

5. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Physiological Role of Nickel and Its Toxic Effects on Higher Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2006, 53, 257–277, doi:10.1134/S1021443706020178.
6. Shahzad, B.; Tanveer, M.; Rehman, A.; Cheema, S.A.; Fahad, S.; Rehman, S.; Sharma, A. Nickel; Whether Toxic or Essential for Plants and Environment - A Review. *Plant Physiol. Biochem.* 2018, 132, 641–651, doi:10.1016/j.plaphy.2018.10.014.
7. Szopiński, M.; Sitko, K.; Gieroń, Ż.; Rusinowski, S.; Corso, M.; Hermans, C.; Verbruggen, N.; Małkowski E. Toxic Effects of Cd and Zn on the Photosynthetic Apparatus of the *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis arenosa* Pseudometallophytes. *Front. Plant Sci.* 2019, 10, 748, doi:10.3389/fpls.2019.00748.
8. Upchurch, R.G. Fatty Acid Unsaturation, Mobilization, and Regulation in the Response of Plants to Stress. *Biotechnol. Lett.* 2008, 30, 967–977, doi: 10.1007/s10529-008-9639-z.
9. Voronkov, A.; Ivanova, T.; Kumachova, T. Micromorphological and Biochemical Features of Malus Fruit: *Malus domestica* Borkh. and its Parent Species – *Malus orientalis* Uglitzk. *Rev. Bras. Bot.* 2020, 43, 21–28, doi:10.1007/s40415-020-00578-8.
10. Zemanová, V.; Pavlík, M.; Kyjaková, P.; Pavlíková, D. Fatty Acid Profiles of Ecotypes of Hyperaccumulator *Noccaea caerulescens* Growing Under Cadmium Stress. *J. Plant Physiol.* 2015, 180, 27–34, doi:10.1016/j.jplph.2015.02.012.

Роль низкомолекулярных лигандов в транспорте и детоксикации металлов у растений

Серегин И. В.^{A*}, Кожевникова А. Д.^A

^A *Институт физиологии растений им. К. А. Тимирязева РАН, Москва, Россия.*

*E-mail: ecolab-ipp@yandex.ru

Минеральное питание играет важную роль в жизни растений и в значительной степени определяет их продуктивность. С одной стороны, дефицит питательных элементов является лимитирующим фактором, снижающим продуктивность сельскохозяйственных культур, а также широко распространенной причиной, вызывающей заболевания человека. С другой стороны, поступление металлов в окружающую среду в результате хозяйственной деятельности человека в последние десятилетия постоянно возрастает, что приводит к повышению содержания ряда металлов в растениях и проявлению токсического действия металлов на различные физиологические процессы. Множественное токсическое действие металлов проявляется в ингибировании активности ферментов, образовании активных форм кислорода, в результате чего возникает металл-индуцированный окислительный стресс, в изменении водного режима, проницаемости мембран и поглощения катионов и анионов, а также в снижении интенсивности дыхания и фотосинтеза [обобщено в Seregin, Ivanov, 2001; Seregin, Kozhevnikova, 2006; Kaur, Garg, 2021], что в конечном итоге выражается в нарушении роста и морфогенеза [обобщено в Ivanov,

Zhukovskaya, 2021]. В отличие от органических соединений, которые могут разлагаться микроорганизмами, металлы и металлоиды фактически не разлагаются, а следовательно, накапливаются в окружающей среде и поглощаются растениями, которые являются основным источником их поступления в пищевые цепи и в организм человека.

По существующей классификации выделяют две контрастные группы растений: исключатели, у которых металлы накапливаются главным образом в корневой системе, и (гипер-)аккумуляторы, у которых они накапливаются преимущественно в надземных органах. В настоящее время известно около 720 видов гипераккумуляторов [Manara et al., 2020], которые привлекают все большее внимание биологов, геохимиков и экологов. Изучение морфофизиологических особенностей растений, определяющих их способность избирательно накапливать металлы в корнях или побегах, имеет большое фундаментальное значение для физиологии растений, токсикологии и иономики.

Способность к накоплению металлов неоднократно возникала у растений в процессе эволюции [Krämer, 2010]. Растения разных видов и экотипов могут существенно различаться по способности накапливать металлы и по устойчивости к их токсическому действию, что может быть связано с их эволюцией на разных типах почв [Kozhevnikova et al., 2020]. Устойчивость к металлам и способность к гипераккумуляции находятся под независимым генетическим контролем, а гены, их определяющие, не являются видоспецифичными, а скорее по-разному экспрессируются у гипераккумуляторов и исключателей. Высокая устойчивость и способность к гипераккумуляции определяются высокой эффективностью механизмов детоксикации металлов, направленных на поддержание гомеостаза. Механизмы гипераккумуляции потенциально могут контролироваться на четырех уровнях: (1) на уровне поглощения металлов из почвы корневыми системами растений, (2) на уровне радиального транспорта металлов в корнях, а также (3) на уровне их транспорта в надземные органы по ксилеме и (4) накопления в листьях в нетоксичной форме. Важнейшая роль в механизмах поглощения, транспорта и детоксикации металлов принадлежит низкомолекулярным лигандам – ключевым игрокам, участвующим в поддержании гомеостаза металлов и в механизмах, определяющих феномен гипераккумуляции [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021]. К важнейшим низкомолекулярным металл-связывающим лигандам относятся гистидин, никотианамин, фитохелатины и органические кислоты. Сродство ионов металлов к лигандам определяется константами стабильности образующихся комплексов, обычно уменьшается в ряду никотианамин > гистидин > органические кислоты и, кроме того, зависит от pH. Количество разных лигандов в клетках разных тканей и органов может различаться.

Кроме того, оно может значительно меняться при действии металлов. Поэтому очевидно, что в клетке имеет место конкуренция между разными лигандами за связывание ионов металлов, а также между разными металлами за связывание с одним лигандом. Основная функция металл-связывающих лигандов заключается в поддержании лабильного пула металлов [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021, 2023a,б].

Содержание свободного гистидина в корнях гипераккумуляторов *Nocca caerulea* и *Odontarrhena serpyllifolia* было значительно выше, чем у близкородственных исключателей *Thlaspi arvense* и *Alyssum montanum* [Ingle et al., 2005; Richau et al., 2009]. Однако, несмотря на различия в способности накапливать металлы и устойчивости к ним, растения разных экотипов гипераккумулятора никеля (Ni), цинка (Zn) и кадмия (Cd) *N. caerulea* не различались по эндогенному содержанию гистидина в корнях и побегах, что свидетельствует о том, что повышенный уровень гистидина в корнях *N. caerulea* не определяет внутривидовые отличия в способности растений разных экотипов накапливать металлы [Richau et al., 2009].

Гистидин, наряду с другими аминокислотами, а также органическими кислотами и другими веществами, входит в состав корневых экссудатов [Panchal et al., 2021]. Экзогенный гистидин может поглощаться из окружающей среды корневыми системами как исключателей (*Thlaspi arvense*), так и гипераккумуляторов (*N. caerulea*). В поглощении гистидина клетками ризодермы, возможно, играют важную роль LHT1 (Lysine Histidine Transporter 1) и APP1 (Amino Acid Permease 1) [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021]. Предобработка экзогенным L-гистидином приводила к увеличению концентрации Ni и Zn в пасоке как у некоторых исключателей, так и у некоторых гипераккумуляторов, но не приводила к увеличению концентрации Cd в ксилемном соке у исключателя *T. arvense* и гипераккумулятора *N. caerulea*, что является отражением низкого сродства гистидина к ионам Cd. В отличие от гистидина, предобработка растений глутамином, аспарагином, а также аланином не приводила к увеличению концентрации Ni или Zn в пасоке или увеличению их загрузки в сосуды ксилемы. Следовательно, эффект гистидина уникален, а не является общим свойством аминокислот [Richau et al., 2009; Kozhevnikova et al., 2014a,b, 2021; Seregin et al., 2019, 2022; Soleymanifar et al., 2024]. Гистидин снижал проявление токсического действия Ni у гипераккумулятора Ni *Odontarrhena inflata* и исключателя *Aurinia saxatilis* благодаря индукции активности антиоксидантных ферментов, в частности, пероксидазы [Soleymanifar et al., 2024].

Эффективность поступления комплексов Ni или Zn с гистидином в выделенные из корней везикулы тонопласта выше у исключателя

T. arvense по сравнению с гипераккумулятором *N. caerulescens* [Richau et al., 2009; Kozhevnikova et al., 2014b]. Связывание металлов с гистидином в цитозоле ограничивает поступление металлов в вакуоли клеток коры корня, облегчая их поступление в ксилему у гипераккумуляторов, тогда как у исключателей Ni и Zn накапливаются в клетках коры, что подтверждается данными гистохимического и количественного анализа металлов. Так как гистидин имеет высокую константу стабильности комплекса с Ni и Zn при pH цитозоля, можно предположить, что эти комплексы образуются при поступлении ионов металлов в цитозоль. Комплекс поступает в вакуоль с помощью неидентифицированного транспортера. Благодаря более низкому значению pH вакуолярного сока (pH 5.0-6.2) по сравнению с цитозолем (pH 7.2-7.5), азот имидазольного кольца протонируется и комплекс разрушается, а металл связывается с более слабыми лигандами, например, с органическими кислотами [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021].

Никотианамин – низкомолекулярный N-содержащий металл-связывающий лиганд, количество которого меняется в зависимости от недостатка или избытка металлов, которые имеют к нему высокое сродство. Хотя синтез никотианамина может индуцироваться *in vivo* различными металлами, эта непротеиногенная аминокислота участвует в детоксикации главным образом Zn, Ni, железа (Fe), меди (Cu) и марганца (Mn). В клетках растений осуществляется двухстадийный синтез никотианамина из L-метионина при участии S-аденозилметионин синтетазы и никотианамин синтазы (NAS). У злаков, а также у гипераккумулятора Zn и Cd *Arabidopsis halleri* никотианамин может секретироваться в ризосферу, в чем, вероятно, может принимать участие транспортер ENA1 (Efflux transporter of NA1). У злаков образующиеся в ризосфере комплексы никотианамина с металлами могут поглощаться корнями растений с участием транспортеров YSL (Yellow-Stripe Like). Комплексы никотианамина с металлами образуются также в цитозоле клеток ризодермы и коры и транспортируются по направлению к проводящим тканям, что ограничивает поступление металлов в вакуоли клеток корня и является одним из механизмов гипераккумуляции. Никотианамин может транспортироваться через тонопласт с участием транспортера ZIF1 (Zinc Induced Facilitator 1) и отчасти участвовать в связывании металлов в вакуоли, хотя стабильность комплексов никотианамина с металлами при pH вакуолярного сока низка. Никотианамин вносит вклад в дальний транспорт металлов. При участии транспортеров NAET1/2 (NA Efflux Transporter1/2) никотианамин поступает в секреторные везикулы, а затем посредством экзоцитоза – в апопласт, где формируются комплексы с металлами, поступающие во флоэму с участием транспортеров YSL. Благодаря более высоким значениям pH,

стабильность этих комплексов во флоэмном соке выше, чем в ксилемном соке, что обеспечивает участие никотианамина главным образом в дальнейшем транспорте металлов по флоэме. Гидроксилирование никотианамина, наблюдающееся у некоторых видов растений, может увеличивать стабильность комплексов металла с лигандом в кислой среде. Содержание никотианамина в корнях ряда гипераккумуляторов выше, чем у исключателей, что определяется более высоким уровнем экспрессии генов *NAS* у первых и свидетельствует о важной роли никотианамина в поддержании гомеостаза металлов и механизмах гипераккумуляции [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021, 2023a].

Фитохелатины – небольшие богатые цистеином пептиды, способные связывать ионы металлов через SH-группы. Хотя синтез фитохелатинов может индуцироваться *in vivo* различными металлами, они участвуют в детоксикации и транспорте по флоэме главным образом Cd и металлоида мышьяка (III) (As), а также, в меньшей степени, Zn, Cu, ртути (Hg) и свинца (Pb), ионы которых обладают высоким сродством к S-содержащим лигандам. Синтез фитохелатинов осуществляется при участии фитохелатинсинтазы в цитозоле. Активность этого фермента возрастает в присутствии ионов металлов, что определяется наличием специфических для определенных металлов аминокислотных последовательностей в C- терминальном домене белка. У некоторых видов растений обнаружены изофитохелатины, отличающиеся C-терминальным аминокислотным остатком. Фитохелатинсинтаза кодируется генами *PCS*, уровень экспрессии которых может меняться при действии металлов. В цитозоле ионы металлов связываются с фитохелатинами с образованием различных комплексов, отличающихся по структуре и степени полимеризации фитохелатинов. АТФ-зависимый транспорт низкомолекулярных комплексов металлов с фитохелатинами через тонопласт осуществляется с помощью транспортеров ABC1/2/3 (ATP-Binding Cassette subfamily C). В вакуоли при участии кислото-лабильного сульфида (S^{2-}), предположительно поступающего из хлоропластов, могут образовываться высокомолекулярные комплексы металлов с фитохелатинами. Благодаря кислому значению pH вакуолярного сока, вероятно, частично эти комплексы могут разрушаться, а ионы металлов связываются с органическими кислотами. Содержание фитохелатинов в корнях и побегах гипераккумуляторов находится на низком уровне, что свидетельствует об отсутствии их участия в механизмах гипераккумуляции, но не исключает определенного их вклада в детоксикацию и транспорт металлов у этих видов растений [обобщено в Seregin, Kozhevnikova, 2021, 2023b].

Органические кислоты также играют важную роль в механизмах детоксикации и транспорта металлов, но не в механизмах гипераккумуляции. В клетке основным местом образования органических кислот являются митохондрии и глиоксисомы, где протекают реакции цикла Кребса и глиоксилатного цикла, соответственно. Транспорт органических кислот через внутреннюю мембрану митохондрий осуществляется по обменному механизму при участии переносчиков, таких как DICs (Dicarboxylate Carriers), DTC (Dicarboxylate/Tricarboxylate Carrier), SFC (Succinate/Fumarate Carrier).

Секреция малата корнями растений осуществляется с помощью ALMT1 (Aluminum-activated Malate Transporter 1), а секреция цитрата – с помощью транспортеров семейства MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion), которые расположены на плазмалемме клеток ризодермы. В ризосфере происходит связывание органических кислот с ионами металлов с образованием комплексов различной структуры, что влияет на поступление металлов в растение. Ионы алюминия (Al^{3+}), находящиеся в клеточных оболочках клеток ризодермы, могут связываться с малатом, поступившим туда с помощью ALMT1, а затем образующиеся комплексы транспортируются через плазмалемму в цитозоль при участии NIP1;2 (Nodulin 26-like Intrinsic Protein).

Поступление ионов металлов в вакуоль осуществляется с помощью различных вакуолярных транспортеров, а транспорт органических кислот через тонопласт, например, с помощью tDT (tonoplast Dicarboxylate Transporter). У *Arabidopsis thaliana* показано участие в транспорте органических кислот через тонопласт также транспортеров ALMT4 и ALMT6, экспрессия генов которых показана в замыкающих клетках устьиц, а ALMT4 также в мезофилле листа. Транспорт металлов в вакуоль и их дальнейшее связывание с органическими кислотами является одним из важнейших механизмов детоксикации металлов.

Дальний транспорт металлов из корней в побеги по ксилеме в значительной степени осуществляется в виде комплексов с органическими кислотами. Поступление цитрата в сосуды ксилемы осуществляется с помощью расположенного на плазмалемме клеток центрального цилиндра транспортера FRD3 (Ferric chelate Reductase Defective 3), а также других представителей MATE семейства.

Несмотря на то, что гипераккумуляторы конститутивно содержат большое количество органических кислот, они участвуют в большей степени в детоксикации металлов, а не в механизмах гипераккумуляции, что определяется более низкой стабильностью их комплексов с металлами по сравнению с другими металл-связывающими лигандами [обобщено в Panchal et al., 2021; Seregin, Kozhevnikova, 2021].

Высокое содержание металлов в окружающей среде на заре становления жизни могло способствовать формированию механизмов их детоксикации уже на ранних этапах эволюции. Об этом свидетельствует функциональное сходство фитохелатинсинтаз растений и цианобактерий, которые, однако, не содержат С-терминального домена [Hirata et al., 2005; Rea, 2012], присутствие никотианамин-подобных металлофоров у бактерий, а также генов *NAS* у бактерий, архей и грибов [Laffont, Arnoux, 2020]. Дальнейшее изучение низкомолекулярных металл-связывающих лигандов позволит не только полнее понять фундаментальные механизмы поглощения, транспорта и детоксикации металлов, направленные на поддержание гомеостаза, но и разработать новые подходы, использующиеся в технологиях биообогащения, фиторемедиации, фитомайнинга, а также мониторинга загрязнения окружающей среды металлами.

Работа поддержана Министерством науки и образования РФ (№122042700044-6).

Библиографические ссылки

1. Hirata, K.; Tsuji, N.; Miyamoto, K. Biosynthetic Regulation of Phytochelatins, Heavy Metal-Binding Peptides. *J. Biosci. Bioeng.* 2005, 100, 593–599, doi:10.1263/jbb.100.593.
2. Ingle, R.A.; Mugford, S.T.; Rees, J.D.; Campbell, M.M.; Smith, J.A.C. Constitutively High Expression of the Histidine Biosynthetic Pathway Contributes to Nickel Tolerance in Hyperaccumulator Plants. *Plant Cell* 2005, 17, 2089–2106, doi:10.1105/tpc.104.030577.
3. Ivanov, V.B.; Zhukovskaya, N.V. Effect of Heavy Metals on Root Growth and the Use of Roots as Test Objects. *Russ. J. Plant Physiol.* 2021, 68, S1–S25, doi:10.1134/S1021443721070049.
4. Kaur, H.; Garg, N. Zinc Toxicity in Plants: A Review. *Planta* 2021, 253, 129, doi:10.1007/s00425-021-03642-z.
5. Kozhevnikova A.D.; Seregin I.V.; Verweij R.; Schat H. Histidine Promotes the Loading of Nickel and Zinc, but not of Cadmium, into the Xylem in *Noccaea caerulescens* // *Plant Signal. Behav.* 2014a, 9, e29580, doi:10.4161/psb.29580.
6. Kozhevnikova, A.D.; Seregin, I. V.; Aarts, M.G.M.; Schat, H. Intra-Specific Variation in Zinc, Cadmium and Nickel Hypertolerance and Hyperaccumulation Capacities in *Noccaea caerulescens*. *Plant Soil* 2020, 452, 479–498, doi:10.1007/s11104-020-04572-7.
7. Kozhevnikova, A.D.; Seregin, I.V.; Erlikh, N.T.; Shevyreva, T.A.; Andreev, I.M.; Verweij, R.; Schat, H. Histidine-Mediated Xylem Loading of Zinc Is a Species-Wide Character in *Noccaea caerulescens*. *New Phytol.* 2014b, 203, 508–519, doi:10.1111/nph.12816.
8. Kozhevnikova, A.D.; Seregin, I.V.; Schat, H. Translocation of Ni and Zn in *Odon-tarrhena corsica* and *Noccaea caerulescens*: The Effects of Exogenous Histidine and Ni/Zn Interactions. *Plant Soil* 2021, 468, 295–318, doi:10.1007/s11104-021-05080-y.
9. Krämer, U. Metal Hyperaccumulation in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010, 61, 517–534, doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112156.

10. Laffont, C.; Arnoux, P. The Ancient Roots of Nicotianamine: Diversity, Role, Regulation and Evolution of Nicotianamine-like Metallophores. *Metallomics* 2020, 12, 1480–1493, doi:10.1039/d0mt00150c.
11. Manara, A.; Fasani, E.; Furini, A.; DalCorso, G. Evolution of the Metal Hyperaccumulation and Hypertolerance Traits. *Plant Cell Environ.* 2020, 43, 2969–2986, doi:10.1111/pce.13821.
12. Panchal, P.; Miller, A.J.; Giri, J. Organic Acids: Versatile Stress-Response Roles in Plants. *J. Exp. Bot.* 2021, 72, 4038–4052, doi:10.1093/jxb/erab019.
13. Rea, P.A. Phytochelatins: of a Protease a Peptide Polymerase Made. *Physiol. Plant.* 2012, 145, 154–164, doi:10.1111/j.1399-3054.2012.01571.x.
14. Richau, K.H.; Kozhevnikova, A.D.; Seregin, I.V.; Vooijs, R.; Koevoets, P.L.M.; Smith, J.A.C.; Ivanov, V.B.; Schat, H. Chelation by Histidine Inhibits the Vacuolar Sequestration of Nickel in Roots of the Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol.* 2009, 183, 106–116, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02826.x.
15. Seregin, I.V.; Ivanov, V.B. Physiological Aspects of Cadmium and Lead Toxic Effects on Higher Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2001, 48, 523–544, doi:10.1023/A:1016719901147.
16. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Low-Molecular-Weight Ligands in Plants: Role in Metal Homeostasis and Hyperaccumulation. *Photosynth. Res.* 2021, 150, 51–96, doi:10.1007/s11120-020-00768-1.
17. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Nicotianamine: A Key Player in Metal Homeostasis and Hyperaccumulation in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2023a, 24, 10822, doi:10.3390/ijms241310822.
18. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Physiological Role of Nickel and Its Toxic Effects on Higher Plants. *Russ. J. Plant Physiol.* 2006, 53, 257–277, doi:10.1134/S1021443706020178.
19. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D. Phytochelatins: Sulfur-Containing Metal(loid)-Chelating Ligands in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2023b, 24, 2430, doi:10.3390/ijms24032430.
20. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D.; Schat, H. Comparison of L-histidine Effects on Nickel Translocation into the Shoots of Different Species of the Genus *Alyssum*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2019, 66, 340–344, doi:10.1134/S1021443719020122.
21. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D.; Schat, H. Correlated Variation of the Zn Accumulation and Tolerance Capacities among Populations and Ecotypes of the Zn Hyperaccumulator, *Noccaea caerulescens*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2021, 68, S26–S36, doi:10.1134/S1021443721070128.
22. Seregin, I.V.; Kozhevnikova, A.D.; Schat, H. Nickel Tolerance and Accumulation Capacities in Different Populations of the Hyperaccumulator *Noccaea caerulescens*. *Russ. J. Plant Physiol.* 2022, 69, 70, doi:10.1134/S1021443722040148.
23. Soleymanifar, S.; Ehsanpour, A.A.; Ghasemi, R.; Schat, H. The Effect of L-histidine on Nickel Translocation and the Activities of Antioxidant Enzymes in Hyperaccumulator (*Odontarrhena inflata*) and Non-accumulator (*Aurinia saxatilis*) Plants. *Plant Soil* 2024, 495, 411–428, doi:10.1007/s11104-023-06340-9.