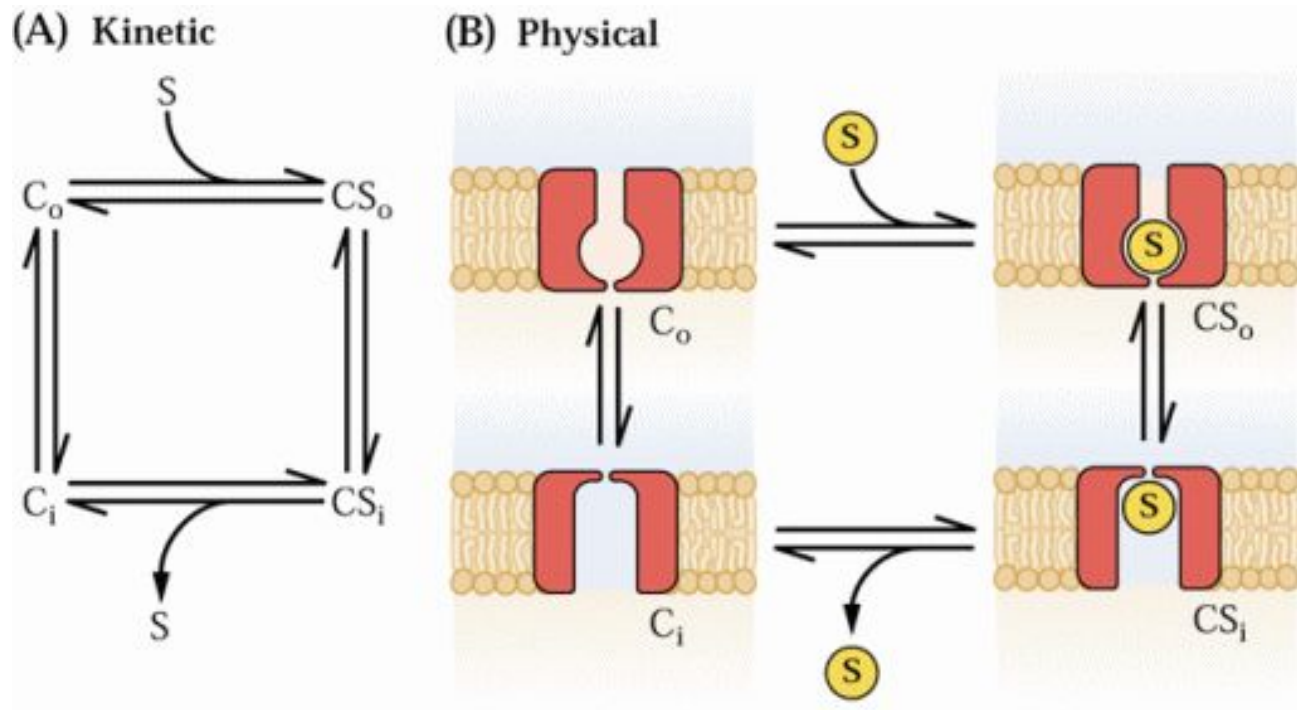
Форма потребляемой
энергии $\Delta p\text{H}$

Вторичный активный транспорт

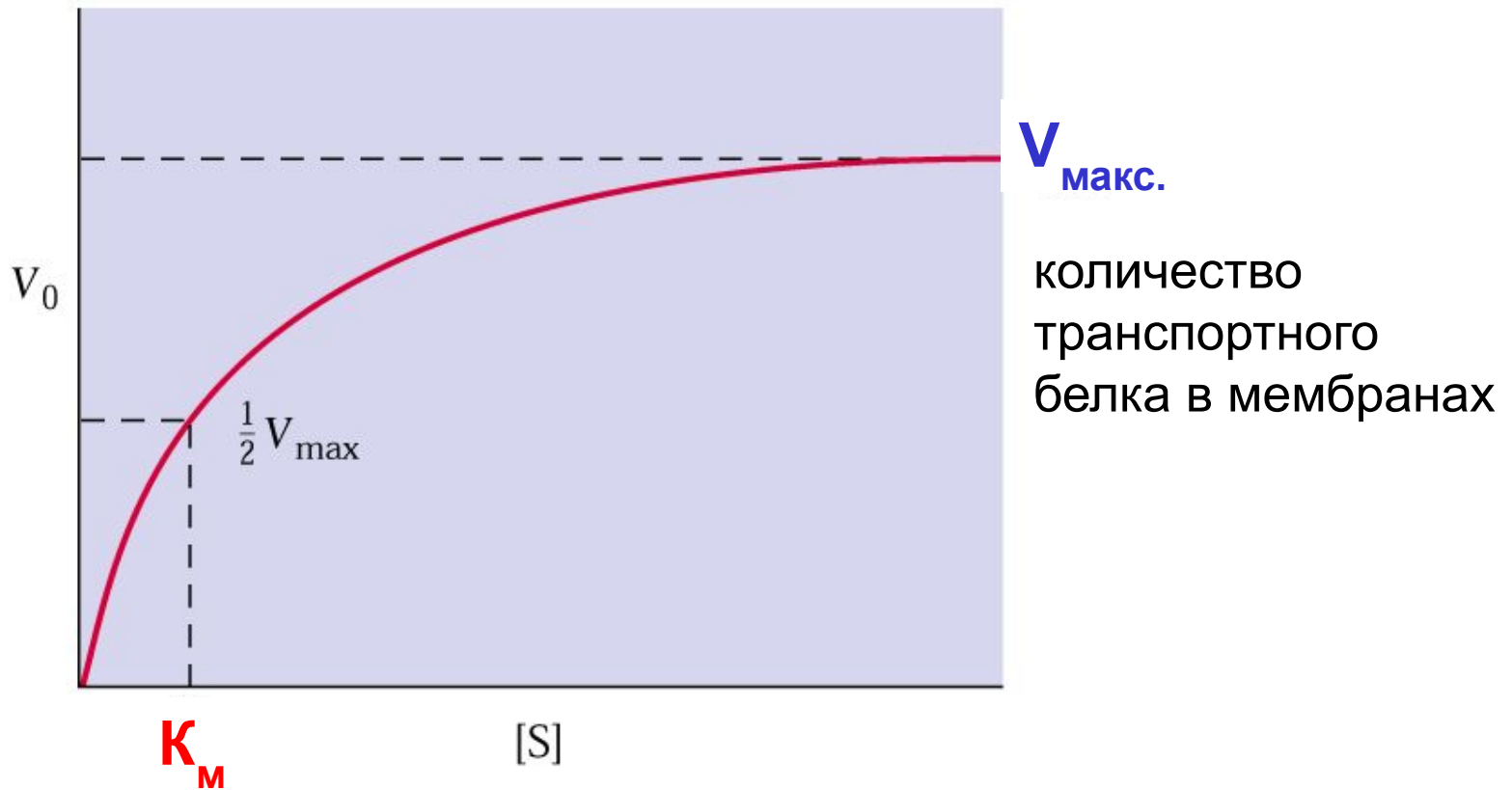




Кинетический подход. Белки переносчики.



Зависимость поглощения ионов от их концентрации в среде сходна с кинетикой ферментативной реакции



V_{\max} .

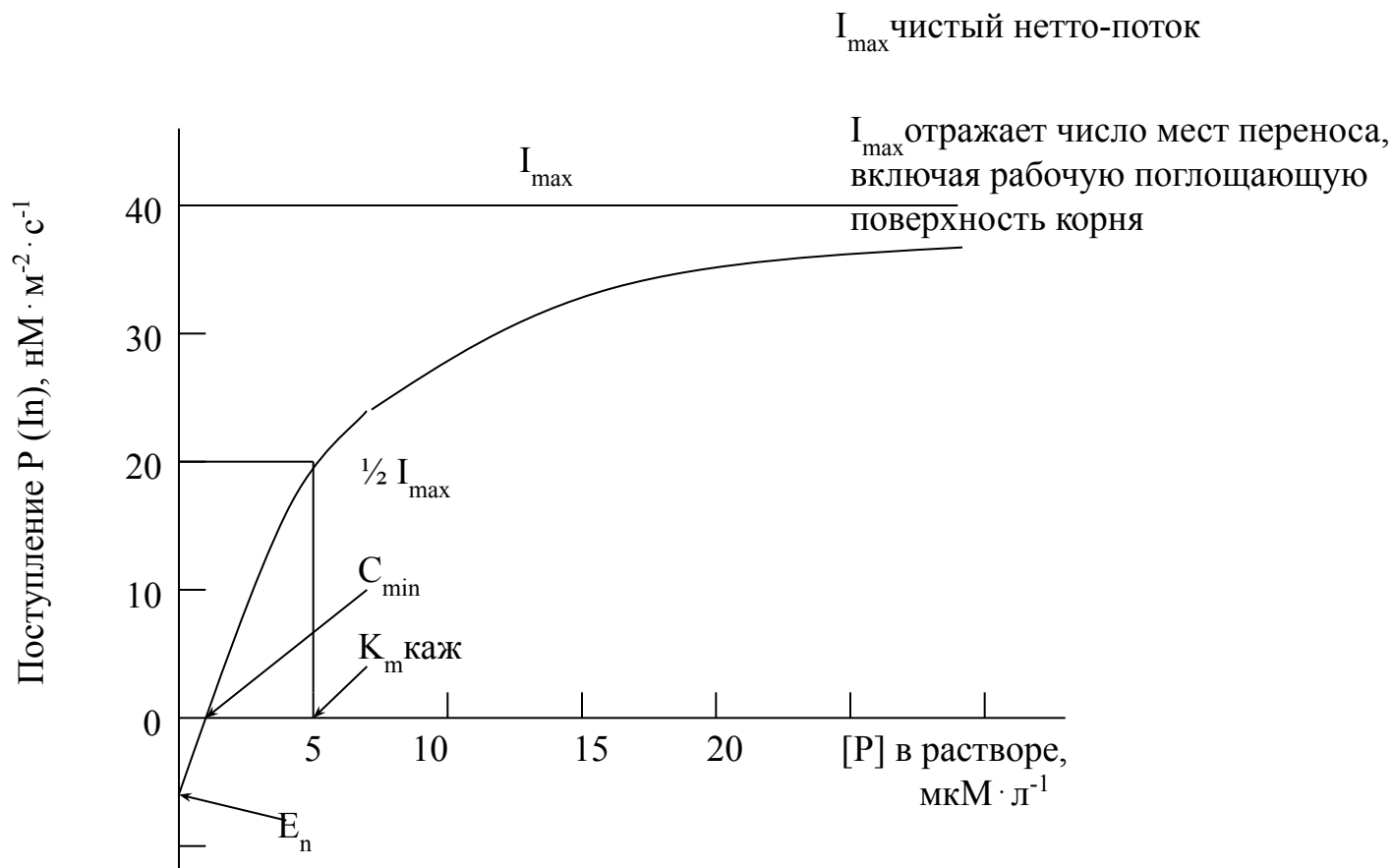
количество
транспортного
белка в мембранах

K_M

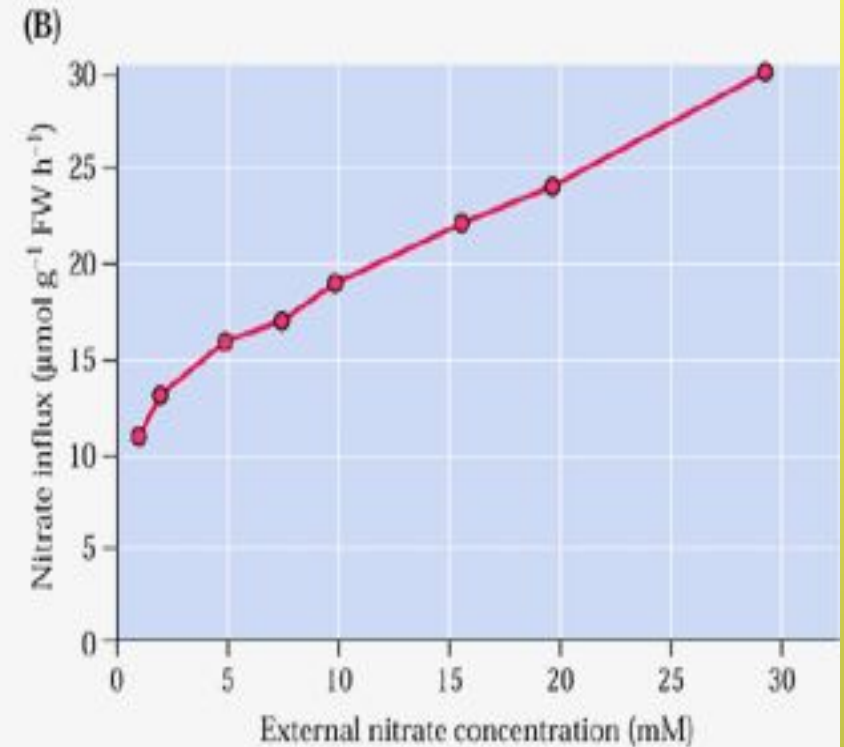
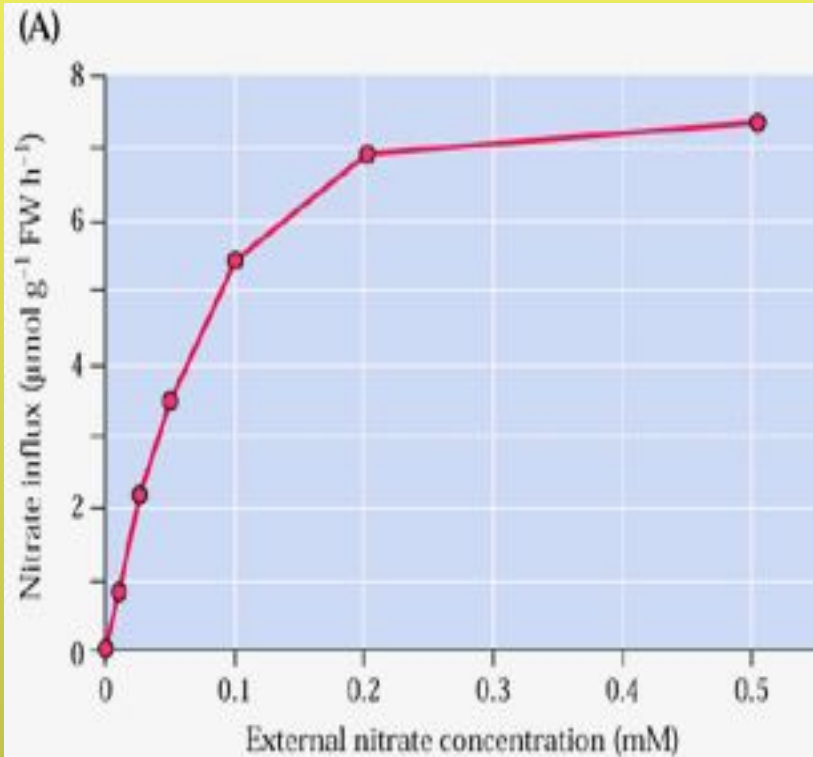
$[S]$

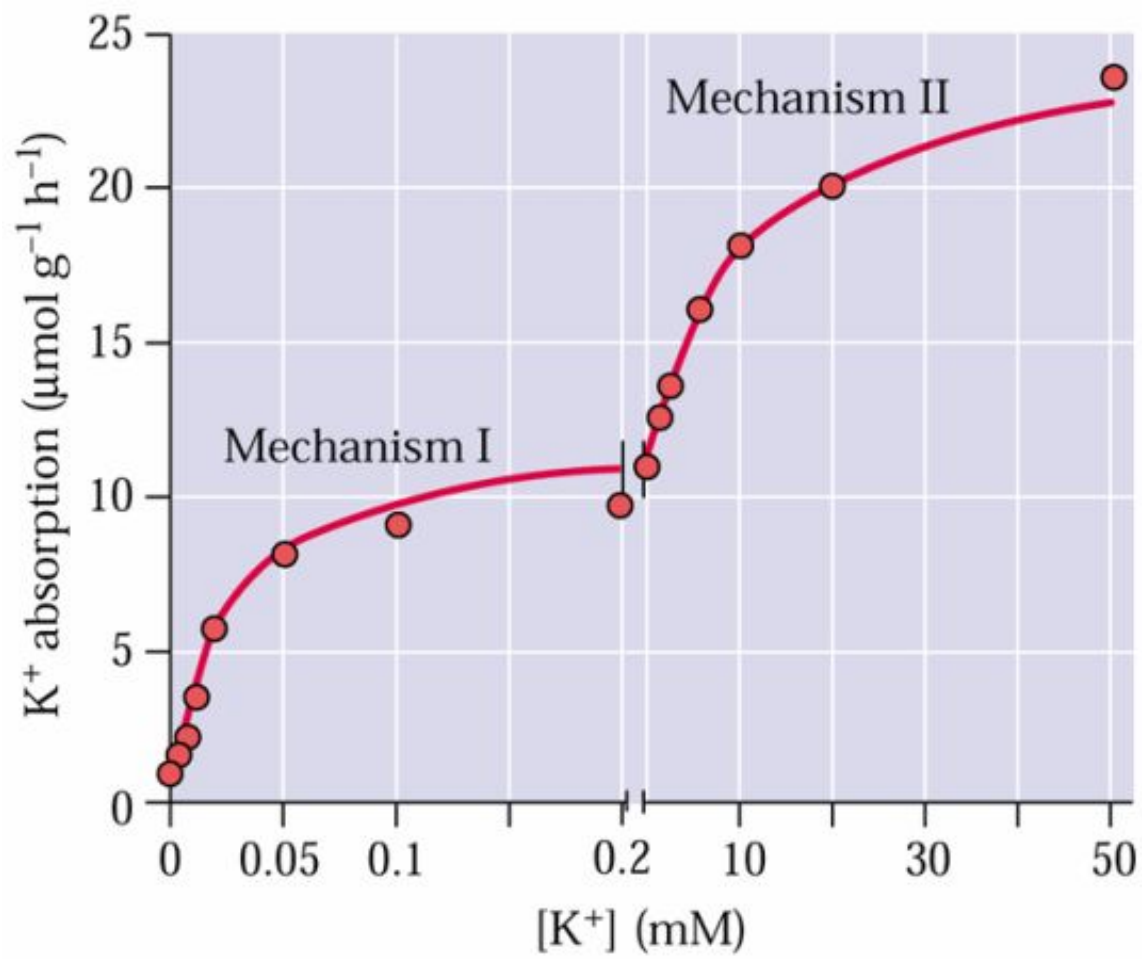
средство транспортного белка к
переносимому иону

Кинетика поглощения ионов интактным растением



**Двойная кинетика поглощения.
Переносчики
высоко и низкого сродства.**





Фосфатные транспортеры

Высокого сродства (PT2) ($K_m = 3 - 7$ мкмолей)

Низкого сродства (PT1) ($K_m = 50 - 330$ мкмолей);

Сульфатные транспортеры

высокого сродства Sultr1 или ST1
(K_m порядка 10 мкмолей)

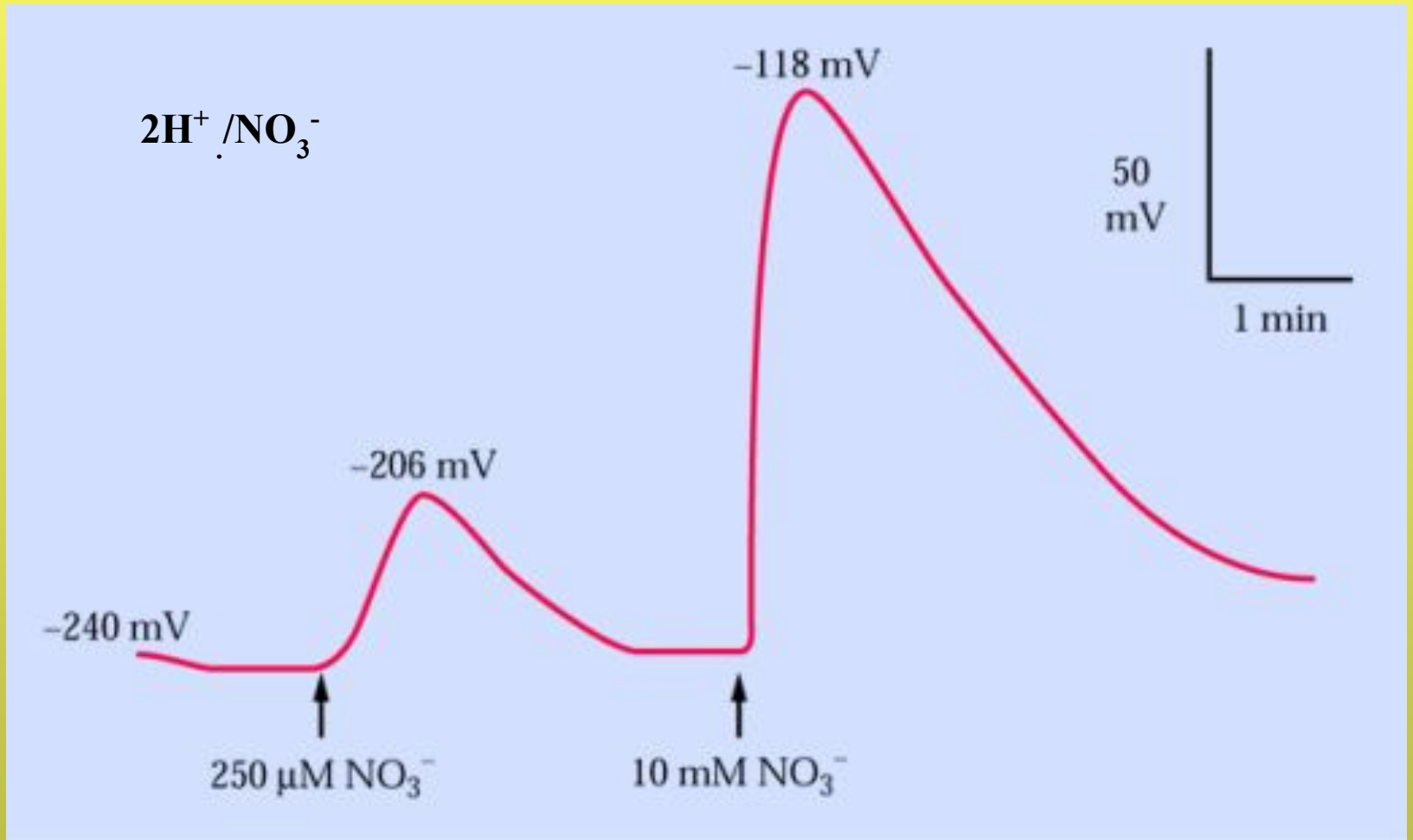
низкого сродства Sultr2 или ST2 (K_m
порядка 100 мкмолей)

Нитратные транспортеры

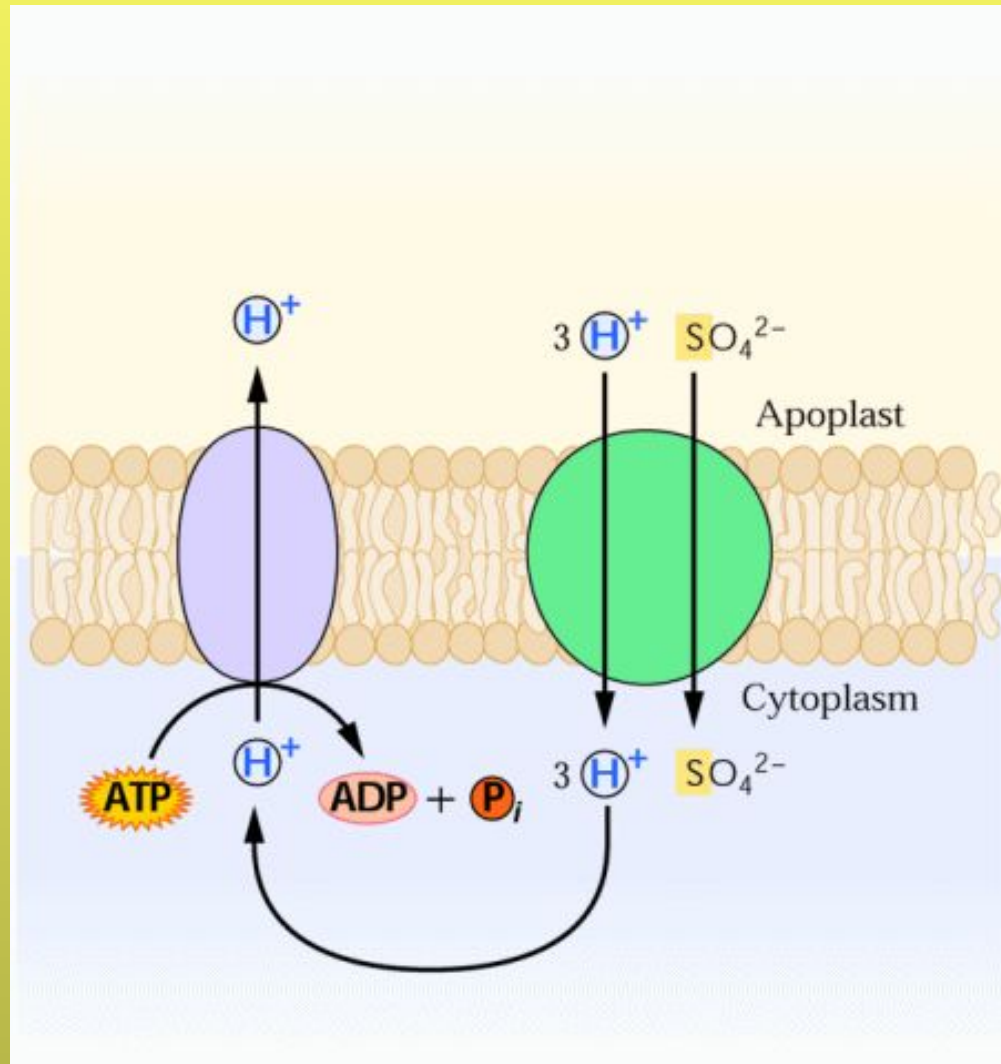
NRT2 переносчики NO_3^- высокого сродства K_m от 10 до 100 μM .

NRT1 переносчики с двойственными свойствами (с высокими и низкими K_m) или переносчики низкого сродства.

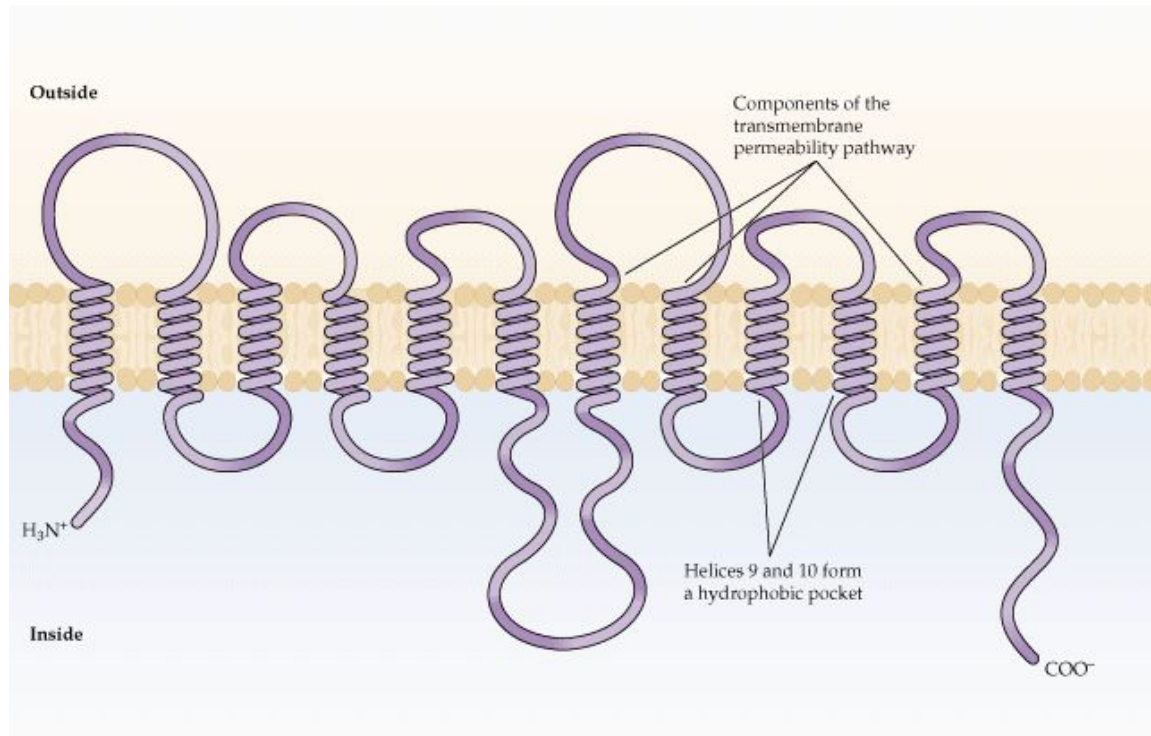
Механизм транспорта - симпорт с протоном



Вторичный активный транспорт (Сульфатный транспортер)



Переносчики, пермеазы, портеры, транспортеры

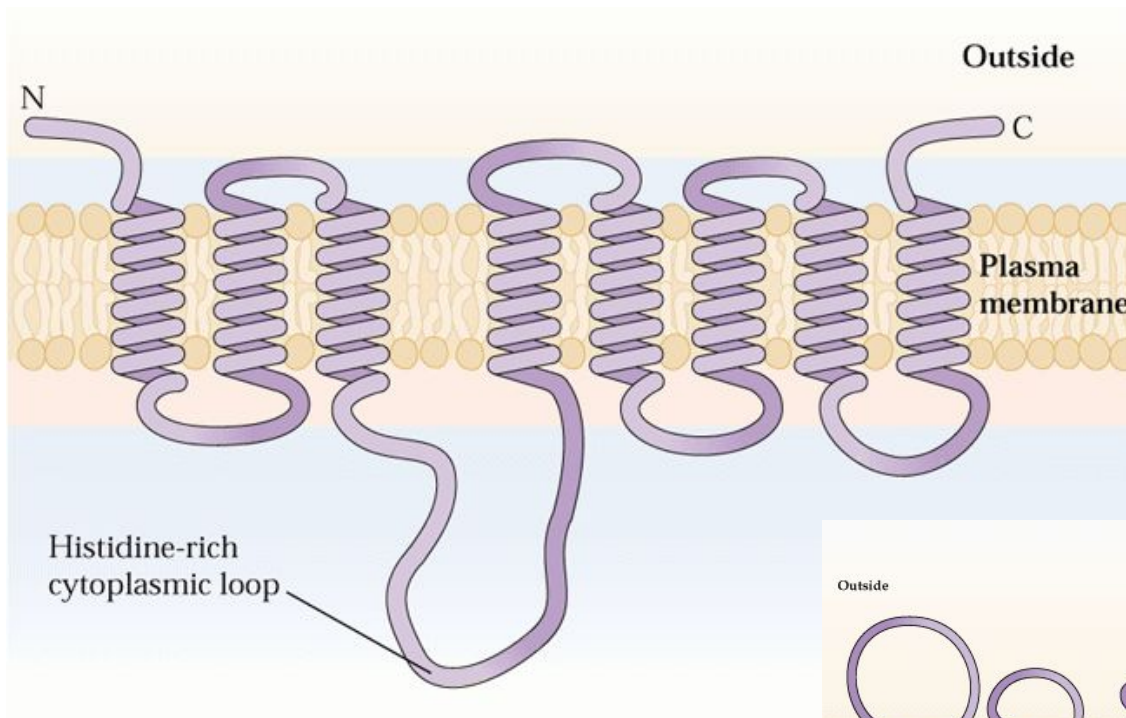


Главное суперсемейство транспортных белков

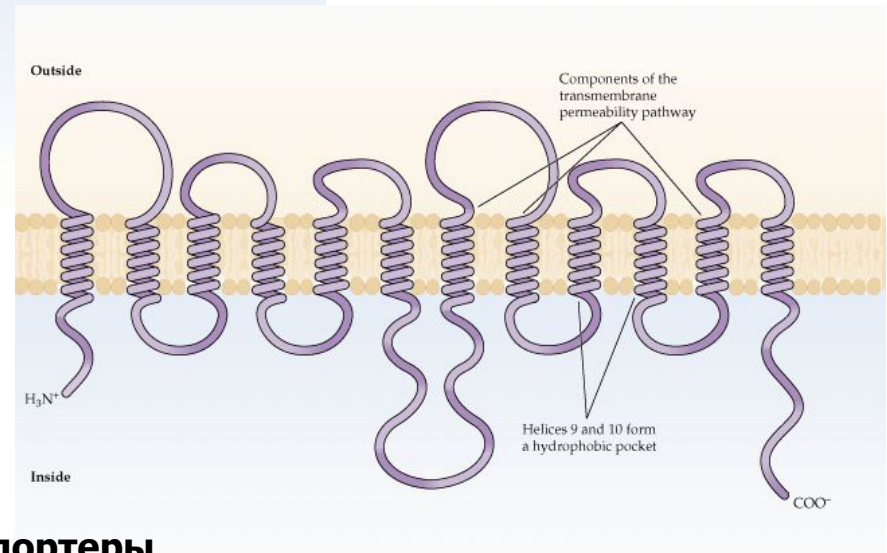
MFS (Major Facilitating Superfamily) – 12 трансмембранных доменов:

Фосфатный, нитратный, сульфатный транспортеры

Микроэлементы: Mo, Zn, B, Cu, Mn
Структура белка транспортера микроэлементов.
ZIP семейство



ZIP семейство: 8
трансмембранных
ДОМЕНОВ



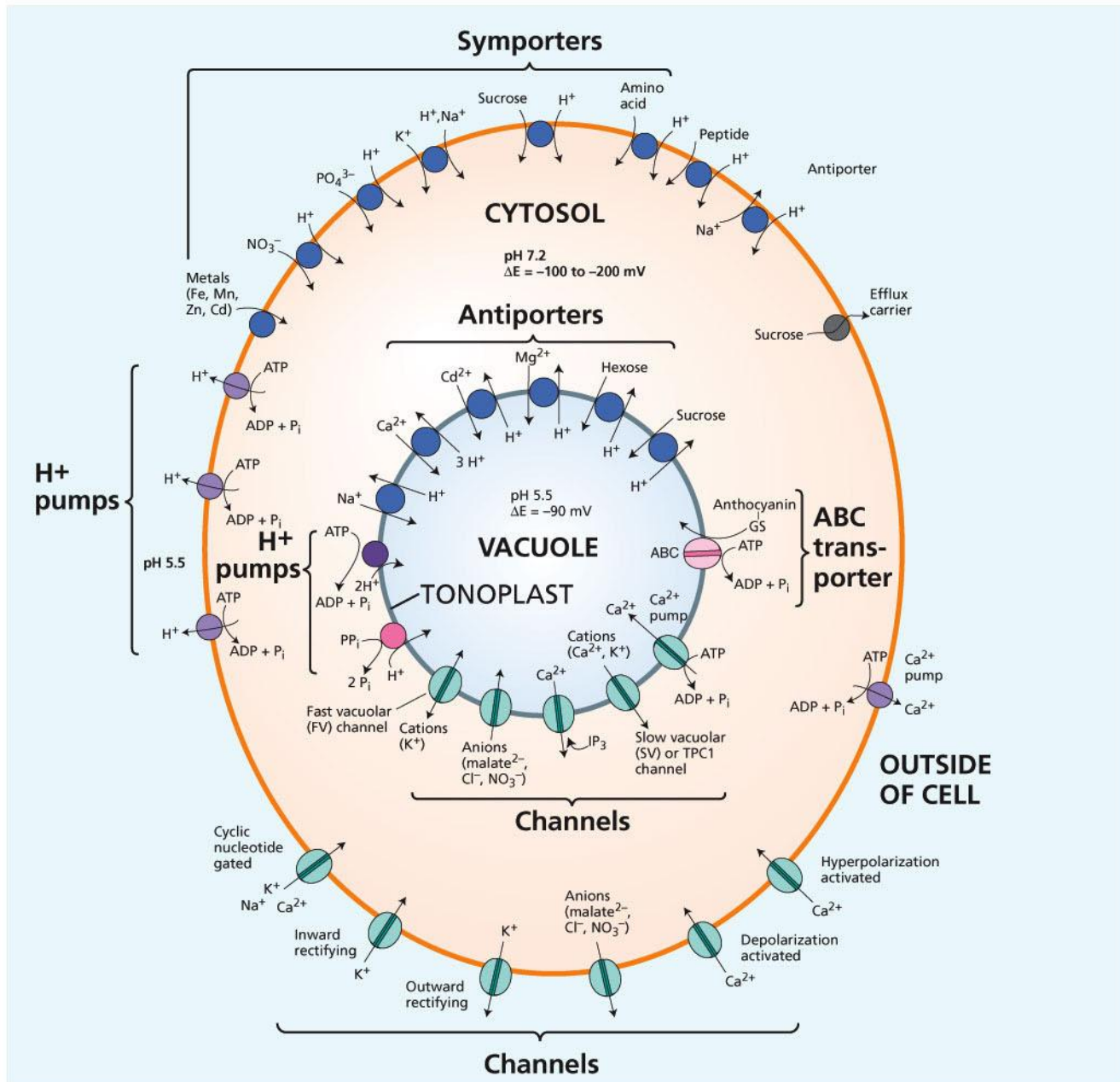
MFS (Major Facilitating Superfamily):

Фосфатный, нитратный, сульфатный транспортеры

Активное поглощение и пассивное поглощение.

Активный транспорт	
Первичный	Вторичный
Помпы	Портерные системы
Н-АТФаза плазмалеммы	Симпорт
Н-АТФаза тонопласта	Антипорт
Пирофосфатаза Тн	Унипорт
АВС транспортеры	
Пассивный транспорт	
Каналы: входящие (in) и выходящие (out)	

Способы (или механизмы) активного поглощения различаются по формам потребляемой энергии.



PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 6.14 © 2006 Sinauer Associates, Inc.