

Transport boru v rostlinách a živočiších. Jeho úloha v růstu a vývoji.

- a) Úvod
- b) Funkce boru v rostlinách
- c) Mechanizmy transportu boru v rostlinách
- d) Bor v živočišných tkáních

Martin Fellner
Laboratoř růstových regulátorů
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR



Xu F et al. (2007) *Advances in Plant and Animal Boron Nutrition*. Springer Netherlands

a) Úvod

Bor (B, boron) – nezbytný mikroelement v rostlinném a živočišném organizmu

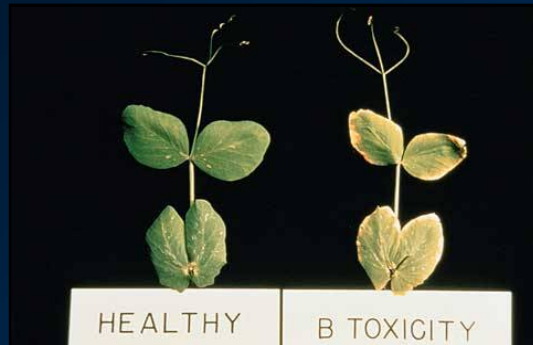
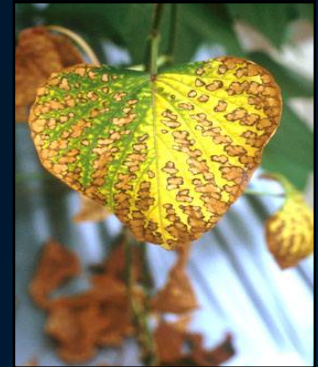
V půdě – $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; hladina B ovlivňuje výnos i kvalitu plodin

Hranice mezi nedostatkem a nadbytkem boru je úzká; mechanismus toxicity není znám

Nedostatek boru je rozšířenější než nedostatek jiných mikroelementů



MFPSB



Význam boru pro rostliny:

- ❖ **Syntéza a struktura buněčné stěny**
- ❖ **Transport cukrů**
- ❖ **Metabolismus karbohydrátů**
- ❖ **Metabolismus RNA**
- ❖ **Metabolismus IAA**
- ❖ **Respirace**
- ❖ **Metabolismus fenolů**
- ❖ **Transport přes membrány**

Mechanismy působení boru nejsou známy

Bor – přijímán kořeny z půdy ve formě H_3BO_3 , transportován do rostliny a akumulován v růstových zónách listů a stonků

Transport:

- pasívní difúze (Raven 1980)
- pomocí proteinových transportérů (Dordas and Brown 2000)



***Arabidopsis* – 3 transmembránové mechanizmy:**

- export B z pericyklu do xylému; efflux (2002); BOR1
- import B do epidermálních, kortikálních, endodermálních buněk; uptake (2006); NIP5;1 – kanál pro kys. boritou
- export B z epidermálních buněk do půdy; efflux (2007); BOR4

b) Funkce boru v rostlinách

Přesná funkce B v metabolismu rostlin není známa.

1) Úloha B ve struktuře buněčné stěny (CW) – dedukována na základě symptomů nedostatku boru

- zastavení růstu apikálních meristémů
- vývoj tuhých listů
- změna fyzikálních vlastností tkání
- velké množství B nalezeno v CW



Změny v syntéze
a struktuře CW

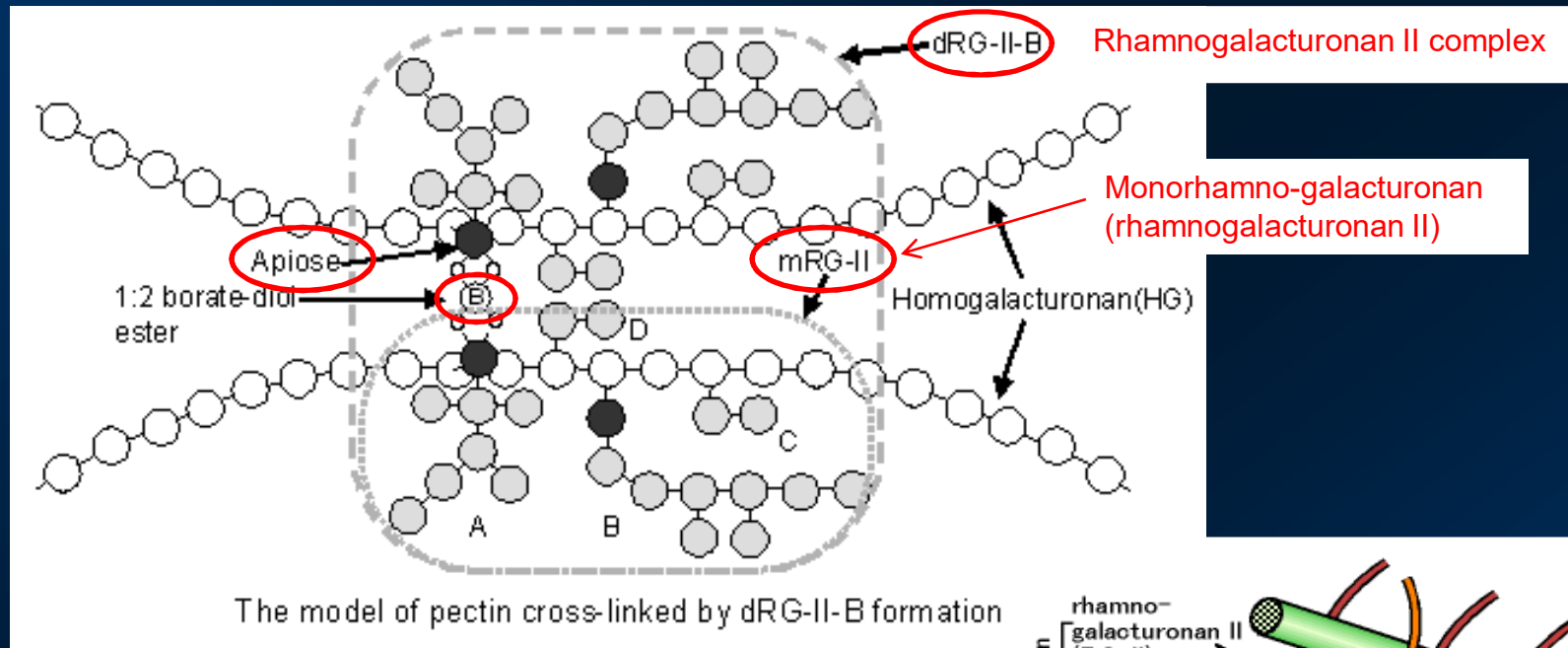
1992 – Hypotéza „apióza“; apióza – cukr v pektinech CW, tvoří estery s B nebo boráty

1994 – B tvoří komplex s pektinovou frakcí CW; nedostatek B – anatomické a fyzikální změny CW

1996 – Identifikace polysacharidu rhamno-galacturonanu-II (RG-II)

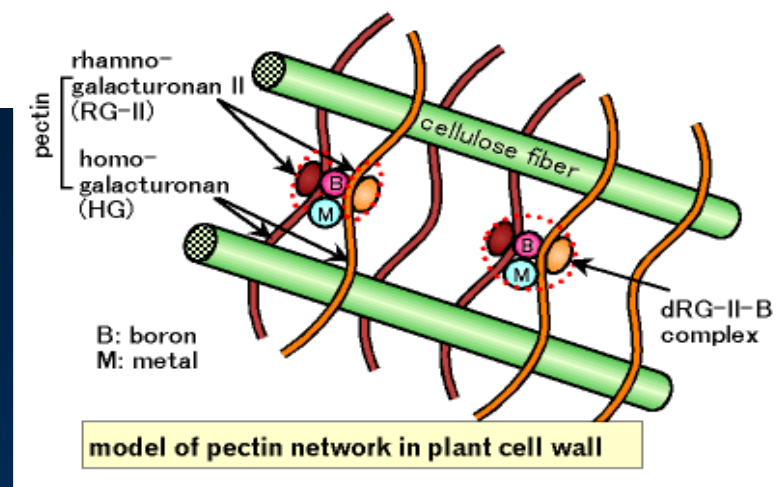
**Monomery homogalacturonanu (HG) – spojeny apiózou => dimer mRG-II
= monorhamno-galacturonan**

Dimery mRG-II – spojeny borem přes apiózu => dRG-II-B = rhamnogalacturonan



Další funkce B:

- inkorporace proteinů, pektinů a prekurzorů do CW (intina)
- určování velikosti pórů v CW (buněčné kultury) (1999)



2) Úloha B v reprodukčním vývoji rostlin

Nedostatek boru => špatný nebo přerušovaný vývoj květu, špatný vývoj plodů, opadávání plodů

1944 – výnos vojtěšky 600x vyšší po přidání B do půdy

1996 – B v CW pylu kontroluje syntézu a ukládání pektinového materiálu prostřednictvím sítě RG-II – póry v CW

Hypotéza: B vytváří chemotaktický gradient, který směřuje pylovou láčku k vajíčku => ovlivnění fertility

Nedostatek boru v reprodukčních orgánech, normální množství B ve vegetativních částech



Hypotéza: Reprodukční a vegetativní části rostliny mají velice odlišnou citlivost k boru => => transport B hraje velice důležitou roli v reprodukčním vývoji



Mutant *bor1-1*

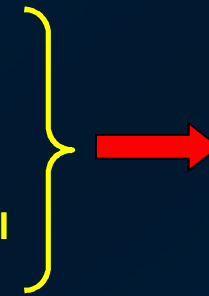


H_3BO_3

3) Úloha B v rostlinném metabolismu

80. léta 20. století:

- askorbát/glutathionový cyklus
- metabolismus fenolů
- metabolismus dusíku
- vývoj kyslíku a aktivita fotosystému II ve fotosyntéze



Mechanismy nejsou známy

4) Úloha B ve struktuře a funkci membrán

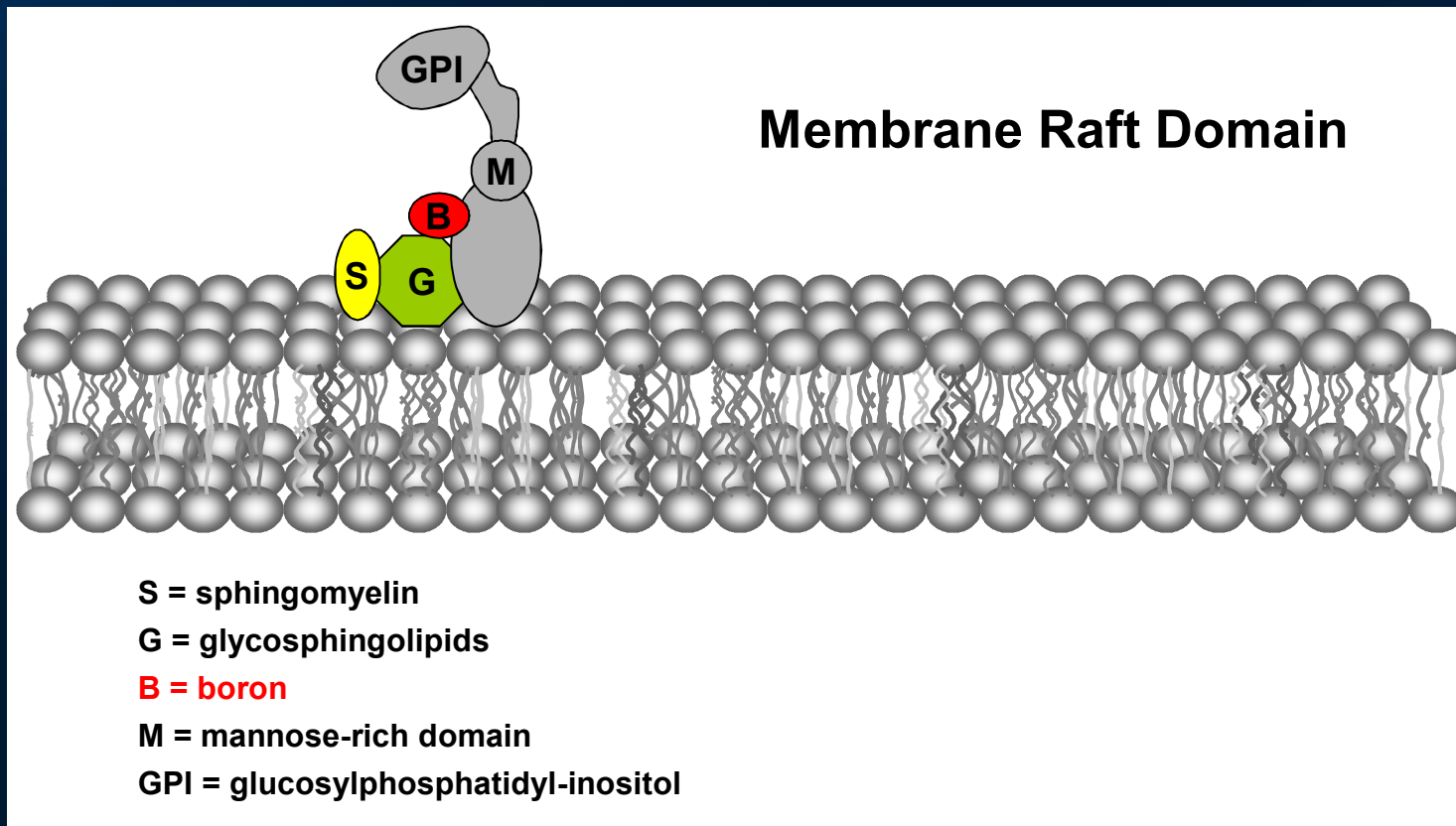
Nedostatek B => narušení transportních procesů přes membránu:

- snížená akumulace fosfátů a rubidia (kukuřice, fazole)
- inhibice aktivity ATP-H⁺ pumpy (90. léta; rajče)
- reaguje s redox enzymatickými systémy => změny v membránovém potenciálu
- mění selektivitu membrány pro Na⁺ a Cl⁻
- tvoří komplexy s glykoproteiny nebo glykolipidy

Glykoproteiny a glykolipidy tvoří agregáty => domény se specifickými vlastnostmi („membrane rafts“)

1997 – membrane rafts jsou specificky aktivní složky membrány (přenos signálu)

- časté v aktivních a rychle se vyvíjejících se membránách
- vysoce citlivé k boru => **hypotéza: B** působí prostřednictvím raftů



c) Mechanizmy transportu boru v rostlinách

- pasívní difúze (Raven 1980)
- pomocí proteinových transportérů (Dordas and Brown 2000)

Bor – přijímán kořeny z půdy, transportován, akumulován v růstových zónách listů a stonků

pKa H_3BO_3 : 9,24



Cytoplazma (pH 7,5): 98% H_3BO_3 [$\text{H}(\text{BO})_3$]; 2% borát $\text{H}(\text{BO})_4^-$

Apoplast (pH 5,5): 99,95% H_3BO_3 [$\text{H}(\text{BO})_3$]; 0,05% borát $\text{H}(\text{BO})_4^-$

Pasivní difúze (Raven 1980)

Teoretický koeficient lipidové permeability H_3BO_3 : $8 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$
(~ 1 mm/4 hod)



Hypotéza: pasivní difúze H_3BO_3 je hlavní a možná jediný mechanismus transportu B přes membránu

Dorden and Brown (2000)

Pomocí syntetických lipozomů: $4,9 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$

Pomocí membrán kořenů *Cucurbita*: $3,9 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ v membráně

$2,4 \times 10^{-8} \text{ cm s}^{-1}$ ve vezikulech bez membrány

Stangoulis et al. (2001)

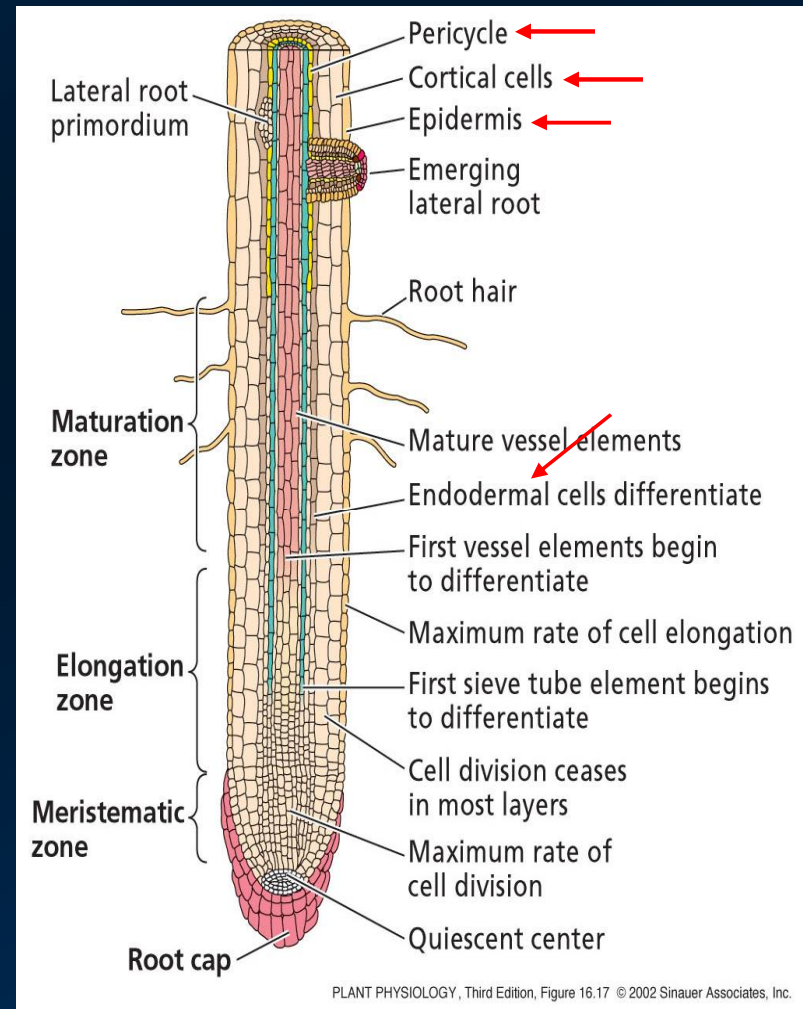
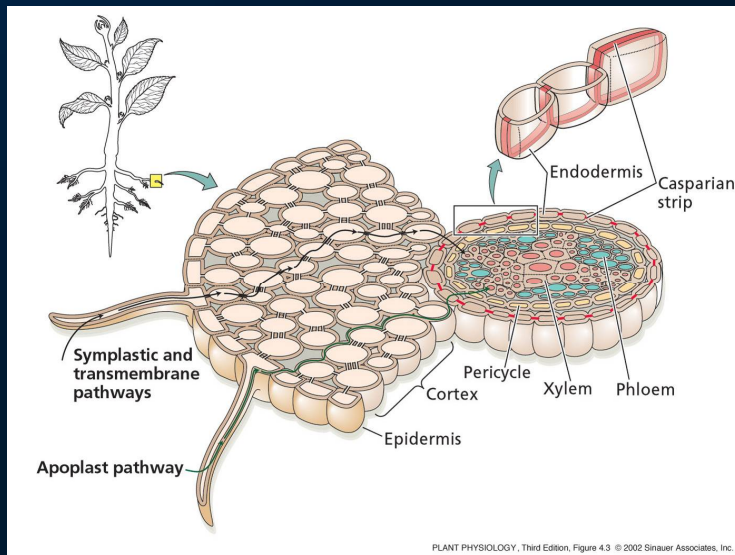
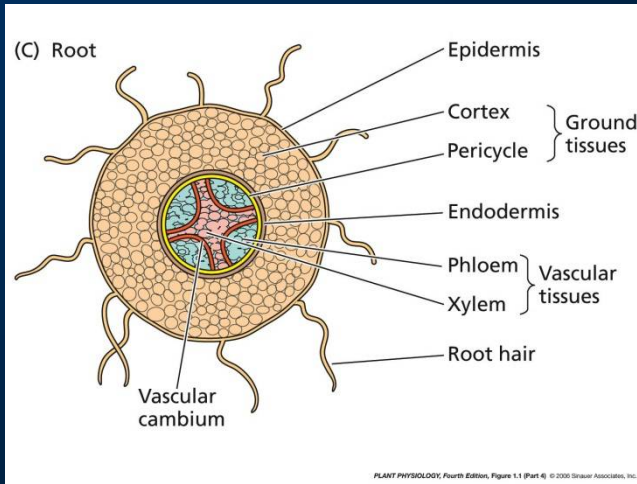
V obřích řasách *Chara*: $4,4 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$

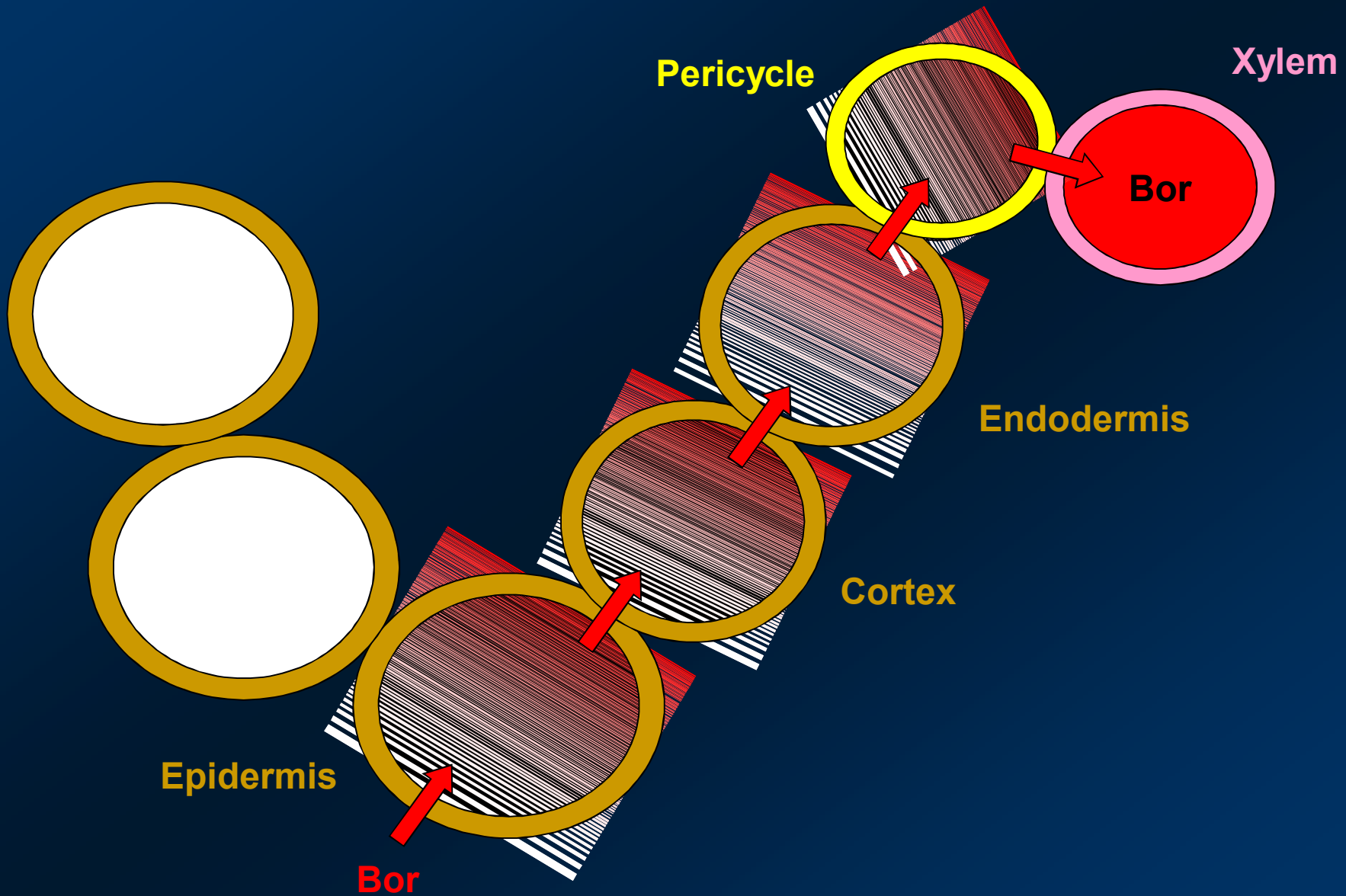


Hypotéza: Existence membránových proteinů, které by transportovaly dostatek boru do buňky

Proteinový transport boru z půdy do stonku

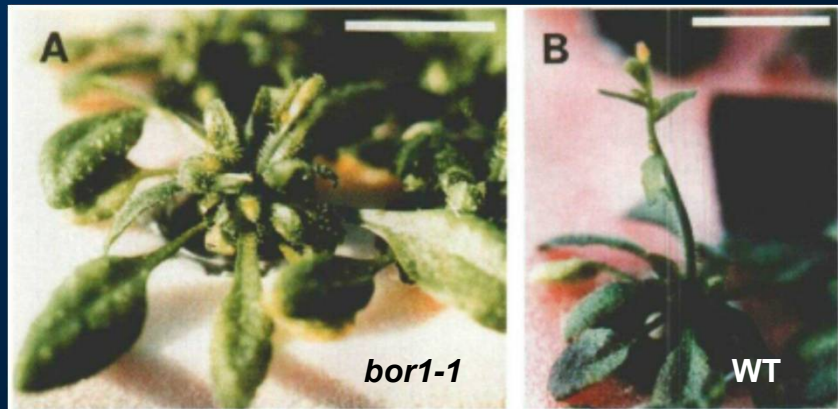
Transport boru z půdy přes epidermis do xylemu (xylem loading)





Protein BOR1

Mutant *bor1-1* (high boron requirement 1) – k normálnímu růstu potřebuje vysokou koncentraci boru (100 μ M)



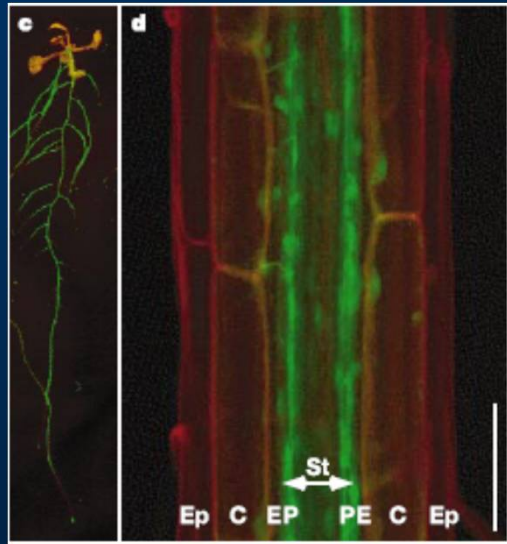
Noguchi et al. 1997

- nízká hladina akumulovaného B
- defekt v příjmu či translokaci B
- chromozom 2

2002 – nepřímé důkazy pro existenci energeticky závislých pro B vysoce afinitních transportérů indukovaných nedostatkem boru (slunečnice)

Takano et al. (2002) – poziční klonování *bor1-1* => identifikován gen **BOR1**

Takano et al. (2002)

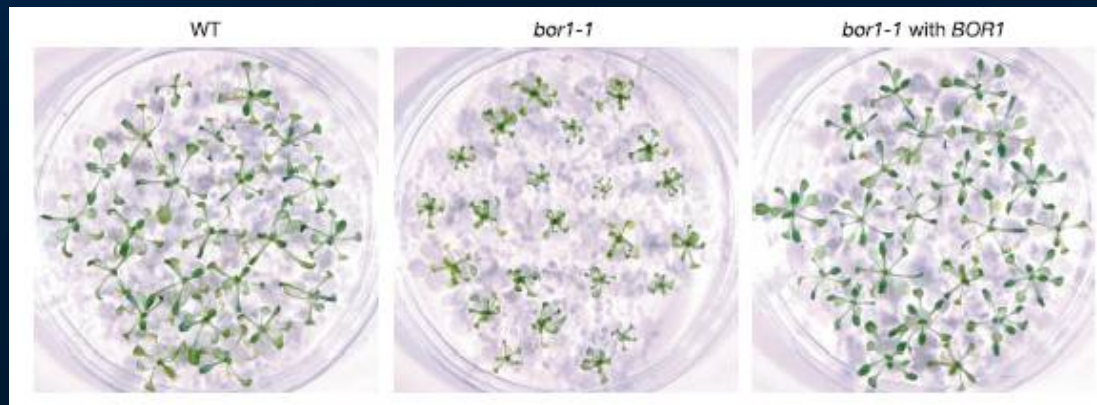


BOR1:

- exprimován především v pericyklu
- lokalizován na plazma membráně
- exprimován v kvasinkách snižoval koncentraci B v buňkách

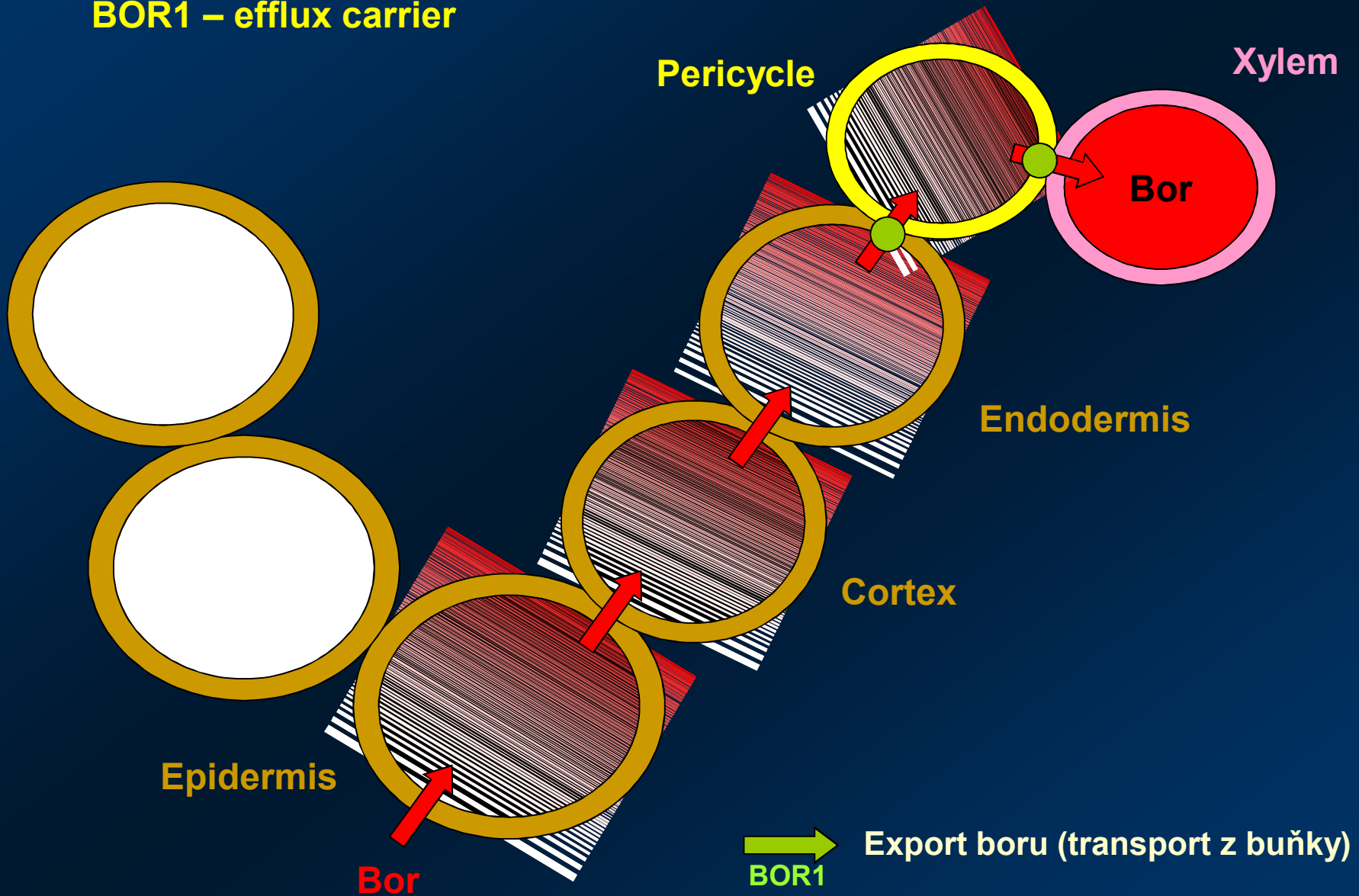


BOR1 je efflux carrier – transport B ven z buňky



Transgenní rostliny over-exprimující BOR1 rostou i při nízké koncentraci B => BOR1 chrání rostlinu před nedostatkem boru

BOR1 – efflux carrier



Množství mRNA *BOR1* je redukováno při vysokých koncentracích B (Svoboda et al. 2008)



[H₃BO₃]
(mM)

0

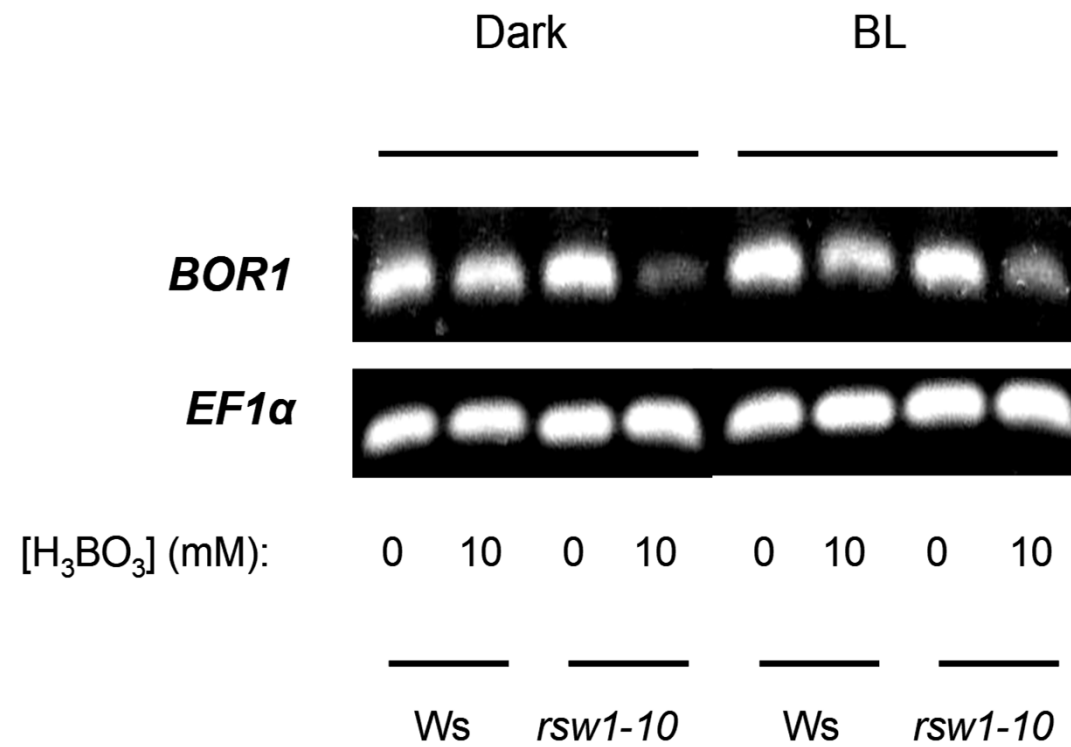
10

0

10

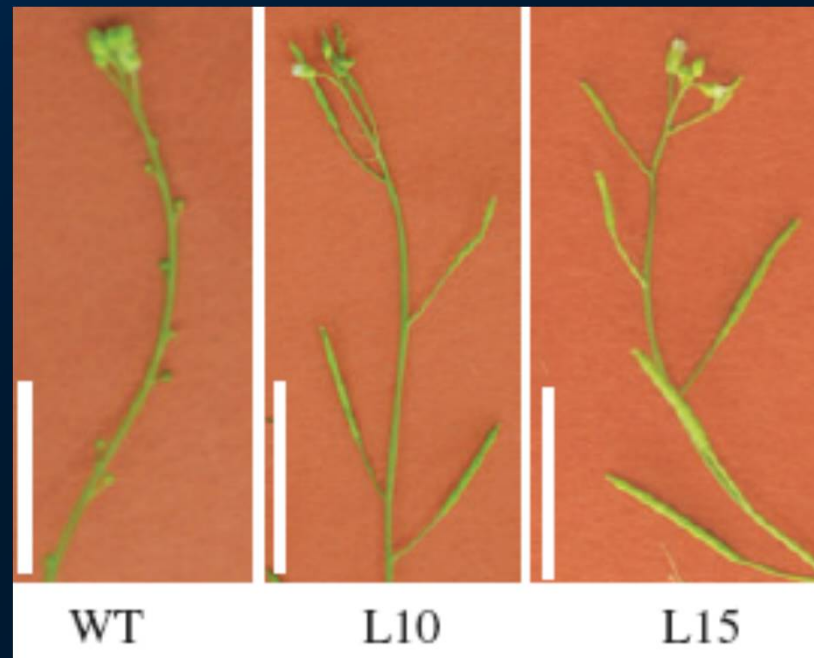
WS

rsw1-10



Využití v praxi – Miwa et al. (2006)

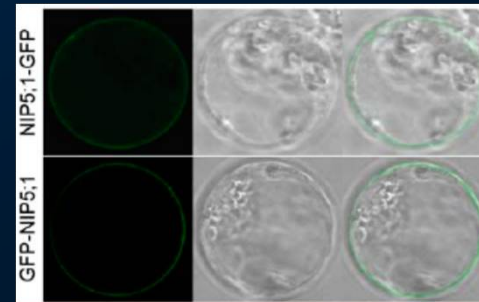
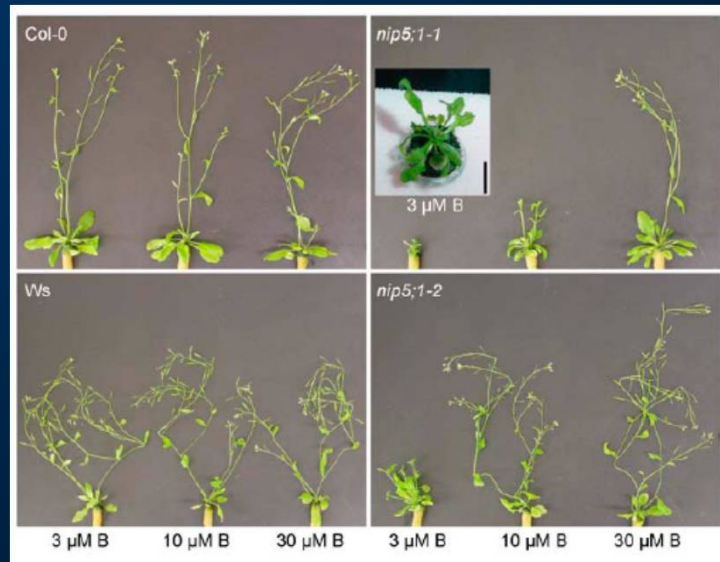
Transgenní rostliny over-exprimující BOR1 mají normální či větší výnos při nízké koncentraci B



Protein NIP5;1 (Takano et al. 2006)

Microarray experimenty – skrining genů over-exprimovaných při nedostatku B

NIP5;1 – 12x více exprimovaný při nedostatku B



NIP5;1 je lokalizován na plazma membráně

NIP5;1 – down-regulován při vysoké koncentraci B



Ochrana proti vysokým koncentracím B

Update 2011

Tanaka M et al. (2011) Plant Cell 23: 3547-3559

Při vysoké koncentraci B, je *NIP5;1* degradován i ve formě mRNA.

Exprese *NIP5;1* v oocytech *Xenopus*



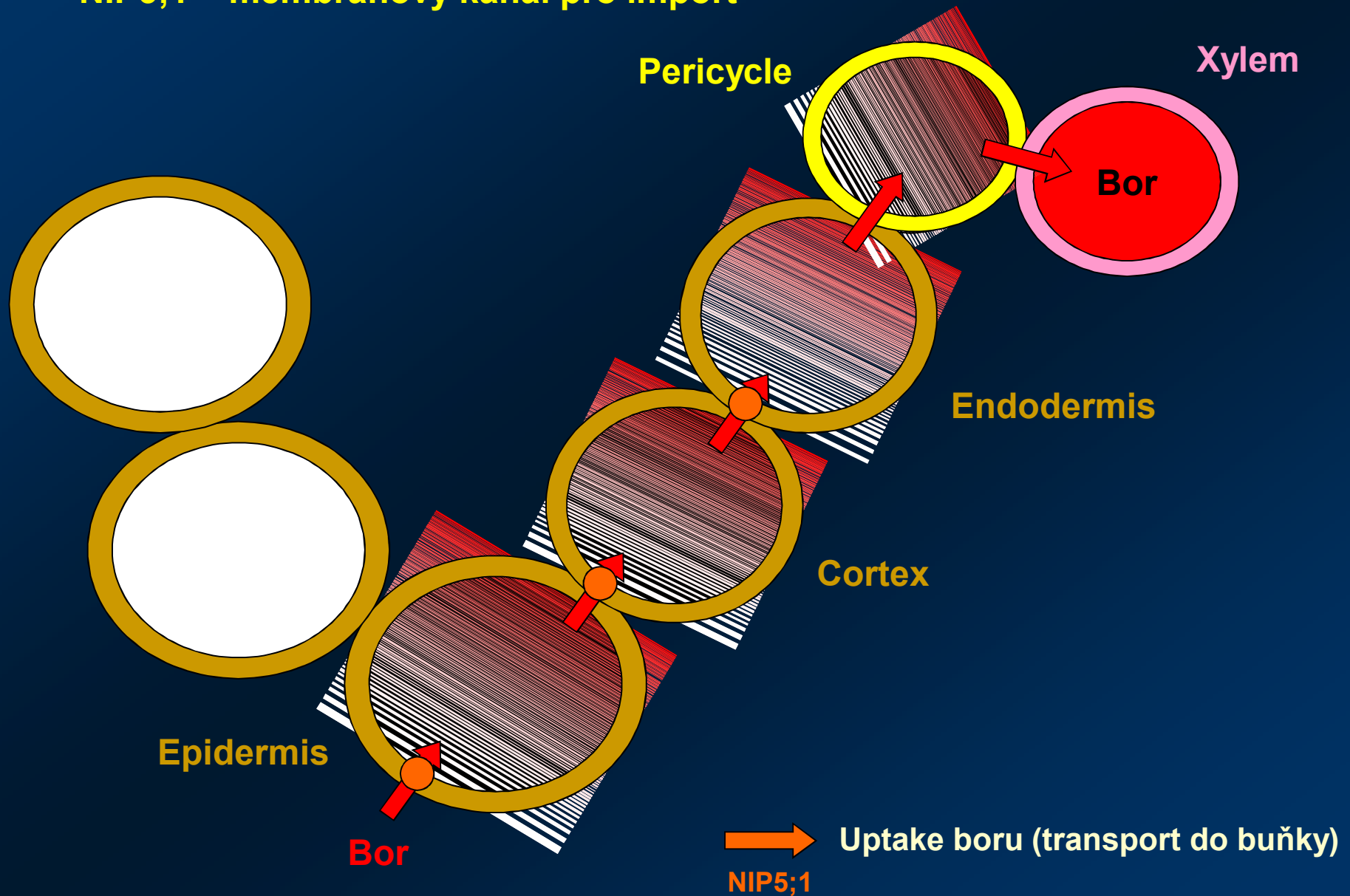
NIP5;1 usnadňuje transport B a H₂O



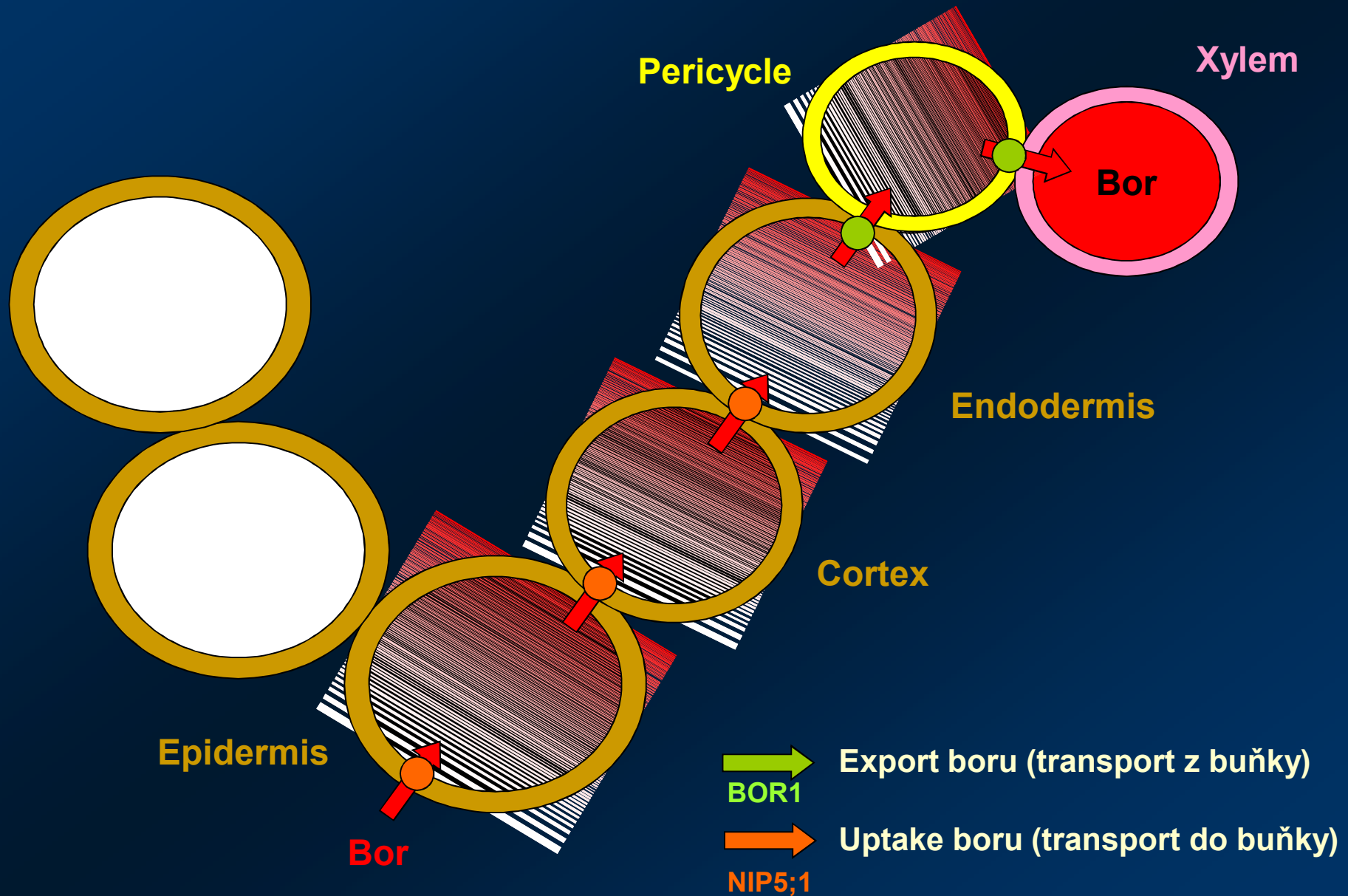
NIP5;1 je membránový kanál pro transport B do buňky (uptake)

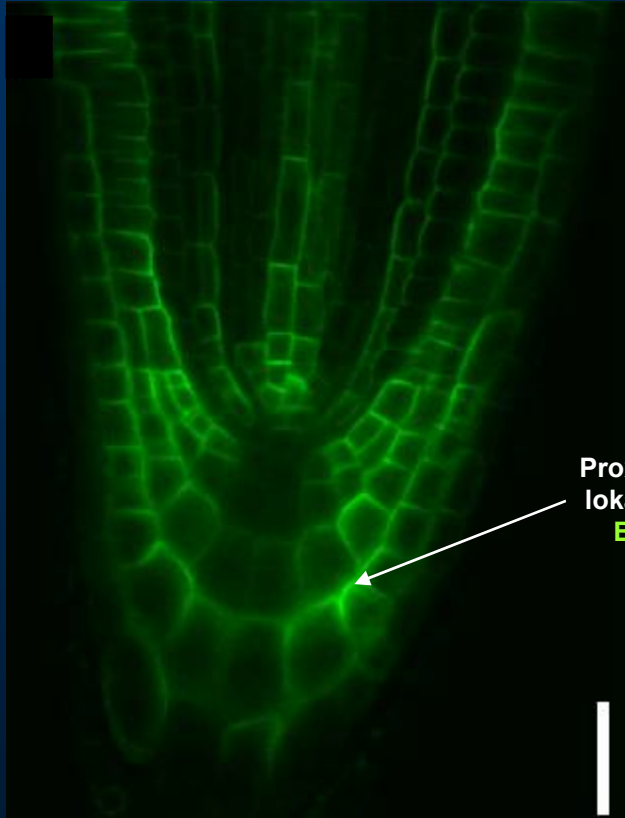


NIP5;1 – membránový kanál pro import



Mechanizmy transportu B: BOR1 + NIP5;1

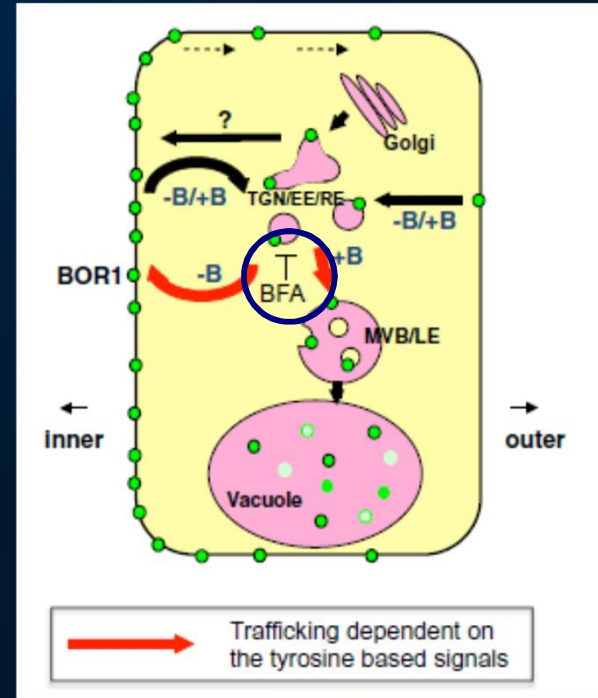




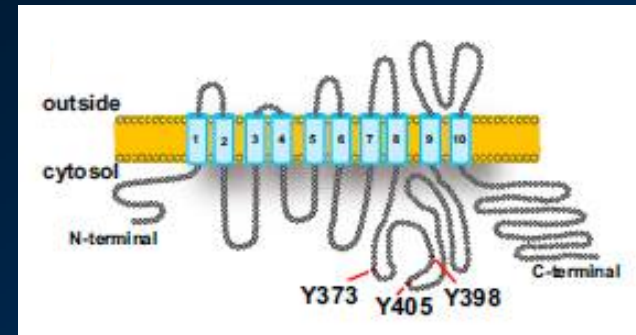
Proximální lokalizace BOR1

Nízká koncentrace B => proximální (vnitřní) lokalizace BOR1

NIP5;1 – lokalizován na distální (vnější) PM (= blíže k povrchu kořene)



Vysoká koncentrace B => degradace BOR1 ve vakuole: ● → ● → ○



Tyrosiny Y jsou zodpovědné za polární lokalizaci BOR1

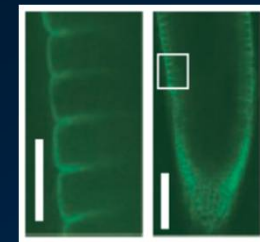
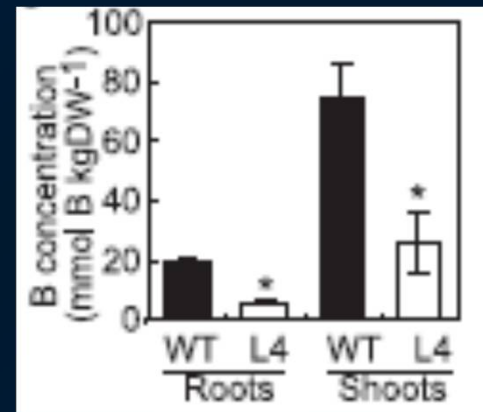
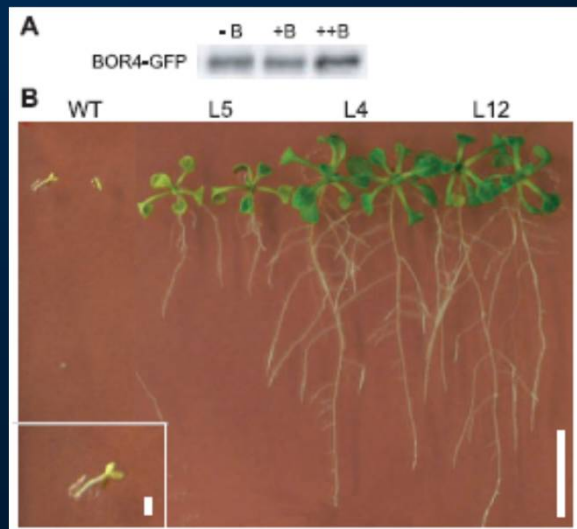
Existuje účinnější mechanismus aktivní ochrany před nadbytkem boru?

Protein BOR4

(Miwa et al. 2007)

Analýza transgenních *Arabidopsis* rostlin BOR4-GFP při vysoké koncentraci B v médiu:

Over-exprese BOR4



BOR4 lokalizován na distální straně epidermálních buněk

Nízká akumulace B v transgenech

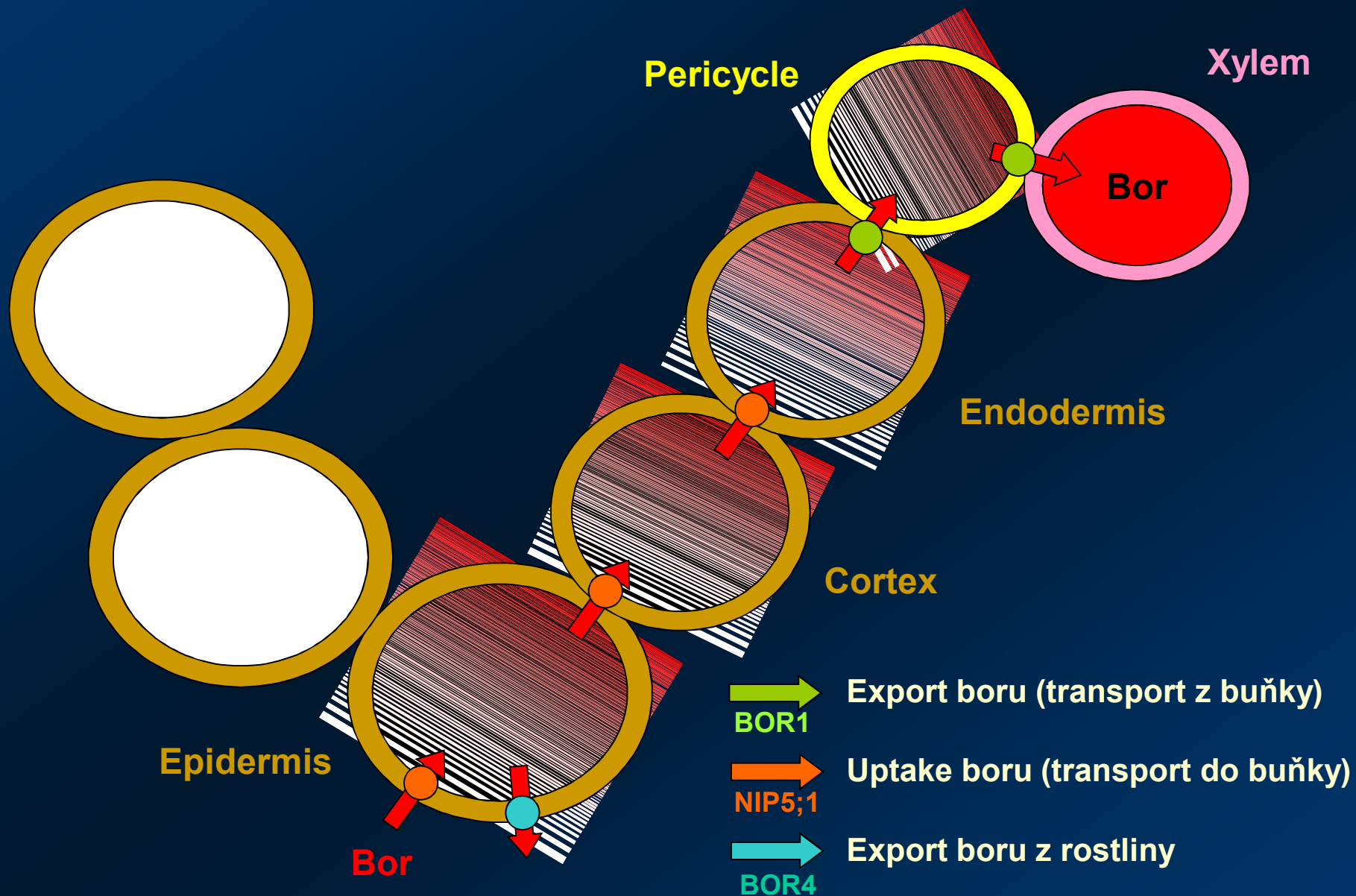
Rezistence k vysokým koncentracím B

BOR4 funguje jako aktivní exportér B z kořenů do půdy



BOR4 důležitý pro rezistenci rostlin k B

Mechanizmy transportu B: BOR1 + NIP5;1 + BOR4



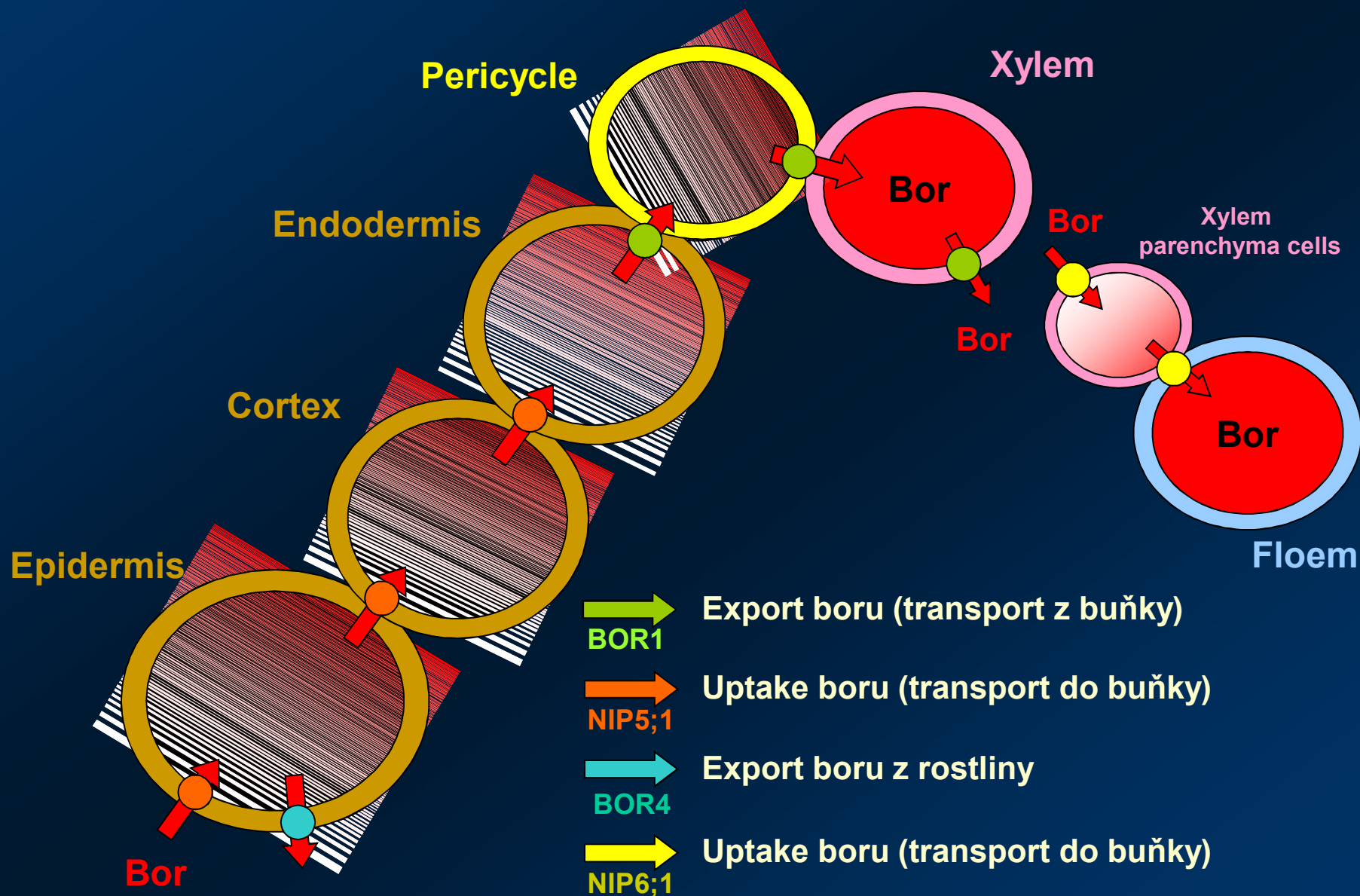
Update 2009

Tanaka M et al. (2008) Plant Cell 20: 2860-2875

Protein NIP6;1

- kanál pro kys. boritou podobný NIP5;1
- kompletně nepropustný pro vodu
- transkript se akumuluje v tkáních s nedostatkem boru
- specifický pro nadzemní části, nevyskytují se v kořenech
- mladá vyvíjející se pletiva
- zajišťuje transport H_3BO_3 z xylému do floému

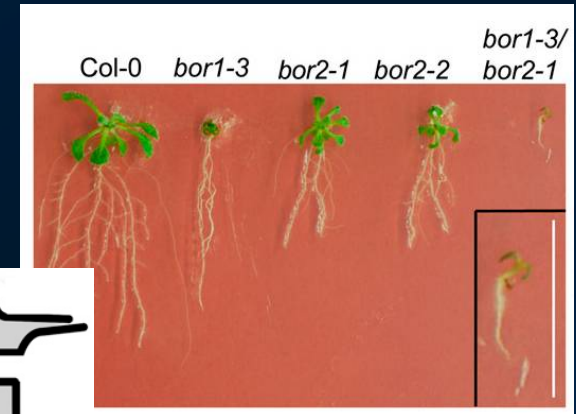
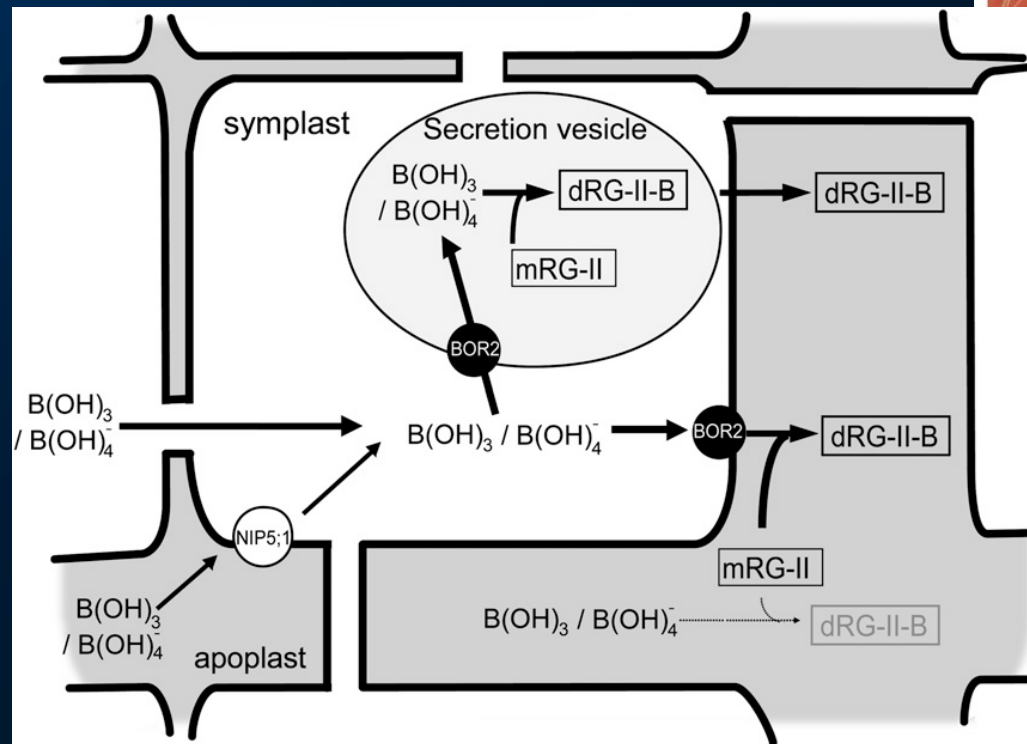
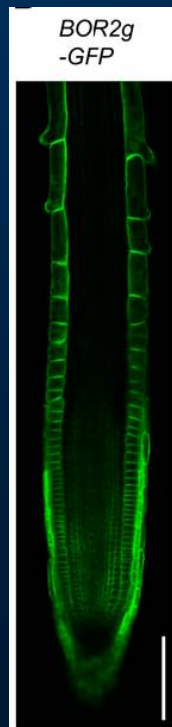
Mechanismy transportu B: BOR1 + NIP5;1 + BOR4 + NIP6;1



Protein BOR2

efflux carrier

Paralog BOR1; exprimován v kořenné epidermis a čepičkách laterálních kořenů v prodlužovací zóně



Nízká
koncentrace B:

$[B]_{\text{kořen}}$: *bor2* = WT

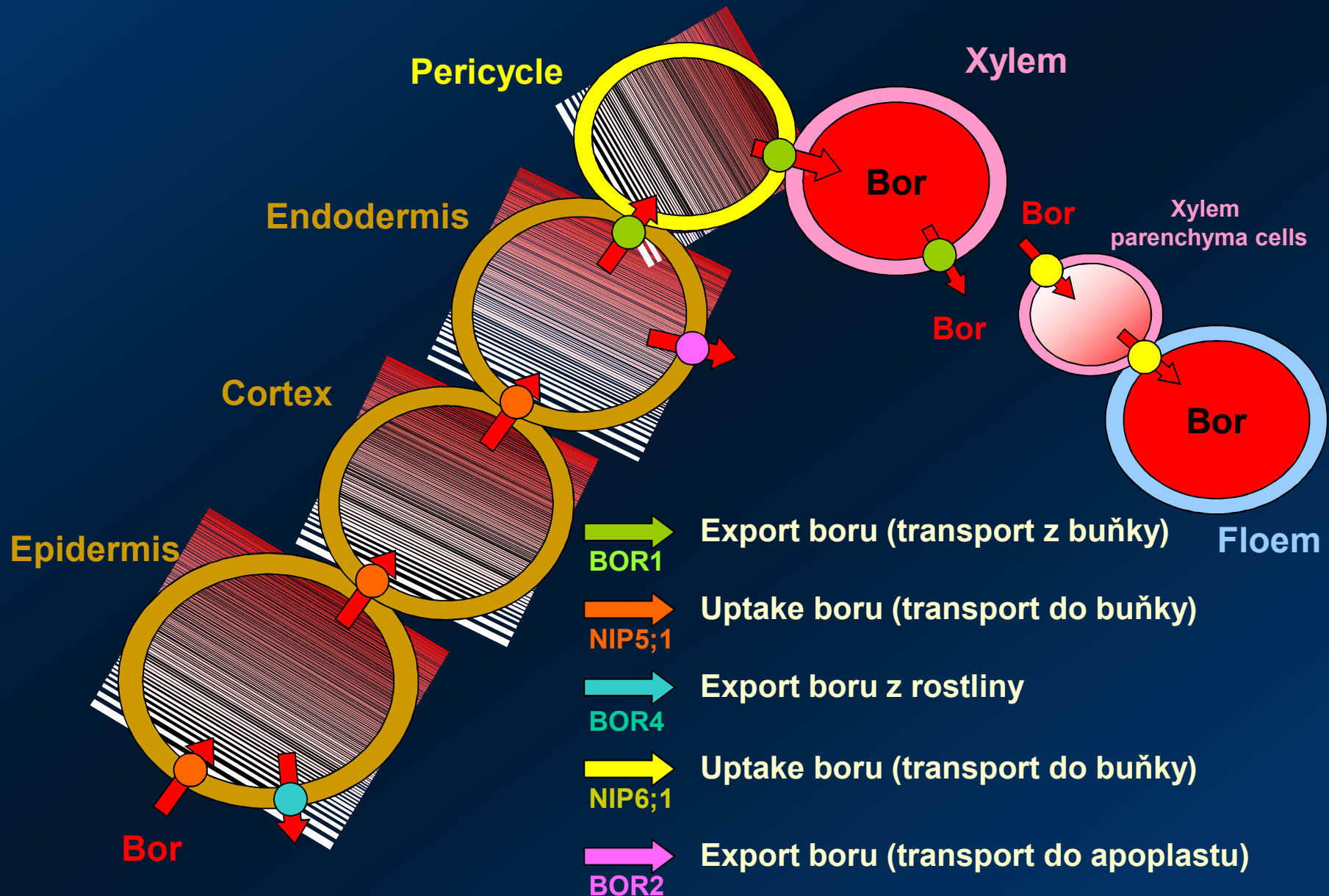
[dRG-II
rhamnogalacturonan] :

bor2 < WT

bor1 = WT

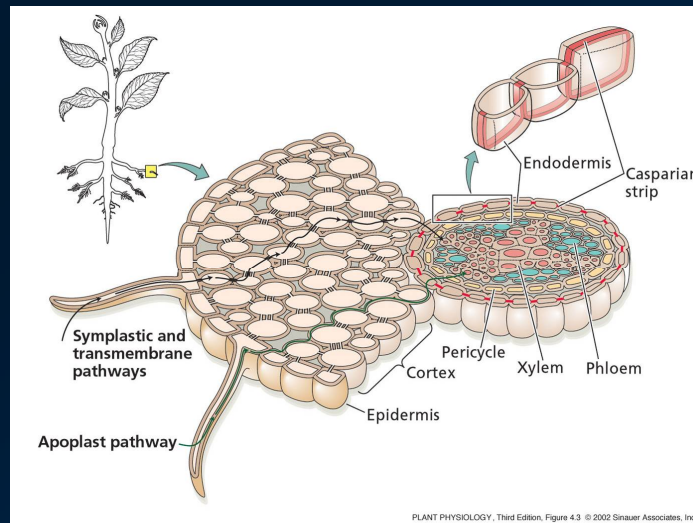
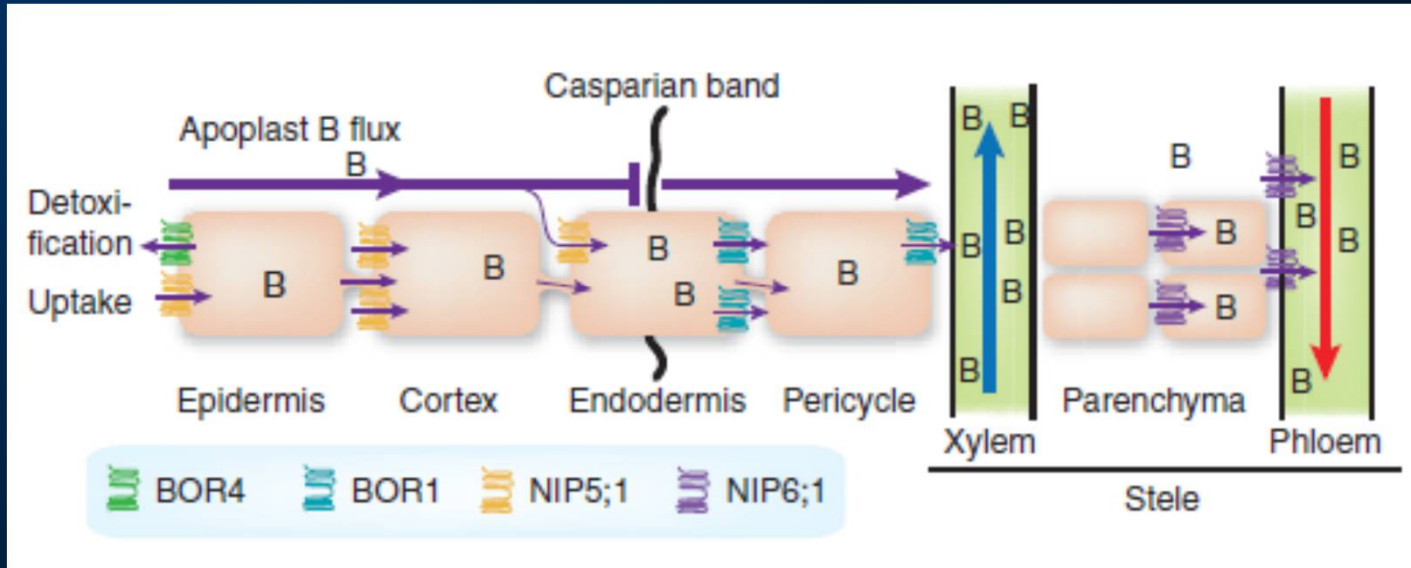
Při nízkých koncentracích B je BOR2 nutný pro transport B ze symplastu do apoplastu, kde zprostředkovává propojení dRG-II v buň. stěně.

Mechanizmy transportu B: BOR1 + NIP5;1 + BOR4 + NIP6;1 + BOR2



Update 2009

Robert HS, Friml J (2009) PNAS Nature Chemical Biology 5: 325-332



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 4.3 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

d) Bor v živočišných tkáních

- ❖ Úloha a transport B v živočišných buňkách jsou velmi málo známy
- ❖ Nedostatek B v živočišné buňce je řídký jev – vyskytuje se v plodech
- ❖ Hladina B v živočišné buňce je kontrolována ledvinami
- ❖ Kostí, srdce, slinivka, játra – nejvyšší hladina B
- ❖ Účinek B – „bell-shaped“ křivka

Význam boru pro živočichy:

- ❖ Vývoj embrya u žab a ryb
- ❖ Metabolismus karbohydrátů a minerálů (savci)
- ❖ Regulace aktivity enzymů (savci)
- ❖ Pevnost kostí (savci)
- ❖ Udržování optimální hladiny steroidů (savci)

Transport boru v živočišné buňce

Lidský BTR1: transportér podobný HCO_3^- transportéru, podobný co-transportéru SLC4 ($\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$)

BTR1 = homologický k *Arabidopsis BOR1* => BTR1 je transportér boru

Park et al. (2004)

Expresní studie – BTR1 je **unikátní** transportér borátu spojený s transportem 2 Na^+



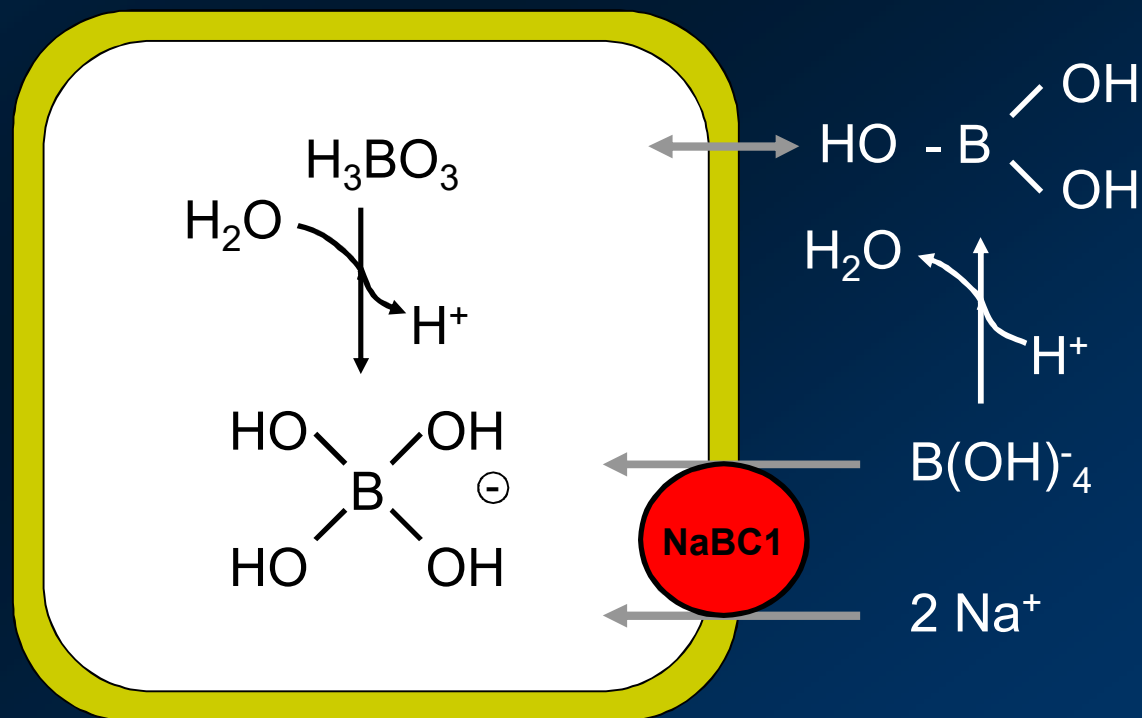
Přejmenován na NaBC1

NaBC1 – borátový co-transporter – udržuje homeostázu borátu

Absence borátu: NaBC1 – transportér propustný pro Na^+ a OH^-

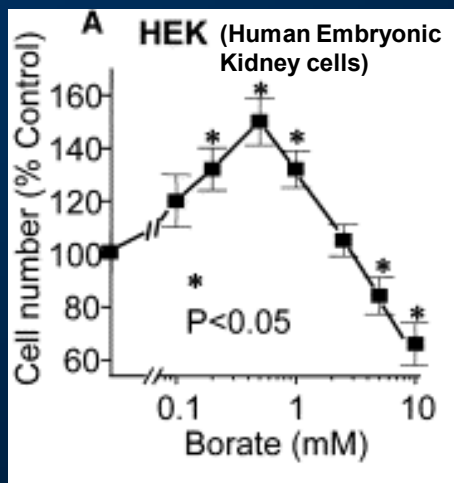
Prezence borátu: NaBC1 – selektivní co-transportér Na^+ - $\text{B}(\text{OH})_4^-$ regulovaný napětím

NaBC1 je regulovatelný borem, a to různě v různých orgánech => transkripční regulace NaBC1 borem je součástí homeotické kontroly metabolismu boru.



$\text{B}(\text{OH})_4^-$ = tetrahydroxyborate anion

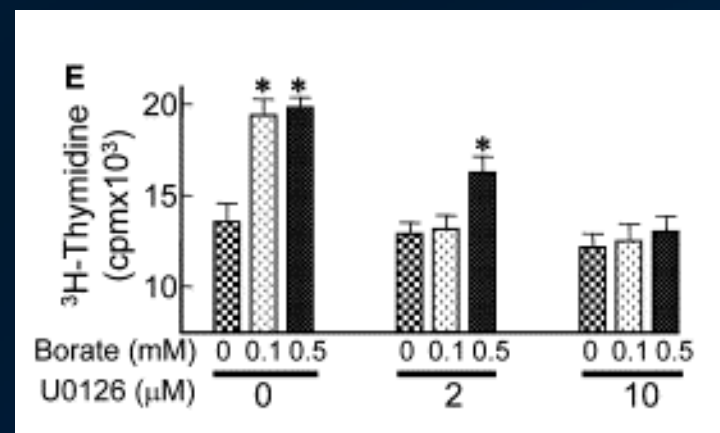
NaBC1 – důležitý v růstu a proliferaci buněk



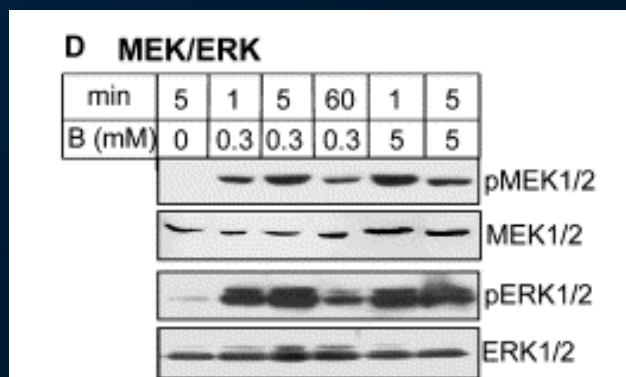
Nízké koncentrace borátu: silná mitogeneze

Vysoká koncentrace borátu: inhibice mitogeneze

Mitogenní účinek borátu je zprostředkován
MAPK: borát zvyšuje fosforylaci MEK/ERK



Specifický inhibitor MAPK U0126 inhibuje
stimulační efekt borátu na aktivitu MEK



MEK = MAPK/ERK kinase
ERK = extracellular-signal-regulated kinase

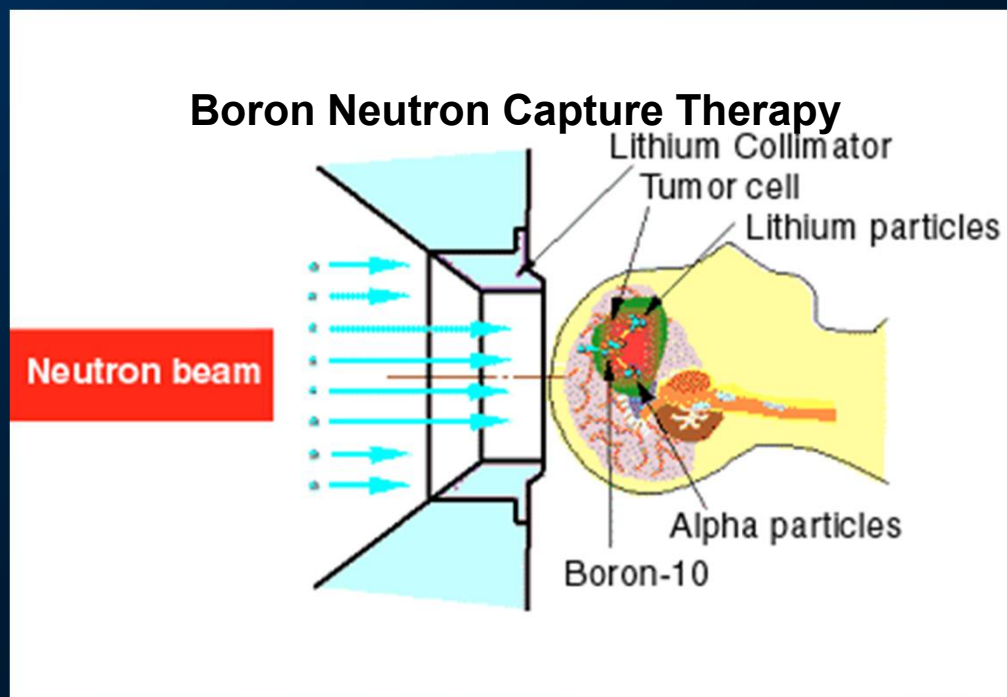
Vypnutí exprese NaBC1 pomocí siRNA vedlo k
zastavení růstu a proliferace buněk

Epidemiologický skríníng: přísun B ↓ → riziko rakoviny prostaty ↑

Inkubace prostatických rak. buněk + B (konc. X) → zastavení proliferace buněk

Inkubace kontrolních buněk + B (konc. Y) → zastavení proliferace buněk

$X < Y$ → odlišné kapacity transportu borátu v buň. liniích



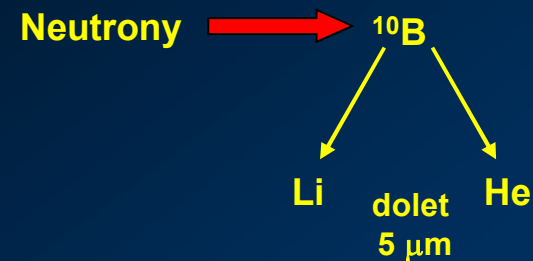
Detaily: Beddoe AH (1997) British J Radiology 70: 665-667

Využití B v medicíně

^{10}B (nosič BPA) – akumulace v nádorových buňkách

Po injekci ^{10}B – nádor bombardován neutrony

(BPA = B phenylalanin)



Usmrcení rak. buněk

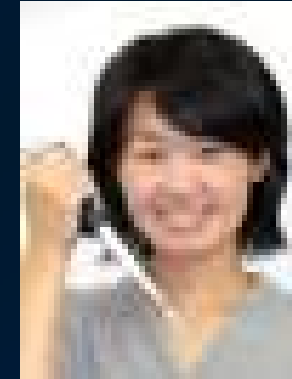
Kdo jsou?



Toru Fujiwara
The University of Tokyo, Tokyo



Junpei Takano
The University of Tokyo, Tokyo



Kyoko Miwa
The University of Tokyo, Tokyo



Patrick H. Brown
University of California, Davis



Shmuel Muallem
University of Texas, Dallas