Физиология растений. Часть первая: физиология

БЭС: Физиология (от греч. physis – природа и *...логия*), наука о жизнедеятельности целого организма и его отд. частей – клеток, органов, функциональных систем. Ф. изучает механизмы разл. 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 индивид. развития особи.

Словарь русского языка Ожегова: Физиология:

1. Наука о функциях, отправлениях организма.
2. Совокупность жизненных процессов, происходящих в организме и его органах.
3. *перен.* Грубая чувственность (разг.)

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

Учебник ФР (Полевой): Ф. - наука о функциональной активности организмов

Китайский язык: 生 理 学 - **жизнь, логика, познание.**

Иерархия познавательных (естественно-научных) исследований

Что происходит – *классическая ботаника, зоология, фитохимия*

Как происходит – *теория эволюции, генетика, биохимия*

И зачем все это – *физиология*

«Только физиолог может позволить себе роскошь задать вопрос – а зачем?»

Б.А.Кудряшов

«Знание без рассуждения бесполезно, рассуждение без знаний губительно»

Конфуций

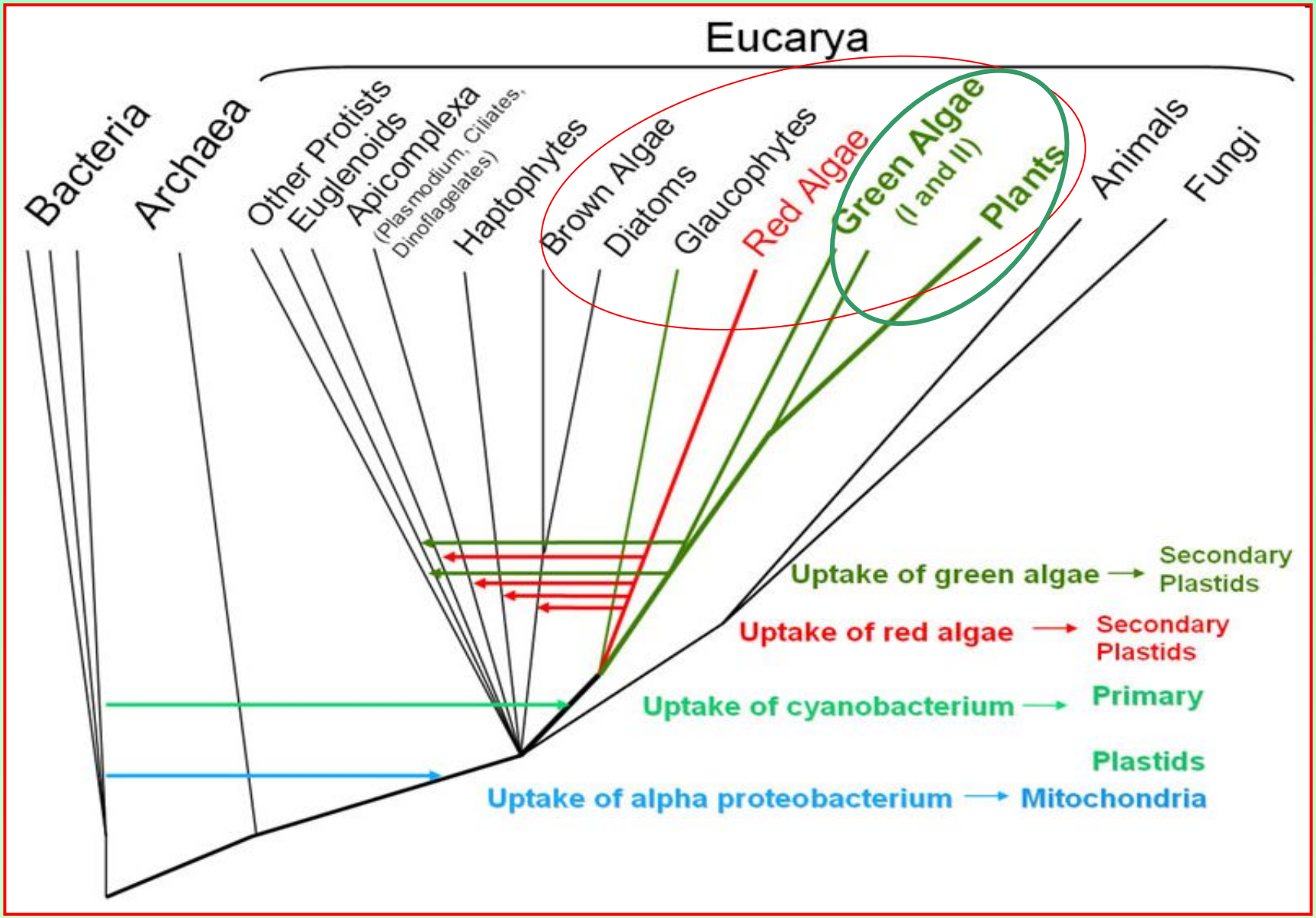
Методы и подходы. **NB – оставить объект живым.**

- **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 «низлежащих уровней иерархии»**

Жизнь принципиально непознаваема, поскольку необходимость оставить объект живим позволяет ему скрыть от исследователя самые сокровенные тайны…

Нильс Бор

Физиология растений. Часть вторая: растения



Физиология растений. Часть вторая: растения

Автотрофность

↕ ?

Прикрепленное существование

Клетка:

- **Три генома**; их взаимодействие
- **Клеточная стенка**: другая стратегия водного обмена, обмена информацией
- **Пластиды**: фабрики «горячих производств»
- **Вакуоли**: многоцелевые органеллы

- **Фотосинтез**
- **Минеральное питание**. Бережное отношение к азоту
- **Метамерное строение, другой тип симметрии**
- **Стадийность развития, зависимое 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)

Стратегия существования:
«жить согласно с окружающей средой».

Физиология растений. Часть третья. Дополнительная…

Экологические аспекты.

«Космическая роль» зеленого растения».

Леса - 10% поверхности земли, 1/3 от площади континентов. Но при этом они составляют 80 – 90% биомассы земли (биомасса животных – 1,5 – 2% от биомассы растений).

В год связывается 300 – 400 млрд. тонн CO_2 , на долю океана приходится 30-35%, континентов – 65-70%.

Полный оборот CO_2 – всего 300 лет.

Политические аспекты

Рамочная Конвенция ООН, Киотский протокол – контроль за соотношением $CO_2 \downarrow$ / $CO_2 \uparrow$ на территории разных стран. При соотношении меньше единицы – надо платить, если больше единицы - можно заработать

По мнению ряда ученых, Россию лишили потенциальных доходов от использования ее «поглотительного ресурса». При расчетах по методологии Киотского протокола «недоучтенная» разница поглотительного ресурса лесов России - 41 млн. т. углерода в год. По ценам Европейского «углеродного рынка» это около 1.23 млрд. US$ в год в период 2008-2012гг.

К этому можно добавить неучет 14 млрд. т сокращений выбросов CO_2 за период 1990-2010 гг Плюс неучет поглотительного баланса территорий России - 0,868 млрд. тонн углерода в год, -

Итого, по оценкам ряда экспертов, начиная с 1995г. (начало переговоров по Киотскому протоколу) Россия ежегодно теряет около 36.4 млрд. US$

Экономические, этические и другие аспекты.

Научные основы современного растениеводства. Растительная биотехнология. Получение и физиологические характеристика трансгенных растений. Опасность их выращивания и использования. Сохранение генофонда. Etc.и etc…

Биоэнергетика: правила игры (законы термодинамики).

Мало не покажется...

Первый закон. Энергия вселенной не может ни создаваться, ни исчезать. Энергия вселенной постоянна

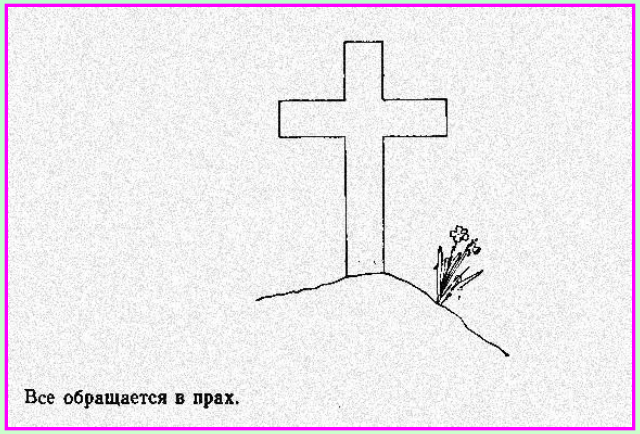
Второй закон. Энтропия Вселенной всегда возрастает. Существует общая тенденция к увеличению хаоса и беспорядка

Третий закон. Энтропия равна нулю лишь для совершенного кристалла при температуре абсолютного нуля

Первый закон. **Вы не можете выиграть**

Второй закон. **Вы не можете остаться «при своих»**

Третий закон. **Вы не можете не участвовать в игре**



Все обращается в прах.

Биоэнергетика. Что же делать?

Самая вредная формула: $\Delta E = \Delta H = \Delta G + T\Delta S$

(второй закон термодинамики), E- полная энергия системы,
H – свободная энтальпия, G – свободная энергия Гиббса,
T – абсолютная температура, S – энтропия

Для самопроизвольных реакций $\rightarrow \Delta G < 0$

Для синтеза упорядоченных структур $\rightarrow \Delta G > 0$

Живые системы – весьма упорядоченные образования!

Решение проблемы - сопряжение реакций (за все надо платить!) :

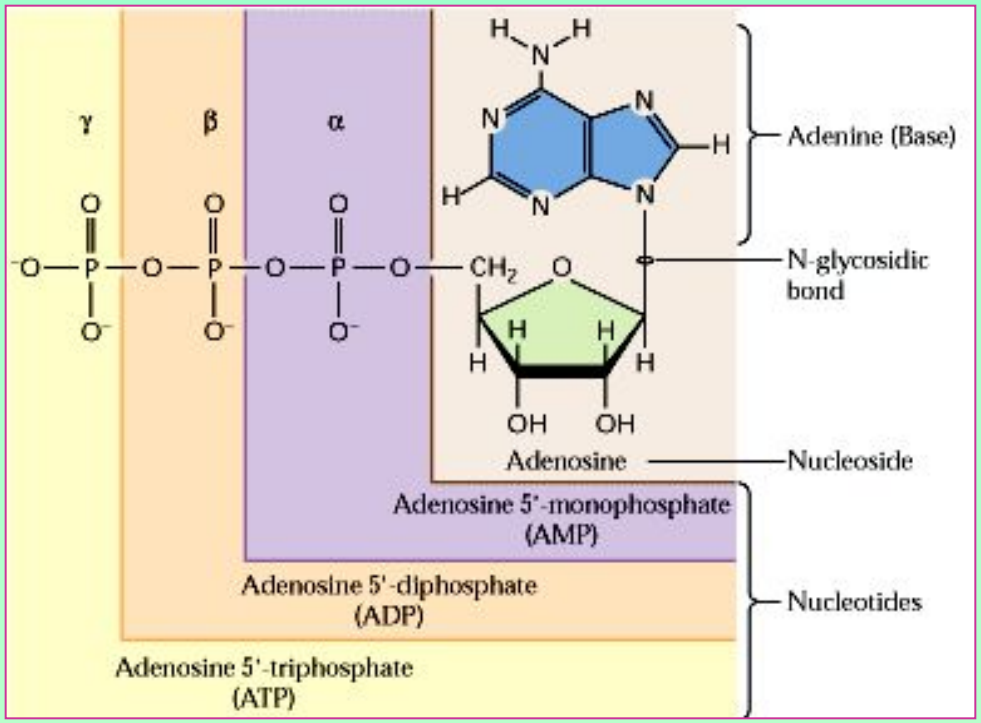
Реакция 1: $A + B \longrightarrow C \quad \Delta G > 0$ («реакция интереса»)
Реакция 2: $X + Y \longrightarrow Z \quad \Delta G < 0$ («оплата»)

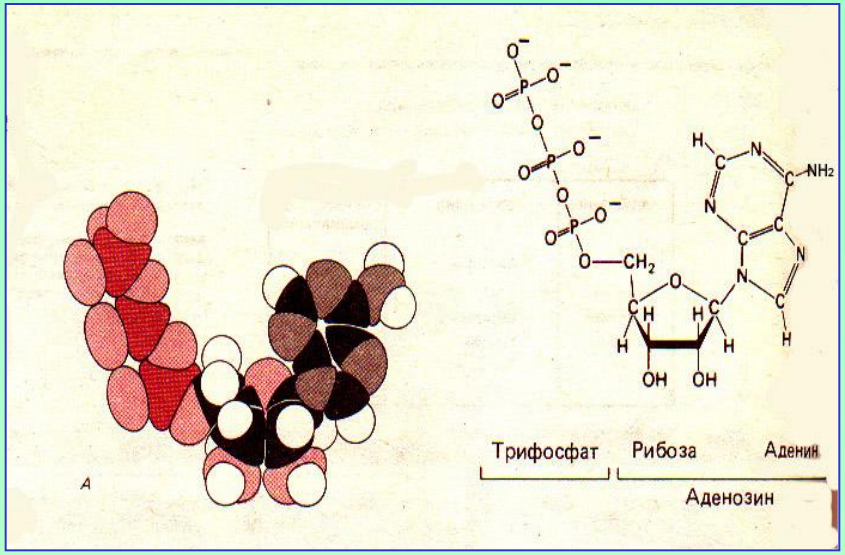
$$\sum \Delta G < 0$$

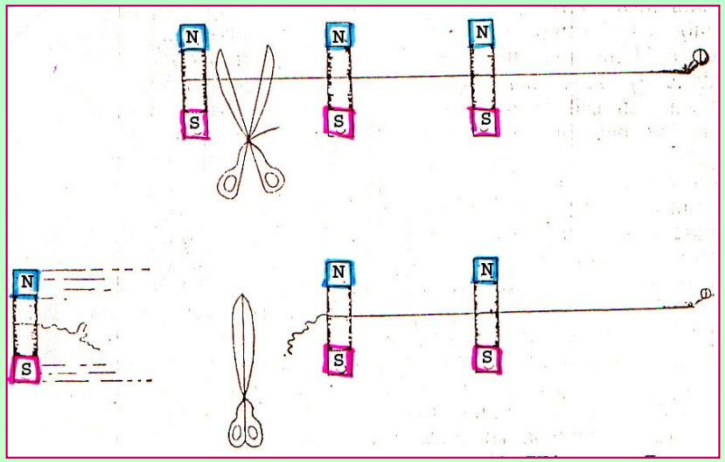
Реакцию 2 («оплату») полезно унифицировать – это гидролиз АТФ:

$$АТФ + H_2O = АДФ + Ф_н$$

АТФ (ATP) - основная «энергетическая денежка» клетки







$\Delta G^{o'}$ = 29,4 кДж / моль

или 7,0 ккал / моль

Изменением концентрации АТФ можно регулировать «выход» энергии ее гидролиза

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln \frac{[АДФ][Ф_Н]}{[АТФ]}$$

АТФ/АДФ	[АТФ]	ΔG (ккал/моль)	ΔG (кДж/моль)	
pH=0	1/1	1M	- 5,6	- 23,5	ΔG^0
pH=7	1/1	1M	- 7,0	- 29,4	$\Delta G^{0'}$
pH=7	10/1	0,01M	- 9,0	- 37,8	
pH=7	100/1	0,001M	- 14,0	- 58,8	

1 ккал = 4.2 кДж.

Откуда взять АТФ?

(или - где ключ от квартиры где деньги лежат?)

“Элементарно, Ватсон !”:

Реакция 1: $АДФ + Ф_{Н} \longrightarrow АТФ \quad \Delta G > 0$ «реакция интереса»

Реакция 2: $A \longrightarrow B + C \quad \Delta G < 0$ «оплата»

$$\sum \Delta G < 0$$

Реакция 2 – это окисление восстановленных молекул.

$\Delta G^0 = - nF\Delta E^0$ где n – число молей e^- ($N_A = 6.02 \times 10^{23}$)

F – число Фарадея, 96 487 кл/моль.

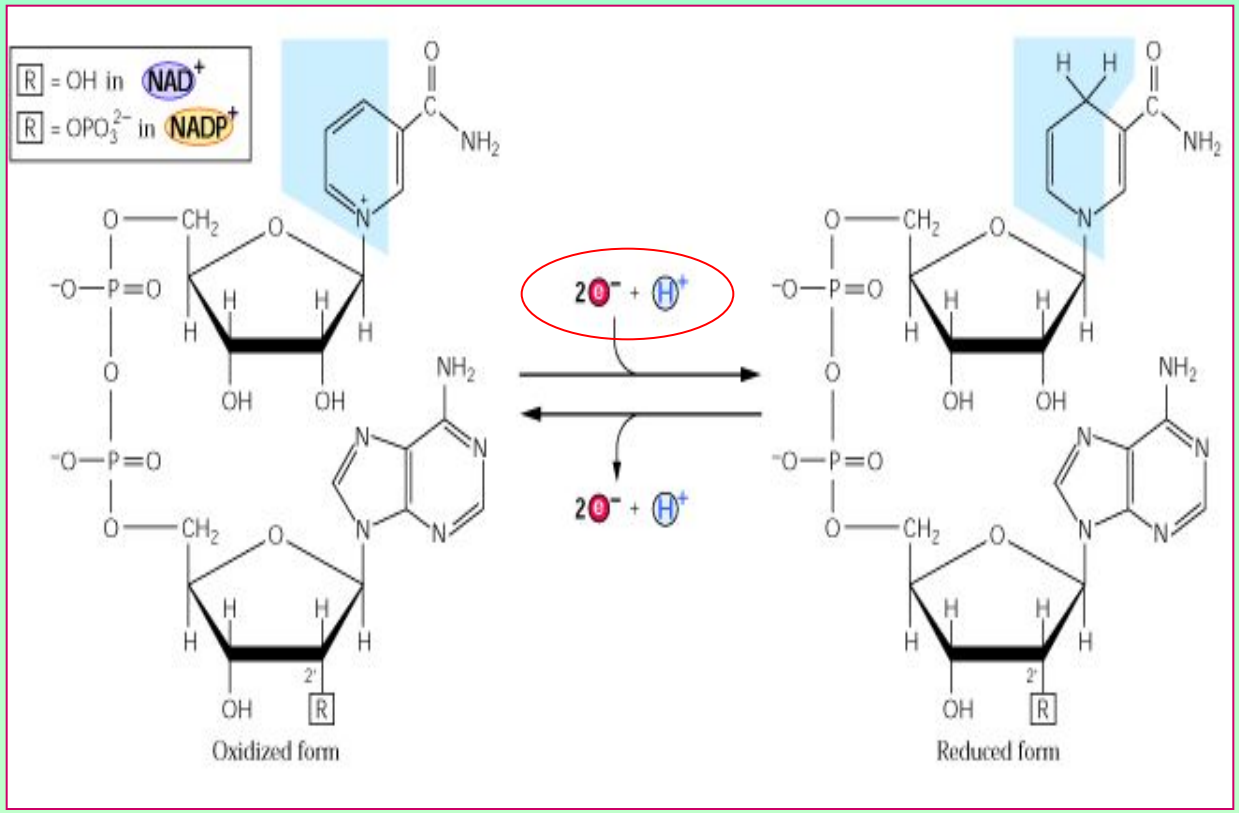
$\Delta E = 1.0v \approx 100$ кДж/моль

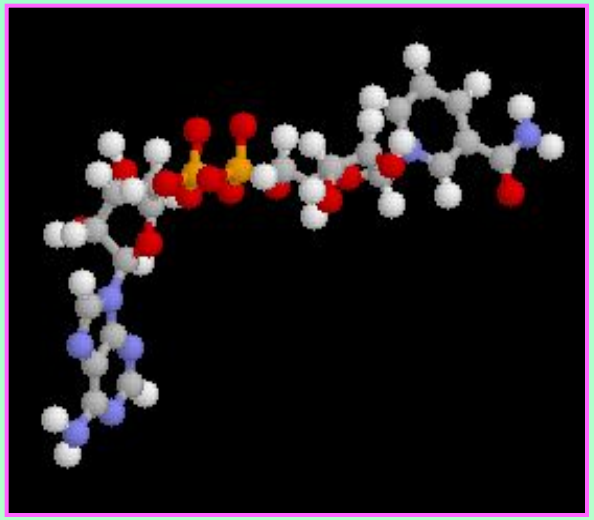
Реакцию 2 тоже полезно унифицировать – это окисление НАДН:

$НАДН + H_2O + 1/2O_2 = НАД^+ + H^+ + 2OH^- \quad \Delta E \approx 1.0v$

ΔE окисления НАДН также можно регулировать ее концентрацией - уравнение Нернста

НАД$^+$ (NAD$^+$) и НАДФ$^+$ (NADP$^+$) – *«золотой запас»* и универсальные «рабочие лошадки» Red-Ox реакций в клетке.





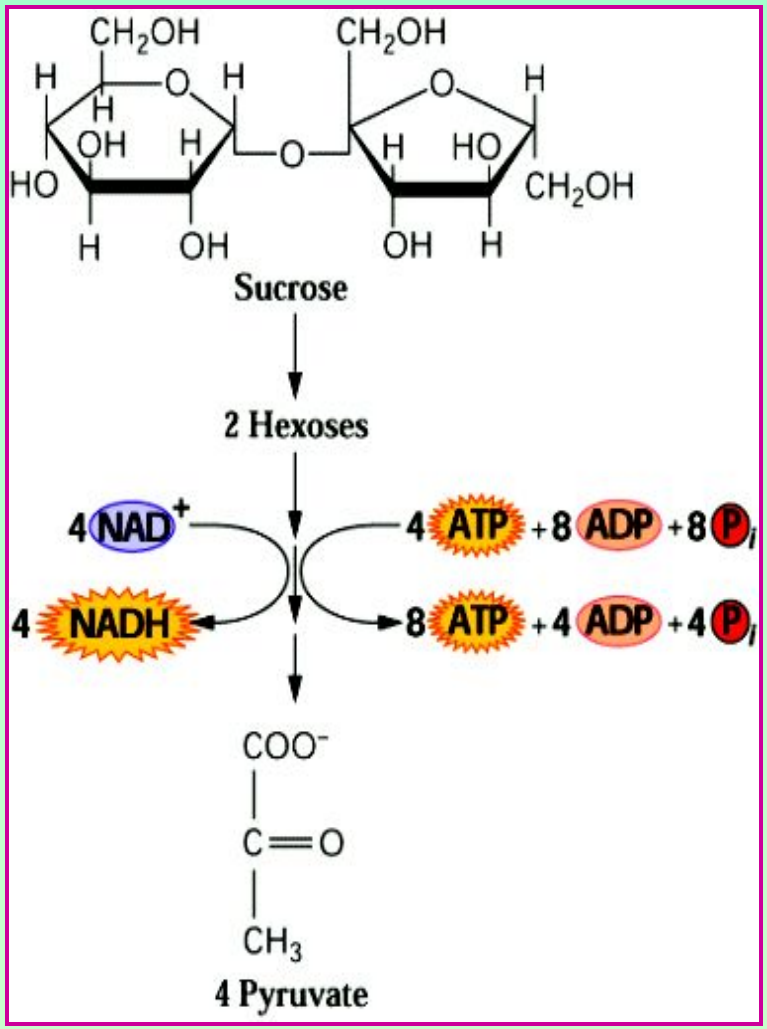
$E^{o'} = - 0,32$ v

Откуда взять восстановленный НАДН?

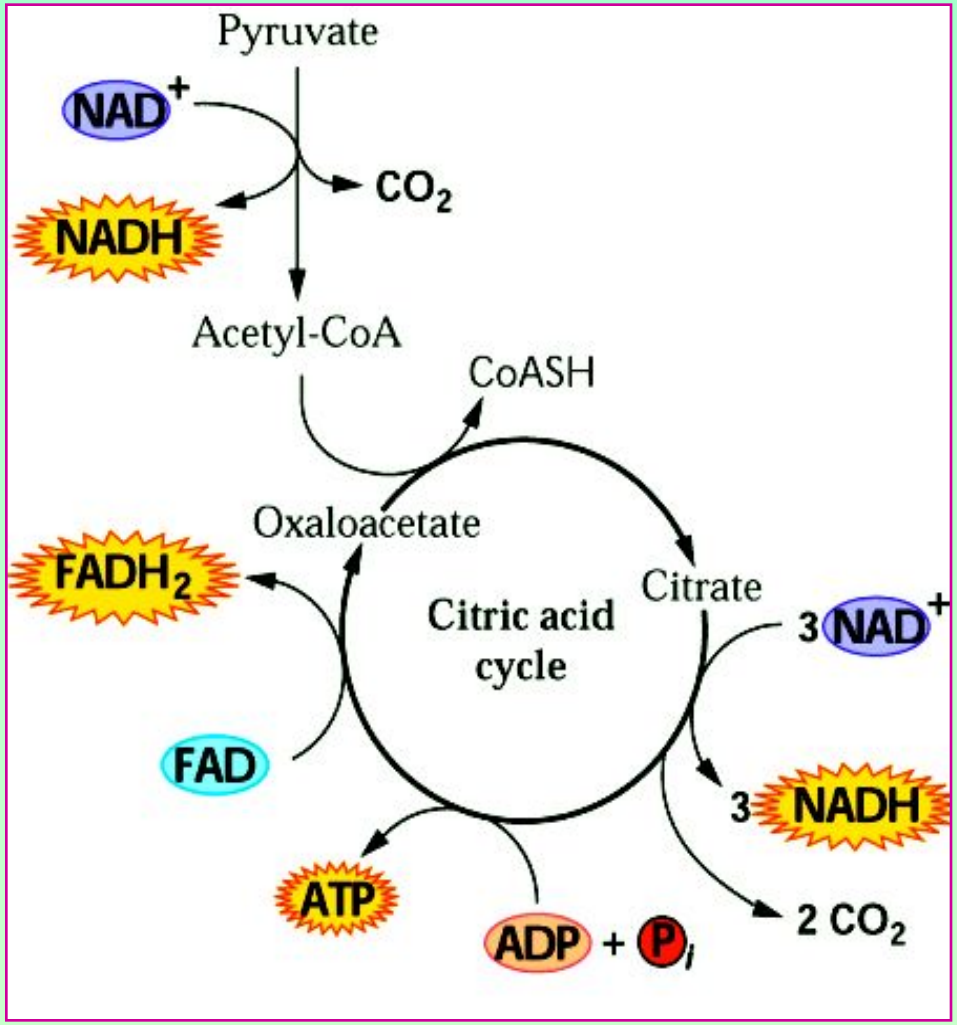
(или – как пополнить «золотой запас»?)

НАДН получается за счет окисления восстановленных соединений - например:

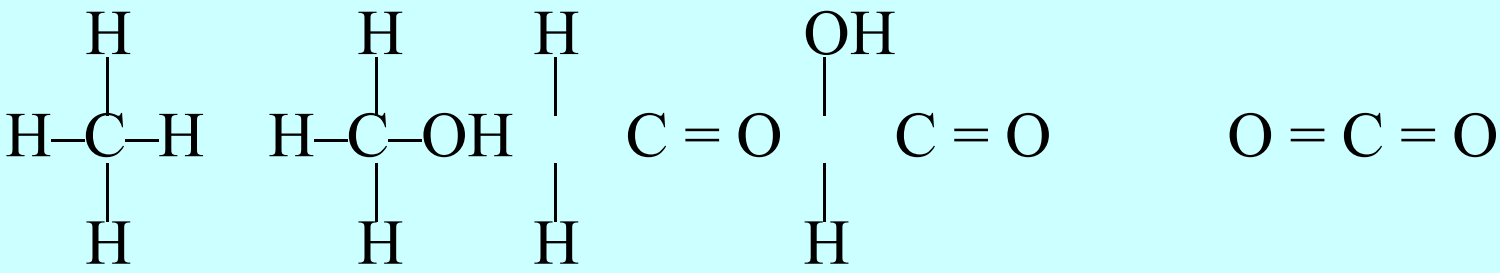
сахарозы – в цитозоле (гликолиз):



пирувата и ацетил-CoA – в митохондриях:



Чем сильнее окислена молекула, тем меньше энергии она содержит



Метан **Метанол (спирт)** **Форм-альдегид** **Муравьиная кислота** **Углекислый газ (диоксид)**

Увеличение степени окисленности

Увеличение запаса энергии в молекуле

По окислительно-восстановительному потенциалу можно определить уровень энергии молекулы и вероятность реакции

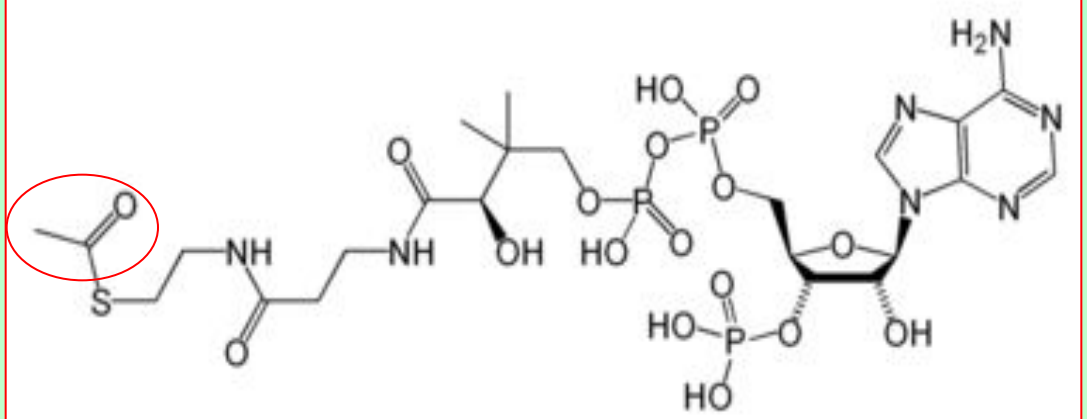
Red-Ox-пара	**$E^{o'}$, v**
Пируват/ацетат + CO_2	- 0,70
α-кетоглутарат/сукцинат + CO_2	- 0,67
H^+ / 1/2H_2	- 0,42
НАДФ$^+$/ НАДФН + H^+	- 0,32
НАД$^+$/ НАДН + H^+	- 0,32
Пируват/ лактат	- 0,19
Оксалоацетат/ малат	- 0,17
Фумарат/ сукцинат	+ 0,03
Дегидроаскорбат/ аскорбат	+ 0,08
1/2 O_2 / H_2O	+ 0,82

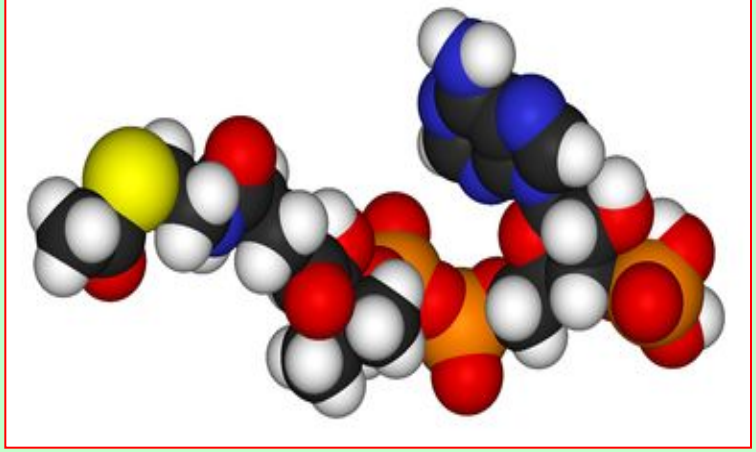
Окисляемый углеводный компонент тоже полезно унифицировать…

Ацетил-кофермент А (Acet-CoA) – восстановленный углеводный фрагмент, который окисляется в митохондриях для восстановления НАДН

Кофермент А - универсальный переносчик и “активатор” ацильных групп

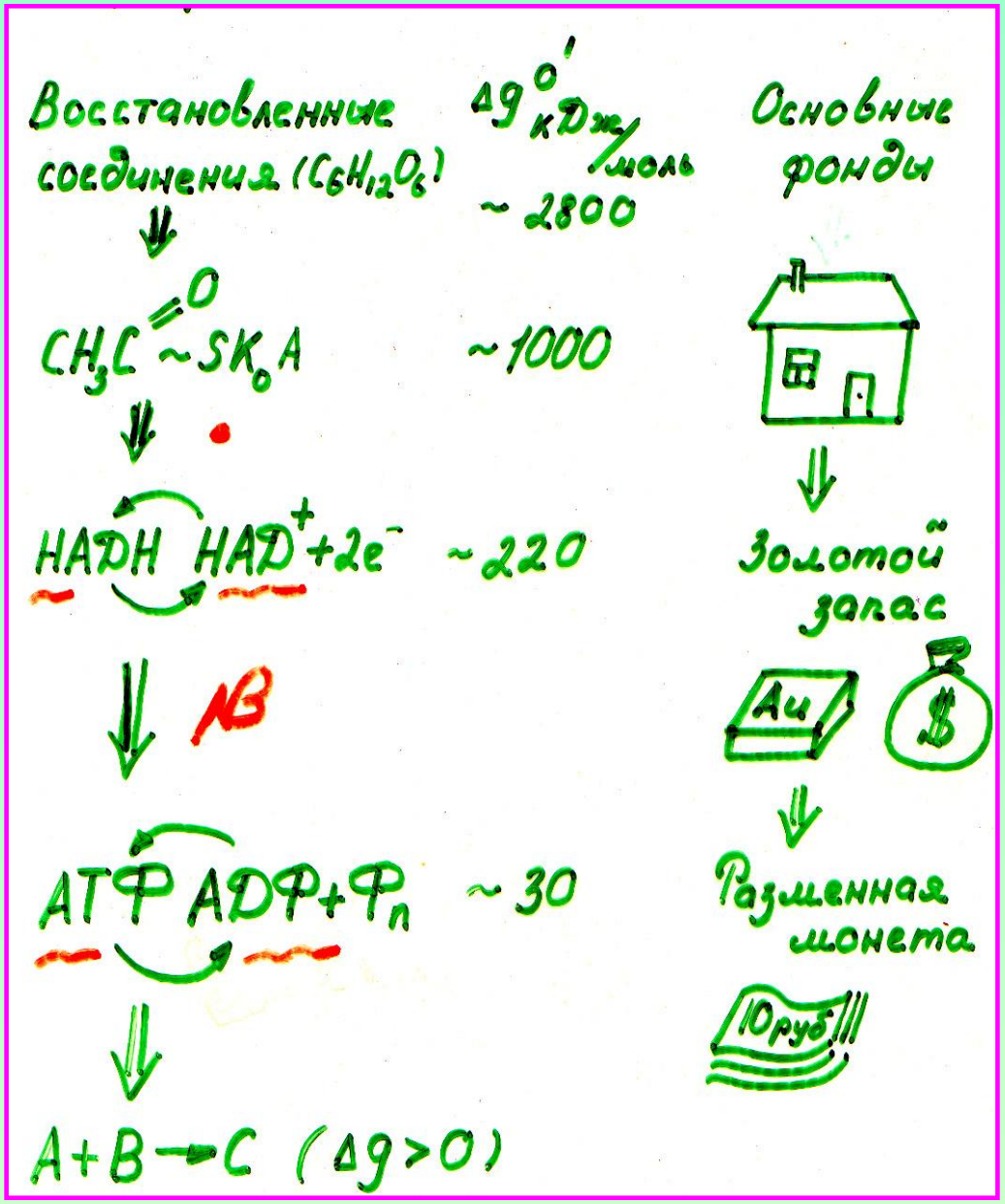
$$CoA\text{-}SH + CH_3COOH \leftrightarrow CoA\text{-}S\sim C(=O)\text{-}CH_3 + H_2O.$$





Пантетеин (пантоевая к-та + β-аланин + цистеамин) + **АДФ-3Ф**

Биоэнергетика: иерархия



Для валютных операций нужны обменные пункты..

Для сопряжения окисления НАДН с синтезом АТФ необходима особая форма запасания энергии – на мембране.
Что-то вроде конденсатора, но гораздо лучше…

Градиент электрохимического потенциала протонов на мембране

$$\Delta\mu H = F\Delta\varphi + RT\ln [H^+]_p/[H^+]_n$$

+ + + + + +

$\Delta\varphi$

– – – – –

$$\Delta\mu H = F\Delta\varphi - RT\Delta pH$$

$$\Delta p = \Delta\varphi - 0.06\Delta pH$$

протон-движущая сила

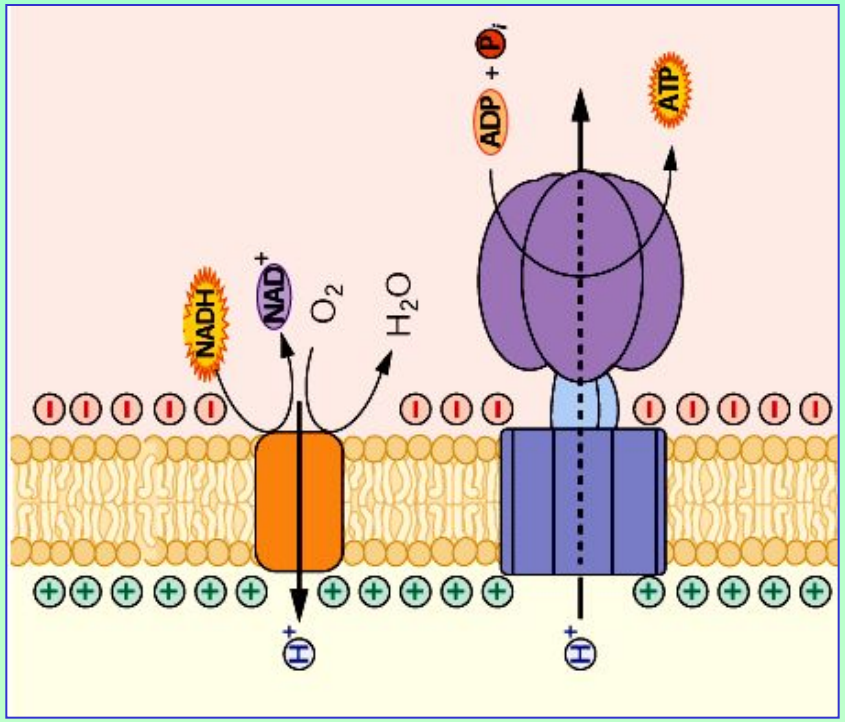
H^+H^+ H^+ H^+ H^+

ΔpH

H^+ H^+

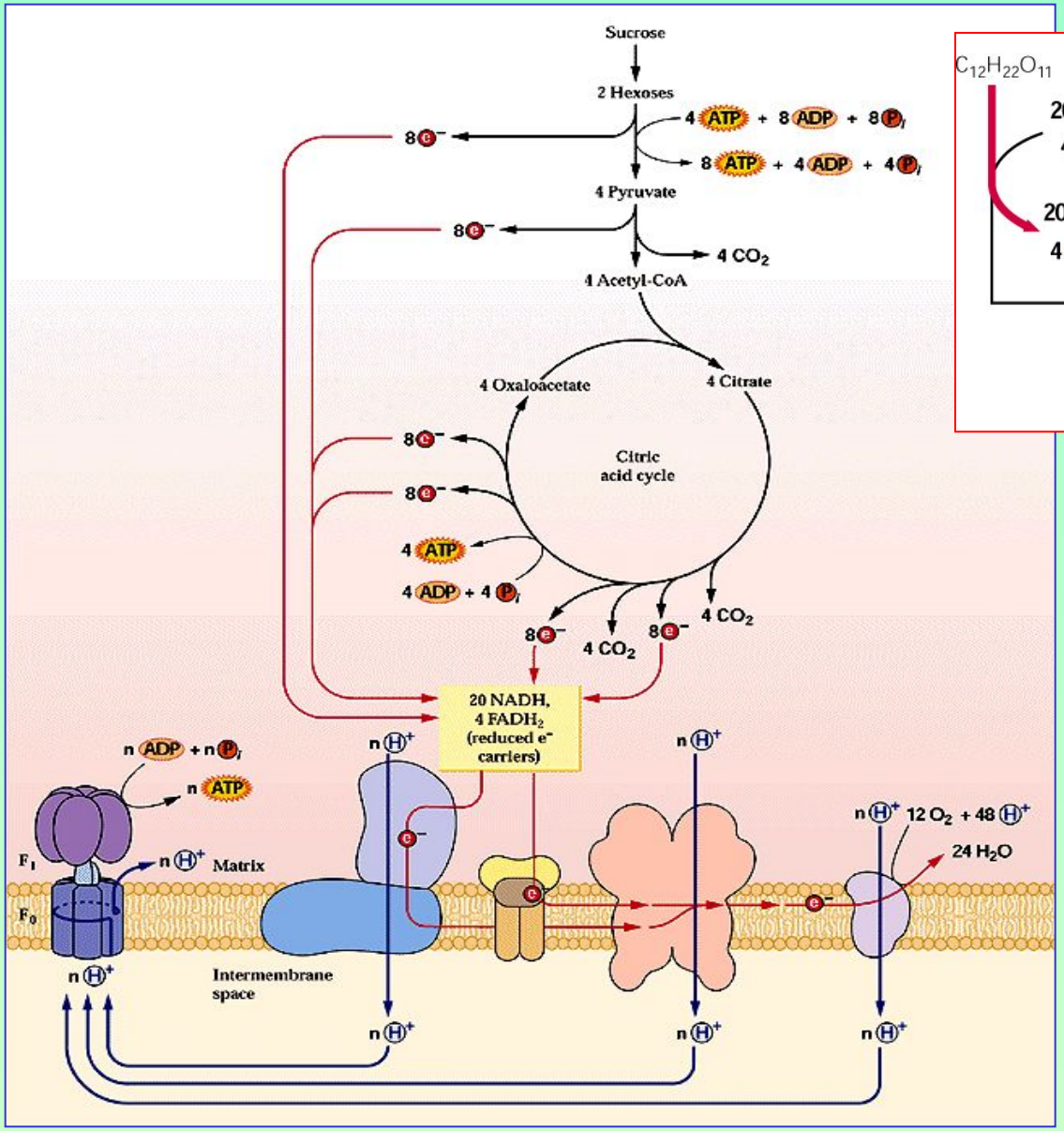
$\Delta\varphi$ - электрическая составляющая

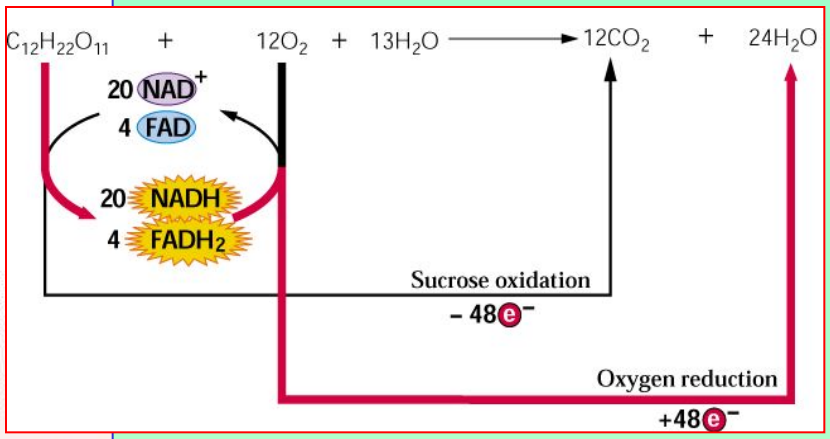
ΔpH - химическая составляющая



1ед. ΔpH = 60mV = 5,7 кДж/моль = 1.4ккал/моль

Результат: энергетическая система клетки - дыхание





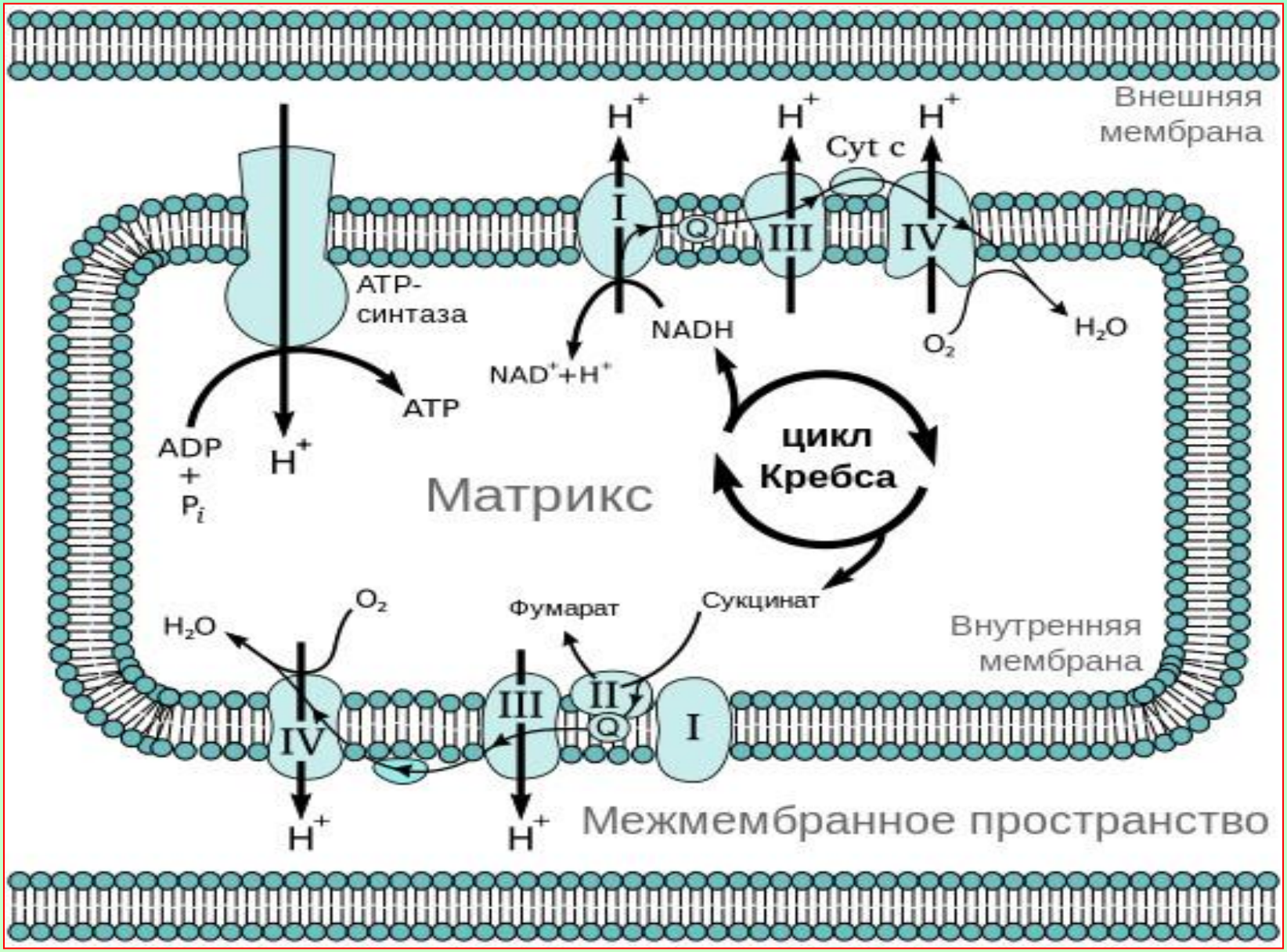
$C_{12}H_{22}O_{11} + 13H_2O \rightarrow 12CO_2 + 48H^+ + 48e^-$

$12O_2 + 48H^+ + 48e^- \rightarrow 24H_2O$

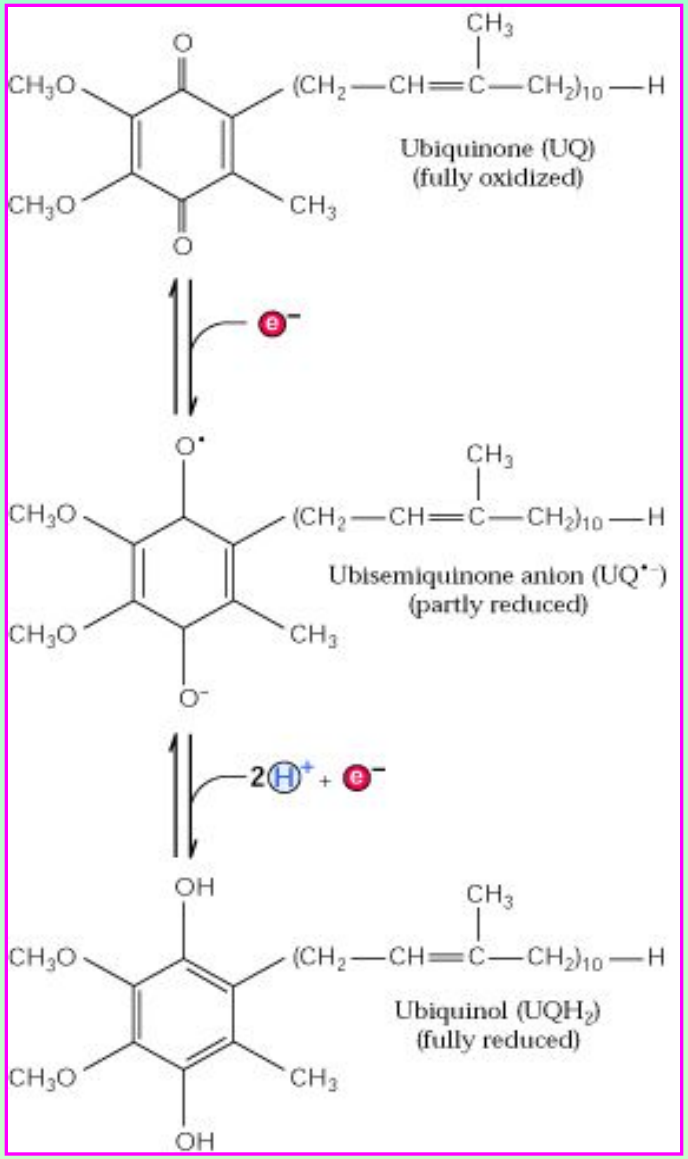
$C_{12}H_{22}O_{11} + 12O_2 \rightarrow 12CO_2 + 11H_2O$

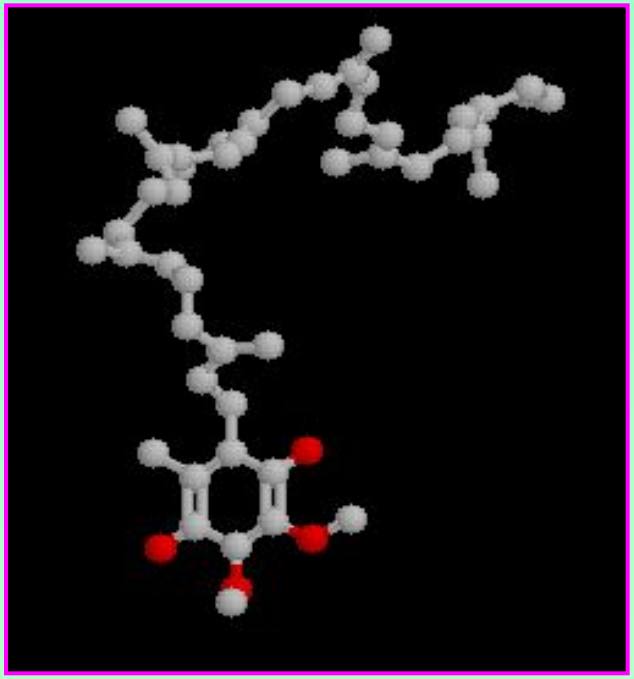
$60ADP + 60Pi \rightarrow 60ATP + 60\ H_2O$

Что происходит в митохондриях…



Хиноны (убихиноны и пластохиноны) – липофильные молекулы с Red-Ox свойствами: перенос $2e^- + 2H^+$



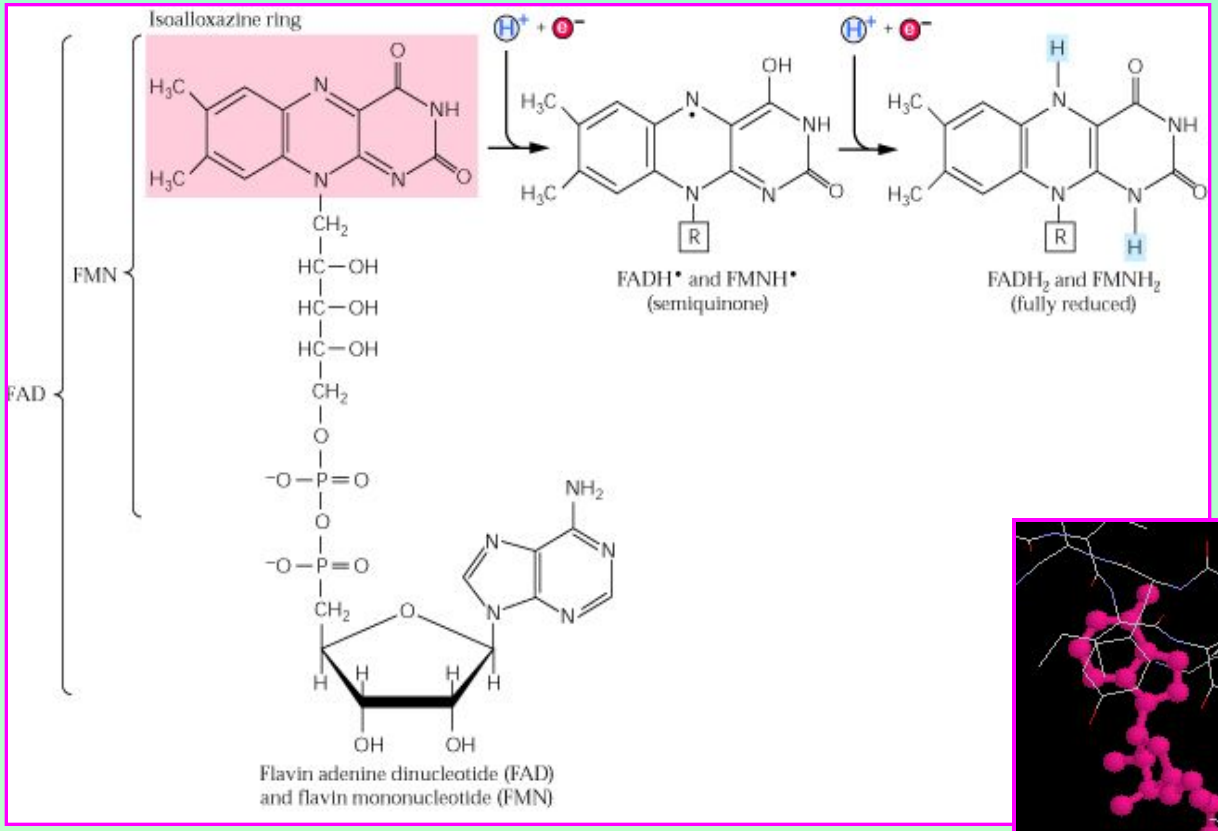


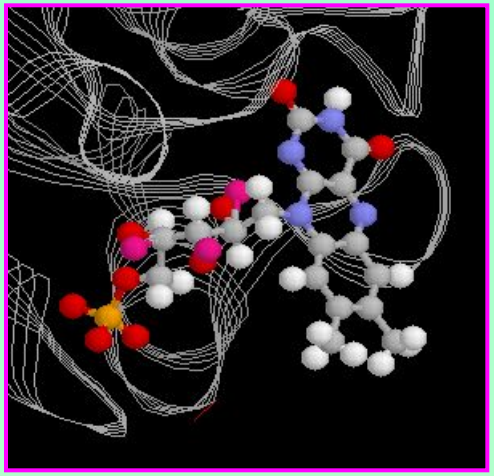
$E^{o'}$: от 0,0 до +0,10 V

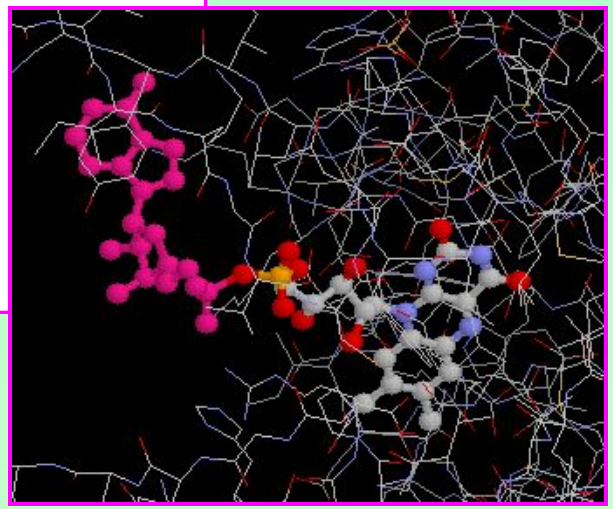
(в связанном виде – до -0,3 V)

в среднем – около 0 V

Флавинадениндинуклеотид (ФАД, FAD) и флавинмононуклеотид (ФМН, FMN) - компоненты многих Red-Ox ферментов: перенос $2e^- + 2H^+$



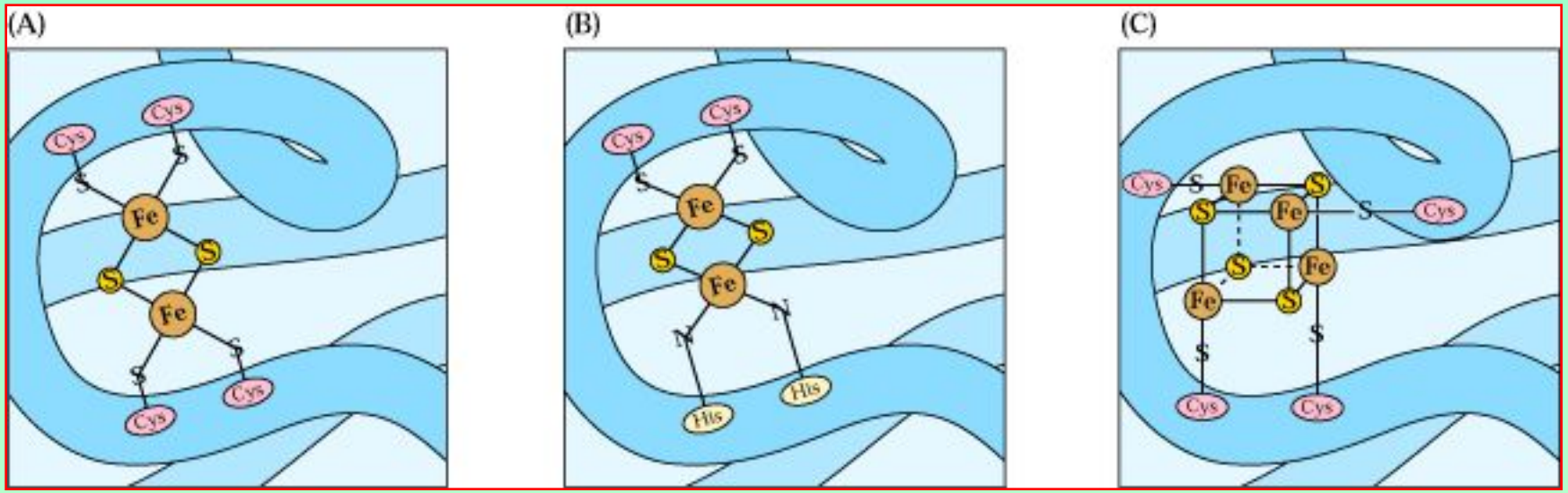


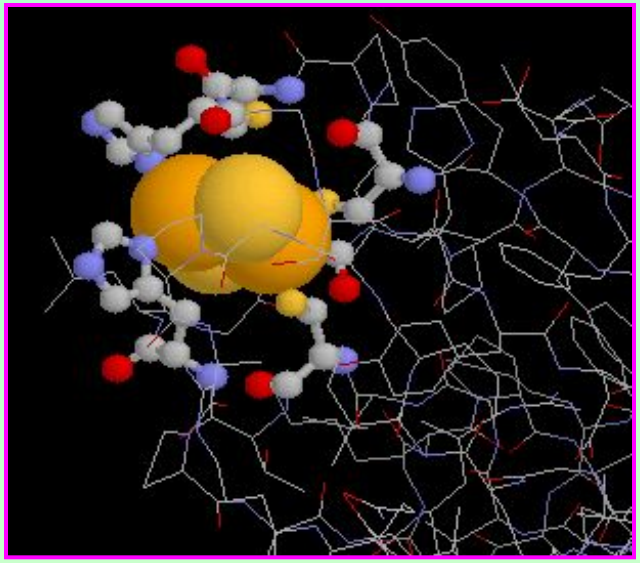


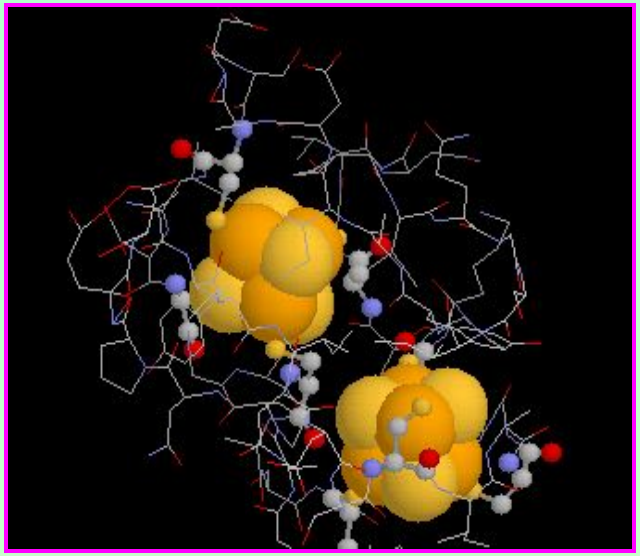
E^o : от -0,5 до +0,2 v

в зависимости от белка,
стабилизации кольца, резонанса

Железо-серные белки - 2Fe-2S и 4Fe-4S: перенос только e^-







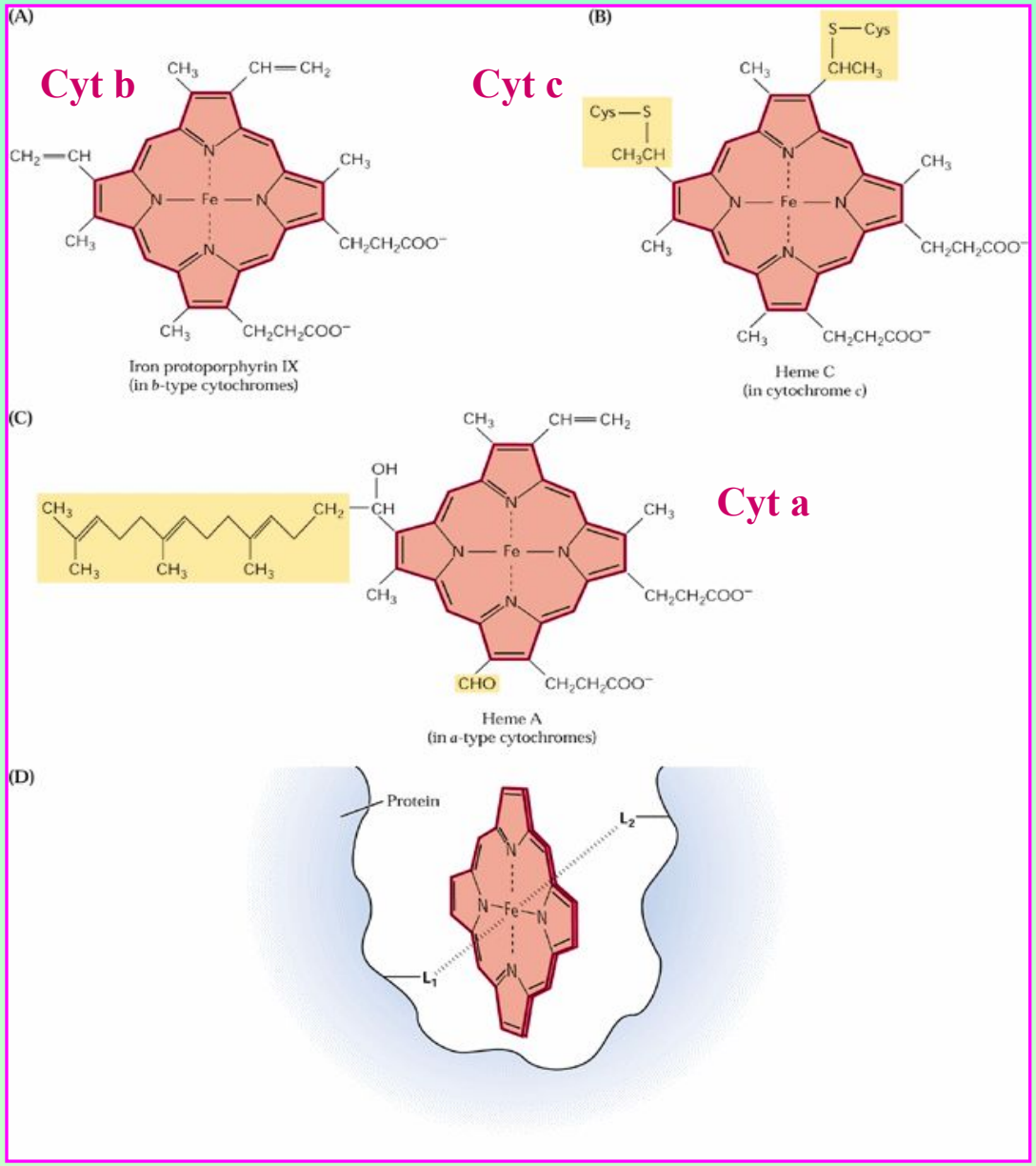
$E^{o'}$:

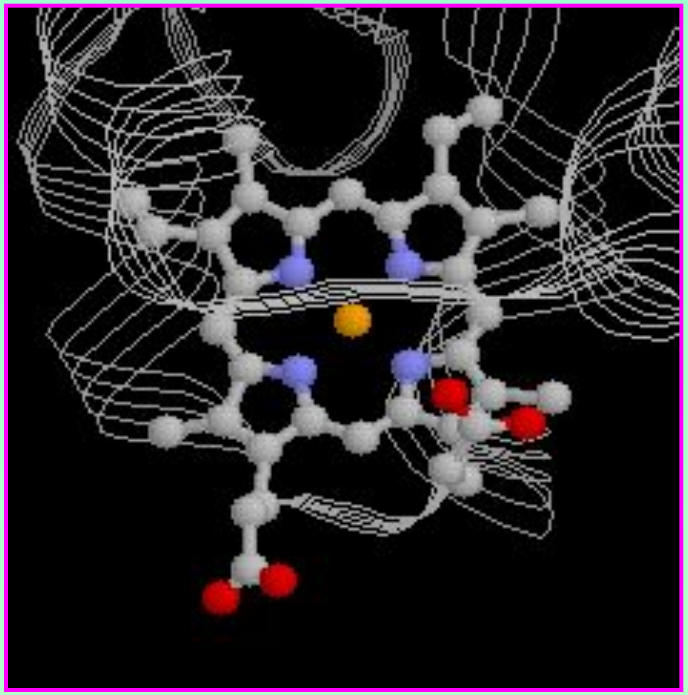
от – 0,42v (Fd)

до + 0,35v

(Fe-S бел. Риске)

Гемы - коферменты цитохромов: перенос только e^-





$E^{o'}$:

от -0,18 V (cyt b_6)

до +0,55 V (cyt a_3)

Переносчики e^- в ЭТЦ выстаиваются согласно своим $E^{o'}$ – «под горку».. Причем, как правило, это «Американские» горки…

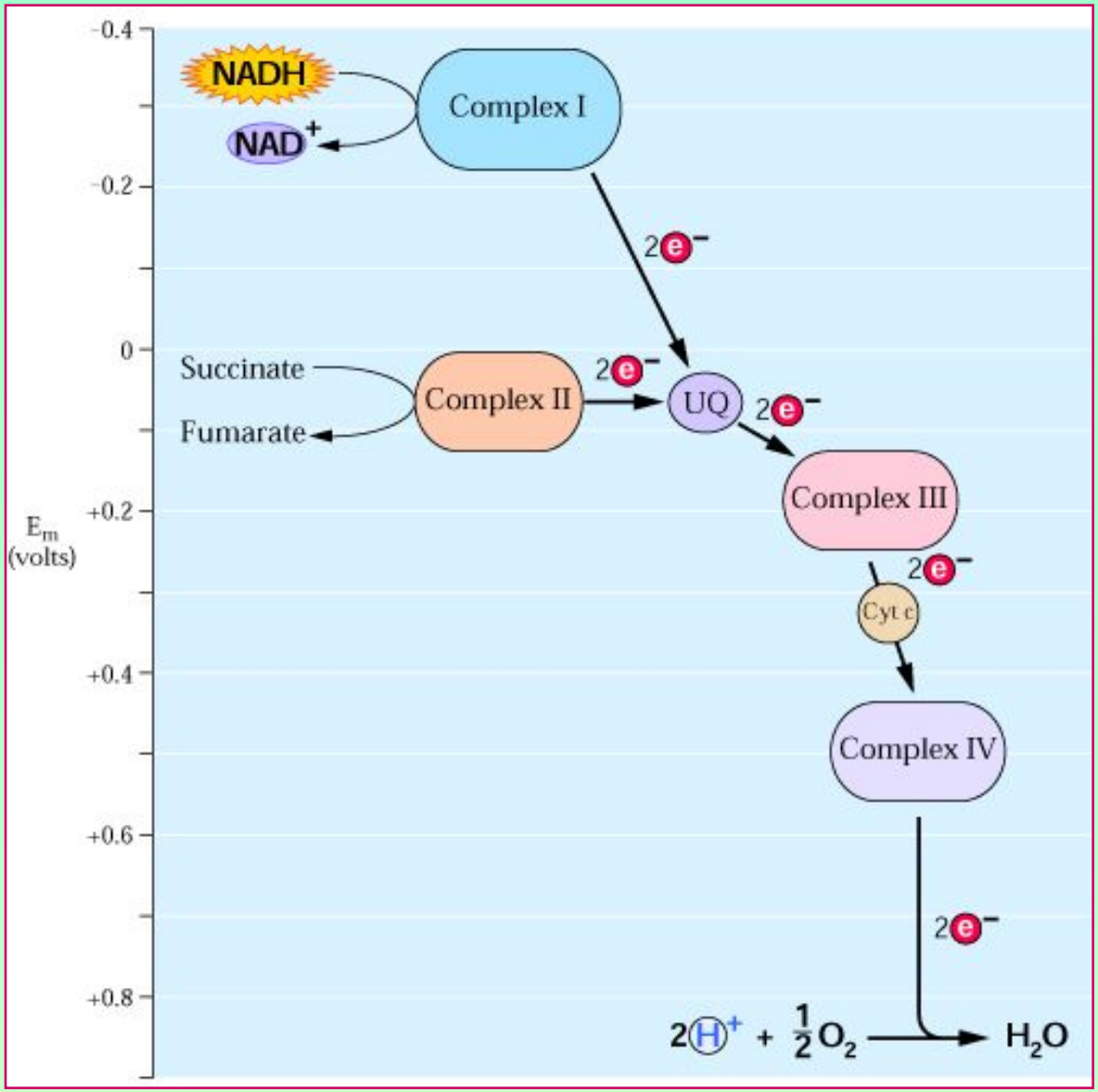
НАДН → ФП (ФМН) → FeS (min 5шт) → UQ(пул) →

-0,32v -(0,3 – 0,1)v -(0,37-0,02)v 0v

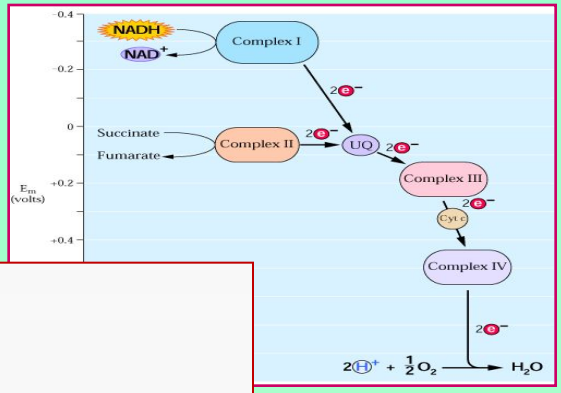
→ цит b → FeS → цит c_1 → цит c → цит a-a_3 → O_2

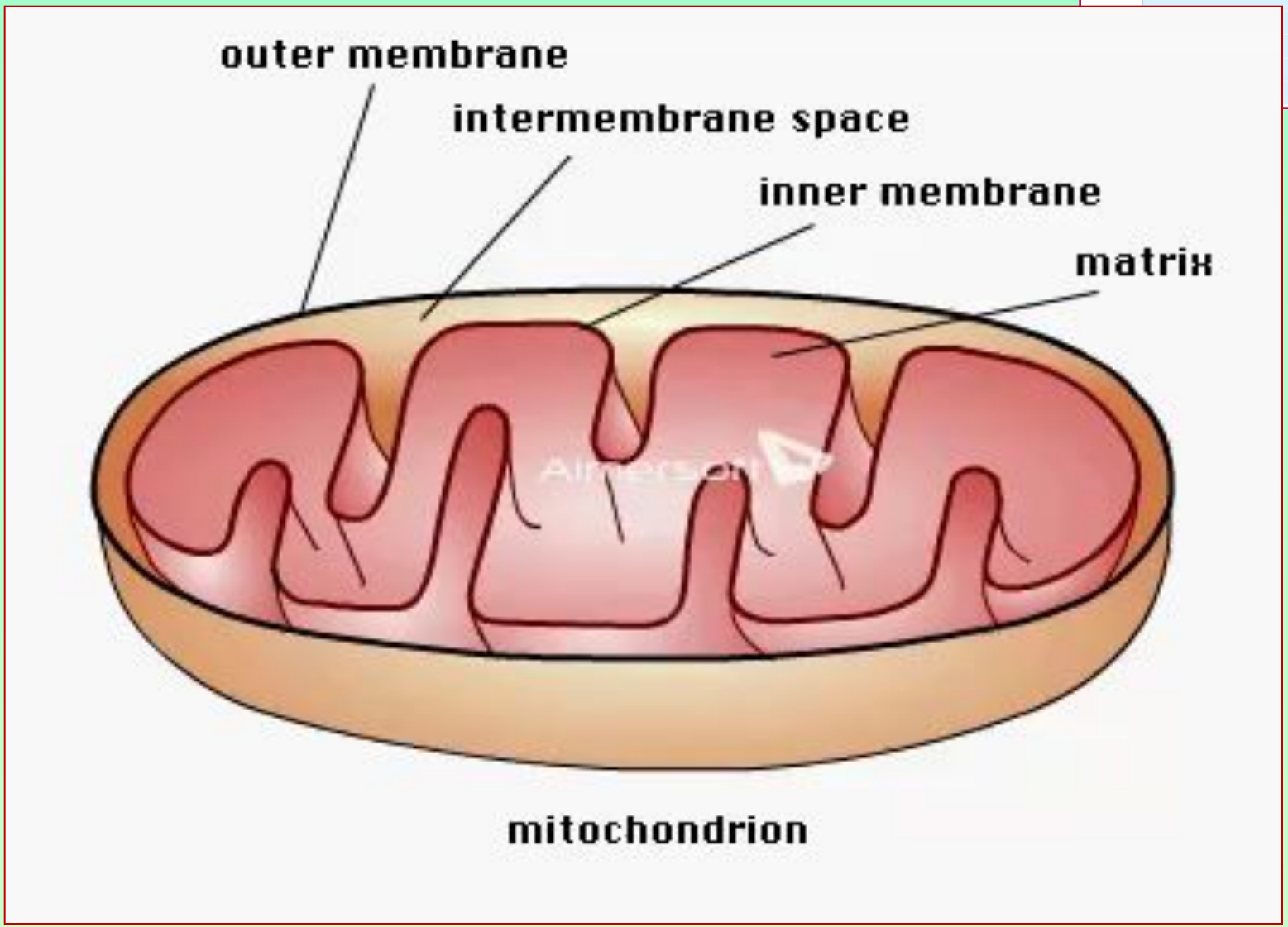
0.1v 0,28v 0,22v 0,25v 0,29-0,55v 0,82v

Общая схема дыхательной ЭТЦ: четыре белковых комплекса, объединяемые подвижными переносчиками e^-



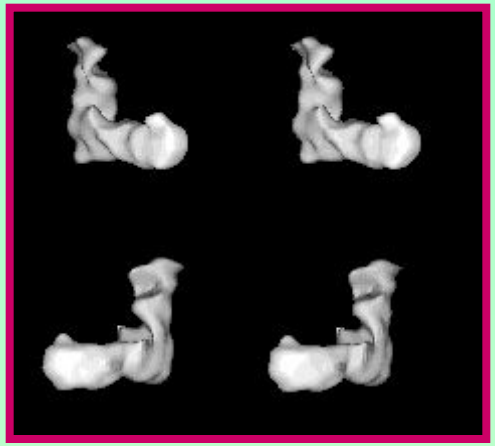
Общая схема дыхательной ЭТЦ: четыре белковых комплекса, объединяемые подвижными переносчиками e^-

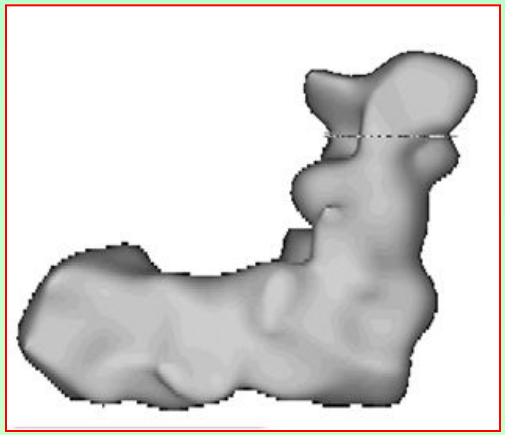




Комплекс I: НАДН-дегидрогеназа. «Старый башмак»…

Эволюционно комплекс возник скорее всего в результате объединения двух комплексов из разных, неродственных белковых семейств:
НАДН-дегидрогеназный и убихинон-связывающий модули («голенище») произошли из растворимой NiFe-гидрогеназы, которая окисляла НАДН и восстанавливала водород, а гидрофобная мембранная «подошва» комплекса, перекачивающая протоны, возникла из Na^+/H^+-антипортов Mrp





М.в. 600-900kDa До 40 белков (min – 14)

I субкомплекс «голенище»:

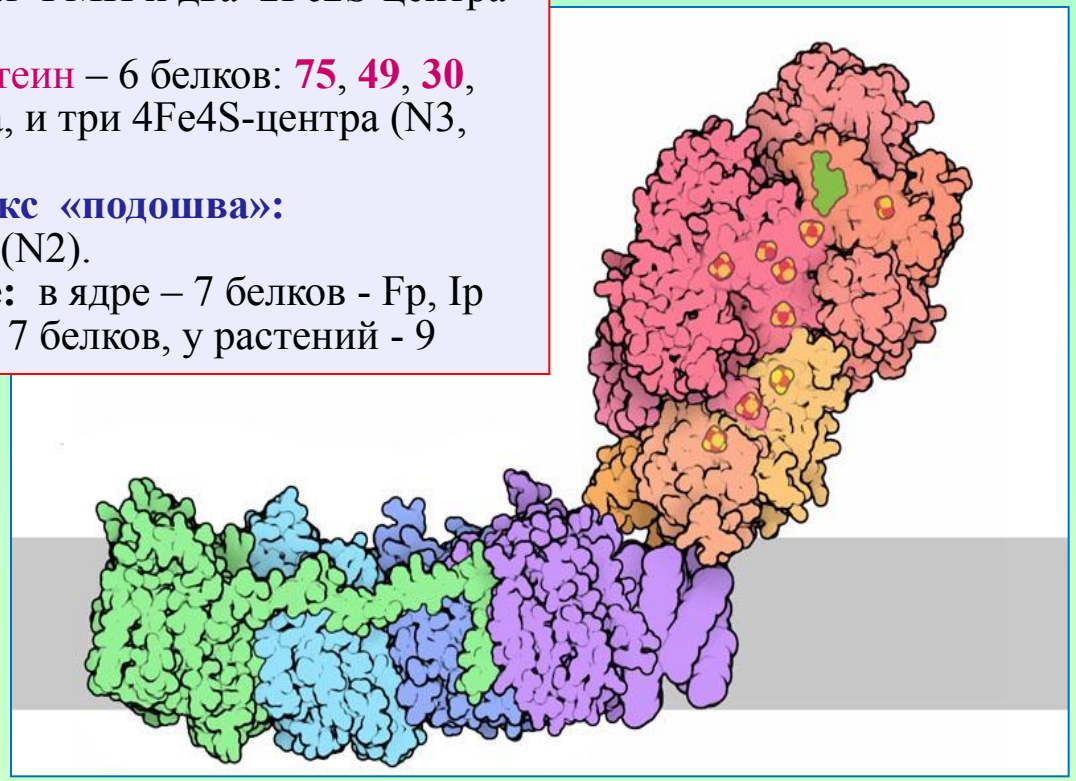
Флавопротеин - 3 белка: 51, 24 и 10 kDa, содержат ФМН и два 2Fe2S-центра (N1)

Железопротеин – 6 белков: **75**, **49**, **30**, 18, 15 13 kDa, и три 4Fe4S-центра (N3, N4)

II субкомплекс «подошва»:

4Fe4S-центр (N2).

Кодирование: в ядре – 7 белков - Fp, Ip
в m-геноме – 7 белков, у растений - 9



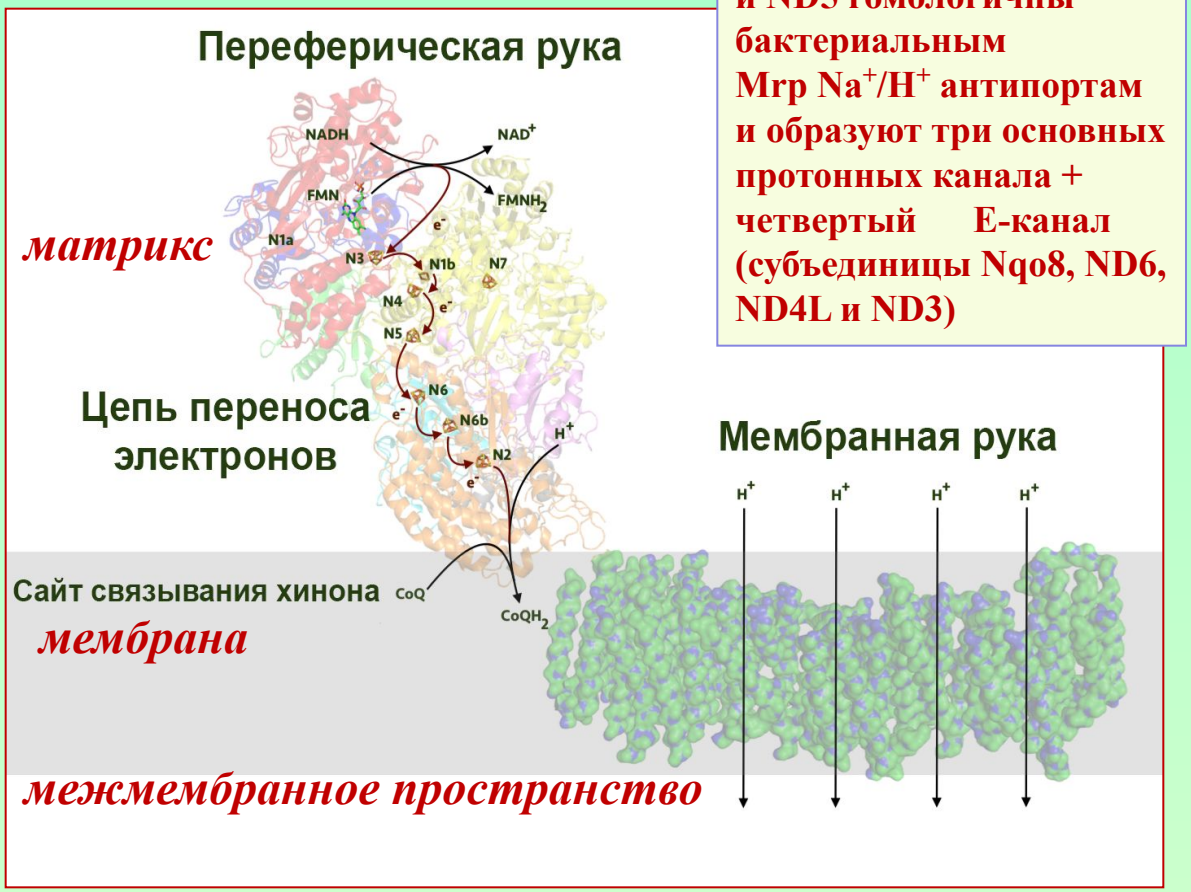
НАДН-дегидрогеназа: принцип работы

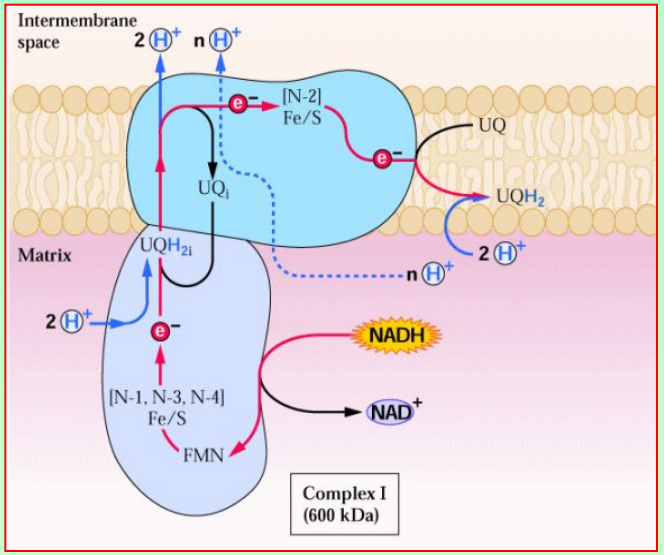
НАДН-дегидрогеназный комплекс имеет уникальный механизм транспорта протонов за счет конформационных изменений самого фермента.

До сих пор неясно, каким образом транспорт электронов сопряжён с переносом протонов…

Субъединицы ND2, ND4 и ND5 гомологичны бактериальным Mrp Na^+/H^+ антипортам и образуют три основных протонных канала + четвертый E-канал (субъединицы Nqo8, ND6, ND4L и ND3)

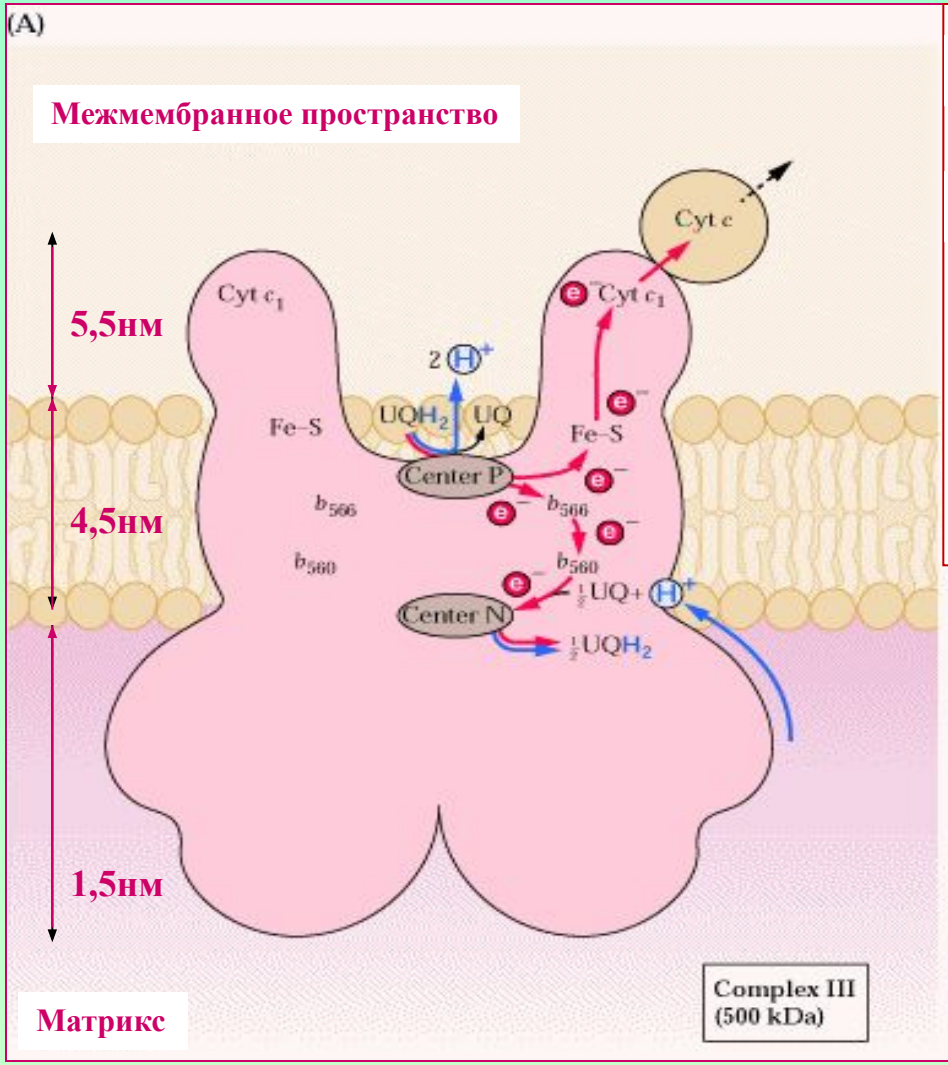
Старая, логичная, но – увы – скорее всего ошибочная схема работы…

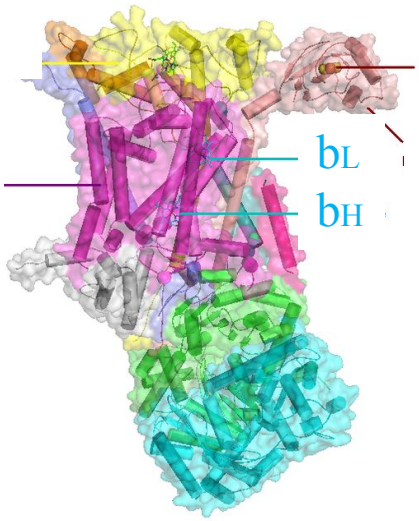




$\Delta E = -0{,}32v - 0v \approx 0{,}3v$

Комплекс III: КоQH$_2$:цитС-редуктаза; цитохром B$_6$C-комплекс





2Fe-2S-кластер

Белок Риске

Структура мономера

В мембране – димер. Мономер - до 11 белков, минимум 3 белка:

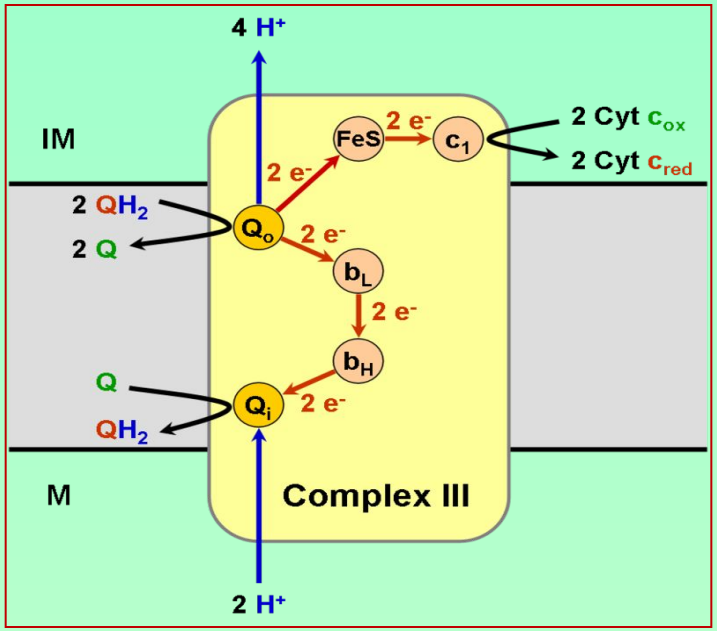
Cyt b (2 гема b_L и b_H), 45kDa

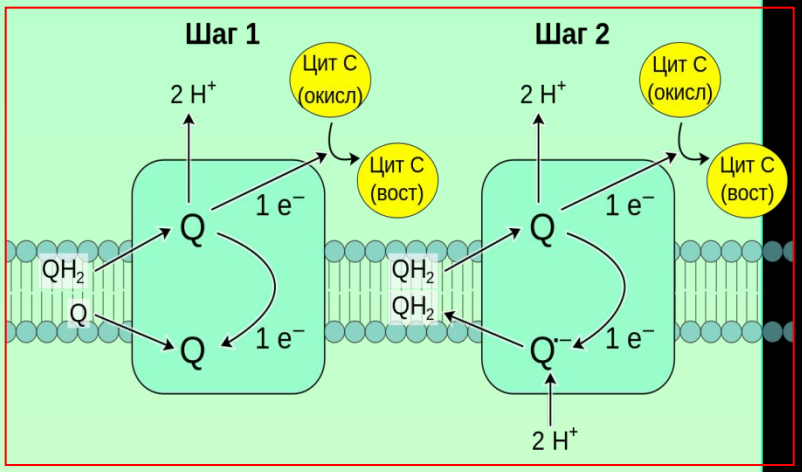
FeS-белок (2Fe2S), 21,5kDa

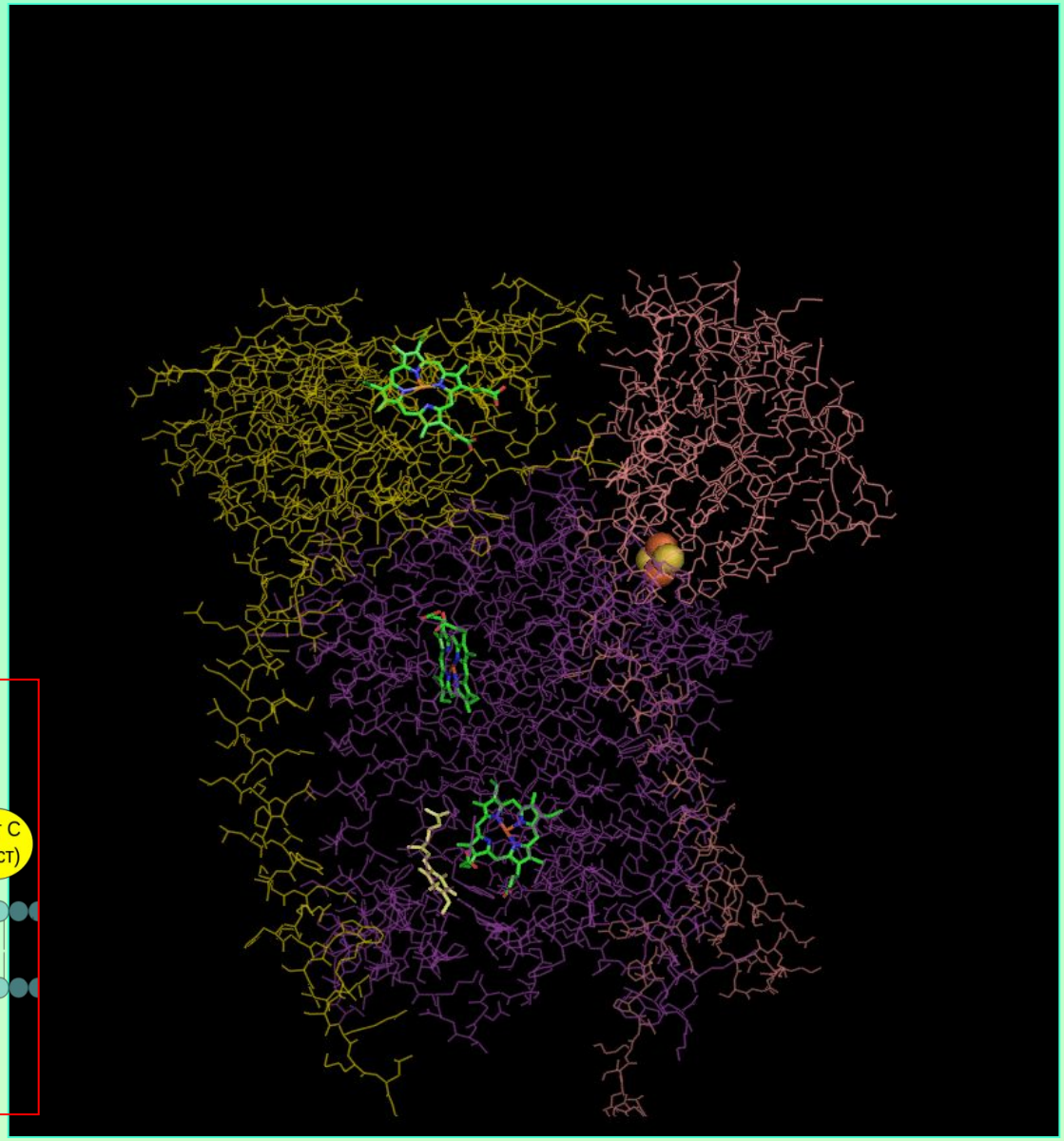
Cyt c_1, 27kDa, 240а-к.

E_0': b_L -0,04v, b_H +0,04v, FeS-белок +0,28v, Cyt c_1 +0,22v, Cyt c +0,25v

Работа Q-цикла. Или как за счет окисления всего одного хинола «перекачать» аж 4 протона...







У растений B_6C-комплекс участвует в транспорте белков в митохондрию..

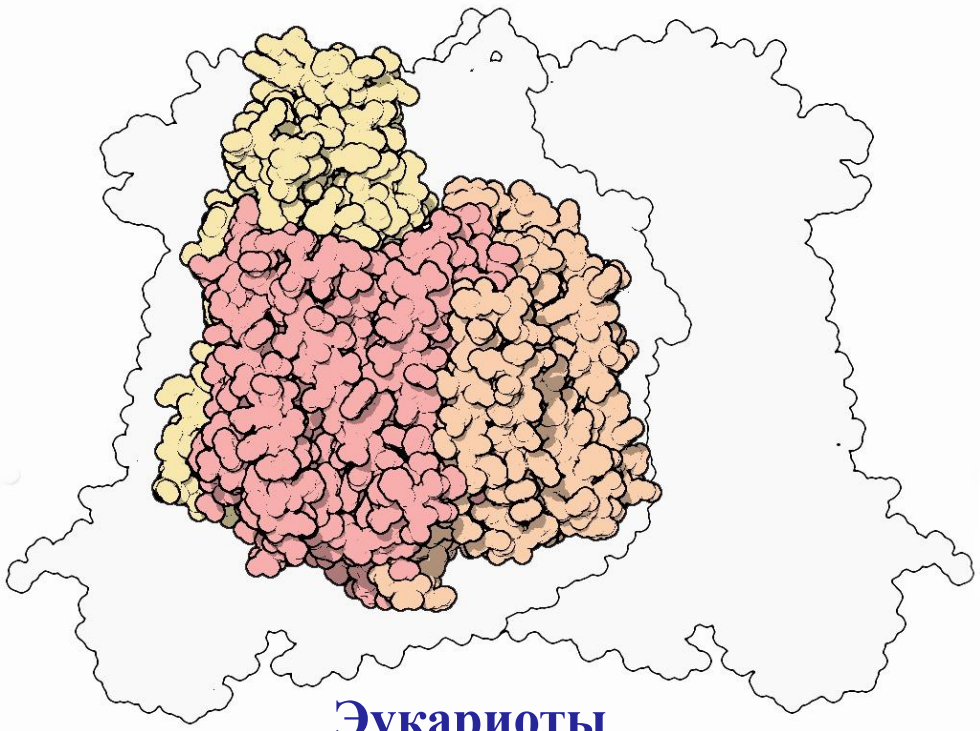
У растений Комплекс III бифункционален. Недавние исследования митохондрий пшеницы (*Triticum aestivum*), картофеля (*Solanum tuberosum*) и шпината (*Spinacia oleracea*) показали, что две коровые субъединицы комплекса, обращенные в матрикс, обладают MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*)-пептидазной активностью и принимает участие в транспорте белков в митохондрии.

MPP-пептидаза - гетеродимер, состоит из α-MPP и β-MPP субъединиц, каждая по 50 кДа. Она отрезает у поступающих в митохондрию белков N-концевую *сигнальную* или *транзитную* последовательность («пресиквенс») из 40-80 аминокислот.

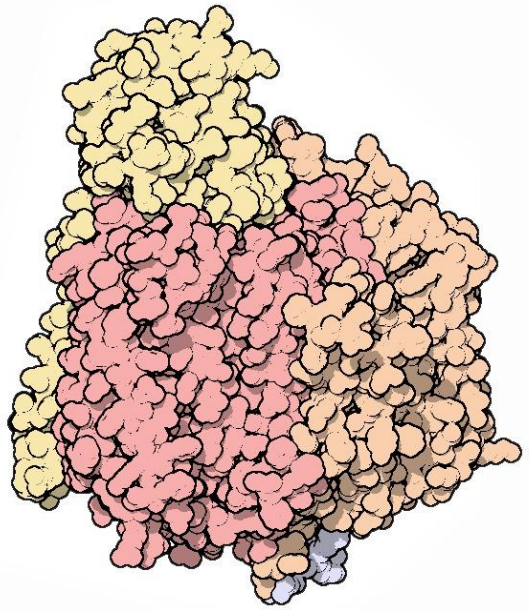
В растениях MPP-пептидаза входит в состав цитохром-bc_1-комплекса, что считается архаичным признаком (на самом деле, спорное утверждение..)

У животных произошла дупликация генов коровых субъединиц, так что MPP-пептидаза у них присутствует как независимый водорастворимый белок матрикса.

Комплекс IV: цитохром a-a_3, цитохромоксидаза



Эукариоты

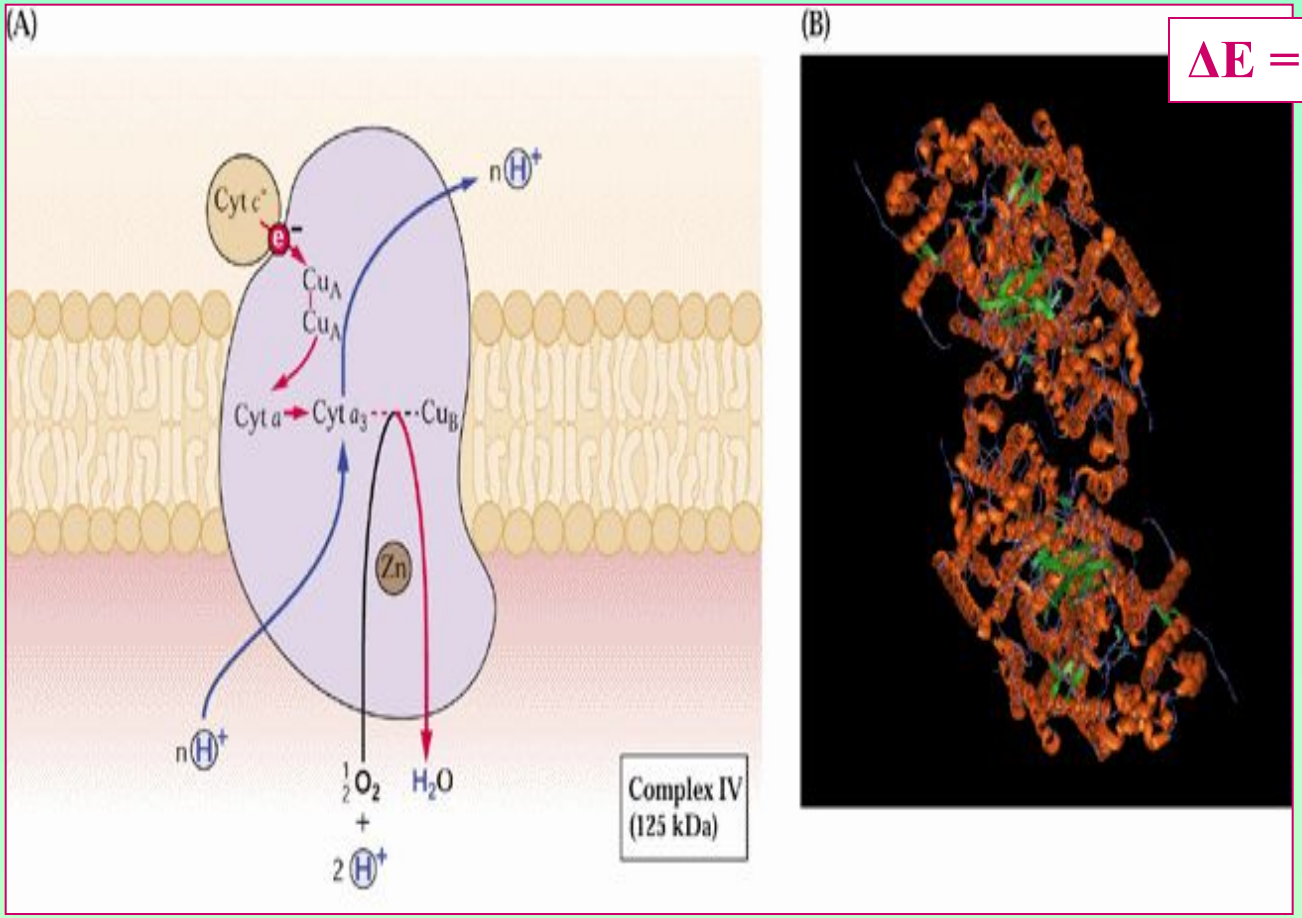


Прокариоты

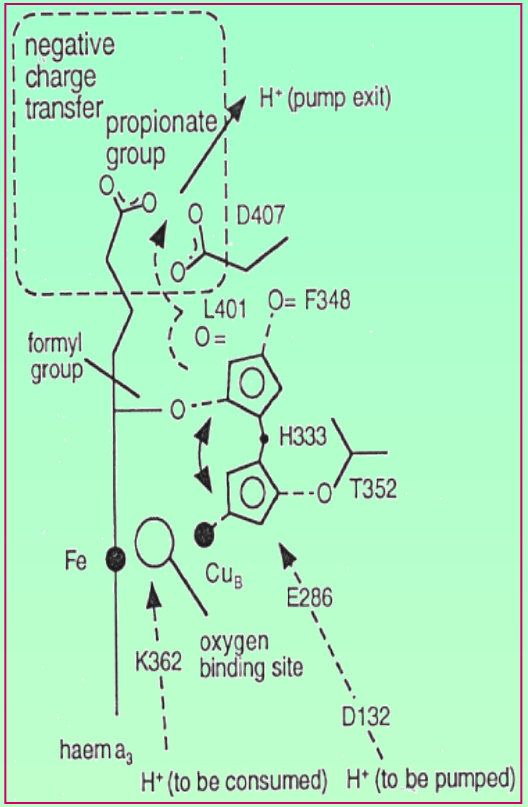
В мембране - димер. Мономер у эукариот - от 10 (дрожжи) до 13 - 14 (млекопитающие, птицы) полипептида. Из них 3 больших полипептида с каталитической активностью, кодируются в m-геноме, и 9 -10 небольших регуляторных белков ядерного кодирования с множеством изоформ

Для митохондрий растений - самый неизученный комплекс. По-видимому, у растений он состоит из восьми субъединиц, схожих с субъединицами комплекса IV других эукариот, и шести дополнительных субъединиц, специфичных для растений.

Комплекс IV: схема работы



ΔE = 0,25v - 0,82v ≈ 0.55v



Основные каталитические полипептиды, кодируемые в m-геноме

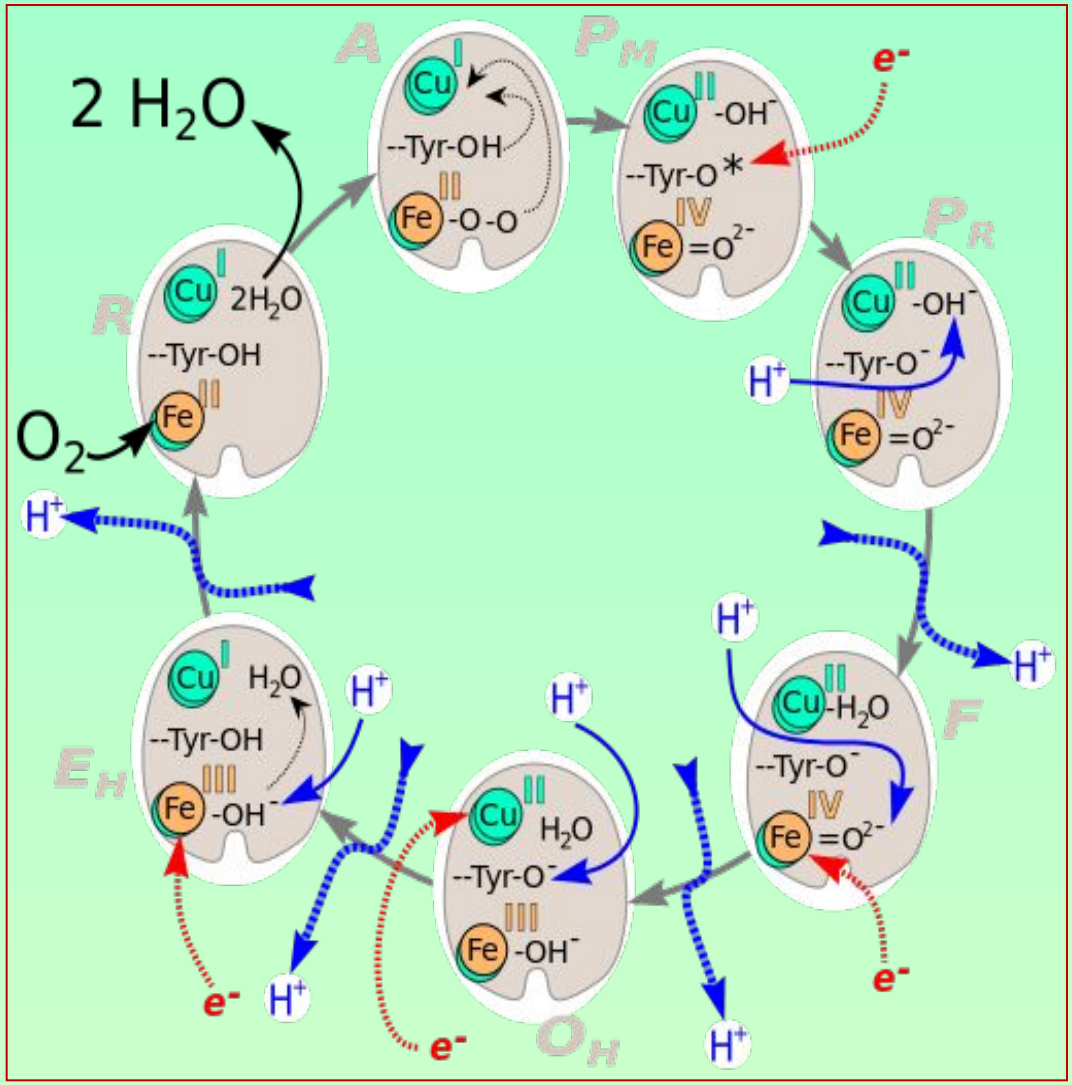
I - 57 kDa., II - 26 kDa. И III - 30kDa.

4 Red-Ox центра: два гема а (а и a_3) и два Cu-центра: Cu_A (2атома) и Cu_B.

Гемы и Cu_B – на I белке, Cu_A – на II.

Предполагаемый механизм восстановления кислорода цитохромом а-a_3

Восстановление идет за счет попарного переноса e^-, что исключает образование активных форм кислорода.



A Полностью восстановленный биядерный центр связывает O_2

P_M Перенос четырёх электронов на кислород: два от железа гема a_3 ($Fe^{II} \rightarrow Fe^{IV}$), один от Cu_B ($Cu^I \rightarrow Cu^{II}$), четвёртый - от Tyr-244.
Tyr-244 отдаёт протон для разрыва двойной связи O_2 и Tyr-244-радикал восстанавливается до аниона цит-м *c*

P_R Протонирование Cu(II)-OH^- с образованием H_2O.

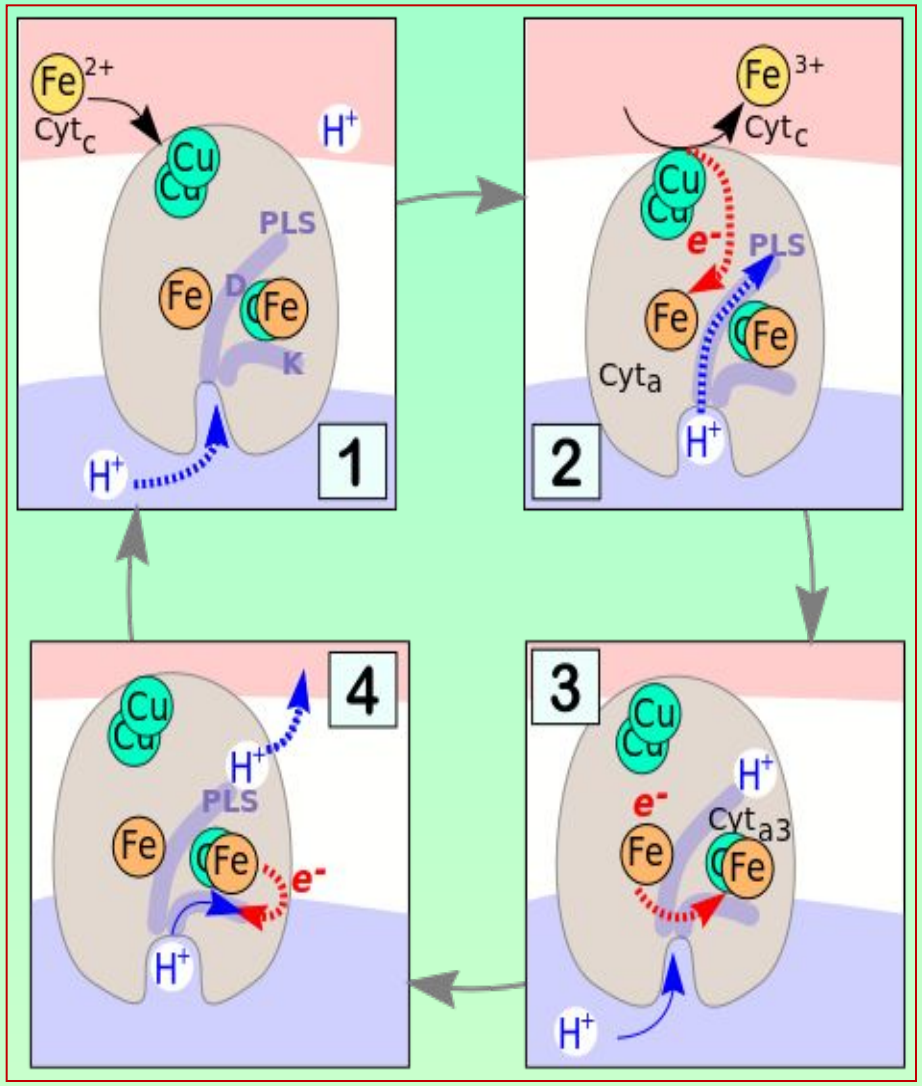
F Образовавшаяся H_2O. связывается с Cu_B. Железо $Fe(IV)=O^{2-}$ восстанавливается до Fe^{III}, а связанный с ним кислород протонируется. Высвобождается первая молекула воды.

O_H Tyr-244-анион протонируется, Cu_B восстанавливается до Cu^I за счёт электрона от цит *c*.

E_H Fe^{III} восстанавливается до Fe^{II}, связанная с ним OH^- группа протонируется с образованием второй молекулы H_2O.

R Биядерный центр полностью восстановлен.

Предполагаемый механизм транспорта протонов через цитохромом а-$а_3$



Для транспорта протонов имеются D-, K- и H-каналы, «выстланные» полярными остатками аминокислот. Считается,, что K-канал связывает матрикс с биядерным центром и служит для доставки «субстратных» протонов, а D- и H-каналы являются «сквозными».
На каждый электрон от цит.с цитохромоксидаза закачивает через канал K один «субстратный» (используемый для образования воды) протон и переносит по каналу D один дополнительный протон.

1. Каналы комплекса закрыты, цитохром *c* передаёт электрон на Cu_A-центр.

2. Электрон перемещается с Cu_A-центра на гем *a*, что приводит к открытию канала D перемещению протона из матрикса в PLS (*сайт загрузки протона - proton loading site*).

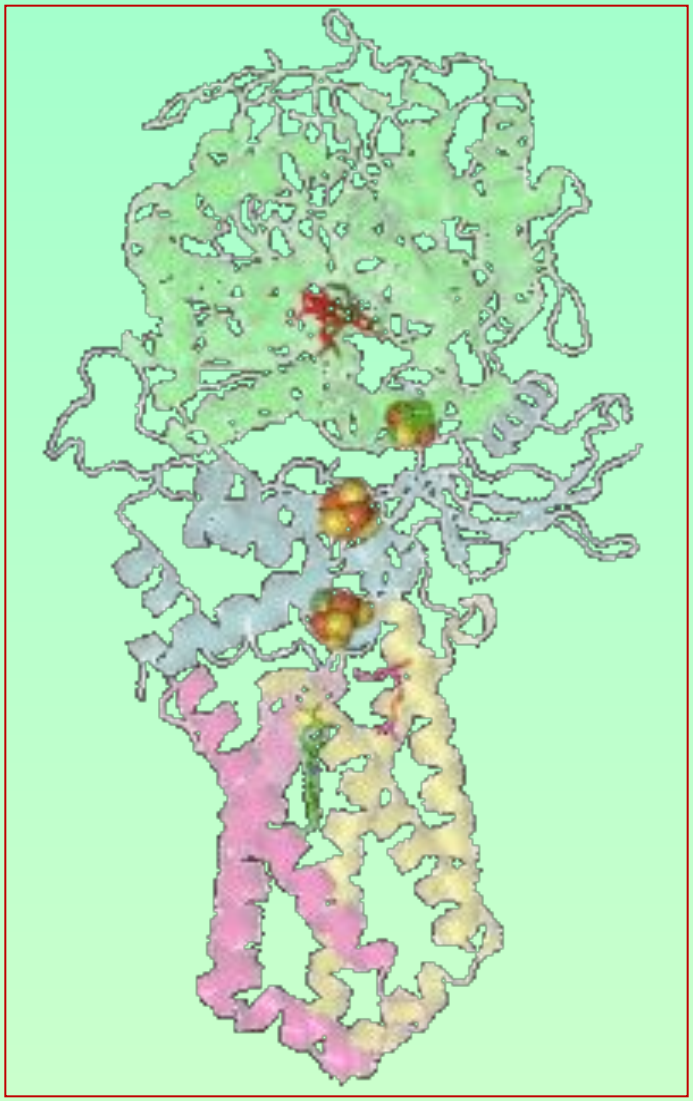
3. Электрон переходит на биядерный центр к гему a_3, и через канал K из матрикса входит один субстратный протон.

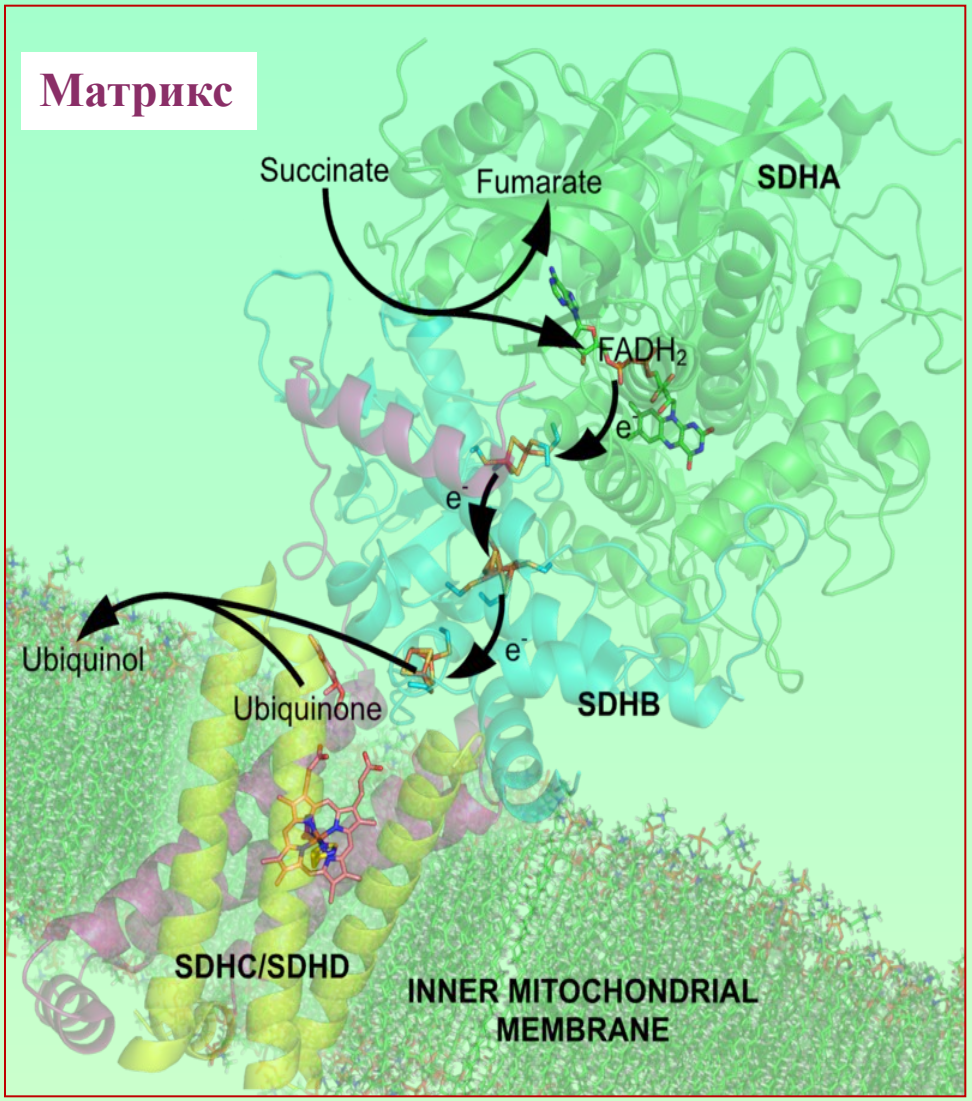
4. Предзагруженный в PLS протон выталкивается в межмембранное пространство, как полагают, за счет электростатического отталкивания от субстратного протона.

Комплекс II: Сукцинатдегидрогеназа.

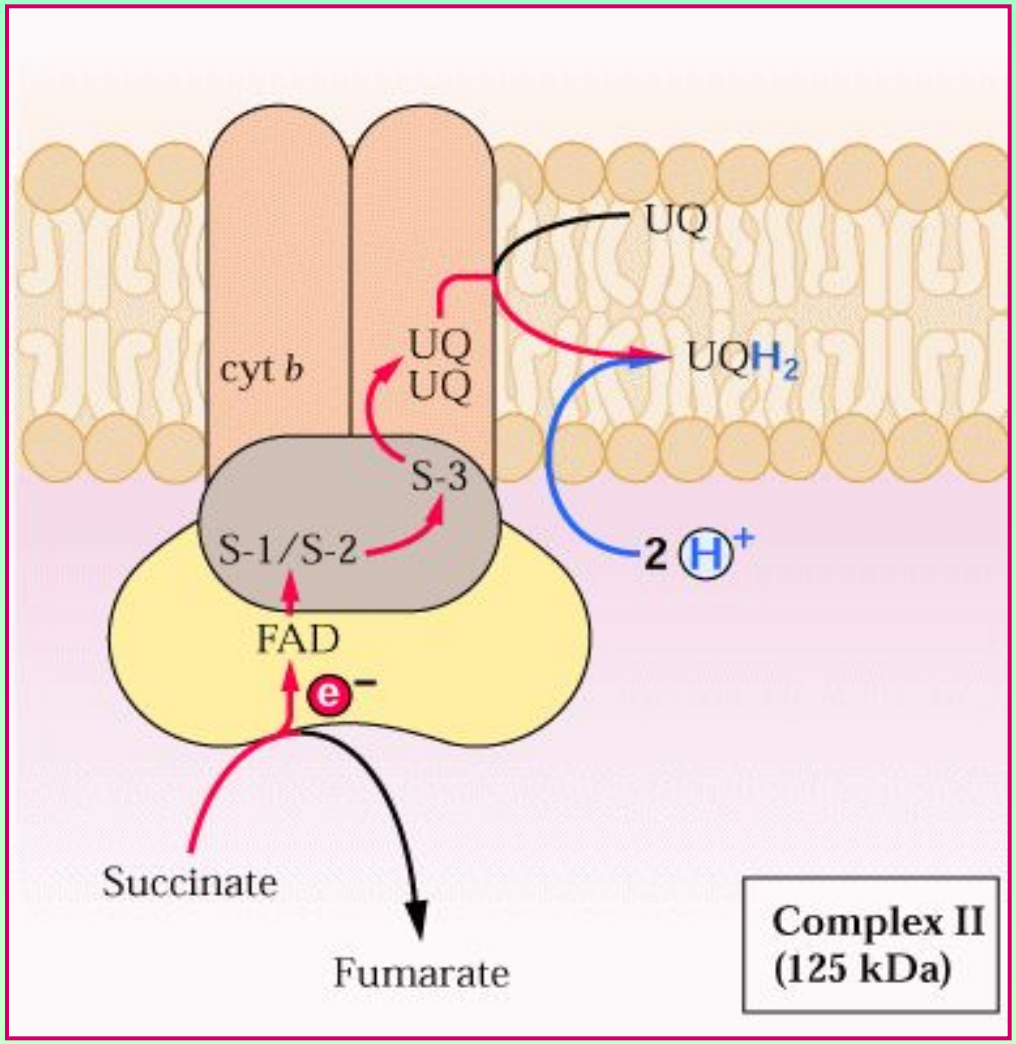
Четыре полипептида: SDH A, B, C и D (SDH 1 – 4).

Единственный фермент цикла Кребса, встроенный в мембрану митохондрий…





Комплекс II: Сукцинатдегидрогеназа. Схема, кофакторы - - и зачем фермент цикла Кребса встраивать в мембрану?



Состав: 4 субъединицы

SDH1, 67kDa, **FAD,**

SDH2, 28kDa, **3FeS центра**

SDH3, 20kDa, **гем cyt b_{560}**

SDH4, 16.5kDa

Почему комплекс II встроен в мембрану ?

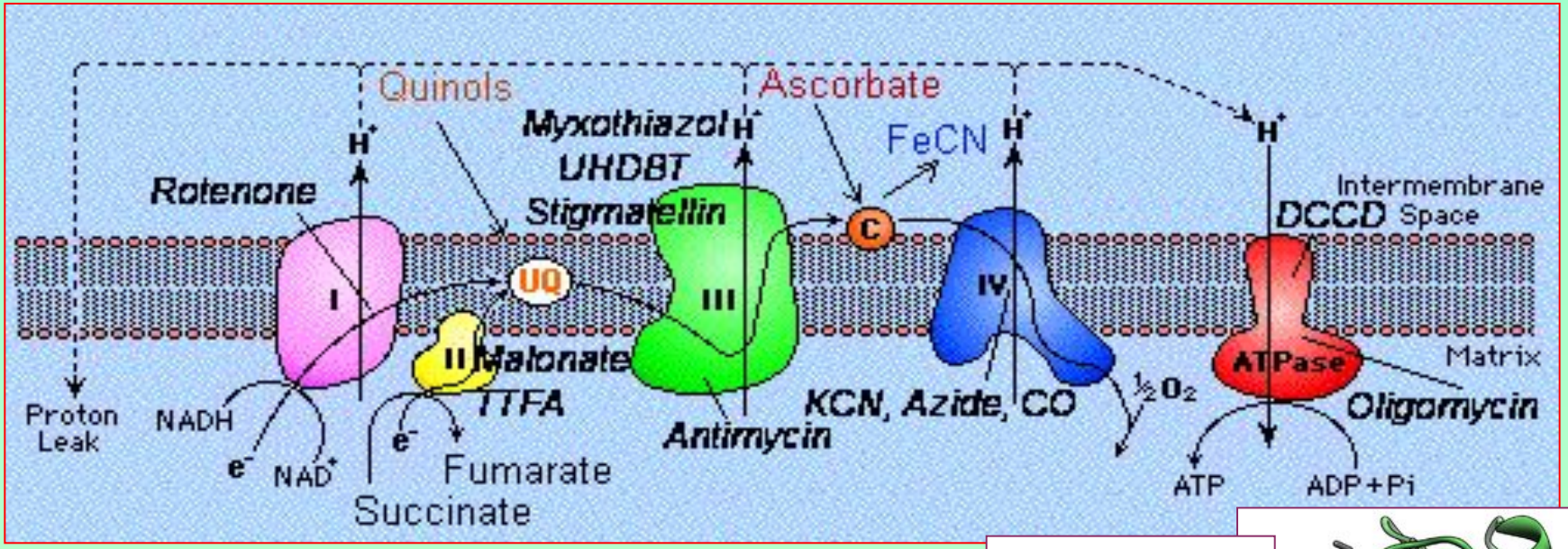
Вход e^- в ЭТЦ от соединений с разным уровнем запаса энергии:

E_o' фумарат/сукцикат +0,03v - для работы комплекса I не хватает…

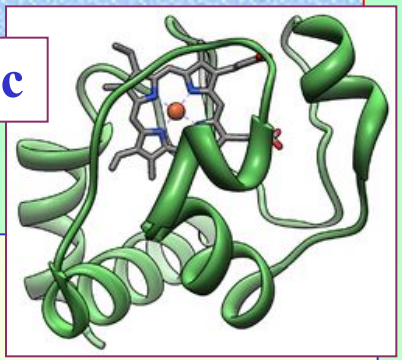
Но передать электроны на убихинон – вполне..

У ряда водорослей и печеночников 3 субъединицы кодируются в геноме митохондрий.

Итак, общая схема дыхательной ЭТЦ: четыре белковых комплекса, объединяемые подвижными переносчиками e^-



Цитохром с

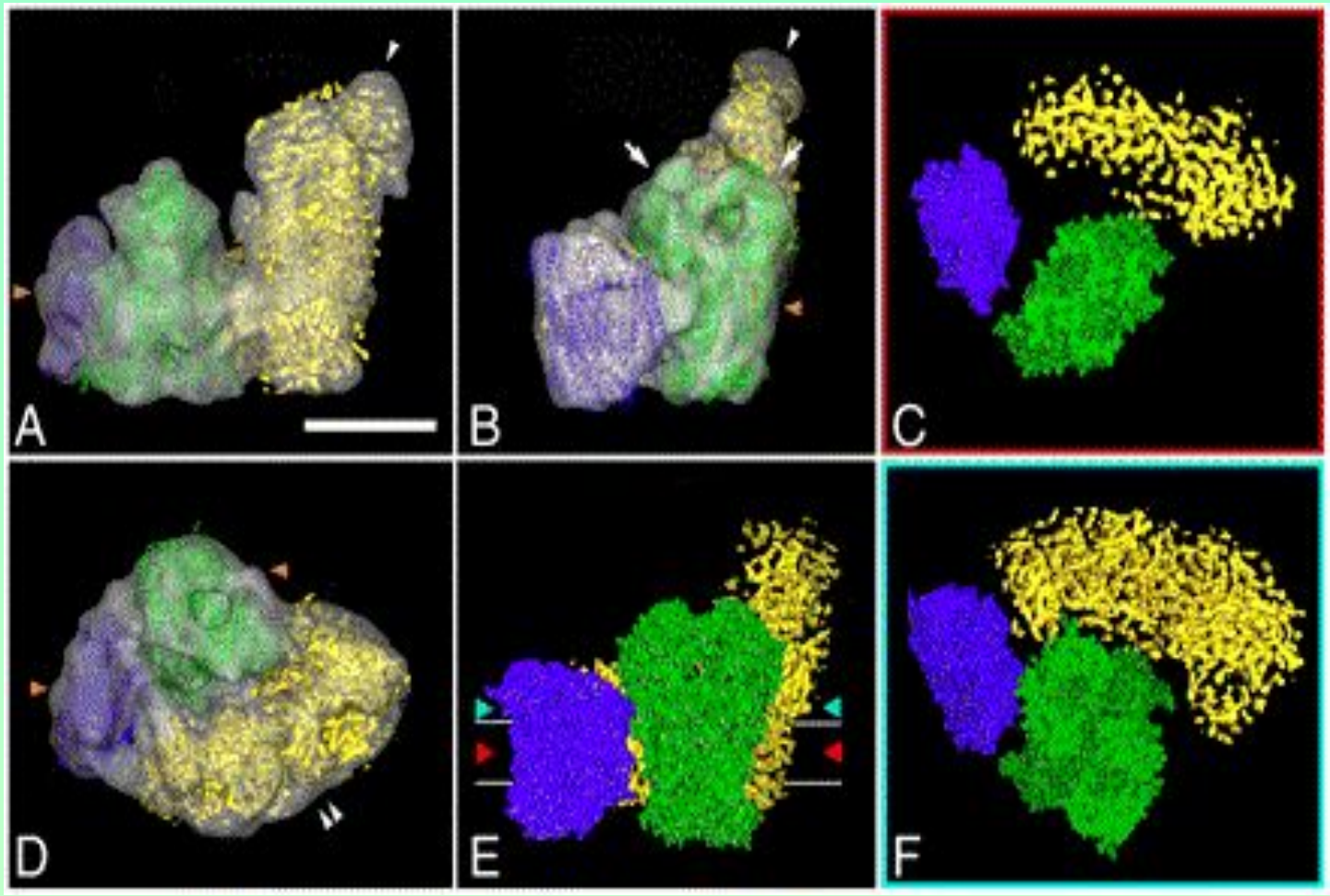


Подвижные переносчики:

1. **Убихиноны** – их много («пул убихинонов»)
2. **Цитохром с** – 104 ак. Локализован с наружной стороны внутренней мембраны. Гем ковалентно связан с белком (через cys14 и cys17)

Примерная стехиометрия: 1 комплекс I : 3 bc_1 : 7 aa_3 : 9 cyt c : 50 UQ

Или «Респирасома»? Суперкомплексы I / III / IV



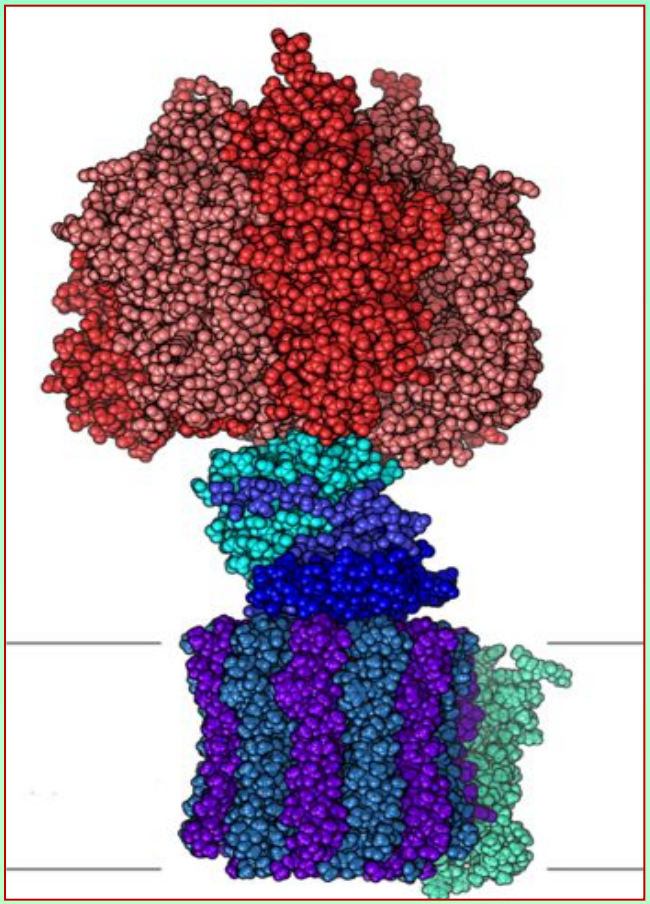
Комплекс I показан жёлтым, комплекс III - зелёным, комплекс IV - фиолетовым.

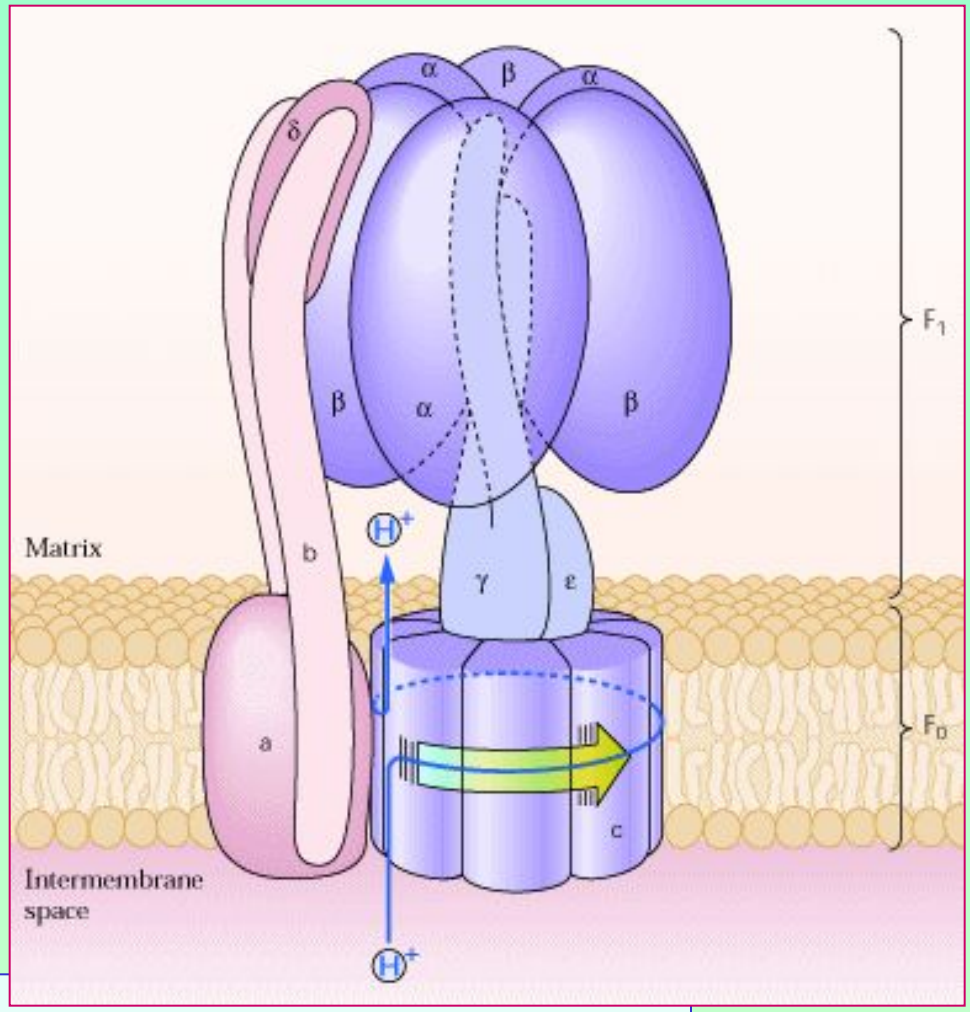
A, B, и E - боковой вид комплексов, расположенных в мембране.

Горизонтальная линия на рисунке E показывает расположение мембраны.

D - вид из межмембранного пространства, C и F - вид из матрикса

АТФ-синтаза: «вальсирующий» комплекс





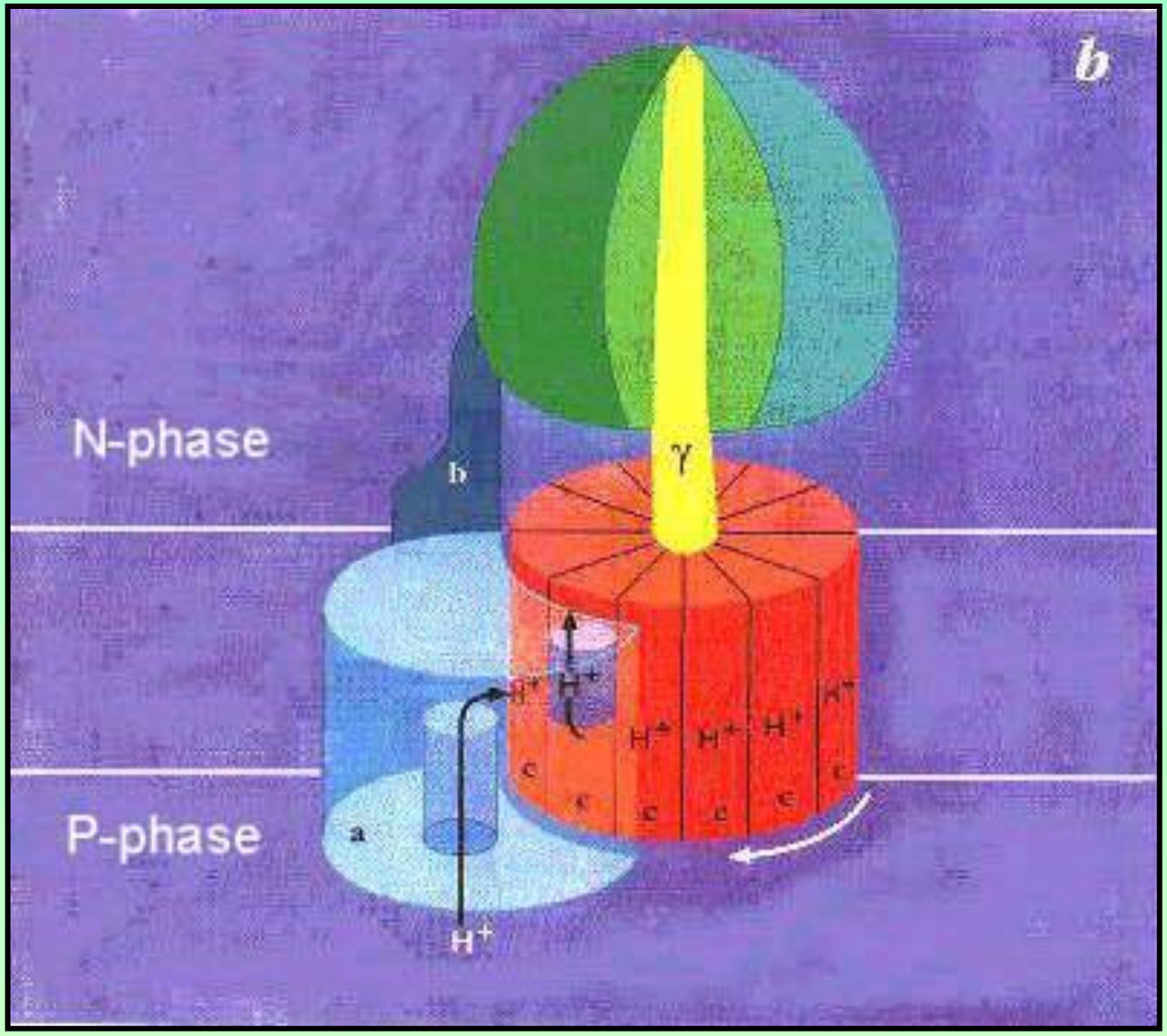
Структура: две субъединицы: F_0 и F_1

F_1: $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ **α** - 59 kDa, **β** - 56 kDa, **γ** – 36 kDa **δ** - 17.5 kDa, **ε** - 13,5kDa

F_0: a (I) -15kDa, **b (II)** - 12.5kDa, **c (III)** - 8kDa **a:b:c** – 1:2: (6-15)

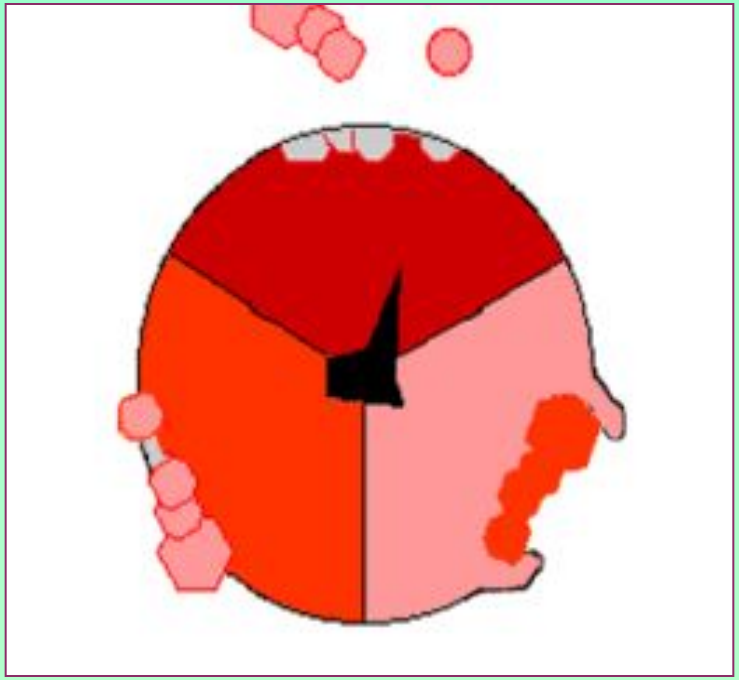
α , β, ε субъединицы F_1 и субъединица a (I) F_0 кодируются в m-геноме.

Работа АТФ-синтазы чем-то напоминает работу электродрели…



«Трехтактная» работа АТФ-синтазы

Вращательная энергия γ-субъединицы нужна для «выталкивания» АТФ из активного центра β-субъединицы

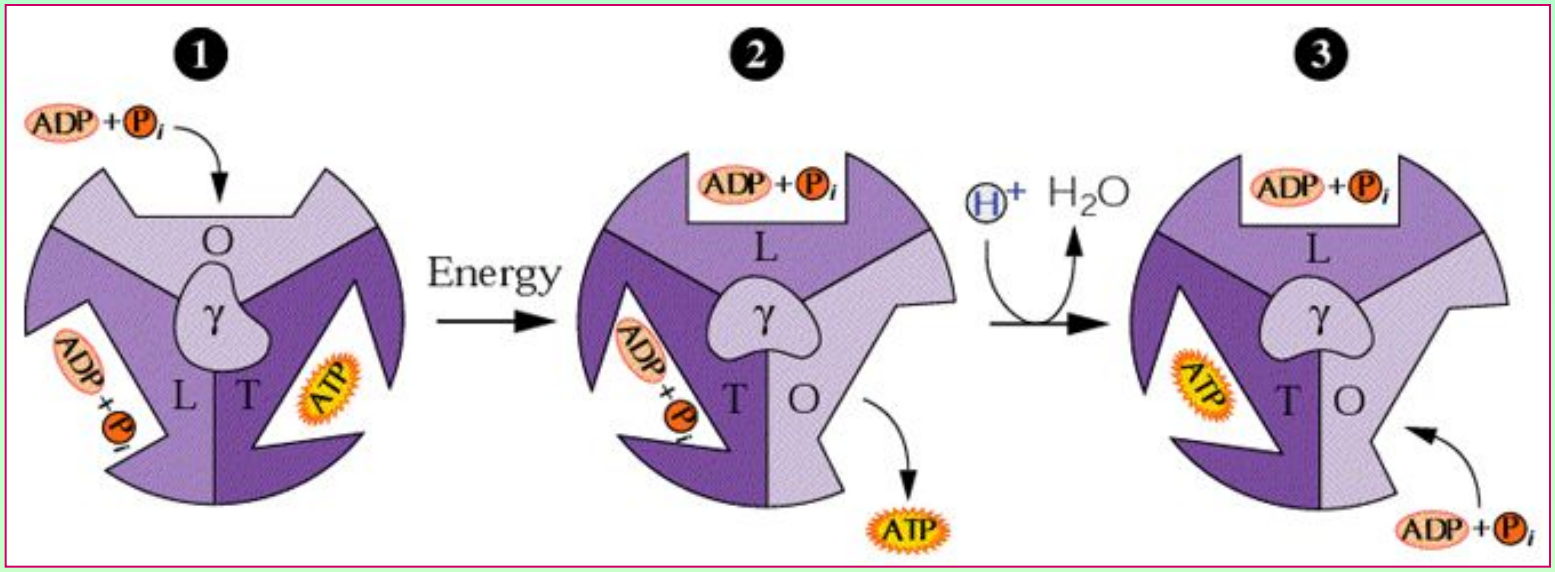


Состояния активных центров β-субъединиц АТФ-синтазы:

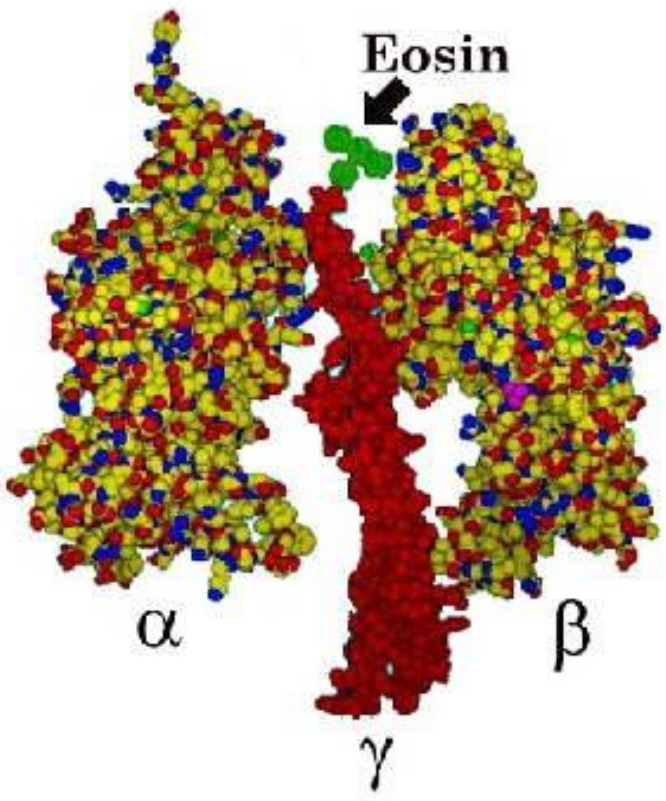
O – открыт («open»),

T – закрыт («напряжен» - tight),

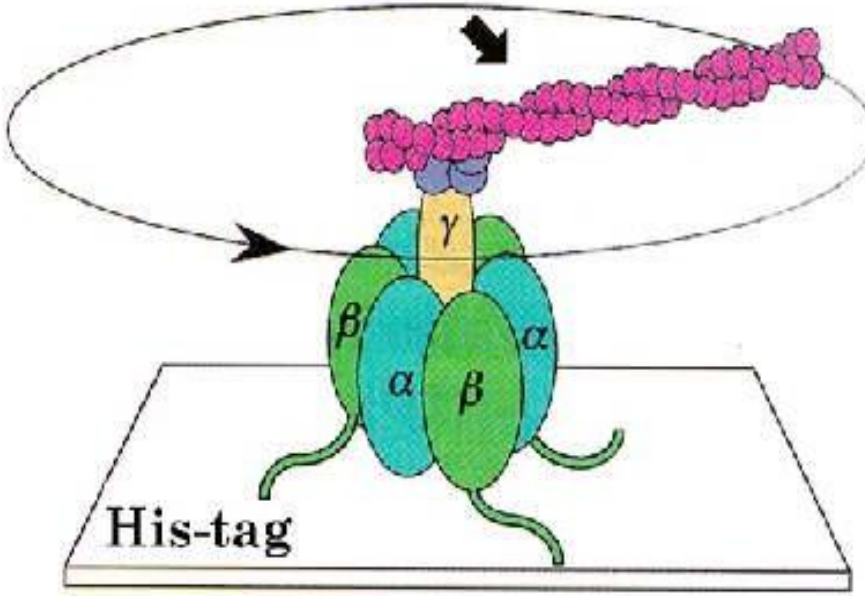
L – полуоткрыт («высвобождающийся» - loose)



Красивое доказательство вращательной работы АТФ-синтазы

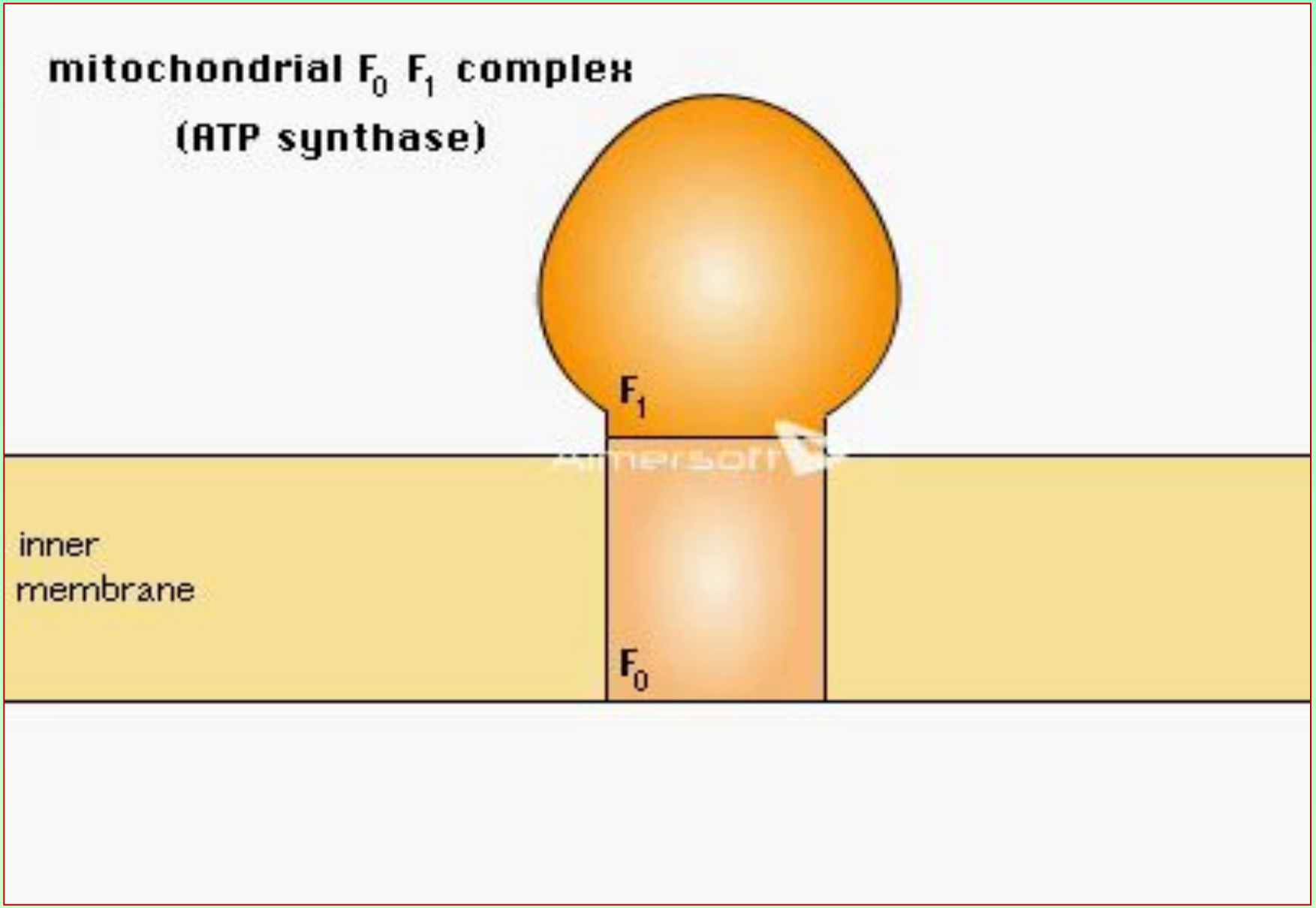


W. Junge, H. Lill & S. Engelbrecht
TIBS 22, 420 - 423 (1997)

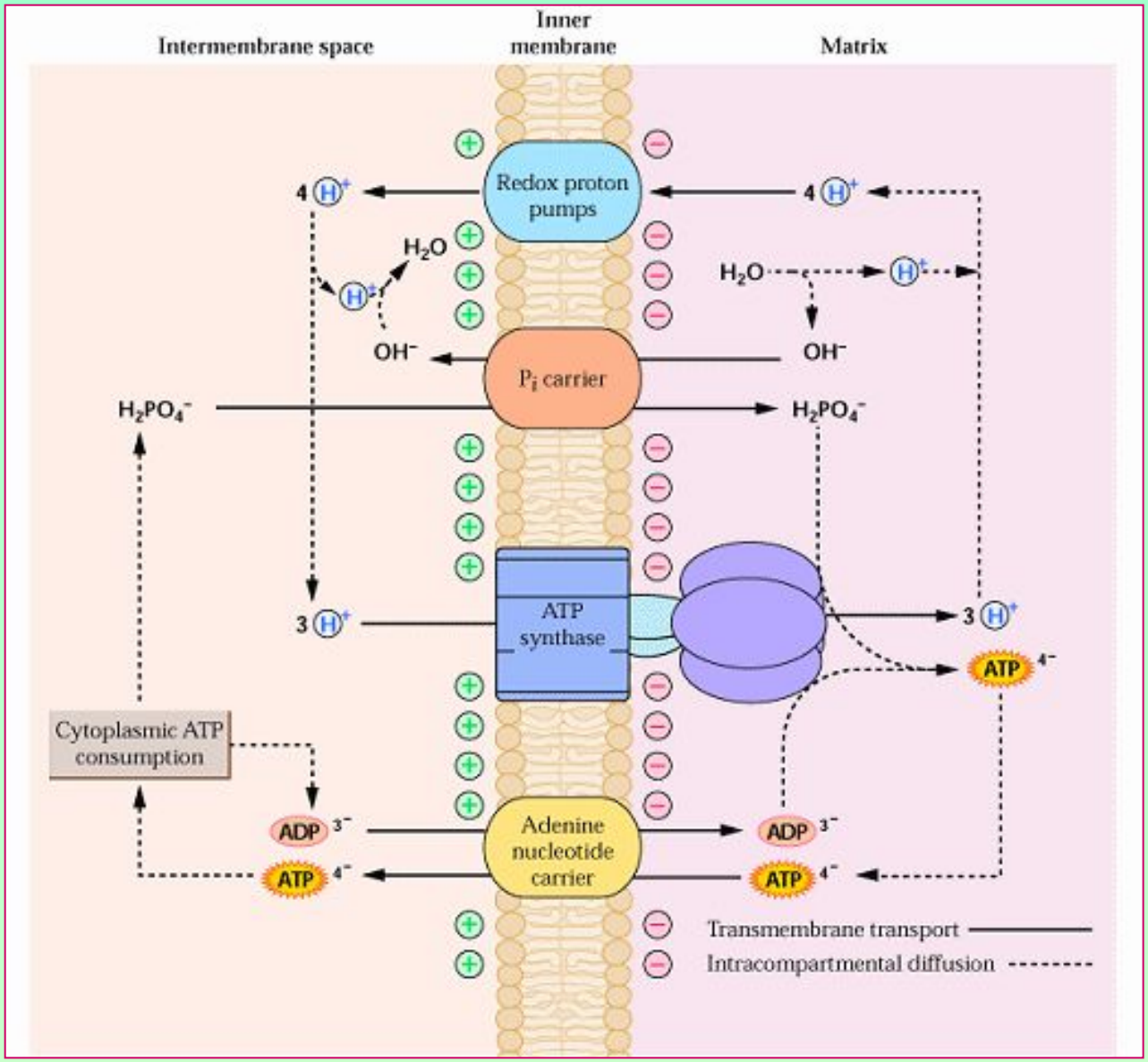


W. Junge, H. Lill & S. Engelbrecht
TIBS 22, 420 - 423 (1997)

Работа АТФ-синтазы: упрощенно..



Работа АТФ-синтазы: анимация..

Работа АТФ-синтазы: в представлении китайских студентов…

Транспорт интермедатов дыхания через мембрану митохондрий.