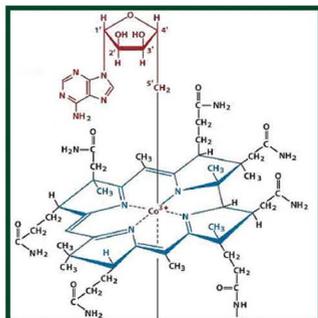
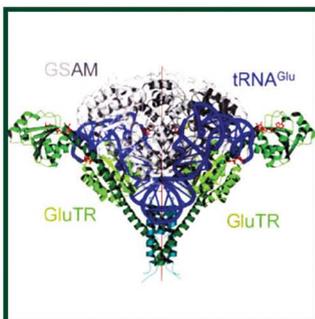




Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская

БИОСИНТЕЗ ТЕТРАПИРРОЛОВ В РАСТЕНИЯХ



УДК 577:581.174.1

Аверина, Н. Г. Биосинтез тетрапирролов в растениях /
Н. Г. Аверина, Е. Б. Яронская – Минск : Беларус. навука,
2012. – 413 с. : ил. – ISBN 978-985-08-1396-1.

Книга охватывает широкий круг вопросов, связанных с биосинтезом и деградацией хлорофилла и гема, описанием участвующих в этих процессах ферментов, их кристаллической структуры, механизмов катализируемых ими реакций, субклеточной локализации, структурной организации и регуляции активности. Особое внимание уделено ключевым реакциям – образованию 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) и включению атома магния в молекулу протопорфирина IX, а также участию продуктов биосинтеза хлорофилла в коммуникации между пластидой и ядром. На основании собственных экспериментальных данных представлена концепция о независимом функционировании систем синтеза хлорофилла и гема в хлоропласте. Большое внимание уделено практическим аспектам – использованию систем биосинтеза тетрапирролов в качестве мишеней для фотодинамических гербицидов, АЛК как стимулятора роста и развития растений и агента, формирующего устойчивость растений к абиотическим факторам внешней среды, а также созданию мутантов и трансгенных растений с модифицированной системой биосинтеза хлорофилла, представляющих собой значительный потенциал для сельского хозяйства.

Адресуется ученым, занимающимся проблемами биосинтеза хлорофилла, фотосинтетикам, биохимикам, биофизикам, генетикам, молекулярным биологам и студентам соответствующих специальностей.

Табл. 13. Ил. 122. Библиогр.: 1205 назв.

Рецензенты:

академик НАН Беларуси И. Д. Волоотовский,
академик НАН Беларуси В. Н. Решетников

ISBN 978-985-08-1396-1

© Аверина Н. Г., Яронская Е. Б., 2012
© Оформление. РУП «Издательский
дом «Беларуская навука», 2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

Принятые сокращения	6
Предисловие	8
Введение	12
<i>Глава 1. Реакции биосинтеза хлорофилла и гема</i>	19
1.1. Два пути биосинтеза 5-аминолевулиновой кислоты	19
1.1.1. С-4 путь	19
1.1.2. С-5 путь	22
1.2. 5-Аминолевулинатдегидратаза	32
1.3. Порфобилиногендеаминаза и уропорфириноген III-синтаза ...	35
1.4. Уропорфириноген III-декарбоксилаза	38
1.5. Копропорфириноген III-оксидаза	41
1.6. Протопорфириноген IX-оксидаза	44
1.7. Реакции, специфичные для геминовой ветви метаболизма рас- тительных тетрапиролов	47
1.7.1. Fe-хелатаза	47
1.7.2. Гем-оксигеназа	52
1.8. Реакции, специфичные для системы биосинтеза хлорофилла ...	55
1.8.1. Mg-Протопорфирин IX-хелатаза	55
1.8.2. S-Аденозил-L-метионин: Mg-протопорфирин IX-метил- трансфераза	61
1.8.3. Образование изоциклического кольца. Циклаза мономети- лового эфира Mg-протопорфирина IX	64
1.8.4. 8-Винилредуктаза	68
1.8.5. НАДФН: протохлорофиллидоксидоредуктаза	71
1.8.6. Биосинтез хлорофилла <i>a</i> . Хлорофилл-синтаза и геранил- геранилредуктаза	77
1.8.7. Биосинтез хлорофилла <i>b</i> . Хлорофиллид <i>a</i> -оксигеназа	80
1.8.8. Хлорофилловый цикл и система деградации хлорофилла ...	87

Глава 2. Внутриклеточная локализация и структурная организация систем биосинтеза хлорофилла и гема	95
2.1. Внутриклеточная локализация	95
2.2. Структурная организация	99
Глава 3. Регуляция биосинтеза тетрапирролов	108
3.1. Регуляция биосинтеза 5-аминолевулиновой кислоты	112
3.1.1. Фотоконтроль биосинтеза 5-аминолевулиновой кислоты	124
3.1.2. Роль гема в регуляции биосинтеза 5-аминолевулиновой кислоты	132
3.1.3. Влияние габакулина на синтез 5-аминолевулиновой кислоты в проростках ячменя	140
3.2. Механизмы регуляции биосинтеза тетрапирролов на стадии образования магнийсодержащих интермедиатов в листьях высших растений	144
3.2.1. Регуляция экспрессии и активности Mg-протопорфирин IX-хелатазы	144
3.2.2. Регуляция экспрессии и активности S-аденозил-L-метионин: Mg-протопорфирин IX-метилтрансферазы	159
3.3. Сопряженность скорости образования 5-аминолевулиновой кислоты, активности ферментов синтеза Mg-содержащих порфиринов и накопления белков светособирающих комплексов фотосистемы 1 и 2	165
Глава 4. Роль пластидной сигнализации в регуляции экспрессии ядерных генов	169
4.1. Роль редокс-состояния хлоропластов в пластидно-ядерной сигнализации	171
4.1.1. Роль редокс-состояния компонентов ФЭТЦ в экспрессии ядерных генов	172
4.1.2. Роль активных форм кислорода в пластидно-ядерной сигнализации	174
4.2. Роль тетрапирролов в пластидно-ядерной сигнализации	176
4.2.1. Активность и содержание Mg-протопорфирин IX-хелатазы и S-аденозил-L-метионин: Mg-протопорфирин IX-метилтрансферазы в листьях растений, обработанных экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой и/или 2,2'-дипиридиллом	187
4.2.2. Содержание белка <i>Lhcb1</i> в зеленых листьях ячменя, обработанных экзогенной 5-аминолевулиновой кислотой ...	189
4.3. Наличие активной системы синтеза белков в пластидах – необходимое условие для экспрессии ядерных генов	192
4.3.1. Влияние стрептомицина на ультраструктуру пластид и активность ключевых реакций биосинтеза тетрапирролов	194

4.3.2. Контроль биосинтеза тетрапирролов в мутанте ячменя линии <i>albostrians</i>	199
4.4. Альтернативные пластидные сигналы	208
4.5. Метаболическая сигнализация	210
4.5.1. Роль 5-аминолевулиновой кислоты в регуляции экспрессии генов ферментов биосинтеза тетрапирролов	212
4.6. Функционирование пластидных сигналов	220
Глава 5. Контроль цитокининами реакций биосинтеза хлорофилла, гема и биогенеза фотосинтетического аппарата	224
5.1. Современные представления о механизмах действия цитокининов	224
5.1.1. Реакции метаболизма цитокининов	226
5.1.2. Сигнальная система цитокининов	229
5.1.3. Взаимодействие сигнальной системы цитокининов с другими сигнальными системами	236
5.2. Регуляция цитокининами биогенеза хлоропластов	243
5.3. Регуляция биосинтеза хлорофилла цитокининами	245
5.3.1. Контроль активности ключевых ферментов биосинтеза хлорофилла кинетином	247
5.3.2. Влияние кинетина на интенсивность фотосинтеза	254
5.4. Регуляция биосинтеза гема цитокининами	259
Глава 6. Регуляция биосинтеза тетрапирролов и пластидная сигнализация: итоги и основные направления будущих исследований	264
Глава 7. Практическое применение порфиринов в сельском хозяйстве	269
7.1. Фотодинамические тетрапирролзависимые гербициды	274
7.1.1. Влияние тетрапирролзависимых фотодинамических гербицидов на высшие растения	274
7.1.2. Влияние тетрапирролзависимых фотодинамических гербицидов на водоросли	285
7.2. 5-аминолевулиновая кислота – регулятор роста растений	295
7.3. Формирование устойчивости растений к абиотическим факторам внешней среды с помощью 5-аминолевулиновой кислоты	304
7.4. Создание мутантов и трансгенных растений с модифицированной системой биосинтеза хлорофилла: перспективы	315
Заключение	325
Литература	330

Книга посвящается памяти крупного отечественного ученого, посвятившего свою жизнь изучению хлорофилла, – члена-корреспондента АН СССР Александра Аркадьевича Шлыка

ПРЕДИСЛОВИЕ

Два важнейших природных соединения, относящихся к классу тетрапирролов, – хлорофилл и гем – обеспечивают существование и развитие растительных, животных и бактериальных организмов на нашей планете за счет фотосинтеза и дыхания. Повсеместное присутствие этих «пигментов жизни» в клетках живых организмов связано с их уникальной структурой, представленной шестнадцатичленным ароматическим макроциклом с системой симметрично расположенных, сопряженных двойных связей, их способностью хелатировать различные катионы металлов, присоединять ряд заместителей и осуществлять экстраординацию лигандов. Эти структурные и функциональные особенности молекул тетрапирролов обеспечивают их множественность и многообразие присущих им фотофизических, фотохимических и биохимических свойств.

История науки о хлорофилле, которая началась в 1818 г., когда французские химики П. Пельтье (P. Pelletier) и Ж. Каванту (J. Caventou) выделили из растений зеленое вещество и назвали его хлорофиллом (от греческих «хлорос» – зеленый и «филлон» – лист), связана с именами целой плеяды замечательных ученых. Среди них М. С. Цвет, выделивший хроматографически чистые хлорофиллы *a*, *b* и *c*, лауреат Нобелевской премии 1915 г. Р. Вильштеттер (R. Willstätter), который установил химический состав хлорофиллов *a* и *b*, доказал их универсальность в природе, Х. Фишер (H. Fisher), расшифровавший структуру хлорофиллов

a и *b*, лауреат Нобелевской премии 1965 г. Р. Вудворд (R. Woodward), осуществивший полный синтез хлорофилла *a*, С. Граник (S. Granick), Л. Богорад (L. Bogorad), Д. фон Веттштейн (D. von Wettstein) и Т. Н. Годнев, посвятившие себя изучению биосинтеза хлорофилла, путям его образования в растении. Огромное значение имеют работы К. А. Тимирязева, который исследовал спектральные свойства хлорофилла и зависимость фотосинтеза от интенсивности света и его спектрального состава, А. А. Красновского, обнаружившего способность хлорофилла к обратимым окислительно-восстановительным превращениям в электронно-возбужденном состоянии (знаменитая «реакция Красновского»), А. А. Шлыка, установившего обновление и физико-химическую гетерогенность хлорофилла в листе, и многих других.

Первые классические работы, посвященные гемму, принадлежат М. В. Ненцкому, который в 1897–1901 гг., исследуя небелковую часть гемоглобина, установил химическую структуру гема и совместно с Л. Мархлевским показал химическое родство гема и хлорофилла. В 1929 г. Х. Фишер (H. Fisher) осуществил один из самых тонких своих экспериментов – синтезировал гемин. За это выдающееся достижение в 1930 г. он был удостоен Нобелевской премии. Основная часть работ, связанных с изучением биосинтеза гема, механизмов регуляции этого процесса выполнена на прокариотах и клетках животных организмов, и значительно меньшая часть – на растениях. С этими исследованиями связаны имена известных ученых, таких как С. Граник (S. Granick), Д. Шемин (D. Shemin), Д. Мозерол (D. Mauzerall), Л. Богорад (L. Bogorad), Д. Ласцеллес (J. Lascelles), Р. Пора (R. Porra) и др.

В течение ряда последних лет внимание многих исследователей было сосредоточено преимущественно на выяснении генетических, биохимических и структурных характеристик отдельных ферментов системы биосинтеза тетрапирролов, а также механизмов их функционирования и регуляции в растительных организмах. Как правило, эти работы в основном касались системы биосинтеза хлорофилла. Значительный вклад в эти исследования внесли Д. Ласцеллес (J. Lascelles), С. Беал (S. Beale), В. Рюдигер (W. Rüdiger), Б. Гримм (B. Grimm), А. Смит (A. Smith),

Р. Танака (R. Tanaka) и А. Танака (A. Tanaka), К. Ребейз (C. Rebeiz), Ф. Ф. Литвин, А. А. Красновский младший, Н. В. Карапетян и многие другие. Сведения о механизмах регуляции биосинтеза гема в растениях и взаимозависимости функционирования систем синтеза хлорофилла и гема практически отсутствовали.

Благодаря классическим трудам выдающегося ученого, академика АН Беларуси Т. Н. Годнева и его талантливого ученика члена-корреспондента АН СССР А. А. Шлыка изучение биосинтеза хлорофилла стало одним из приоритетных и важнейших научных направлений в области физиологии и биохимии растений в Беларуси. Блестящие гипотезы Т. Н. Годнева о синтезе молекулы хлорофилла через первичное образование пиррольных ядер с последующей их конденсацией в систему порфина, о протекании начальных стадий этого процесса через восстановленные, а не окисленные соединения, опередили на многие годы экспериментальные факты. С именем А. А. Шлыка связано открытие фундаментального процесса обновления молекул хлорофилла в течение всей жизни зеленого листа, обнаружение физико-химической гетерогенности хлорофилла в листе и оригинальный корпускулярный подход в представлениях об организации биосинтеза хлорофилла в хлоропласте.

Настоящая монография написана учениками А. А. Шлыка. В ней обобщены литературные данные последних лет, а также собственные исследования авторов, описывающие функционирование в растительной клетке систем биосинтеза хлорофилла и гема, метаболические, генетические и структурные механизмы регуляции двух систем, взаимодействие светового, цитокининового и пластидного сигналов в контроле реакций биосинтеза хлорофилла, роль первичного предшественника хлорофилла и гема – 5-аминолевулиновой кислоты как фотодинамического гербицида, стимулятора роста и развития растений, а также фактора, формирующего устойчивость растений к действию абиотических факторов внешней среды. Описаны мутанты и трансгенные растения с модифицированной системой биосинтеза хлорофилла, представляющие интерес для сельского хозяйства как исходный материал для выведения новых сортов растений.

Книга будет полезна ученым, занимающимся проблемами биосинтеза хлорофилла, фотосинтетикам, биохимикам, биофизикам, генетикам, молекулярным биологам и студентам соответствующих специальностей.

Авторы выражают благодарность академикам НАН Беларуси И. Д. Волотовскому и В. Н. Решетникову за рецензирование рукописи книги и сделанные замечания.

ВВЕДЕНИЕ

Хлорофилл (Хл) и гем относятся к порфиринам – циклическим тетрапирролам, играющим центральную роль в метаболизме животных, бактериальных и растительных клеток. Почти 2% белков, закодированных в геноме *Arabidopsis (A.) thaliana*, образуют специфические комплексы с порфиринами [1]. Последние участвуют в двух важнейших процессах превращения энергии на нашей планете – дыхании и фотосинтезе. В то время как гем является главным продуктом системы синтеза порфиринов во всех животных и дрожжевых клетках, растения образуют широкое разнообразие тетрапирролов, осуществляющих различные жизненно важные функции.

В обзоре **Y. I. Avissar и P. A. Möberg [2] биосинтез растительных тетрапирролов** представлен в виде дерева, которое имеет раздвоенную корневую систему, принимающую участие в ранних стадиях биосинтеза тетрапирролов и ведущую двумя путями (через C-4 и C-5 пути) к образованию универсального предшественника всех циклических и линейных тетрапирролов – 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) (рис. В1). Ствол представляет собой этапы, общие для биосинтеза тетрапирролов во всех изученных до сих пор организмах – от АЛК до первого циклического тетрапиррола, уропорфириногена III (УПГ III). Шатер состоит из ветвей, ведущих от УПГ III к синтезу уникальных конечных продуктов порфиринового пути растений.

Продукты первой ветви основного ствола включают корриноиды, содержащие ион кобальта в макроцикле УПГ III (важ-

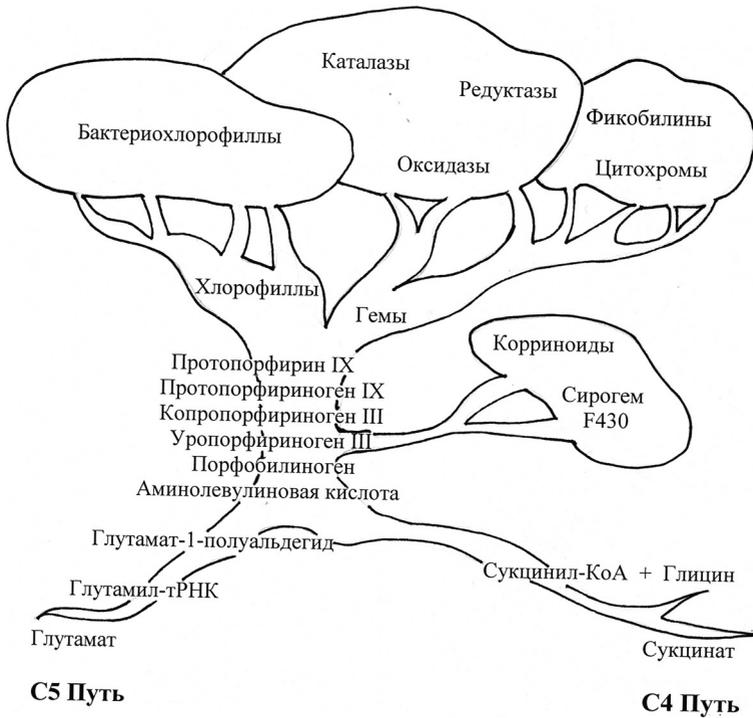


Рис. В1. Система синтеза тетрапирролов
(модифицировано по Avissar and Möberg [2])

нейший представитель – кобаламин витамин B_{12} , участвующий в кроветворении, жировом и углеводном обмене (рис. В2), а также сирогем – железосодержащее производное метилированного УПГ III, являющееся простетической группой сульфит- и нитритредуктаз бактерий, низших растений и грибов. Фактор F_{430} – никельсодержащее производное метилированного УПГ III, участвующее в заключительных стадиях микробиологического распада органического вещества у метаногенных бактерий, также относится к продуктам этой ветви [3].

Хл входит в состав второй основной (так называемой магниевой) ветви биосинтеза растительных тетрапирролов, начинающейся с хелатирования магния молекулами протопорфирина IX (Прото). Молекулы Хл (рис. В3) – основные участники

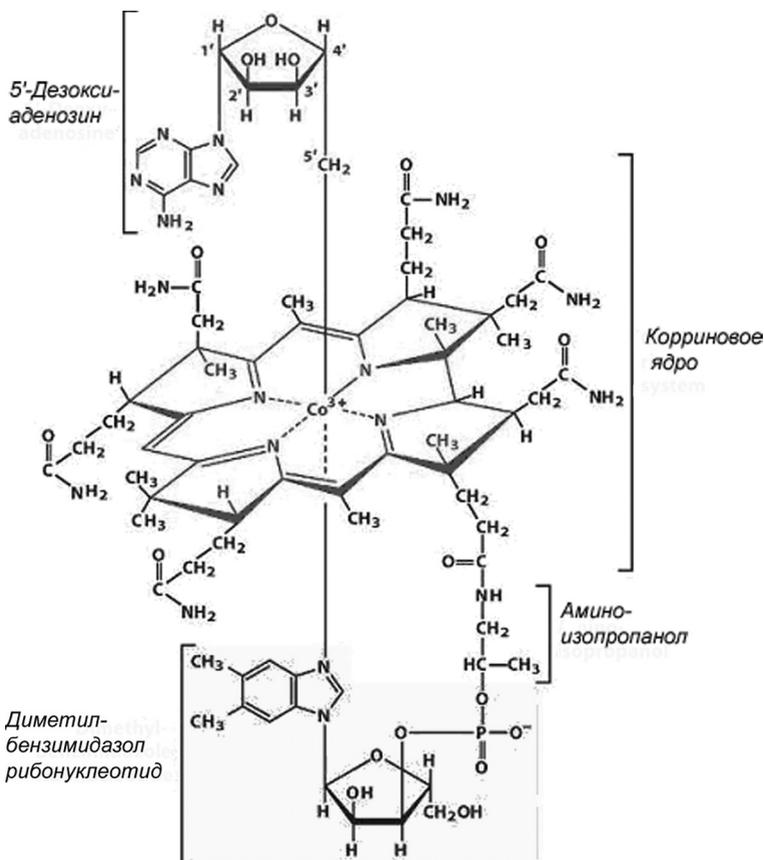


Рис. В2. Представитель корриноидов – витамин В₁₂, содержащий ион Co^{3+} в макроцикле уропорфириногена III

фотосинтеза в растениях, водорослях и цианобактериях. В ходе фотосинтеза осуществляется преобразование солнечной энергии в энергию химических связей синтезируемых фототрофными организмами органических веществ. Фотосинтез дает человеку пищу и энергию. Это практически единственный процесс на нашей планете, который противостоит смерти и разрушению органического вещества, и это один из основных процессов, в ходе которого в природе образуется свободный кислород. Циклические тетрапирролы бактериохлорофиллы (БХл) исполь-

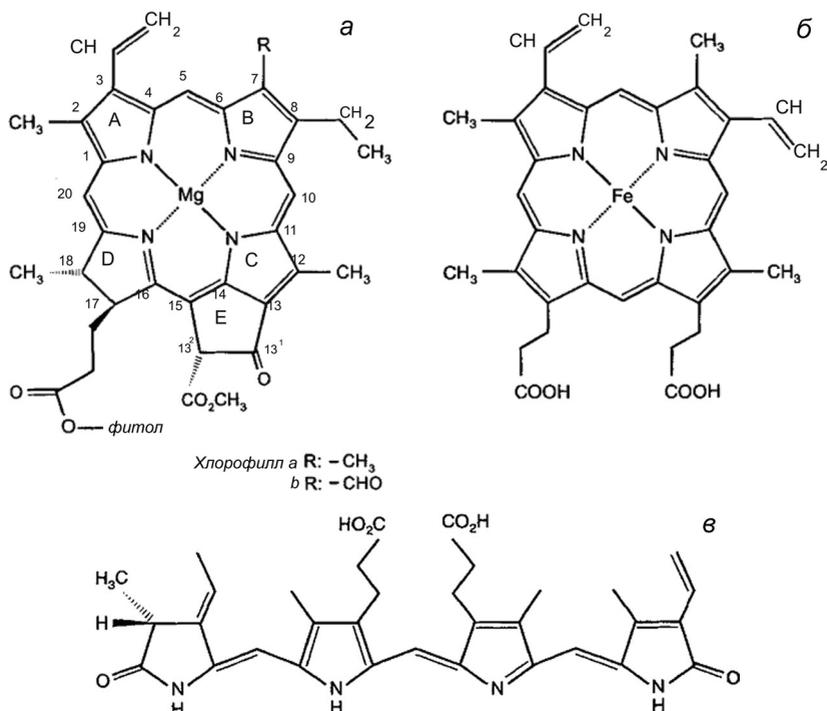


Рис. В3. Три функционально важных тетрапиррола в растительных организмах: а – хлорофиллы а и б; б – гем; в – фитохромобилин

зуются в зеленых и пурпурных бактериях, осуществляющих фотосинтез в отсутствие кислорода.

Гемы являются продуктами третьей (так называемой, «геминовой») ветви, начинающейся с включения железа в Прото (рис. В3). В отличие от Хл, который присутствует только в хлоропластах, гем обнаруживается во всех компартментах растительной клетки. Гемсодержащие белки участвуют в связывании кислорода, дыхании, детоксикации активных форм кислорода (АФК) – пероксидазы, каталазы, генерации АФК (НАДФН-оксидаза), транспорте электронов в ходе окислительного и фотосинтетического фосфорилирования (цитохромы) и восстановлении нитратов высшими растениями (нитратредуктаза и нитритредуктаза). Ферменты, содержащие цитохром P₄₅₀, являются компонентами защитной

системы растений против ксенобиотиков. Наряду с этим гем осуществляет тонкий контроль над образованием и активностью ряда ферментов, участвующих в биосинтезе тетрапирролов.

Линейные тетрапирролы – фикобилины (фикоцианобилин и фикоэритробилин), функционирующие как дополнительные светособирающие пигменты в красных водорослях и цианобактериях, хромофор фитохрома – фитохромобилин (ФБ) (рис. В3), также являются продуктами геминовой ветви [2, 3]. Важнейший фоторецептор растений – фитохром – контролирует фотоморфогенез растений. При его участии осуществляется стимулирование и ингибирование прорастания семян, индукция де-этиоляции, регуляция синтеза различных ферментов, регуляция развития корня, стимуляция цветения и регуляция циркадных ритмов.

Повсеместное присутствие тетрапирролов в клетках живых организмов, по-видимому, определяется уникальной структурой их молекул, представленной системой симметрично расположенных, сопряженных двойных связей порфиринового кольца, и способностью порфиринов хелатировать различные катионы металлов. Эти структурные и функциональные особенности молекул тетрапирролов обеспечивают их множественные биохимические и фотофизические свойства, подобные переносу электрона, транспорту кислорода, поглощению света или катализу окислительно-восстановительных реакций.

В течение последних 20 лет значительные успехи достигнуты при идентификации и клонировании генов, кодирующих ферменты пути биосинтеза и деградации тетрапирролов, изучении роли их отдельных семейств, выделении и очистке индивидуальных ферментов, изучении их активных центров, аллостерических областей, внутрипластидной локализации, механизмов регуляции активности *in vitro* и *in vivo* и сборки в надмолекулярные комплексы (см. обзоры [1, 4–10]). Несомненно, огромный вклад в эту область знаний внесли современные молекулярно-генетические методы, использование которых позволило получить миллиграммовые количества высокоочищенных белков и с помощью рентгеноструктурного анализа осуществить анализ их пространственной структуры, лучше понять их химическое строение и свойства.

До сих пор не уменьшается интерес к ключевым реакциям системы биосинтеза тетрапирролов, в частности, участвующим в синтезе АЛК: их свето- и гормонозависимости, генетической и метаболической регуляции участвующих в биосинтезе ферментов, комплексообразовании последних, функциональной гетерогенности клеточного пула АЛК, участвующей в синтезе гема и Хл (см. обзоры [11–13]). В последние годы появился огромный пласт работ, в которых АЛК рассматривается как регулятор роста растений [14–17], обработка которым ряда сельскохозяйственных культур приводит к повышению их продуктивности и способствует формированию у растений устойчивости к стрессовым факторам [18–21]. Молекулярная природа и механизмы рострегулирующей и антистрессовой активности АЛК практически не известны и в настоящее время интенсивно изучаются.

Большое внимание уделяется изучению механизмов, контролирующих вторую ключевую реакцию хлорофилльной ветви биосинтеза порфиринов – включение магния в Прото, осуществляемую сложноорганизованным трехсубъединичным ферментом Mg-хелатазой (МХ). Идентифицированы гены трех субъединиц фермента, изучаются механизмы сборки активного комплекса, регуляции активности фермента на генетическом, метаболическом и мембранном уровнях. Интригующим является обнаружение роли продуктов и ферментов Mg-ветви биосинтеза тетрапирролов в осуществлении коммуникации между пластидой и ядром (см. обзоры [22–26]), а СНLН-субъединицы МХ в роли возможного рецептора абсцизовой кислоты (АБК) [27, 28]. Следует, однако, отметить, что эта область исследований развивается особенно бурно, и появление все новых и новых экспериментальных фактов, выявление новых участников пластидно-ядерной сигнализации, расшифровка компонентов сигнальных цепей приводит к пересмотру устоявшихся, казалось бы, научных идей и взглядов [1, 29–34]. Исследование путей и механизмов передачи пластидных сигналов в ядро, их взаимодействия с другими сигнальными цепями, формируемыми светом, фитогормонами, АФК и другими стимулами, выявление транскрипционных факторов, контролирующих экспрессию сотен функционально связанных генов, помогает выявить механизмы тонкого

контроля координированной экспрессии органелльных геномов растительных клеток, обеспечивающие устойчивое развитие растительного организма во внешней среде, и роль в этой слож-ноорганизованной системе тетрапирролов.

Чрезвычайно перспективным оказалось направление, связанное с искусственным нарушением метаболизма растительных тетрапирролов, многие из которых являются фотодинамически активными пигментами. Их накопление в хлоропластах приводит к генерации АФК и индукции фотодеструкционных процессов. Эти исследования привели к представлениям о биосинтезе Хл как мишени для фотодинамических гербицидов, действие которых приводит к гибели сорняков под действием солнечного света [35–38].

И, наконец, широкие перспективы открываются в области создания трансгенных растений. Генетические манипуляции в системе биосинтеза тетрапирролов позволяют целенаправленно выключать синтез определенных ферментов и изучать последствия их дефицита для процесса хлорофиллообразования и биогенеза хлоропласта в целом. Ведутся работы по созданию трансгенных растений с высоким содержанием Хл и высокой степенью его сохранности в условиях старения растений, повышенной фотосинтетической продуктивностью, устойчивостью к различного рода стрессовым воздействиям [39–43].

Цель настоящей монографии состоит в изложении фундаментальных и прикладных аспектов функционирования систем биосинтеза растительных тетрапирролов – последних достижений в области биосинтеза молекул Хл и гема, регуляции этого процесса, генетики биосинтеза тетрапирролов, описании фотодинамических свойств тетрапирролов и использования этих свойств при создании фотодинамических гербицидов, участия промежуточных продуктов хлорофиллообразования в коммуникации между пластидой и ядром, обнаружении рострегулирующих и антистрессовых свойств АЛК и применении последней в растениеводстве, а также в изложении важнейшей проблемы растительной биологии – создания мутантов и трансгенных растений с модифицированной системой биосинтеза Хл.

РЕАКЦИИ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА И ГЕМА

1.1. Два пути синтеза 5-аминолевулиновой кислоты

1.1.1. C-4 путь

АЛК является универсальным предшественником всех циклических (Хл, гемы, корриноиды) и линейных (билины, фикобилины) тетрапирролов [2, 11, 44]. Энзиматическое образование АЛК впервые было продемонстрировано в экстрактах фотосинтезирующих бактерий *Rhodospseudomonas (Rps.) sphaeroides* и в эритроцитах птиц [45, 46]. Две системы синтеза АЛК, отличающиеся использованием начальных субстратов, были независимо сформированы в ходе эволюции живых организмов. В клетках животных, в дрожжах, грибах, несерных пурпурных и некоторых других бактериях АЛК образуется через C-4 путь (путь Шемина) в результате одноступенчатой конденсации глицина и сукцинил-КоА. Эту реакцию катализирует фермент АЛК-синтетаза (АЛКС, КФ 2.3.1.37), который содержит в качестве кофермента пиридоксаль 5'-фосфат (ПФ) [45, 46]. Кристаллическая структура связанного с ПФ гомодимера АЛКС из красной аноксигенной фотосинтезирующей бактерии *Rhodobacter (Rba.) capsulatus* представлена на рис. 1.1 (см. цв. вклейку) [47].

Фермент состоит из двух одинаковых субъединиц с молекулярной массой 41–57 кДа, водорастворим, локализован в цитоплазме бактериальных клеток и в митохондриях животных организмов и грибов. В клетках водоросли *Euglena gracillis (Euglena)* фермент локализован в митохондриях, где он осуществляет биосинтез гема *a* для цитохром *c*-оксидазы [48].

Исследование механизма действия АЛКС показывает, что в присутствии глицина остаток лизина фермента (Lys248) связывается

с ПФ, образуя шиффово основание – альдимин (internal aldimine) (рис. 1.2) [47, 49, 50]. Затем лизин замещается на глицин с образованием нового шиффово основания (external aldimine) после чего активированный глицин осуществляет нуклеофильную атаку на карбонильный атом сукцинил КоА, в результате чего отщепляется КоА. На следующем этапе к глицину присоединяется остаток сукцинила с образованием 2-амино-3-кетоадипиновой кислоты, что сопровождается ее декарбоксилированием. Перераспределение двойных связей и присоединение еще одного протона завершает формирование молекулы АЛК, ее отщепление от фермента и регенерацию АЛКС. В этой реакции C_1 карбоксильный атом глицина теряется в виде CO_2 .

В *Rba. capsulatus* фермент кодируется одним геном – *hemA*, а в *Rba. sphaeroides* информация о ферменте закодирована в двух генах – *hemA* и *hemT*, локализованных на разных хромосомах

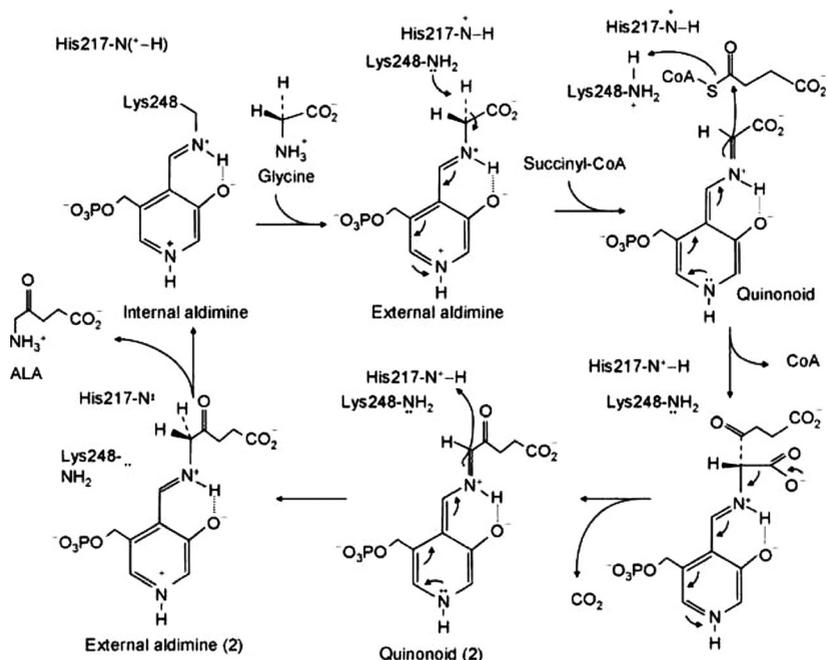


Рис. 1.2. Механизм образования АЛК с участием АЛК-синтетазы, глицина и сукцинил-КоА [47, 49]

[51]. Продукты этих генов на 53% идентичны, и каждый содержит 407 аминокислотных остатков. В *Rba. capsulatus* и *Rba. sphaeroides* белки HemA идентичны на 76%. Активность АЛКС, выделенной из *Rps. sphaeroides*, аллостерически угнетается гемом и гемоминном путем образования координационного комплекса с ферментом через атом Fe. Гем также контролирует образование АЛКС. Предполагается, что в этом случае гем выступает в качестве ко-репрессора некоторого регуляторного белка [52]. Высокие концентрации Fe^{3+} или Co^{2+} полностью инактивируют АЛКС в клетках *Rps. sphaeroides* [53]. Добавление в среду перед внесением Fe^{3+} имидазола предотвращает угнетение активности фермента [54]. АЛКС также угнетается АТФ и неорганическим пирофосфатом при использовании их в физиологических концентрациях (1 ммоль АТФ угнетает АЛКС на 60–88%).

Важную роль в модуляции активности АЛКС играет изменение окислительно-восстановительных условий внешней среды. Оксигенация среды приводит к инактивации АЛКС и потере пигментации клеток *Rps. sphaeroides* из-за снижения *in vivo* содержания трисульфидов цистеина и глутатиона [55]. Перенос культуры клеток из аэробных условий в микроаэробные увеличивает активность АЛКС в 2–4 раза. В *Rps. palustris* синтез АЛКС на свету угнетается кислородом, однако эффект можно снять, если бактерии перенести в анаэробные условия [56]. Уровень транскрипции генов *hemA* в *Rba. capsulatus* и *Rba. sphaeroides* регулируется кислородом, действие которого приводит к повреждению структуры генов [57, 58]. В *Rba. sphaeroides* достаточно повредить один из генов *hemA* или *hemT*, чтобы вызвать значительное снижение содержания БХЛ, каротиноидов и светособирающих комплексов.

Тиоловые соединения, например такие, как восстановленная форма тиоредоксина, цистатионаза, цистеин, так же, как и трисульфиды, поддерживают фермент в высокоактивном состоянии [55]. Добавление в культуральную среду нитритов угнетает биосинтез АЛК [53].

Как мы отметили выше, в единственной водоросли, фитофлагеллате *Euglena*, синтез АЛК осуществляют как АЛКС, так

и ферменты C-5 пути [48]. Тем не менее при выращивании водоросли хлорелла (*Chlorella*) (штамм YA-603) на гетеротрофной среде добавление глутамата в среду не приводит к увеличению выхода АЛК [59]. В то же время однократное внесение глицина, субстрата АЛКС, значительно увеличивает скорость образования АЛК, а его повторное добавление в среду в полтора раза увеличивает скорость синтеза АЛК по сравнению с однократным введением глицина. Авторы предполагают, что в этих условиях культивирования клеток *Chlorella* в них дополнительно к ферментам C-5 пути функционирует C-4 путь биосинтеза АЛК.

1.1.2. C-5 путь

В высших растениях, водорослях и многих фотосинтезирующих бактериях АЛК образуется через трехступенчатый тРНК-зависимый C-5 путь (рис. 1.3) [60–63]. Считается, что это более древняя и широко используемая система синтеза АЛК, чем сукцинат-глициновый путь. В образовании принимают участие глутамил-тРНК^{Глу}-синтетаза (ГС), глутамил-тРНК^{Глу}-редуктаза (ГР) и глутамат-1-полуальдегидаминотрансфераза (ГАТ). В качестве промежуточных продуктов образуются глутамил-тРНК^{Глу} и глутамат-1-полуальдегид.

На первой стадии глутаминовая кислота (Глу) активируется в результате связывания с молекулой тРНК^{Глу}. Реакция катализируется глутамил-тРНК-синтетазой (ГС или лигазой) в присутствии АТФ и Mg^{2+} , что приводит к образованию глутамил-тРНК^{Глу}, который является субстратом для синтеза как белков, так и порфиринов [64–66]. Участвуя в синтезе тетрапирролов, глутамил-тРНК^{Глу} восстанавливается затем до глутамат-1-полуальдегида в НАДФН-зависимой реакции, катализируемой ГР. В следующем акте ГАТ осуществляет внутримолекулярный обмен амино- и кетогрупп в глутамат-1-полуальдегиде с образованием АЛК [67]. Все ферменты, участвующие в синтезе АЛК, закодированы в ядерном геноме [67]. Механизмы, контролируемые синтез АЛК на генетическом и метаболическом уровнях, а также влияние света и фитогормонов цитокининов на эту клю-

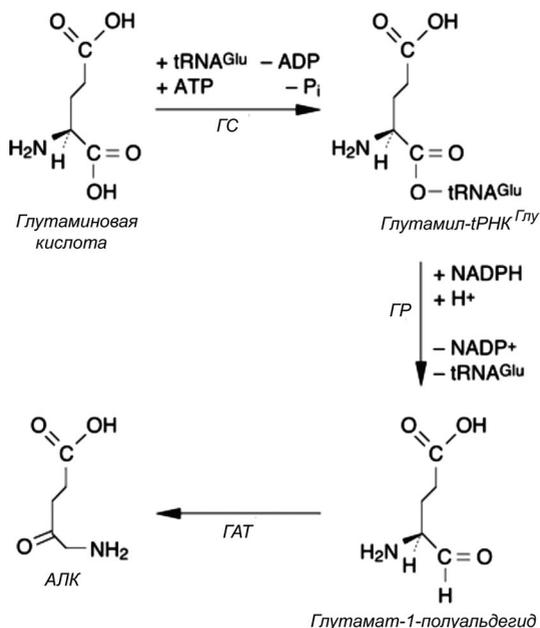


Рис. 1.3. Биосинтез АЛК по С-5 пути из глутаминовой кислоты

чевую стадию биосинтеза растительных тетрапирролов освещены в главах 3 и 5.

Глутамил-тРНК^{Глу}-синтетаза. ГС (КФ 6.1.1.17) не является специфическим ферментом биосинтеза тетрапирролов, поскольку она участвует также и в образовании белков. ГС активирует Глу путем связывания ее С-1 атома с тРНК^{Глу}, в результате чего образуется глутамил-тРНК^{Глу} [68, 69]. Реакция протекает в два этапа: сначала Глу активируется АТФ, после чего переносится на тРНК^{Глу} [70] (рис. 1.4).

В ячмене (*Hordeum vulgare* L.) обнаружены две ГС, закодированные в ядерном геноме [71, 72]. Одна из них локализована в цитоплазме, вторая транспортируется в хлоропласты, где участвует в синтезе АЛК и пластидных белков. В зависимости от объекта молекулярная масса фермента составляет от 54 до 73 кДа [73]. Бактериальный фермент и белок из зеленых водорослей активен в виде мономера с молекулярным весом ~50 кДа [70].

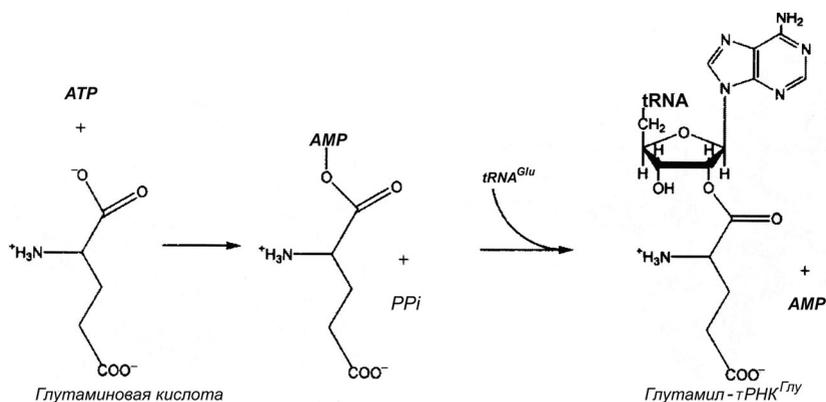


Рис. 1.4. Образование глутамил-тРНК^{Глу}, катализируемое глутамил-тРНК^{Глу}-синтетазой

ГС, локализованная в хлоропластах, митохондриях и цитоплазме пшеницы (*Triticum aestivum*), является гомодимером [74].

Изучена кристаллическая структура ГС из термофильного организма *Thermus thermophilus* как для свободного белка [75], так и для его комплекса с тРНК^{Глу} и АТФ (рис. 1.5, см. цв. вклейку) [76]. Мономерный белок содержит 468 аминокислотных остатков и по форме представляет собой вытянутую и слегка изогнутую молекулу, содержащую 5 различных доменов. Домен 1 содержит два АТФ-связывающих мотива – «укладку Россмана» (Rossman fold). **Уникальные для каждой синтетазы области доменов 2 и 3** служат для узнавания аминокислоты, в данном случае, Глу. Домены 4 и 5 предназначены для связывания тРНК^{Глу}.

ГС эукариотов и некоторых бактерий, в том числе *Thermus thermophilus*, высокоспецифична по отношению к тРНК, однако во многих других бактериях ГС может связывать Глу как с тРНК^{Глу}, так и с тРНК^{Гли} [77]. Антикодоны тРНК^{Глу} и тРНК^{Гли} отличаются только в одном основании – 36, в то время как пять аминокислотных остатков участвуют в узнавании тРНК^{Глу} и тРНК^{Гли}-синтетазой [78]. Кристаллическая структура обоих типов ГС во многом идентична [77]. Ацидофильная бактерия *Acidithiobacillus (A.) ferrooxidans* экспрессирует две ГС – GluRS1 и GluRS2 с различной специфичностью по отношению к тРНК [79].