УДК: 577.325

ВОЗМОЖНОСТИ ВОСПОЛНЕНИЯ ПУЛА ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ У *RHODOBACTER CAPSULATUS*

Е. П. Петушкова, А. А. Цыганков

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук
Поступила в редакцию 5.04.2018 г.

Аннотация. Пурпурная несерная бактерия *Rhodobacter capsulatus* штамм B10 может использовать для восполнения биосинтетических звеньев цикла трикарбоновых кислот (ЦТК), расходуемых на конструктивный метаболизм, глиоксилатный цикл и несколько других анаплеротических путей. В частности, ранее было обнаружено, что у *R. capsulatus* имеется генетический потенциал для этилмалонил-КоА пути, а также комбинации реакций синтеза пирувата/фосфоенолпирувата (ПВК/ФЕП) с последующим карбокилированием этих С3-кислот: из ацетил-КоА и формиата, из ацетил-КоА и углекислоты, а также из 3-фосфоглицериновая кислота (3-ФГК), образованной в цикле Кальвина-Бенсона. В ацетатных фотогетеротрофных культурах *R. capsulatus* экспрессируются гены глиоксилатного цикла, этилмалонил-КоА пути и гены путей синтеза ПВК/ФЕП из интермедиатов цикла Кальвина-Бенсона и ферментов для их последующего карбоксилирования (пируваткарбоксилазы, ФЕП-карбоксикиназы, двух малик-ферментов) до интермедиатов ЦТК. Для этилмалонил-КоА пути продемонстрировано наличие аналогов ранее показанных ферментов, отличающихся специфичностью к S-энантиомерам. Проведенный в данной работе биоинформационный анализ позволил обнаружить новые последовательности реакций, ранее не рассматриваемые с точки зрения возможного участия в восполнении ЦТК интермедиатами. Анализ полного генома *R. capsulatus* показал, что бактерия, в дополнение к уже известным, имеет путь образования малата через глиоксилат, образуемый из гликолата, интермедиата фотодыхания, использующего Рубиско в качестве оксигеназы. Анализ общедоступных транскрипционных профилей *R. capsulatus* показал, что данный путь активен на уровне транскриптов в фототрофных культурах исследуемой бактерии, росшей при использовании ацетата в качестве единственного органического субстрата. В то же время, учитывая, что в анаэробных условиях оксигеназная активность Рубиско не проявляется, высказывается предположение, что данная реакция нужна бактериям в краткосрочный период попадания культур в природе на освещенный и аэрируемый участок для защиты фотосинтетического аппарата от токсического действия кислорода и его активных форм. Однако для подтверждения данной гипотезы требуются дальнейшие исследования.

Ключевые слова: *Rhodobacter capsulatus*, ассимиляция ацетата, анаплеротические пути, фотодыхание, Рубиско, итаконат, малик-фермент.

Пурпурная несерная бактерия *R. capsulatus* является перспективным организмом для получения практически значимых соединений: бактериохлорофилла *a* (субстрат для синтеза новых фотосенсибилизаторов, используемых в фотодинамической терапии и диагностике онкологических заболеваний) [1], специфических липополисахаридов (основа для получения лекарственного средства против сепсиса [2]), а также молекулярного водорода, который в настоящее время рассматривается как экологически чистый источник возобновляемой энергии [3]. Для практического внедрения процесса получения биоводорода требуется существенное повышение общей эффективности преобразования энергии света и органических субстратов в биотопливо. Для этого необходимо более детальное знание метаболических процессов, происходящих внутри фотосинтетической клетки, и их перенаправление на образование биоводорода.

Наиболее доступными и экономически рентабельными субстратами для промышленного получения перечисленных выше соединений являются продукты брожения органических отходов. Часто при сбраживании углеводов в фер-

© Петушкова Е. П., Цыганков А. А., 2018

ментационной жидкости преобладают ацетат и бутират [4]. Эти органические кислоты метаболизируются пурпурными несерными бактериями через ацетил-КоА в ЦТК. В нем осуществляется полное окисление ацетил-КоА до CO_2 с синтезом НАДН и метаболитов для биосинтетических процессов. В этих условиях клетка нуждается в активных анаплеротических путях образования из ацетил-КоА интермедиатов ЦТК для компенсации их оттока на биосинтетические нужды. Ранее была создана метаболическая схема путей восполнения пула интермедиатов ЦТК у прокариот. С применением доступных баз данных, содержащих полный геном *R. capsulatus*, определено, какие из обнаруженных путей имеют генетический потенциал у данной бактерии [5]. На основе этих результатов и опубликованных данных о транскрипционных профилях фототрофных ацетатных культур *R. capsulatus* из общедоступных баз данных, были выявлены активные пути восполнения пула ЦТК. В указанной работе создание схемы проводилось на основе данных об уже известных анаплеротических путях и путях автотрофной фиксации CO_2. При ее анализе обнаружено, что все известные анаплеротические последовательности приводят к синтезу небольшого числа предшественников (глиоксилата, пропионил-КоА, ПВК и ФЕП), из которых и образуются интермедиаты ЦТК.

Целью данной работы был поиск возможных реакций, не входящих в описанные другими авторами анаплеротические пути и приводящих к синтезу интермедиатов ЦТК, а также анализ возможности реализации этих путей у изучаемой бактерии на транскрипционном уровне.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Для поиска неучтенных ранее реакций и, соответственно, ферментов, которые могут быть задействованы в восполнении пула ЩУК, по записям для субстратов и продуктов биохимических реакций в базе данных KEGG в разделе Compounds [6] был проанализирован известный в настоящее время набор ферментативных реакций, в которых участвуют предшественники метаболитов ЦТК. Затем в разделе Organisms: Complete Genomes базы данных KEGG по названию фермента производили поиск соответствующего гена в геноме *R. capsulatus* SB1003. Если поиск не давал положительного результата, то, опираясь на данные базы UniProt [7], искали фермент у других штаммов бактерии. Дополнительный поиск гомологичного гена в геноме *R. capsulatus* SB1003 проводили при помощи алгоритма tBLASTn (по аминокислотной последовательности белка по транслируемому в шести рамках считывания геному [8]). В качестве шаблона для анализа выбирали интересующий ген прокариотического организма, продукт которого наиболее охарактеризован (выполняемая функция подтверждена экспериментально). В случае отсутствия высоко гомологичных генов проверку повторяли, выбрав в качестве эталона менее охарактеризованные аннотированные последовательности, но из пурпурных бактерий. Использовали стандартные параметры работы данных алгоритмов. Критериями обнаружения интересующего гена были: при сравнении белковой последовательности – идентичность более 40% при длине более 100 аминокислот, Bit Score (мера статистической значимости выравнивания) более 50, e-value (the expectation value) $0\text{-}10^{-6}$ – ген есть (при удовлетворении остальным критериям), а более 10^{-6} – гена нет. В случае если данная последовательность действий не приводила к нахождению возможного гена, считали, что гена нет.

Для анализа экспрессионного профиля культур *R. capsulatus*, использовали данные экспериментов, размещенные в базе NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) с вводным номером GSE53303. Авторы экспериментов (Erkal, N., Gurgan, M., Ozgur, E., and Yucel, M.) выращивали культуры *R. capsulatus* SB1003 на среде с 40 мМ ацетата и разными источниками азота (2 мМ глутамата и 5 мМ NH_4Cl) в фотогетеротрофных условиях. ДНК-микрочипы были изготовлены «Affymetrix», США, на основе данных о нуклеотидных последовательностях *R. capsulatus* SB 1003 в GenBank № CP001312 для хромосомы и № CP001313 для плазмиды pRCB133 [9].

В общей сложности Erkal et al. получены данные по транскрипции 4052 последовательностей открытых рамок считывания и 200 межгенных последовательностей длиной более 300 п.н. Авторы анализировали данные при помощи программного обеспечения GeneSpring GX 11 («Agilent Technologies», США). Эта программа вычисляет *p*-значения детекции для каждого транскрипта. Значение ниже определенного порога *p*-значения (в данном случае 0.05) указывает, что транскрипт обнаружен. Если значение попадает в диапазон *p*-значений 0.05–0.06, то присутствие транскрипта считается неоднозначным. Все транскрипты, для которых *p*-значение детекции больше 0.06, считаются отсутствующими в образце.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенный анализ информации базы данных KEGG в разделе Compounds [6] об известном в настоящее время наборе ферментативных реакций, в которых участвуют предшественники метаболитов ЦТК, позволил обнаружить три последовательности реакций, которые могут быть задействованы в восполнении пула ЩУК в ЦТК у прокариот (путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы с дальнейшим превращением его в малат, а также два пути преобразования ПВК/ФЕП в фумарат, малат или *цис*-аконитат).

Путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы.

Реакции, входящие в этот путь, ранее не рассматривались с точки зрения возможного их участия в восполнении пула ЩУК (рисунок 1, реакции 1, 2, 3/3а/(3а,3б), 8/(9,10)). Формы I и II Рубиско пурпурных несерных бактерий, наряду с карбоксилазной активностью, способны проявлять оксигеназную активность, окисляя рибулозобисфосфат до фосфогликолата и фосфоглицериновой кислоты (ФГК) [10-12] в присутствии кислорода. ФГК может далее вступать в реакции цикла Кальвина, в котором Рубиско функционирует как карбоксилаза, а фосфогликолат превращается в гликолат. Последний либо выделяется в окружающую среду, либо вступает в гликолатный путь (рисунок 1, реакции 1-4а, 4б, 5-7), в котором из двух молекул гликолата происходит образование одной молекулы ФГК и выделение одной молекулы CO_2. Процесс светозависимого поглощения O_2 и выделения CO_2 (фотодыхание) у высших растений протекает в клетке одновременно с функционированием цикла Кальвина-Бенсона [13]. Фотодыхание обнаружено и у фототрофных бактерий [14].

Глиоксилат, образовавшийся из гликолата в реакциях гликолатного пути, будучи преобразован в малат (рисунок 1, реакции 8 или 9, 10), может быть задействован для пополнения пула ЩУК. Наличие генов, кодирующих ферменты для цикла Кальвина-Бенсона и реакций превращения глюкозы, а также их транскриптов в исследуемых ацетатных культурах *R. capsulatus* показано нами ранее [5]. Определение присутствия у *R. capsulatus* других генов, необходимых для реализации пути синтеза глиоксилата в реакциях фотодыхания, проводили с помощью алгоритма tBLASTn, как описано в разделе «Материалы и методы».

Реакцию 2 (рисунок 1) превращения фосфогликолата в гликолат осуществляет фермент фосфогликолатфосфатаза (фосфогликолатгидролаза, EC: 3.1.3.18). В геноме *R. capsulatus* присутствует три гена, которые в соответствии с GenBank аннотированы как фосфогликолатфосфатаза-1 (*gph1,* RCAP_rcc00333), фосфогликолатфосфатаза-2 (*gph2*, RCAP_rcc01502) и фосфогликолатфосфатаза-3 (*gph3*, RCAP_rcc01826) с номером EC: 3.1.3.18. Также есть ген без названия (RCAP_rcc02632), продукт которого аннотирован как вариант 1 субсемейства IA НАД-суперсемейства гидролаз, который в соответствии с функциональной аннотацией KEGG Orthology отнесен к фосфогликолатфосфатазам.

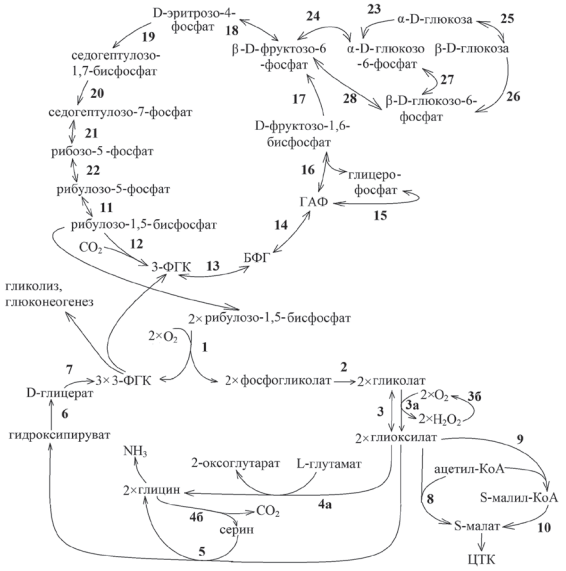

Рис. 1. Схема пути фотодыхания (реакции 1-7), пути образования малата с участием Рубиско в качестве оксигеназы (реакции 1-3/3а/(3а,3б), 8/(9,10)), реакций цикла Кальвина-Бенсона (реакции 11-22), реакций пути образования рибулозо-1,5-бисфосфата из запасенной глюкозы (реакции 23-28, 18-22, 11). Схема составлена на основе информации базы данных KEGG Pathway.

Образование глиоксилата из гликолата (реакции 3а/3а-3б или 3, рисунок 1, таблица 1) могут катализировать несколько различных ферментов: необратимая гликолатдегидрогеназа (реакция 3а, гликолатоксидоредуктаза, EC: 1.1.99.14); необратимая (S)-2-гидроксикислотаоксидаза (EC: 1.1.3.15, реакция 3а) в сочетании с каталазой (EC: 1.11.1.6, реакция 3б) или каталазой-пероксидазой (EC: 1.11.1.21, реакция 3б). Получение глиоксилата возможно также с

помощью обратимых ферментов, осуществляющих обратные реакции (реакция 3): НАД-зависимой глиоксилатредуктазы (EC: 1.1.1.26/ EC: 1.1.1.29); НАДФ-зависимой глиоксилатредуктазы (EC:1.1.1.79).

В настоящее время сведений о характеристиках и активности необратимых ферментов с EC: 1.1.99.14 и EC: 1.1.3.15 в *R. capsulatus* в доступных источниках не обнаружено, не известно и сколько субъединиц они включают. Однако в геноме исследуемой бактерии присутствуют следующие гены в соответствии с GenBank (таблица 1): железо-серной субъединицы гликолатдегидрогеназы (*glcF*, RCAP_rcc02869), субъединицы GlcE гликолатдегидрогеназы (*glcE*, RCAP_rcc02870), субъединицы GlcD гликолатдегидрогеназы (*glcD*, RCAP_rcc02871). Последняя в соответствии с KEGG Orthology отнесена к EC: 1.1.3.15. У *E. coli* гены *glcD*, *glcE*, и *glcF*, кодирующие все три субъединицы, ответственны за гликолатоксидазную активность [15]. Каталаза (EC: 1.11.1.6) в геноме исследуемой бактерии отсутствует, но есть ген каталазы-пероксидазы (EC: 1.11.1.21, *katG*, RCAP_rcc01738).

В геноме бактерии присутствует ген НАД-зависимой глиоксилатредуктазы (EC: 1.1.1.26, *gyaR1*, RCAP_rcc00524, таблица 1). Также имеется ген, не имеющий имени (RCAP_rcc00798), продуктом которого в соответствии с GenBank является белок семейства D-изомер-специфичных

Таблица 1.

Наличие генов, кодирующих ферменты пути образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы (наличие необходимых генов для реакции образования глиоксилата 1, 2, 3/3а/(3а,3б), реакции его превращения в малат 8/(9,10) продемонстрированы ранее [5]), а также их транскрипция у R. capsulatus при фототрофном росте с использованием ацетата и разных источников азота.

Номер реакции по рисунку 1	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Присутствие транскриптов в культурах росших с использованием разных источников азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH_4Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
1,	*cbbL*	K01601; рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа большая субъединица (EC: 4.1.1.39)	RCAP_rcc00579	P*	P	P	P	P	P
	cbbS	K01602; рибулезобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа малая субъединица (EC: 4.1.1.39)	RCAP_rcc00578	P	P	P	P	P	P
1,	*cbbM*	K01601; рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа большая субъединица (EC: 4.1.1.39)	RCAP_rcc01829	P	P	P	P	P	P
2	*gph1*	K01091; фосфогликолатфосфатаза-1 (-)	RCAP_rcc00333	A	P	M	A	M	P
2	*gph2*	K01091; фосфогликолатфосфатаза-2 (-)	RCAP_rcc01502	P	P	P	P	P	P
2	*gph3*	K01091; фосфогликолатфосфатаза-3 (-)	RCAP_rcc01826	A	A	A	A	P	A
2	-	K01091; вариант 1 субсемейства IA НАД-суперсемейства гидролаз (-)	RCAP_rcc02632	P	P	P	P	M	P
3а	*glcF*	K11473; железо-серной субъединицы гликолатдегидрогеназы	RCAP_rcc02869	M	A	P	A	P	P
	glcE	K11472; субъединица GlcE гликолатдегидрогеназы	RCAP_rcc02870	P	A	M	P	A	P
	glcD	K00104; субъединица GlcD гликолатдегидрогеназы	RCAP_rcc02871	A	A	M	A	A	A
3б	*katG*	K03782; каталаза/пероксидаза	RCAP_rcc01738	P	P	P	P	P	P
3	*gyaR1*	K00015; глиоксилатредуктаза-1	RCAP_rcc00524	P	P	P	P	P	P
3	-	K12972; D-изомер-специфичных 2-гидроксикислот-дегидрогеназ	RCAP_rcc00798	P	P	P	P	P	P

* Примечание. Обозначения: транскрипт присутствует в образце – P, отсутствует – A, присутствие транскрипта считается неоднозначным – M.

2-гидроксикислота-дегидрогеназ, а в соответствии с функциональной классификацией KEGG отнесенный к глиоксилат/гидроксипируватредуктазам А (EC: 1.1.1.79 1.1.1.81).

Анализ генома *R. capsulatus* показал наличие всех необходимых генов рассматриваемого пути (таблица 1). Для определения их транскрипции, проведен анализ транскрипционных профилей культур *R. capsulatus,* выросших на свету на среде с ацетатом в качестве единственного органического субстрата. Подтверждено присутствие транскриптов Рубиско, фосфогликолатфосфатазы-2, глиоксилатредуктазы-1 и белка семейства D-изомер-специфичных 2-гидроксикислот-дегидрогеназ, в соответствии с функциональной классификацией KEGG отнесенного к глиоксилат/гидроксипируватредуктазам А в исследуемых культурах *R. capsulatus* (таблица 1). Это свидетельствует в пользу того, что рассматриваемый путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы активен на транскрипционном уровне. Транскриты перечисленных генов присутствуют в образцах вне зависимости от вида источника азота в среде. В пользу предположения, что рассмотренные реакции могли бы выступать как альтернативный путь образования малата, можно отнести тот факт, что у *R. capsulatus* присутствуют гены двух малатсинтаз, *glcB* и *aceB,* и их транскрипты детектируются в образцах ацетатных культур [5]. Из литературных данных известно, что у некоторых организмов, обладающих этими ферментами, осуществляющими конденсацию глиоксилата и ацетил-КоА в малат, малатсинтаза *glcB* 1000-кратно активируется в присутствии гликолата [16].

Гипотетический путь образования фумарата из ПВК/ФЕП.

В результате наших исследований выявлены альтернативные классическим анаплеротическим карбоксилазам [17] пути образования из ПВК интермедиатов ЦТК за счет реакций с участием специфичного к R-изомеру субстрата декарбоксилирующего малик-фермента (рисунок 2, реакции 9-11 или 9,12). Считается, что преимущественное направление реакции малик-ферментов – декарбоксилирование. Однако показано, что у некоторых малик-ферментов преимущественное направление реакции в сторону образования ПВК или малата зависит, например, от pH [18]. Кроме того, в *Synechocystis* sp. PCC 6803, не имеющей активного анаплеротического пути ассимиляции ацетата, малик-фермент (EC: 1.1.1.40) является ключевым ферментом восполнения интермедиатов ЦТК, осуществляя карбоксилирование ПВК [19]. Малик-фермент (EC: 1.1.1.83), в отличие от описанных выше ферментов, обладает субстратной специфичностью к (R)-энантиомеру малата. В случае возможного осуществления данным ферментом карбоксилирования ПВК образуется (R)-малат (рисунок 2, реакция 9), который не может напрямую включиться в ЦТК из-за специфичности его ферментов к (S)-форме субстрата. (R)-малат может превращаться далее либо в фумарат, либо в S-малат.

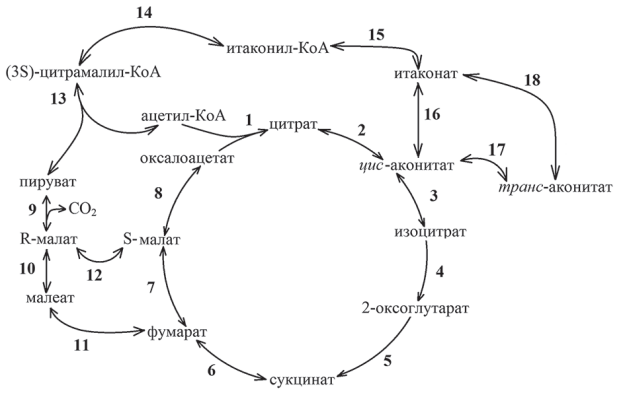

Рис. 2. Схема ЦТК (реакции 1-8), пути образования интермедиатов ЦТК из ПВК через R-малат (реакции 9-11 и 9 и 12), путь образования цис-аконитата из ПВК и ацетил-КоА через итаконат (реакции 13-16 или 13-15, 18, 19). Схема составлена на основе информации базы данных KEGG Pathway.

Реакции превращения (R)-малата в фумарат начинаются с образования из R-малата малеата с участием малеатгидратазы (рисунок 2, реакция 10, EC: 4.2.1.31). Малеат далее под действием малеатизомеразы (реакция 11, EC: 5.2.1.1) преобразуется в фумарат, вступающий в реакции ЦТК.

Преобразование (R)-малата в (S)-малат может осуществляться за счет одного фермента, обладающего рацемазной активностью (рисунок 2, реакция 12). Возможность осуществления данной реакции продемонстрирована экспериментально в культурах *R. capsulatus* [20], однако нет пока ассоциированного с этой функцией гена.

В геноме *R. capsulatus* ген (R)-малик-фермента (EC: 1.1.1.83) не обнаружен. С функцией малеатгидратазы (EC: 4.2.1.31) в настоящее время ассоциирован многофункциональный фермент, обнаруженный в *Methanocaldococcus jannaschii,* кодируемый геном *leuC* [21]. Продемонстрировано, что он проявляет активность малеатгидратазы.

В геноме *R. capsulatus* не обнаружено сходного гена. Малеатизомераза (EC: 5.2.1.1) у этой бактерии также отсутствует.

Таким образом, в связи с отсутствием в геноме бактерии гена ключевого фермента пути образования интермедиатов ЦТК через R-малат (малик-фермента (EC: 1.1.1.83)), эти пути образования малата и фумарата у *R. capsulatus* отсутствуют.

Гипотетический путь образования цис-аконитата из ПВК и ацетил-КоА.

Последовательность реакций, связанная с метаболизмом итаконата (рисунок 2, реакции 13-16 или 13-15, 17, 18), гипотетически, могла бы участвовать в восполнении ЦТК интермедиатами на уровне *цис*-аконитата. В настоящее время этот путь рассматривается как основной для ассимиляции итаконата (реакции 15, 14, 13 [22]) и его синтеза (реакции 16 [23] или 17, 18 [24]). В нем все реакции, кроме декарбоксилирования *цис*-аконитата/*транс*-аконитата до итаконата (реакция 16/19) – в настоящее время считаются обратимыми. Но, как отмечалось выше, у некоторых карбоксилиаз (декарбоксилаз) при определенных условиях направление реакции может смещаться в сторону карбоксилирования [18, 19]. В случае возможности протекания реакции 16 (рисунок 2) в обратном направлении за счет гипотетичекой обратимости реакции (или при существовании фермента-антагониста) возможно образование *цис*-аконитата, метаболита ЦТК, из ацетата и ПВК. Для понимания возможности преобразования трансизомера аконитата в реакции 18 (рисунок 2) и далее информации в UniProt о последовательностях ферментов, способных к превращению итаконата, недостаточно [7]. Однако есть экспериментальные статьи, в которых реакции преобразования итаконата в бактериях исследованы на уровне активностей ферментов. Имеются данные по влиянию итаконата на другие пути восполнения ЦТК у пурпурных несерных бактерий *Rhodospirillum rubrum* и *R. sphaeroides*, не имеющих глиоксилатного цикла [25].

Уникальными для гипотетического пути образования *цис*-аконитата являются все перечисленные выше реакции, кроме конденсации ацетил-КоА и ПВК (рисунок 2, реакция 13), которую осуществляет (S)-цитрамалил-КоА-лиаза (EC: 4.1.3.25), и реакции превращения итаконил-КоА в итаконат, которую осуществляет сукцинил-КоА-синтетаза (EC: 6.2.1.4, 6.2.1.5, ген *sucD*, α-субъединица, RCAP_rcc00721; и ген *sucC*, β-субъединица RCAP_rcc00720).

Первая реакция предполагаемого пути, конденсация ацетил-КоА и ПВК, катализируется (S)-цитрамалил-КоА-лиазой (EC: 4.1.3.25; реакция 24, рисунок 2). Превращение (3S)-цитрамалил-КоА в итаконил-КоА (рисунок 2, реакция 14) катализирует фермент итаконил-КоА-гидратаза (EC: 4.2.1.56). Далее итаконил-КоА под действием сукцинил-КоА:итаконат КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.-) или сукцинил-КоА-синтетазы (EC: 6.2.1.4, 6.2.1.5) превращается в итаконат (рисунок 2, реакция 15). Далее *цис*-аконитатдекарбоксилаза (EC: 4.1.1.6, реакция 16), которая гипотетически могла бы катализировать обратную реакцию, осуществляет карбоксилирование итаконата до *цис*-аконитата.

В геноме *R. capsulatus* отсутствуют все известные в настоящее время гены уникальных ферментов рассматриваемого пути. Гены ферментов, осуществляющих реакцию 17 (аконитатизомераза (EC: 5.3.3.7)) и реакцию 18 (*транс*-аконитатдекарбоксилаза) также отсутствуют в геноме исследуемой бактерии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в данной работе результаты дополняют описанную раннее универсальную схему и классификацию путей восполнения пула ЩУК в ЦТК у прокариот [5]. В соответствии с новой информацией, пути восполнения пула ЩУК подразделены на четыре основные группы по образуемому в них центральному метаболиту, через который происходит образование интермедиатов ЦТК (I) – пути, в которых происходит образование глиоксилата (глиоксилатный цикл; путь с участием Рубиско в качестве оксигеназы): (II) – пути, в которых происходит одновременно образование глиоксилата и пропионил-КоА (метиласпартатный, цитрамалатный циклы и этилмалонил-КоА путь); (III) – пути, в которых происходит образование только пропионил-КоА (часть реакций 3-гидроксипропионатного цикла); (IV) – пути, в которых образуются ПВК/ФЕП (образование ПВК из экзогенного ацетата и CO_2 с участием пируват:оксидо-редуктазы; из экзогенного ацетата и CO_2 с участием обратимой формиат-дегидрогеназы и обратимой формиат-С-ацетилтрансферазы; образование ФЕП/ПВК за счет запасных углеводов в путях Энтнера–Дудорова и Эмбдена–Мейергофа–Парнаса; образование ФЕП/ПВК из интермедиа-тов цикла Кальвина–Бенсона).

Пути преобразования синтезировавшихся глиоксилата, пропионил-КоА или ПВК/ФЕП в звенья ЦТК вариабельны. Образовавшийся разными способами пропионил-КоА может преобразоваться до сукцинил-КоА (в метилцитратном или метилмалониловом путях) или до ПВК (путь окисления

пропионил-КоА через лактат). Преобразование глиоксилата в интермедиаты ЦТК также может осуществляться разными путями (за счет двух малатсинтаз, отличающиеся стабильностью и активаторами; за счет образования малата через стадию образования (S)-малил-КоА). Образование из ПВК/ФЕП предшественников ЩУК возможно напрямую за счет шести различных анаплеротических карбоксилирующих ферментов или через стадию образования фумарата с участием специфичного к (R)-изоформе субстрата обратимого декарбоксилирующего малик-фермента. Кроме того, образование ПВК в интермедиаты ЦТК возможно также в гипотетическом пути образования *цис*-аконитата через стадию образования итаконата.

Из обнаруженных в ходе данной работы метаболических путей генетический потенциал у *R. capsulatus* имеет только путь образования малата через глиоксилат в реакциях фотодыхания с участием Рубиско в качестве оксигеназы. Установлено, что все необходимые для реализации данного пути гены экспрессируются в фототрофных культурах исследуемой бактерии при использовании ацетата в качестве единственного органического субстрата. Однако в анаэробных условиях он не может функционировать, поскольку требует присутствия кислорода. Более того, константа Михаэлиса для реакции Рубиско с кислородом высока. Например, у пурпурной несерной бактерии *Rsp. rubrum* она составляет 170±20 мкМ [26], у высших растений – 300-700 мкМ [27]. При этом концентрация O_2 в жидкости при 30^0С при насыщении ее воздухом составляет 236 мкМ, поэтому в микроаэробных условиях (примерно 5-10 мкМ O_2) скорость поглощения O_2 Рубиско будет меньше 1% от максимальной скорости. Таким образом, скорость этой реакции будет значимой лишь в условиях полного насыщения среды обитания бактерии воздухом. Физиологическая роль данного набора реакций является предметом будущих исследований. На данном этапе можно лишь полагать, что данный процесс может быть важен в природе, когда бактерия неожиданно попадает в условия насыщения среды воздухом или когда она оказывается рядом с водорослью, активно образующей кислород в процессе фотосинтеза. Для сохранения фотосинтетического аппарата, который разрушается на свету в присутствии кислорода активными формами кислорода, необходимо быстро снизить содержание кислорода в клетках в таких условиях. Фотодыхание за счет Рубиско позволяет выполнить такую задачу. Роль же данного процесса в восполнении пула ЩУК еще предстоит определить.

Суммированная информация о том, какие пути восполнения пула ЩУК в ЦТК имеют генетический потенциал у *R. capsulatus*, а также какие из них экспрессируются у бактерии в фотогетеротрофных условиях с использованием ацетата в качестве единственного органического субстрата, приведены на рисунке 3. Необходимо обратить внимание, что на рисунке отсутствуют реакции цитрамалатного цикла, так как в отношении него проведенный ранее анализ не позволил прийти к определенному заключению [5].

Таким образом, полученные ранее [5] и новые результаты указывают на наличие у *R. capsulatus* нескольких путей, способных осуществлять вклад в пополнение пула ЩУК. В культурах данной бактерии, росших фототрофно на среде с ацетатом, обнаружены транскрипты генов глиоксилатного пути, этилмалонил-КоА пути, цикла Кальвина-Бенсона, пути образования малата с участием Рубиско в качестве оксигеназы. Одновременное присутствие в культурах транскриптов генов нескольких путей можно объяснить по-разному. Во-первых, наличие различных путей для выполнения одной функции повышает устойчивость живой системы в случае ингибирования какого-либо фермента внешними условиями.

Во-вторых, присутствие нескольких путей, способных к синтезу С4-дикарбоновых кислот, может объясняться их дополнительными функциями, способствующими оптимальному росту на среде с ацетатом в качестве единственного органического субстрата. Так, цикл Кальвина-Бенсона может способствовать поддержанию окислительно-восстановительного баланса [30]. Этилмалонил-КоА цикл может являться источником пропионил-КоА, который не только служит субстратом для синтеза интермедиатов ЦТК, но и является предшественником при синтезе жирных кислот с нечетным числом углеродных атомов. Путь синтеза глиоксилата с участием Рубиско в роли оксидазы может быть важен в кратковременных аэробных условиях, снижая количество кислорода в среде до уровней, не ингибирующих фотосинтез. Однако, несмотря на разное функциональное значение путей образования С4-кислот, которые одновременно активны в клетке, при отсутствии активности глиоксилатного пути анаплеротическая функция может являться для них основной.

Кроме того, экспрессируемый фермент может в некоторых условиях катализировать не прямую, а обратную реакцию, не способствуя функционированию пути. В связи с этим, для полного доказа-

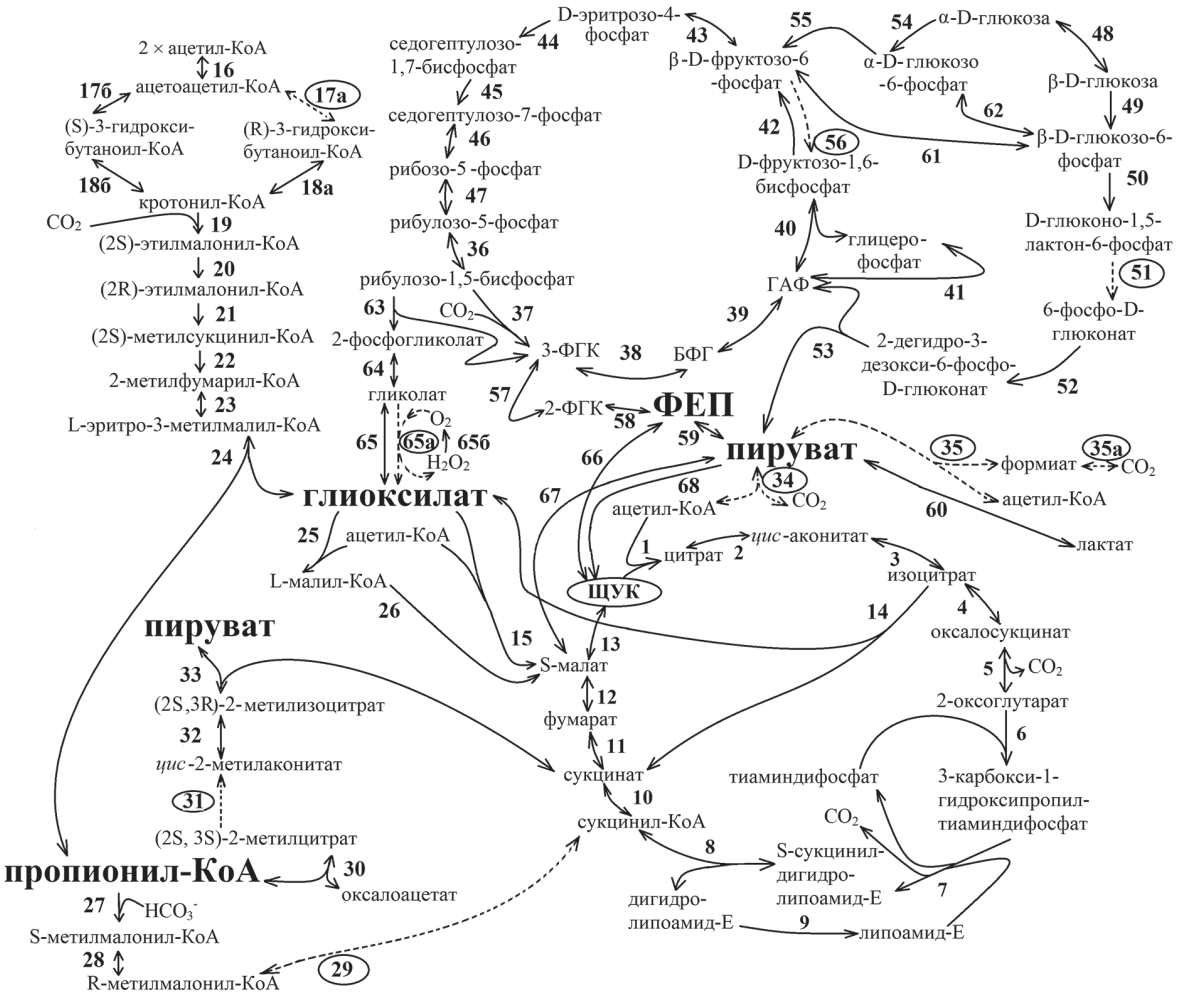

Рис. 3. Пути восполнения пула ЩУК в ЦТК, имеющие генетический потенциал у Rba. capsulatus и их экспрессия в фотогетеротрофных условиях с использованием ацетата. Пунктиром обозначены реакции, не активные на уровне транскриптов, а их номера обведены сплошной линией. ЦТК (1–13); глиоксилатный цикл (1–3, 14, 15 или 25-26, 11–13); часть реакций этилмалонил-КоА пути (16-24, 15 или 25-26). Путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы (63, 64, 65 или 65а-65б). Пути, в которых пропионил-КоА превращается в ЩУК – метилмалонил-КоА путь (27–29, 10–13), часть реакций метилцитратного цикла (30-33). Пути образования ПВК из экзогенного ацетата (34 и 35, 35а); путь Энтнера–Дудорова (48-53) в сочетании с реакциями 39, 38, 57-59 и 66-68; путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса (54-56, 40, 39, 38, 57-59) в сочетании с реакциями 66-68; цикл Кальвина–Бенсона (36-47) в сочетании с реакциями 57-59 и 66-68. Анаплеротические карбоксилазы: 66-68. БФГ – 1,3-бисфосфоглицерат, ГАФ – глицеральдегид-3-фосфат. Схема составлена на основе информации базы данных KEGG Pathway.

тельства наличия тех или иных анаплеротических путей у изучаемой бактерии, необходимо провести дополнительные исследования, позволяющие показать существование указанных путей на уровне наличия белков и продуктов реакций.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Grin M. A., Mironov A. F., Shtil A. A. // Anticancer Agents Med. Chem. 2008. Vol. 8, pp. 683-697.
2. Прохоренко И.Р., Грачев С.В., Зубова С.В. Патент РФ, №2392309, 2010.
3. Цыганков А.А., Хуснутдинова А.Н. // Микробиология. 2015. Т. 84. № 1. С. 3-26.
4. Текучева Д.Н., Цыганков А.А. // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48. № 4. С. 357-375.
5. Петушкова Е.П., Цыганков А.А. // Биохимия. 2017. Т. 82, № 5. С. 786-807.
6. Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Furumichi M., Tanabe M. // Nucleic Acids Res. 2012. Vol. 40, pp. D109–114.
7. The UniProt Consortium // Nucleic Acids

Res. 2015. Vol. 43, pp. D204–212.

8. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. // Nucleic Acids Res. 1997. Vol. 25, pp. 3389–3402.

9. Strnad H., Lapidus A., Paces J., Ulbrich P., Vlcek C., Paces V., Haselkorn R. // J. Bacteriol. 2010. Vol. 192, pp. 3545–3546.

10. Bowes G., Ogren W.L., Hagerman R.H. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1971. Vol. 45, pp. 716-722.

11. Tabita F.R. // Microbiol. Rev. 1988. Vol. 52, pp. 155-189.

12. Gibson J.L., Tabita F.R. // J. Bacteriol. 1977. Vol. 132, pp. 818-823.

13. Эдвардс Дж., Уокер Д. Фотосинтез С3 и С4 растений: механизмы и регуляция. Москва, Мир, 1986, 464 с.

14. McFadden B.A., Shively L.M. in: Variations in autotrophic life. Shively L.M. and Barton L.L., eds. London, Acad. Press. 1991. pp. 25–49.

15. Pellicer M.T., Badía J., Aguilar J., Baldomà L. // J. Bacteriol. 1996. Vol. 178, pp. 2051-2059.

16. Molina I., Pellicer M.T., Badia J., Aguilar J., Baldoma L. // Eur. J. Biochem. 1994. Vol. 224, pp. 541–548.

17. Sauer U., Eikmanns B.J. // FEMS Microbiology Reviews. 2005. Vol. 29, pp. 765–794.

18. Nuiry I.I., Cook P.F. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. Vol. 829, pp. 295–298.

19. Bricker T.M., Zhang S., Laborde S.M., Mayer P.R., Frankel L.K. and Moroney J.V. // J. Bacteriol. 2004. Vol. 186, pp. 8144–8148.

20. Martínez-Luque M., Castillo F., Blasco R. // Curr. Microbiol. 2001. Vol. 43, pp. 154-157.

21. Drevland R.M., Waheed A., Graham D.E. // J. Bacteriol. 2007. Vol. 189, pp. 4391-4400.

22. Gray C.T., Kornberg H.L. // Biochim. Biophys. Acta. 1960. Vol. 42, pp. 371-372.

23. Steiger M.G., Blumhoff M.L., Mattanovich D., Sauer1 M. // Front Microbiol. 2013. Vol. 4, pp. 1-5.

24. Geiser E., Przybilla S.K., Friedrich A., Buckel W., Wierckx N., Blank L.M., Bölker M. // Microb Biotechnol. 2016. Vol. 9, pp. 116-126.

25. Berg I.A., Filatova L.V., Ivanovsky R.N. // FEMS Microbiology Letters. 2002. Vol. 216, pp. 49-54.

26. Witzel F., Goetze F., Ebenhoeh O. // FEBS J. 2010. Vol. 277, pp. 931-950.

27. Andrews T.J., Whitney S.M., Manipulating ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants, In: Collings A.F., Critchley C. (eds) Wiley-VCH. Weinheim. 2005. pp. 243–261.

28. McKinlay J.B., Harwood C.S. // PNAS. 2010. Vol. 107, pp. 11669–11675.

Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук
Петушкова Е. П.,научный сотрудник,
Тел.: +7 (4967) 73-27-91
E-mail: peteka2008@gmail.com

Цыганков А. А., Врио директора ИФПБ РАН,
Тел.: +7 (4967) 73-27-91
E-mail: ttt-00@mail.ru

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences
Petushkova E.P., researcher
Ph.: +7 (4967) 73-27-91
E-mail: peteka2008@gmail.com

Tsygankov A. A., the acting director of IBBP RAS
Ph.: +7 (4967) 73-27-91
E-mail: ttt-00@mail.ru

POSSIBILITIES OF REPLENISHMENT OF TRICARBONIC ACID CYCLE IN RHODOBACTER CAPSULATUS

E. P. Petushkova, A. A. Tsygankov

Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences

Abstract. Purple non-sulphur bacterium *Rhodobacter capsulatus* B10 had been shown to be capable of using glyoxylate cycle and several other anaplerotic pathways for replenishing TCA cycle pool. Earlier, it was shown that *R. capsulatus* has genetis capabilities for realization of ethylmalonyl-CoA pathway, as well as a combination of reactions of pyruvate/phosphoenolpyruvate synthesis (from acetyl-CoA and formate, from acetyl-CoA and CO_2, and from 3-phosphoglycerol which was synthesyzed in Calvin-Benson cycle)

with following carboxylation of these C_3 organic acids. In photoheterotrophic cultures of *R. capsulatus* grown with acetate as a sole organic electron donor genes of glyoxylate cycle, ethylmalonyl-CoA pathway, and genes of pyruvate/phosphoenolpyruvate synthesis from intermediates of Calvin-Benson cycle as well as genes necessary for their following carboxylation were expressed. Bioinformatic analysis of known biochemical reactions has allowed to find new pathway which have not been considered earlier from the point of view of possible participation in replenishing TCA cycle intermediates. The complete sequenced genome of *R. capsulatus* has all necessary genes for only malate formation pathway via glyoxylate produced in photorespiration recruiting Rubisco oxygenase activity. Analysis of available transcriptional profiles showed this pathway to be transcriptionally active in the cultures of the studied bacterium grown on acetate as the only source of organic carbon. Nevertheless, Rubisco oxygenase activity does not produce glycolate under anaerobic conditions due to oxygen absence. We suggest that this reaction is important for bacteria in the Nature for the case when culture suddenly experience aerobic conditions under the light .In this case increased respiration is necessary to decrease oxygen content inside cells and prevent the damage of photosynthetic apparatus by active forms of oxygen. However, this suggestion needs in future experimental validation.

Keywords: *Rhodobacter capsulatus;* acetate assimilation; anaplerotic pathways; photorespiration; Rubisco; itaconate; malic enzyme.

REFERENCES

1. Grin M. A., Mironov A. F., Shtil A. A., Anticancer Agents Med. Chem., 2008, Vol. 8, pp. 683-697.
2. Prokhorenko I.R., Grachev S.V., Zubova S.V. Patent RF, no. 2392309, 2010.
3. Tsygankov A.A., Khusnutdinova A.N., Microbiology (Mikrobiologiya), 2015, Vol. 84, No. 1, pp. 3-26.
4. Tekucheva D.N., Tsygankov A.A., Applied Biochemistry and Microbiology (Prikladnaya biohimiya i mikrobiologiya), 2012, Vol. 48, No. 4, pp. 357-375.
5. Petushkova E.P., Tsygankov A.A., Biochemistry (Biohimiya), 2017, Vol. 82, No. 5, pp. 786-807.
6. Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Furumichi M., Tanabe M., Nucleic Acids Res., 2012, Vol. 40, pp. D109–114.
7. The UniProt Consortium, Nucleic Acids Res., 2015, Vol. 43, pp. D204–212.
8. Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J., Nucleic Acids Res., 1997, Vol. 25, pp. 3389–3402.
9. Strnad H., Lapidus A., Paces J., Ulbrich P., Vlcek C., Paces V., Haselkorn R., J. Bacteriol., 2010, Vol. 192, pp. 3545–3546.
10. Bowes G., Ogren W.L., Hagerman R.H., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1971, Vol. 45, pp. 716-722.
11. Tabita F.R., Microbiol. Rev., 1988, Vol. 52, pp. 155-189.
12. Gibson J.L., Tabita F.R., J. Bacteriol., 1977, Vol. 132, pp. 818-823.
13. Edvards Dzh., Uoker D., Fotosintez C3 i C4 rasteniy: mehanizmyi i regulyatsiya, Moskva, Mir, 1986, 464 p.
14. McFadden B.A., Shively L.M. in: Variations in autotrophic life, Shively L.M. and Barton L.L., eds. London, Acad. Press., 1991, pp. 25–49.
15. Pellicer M.T., Badía J., Aguilar J., Baldomà L., J. Bacteriol., 1996, Vol. 178, pp. 2051-2059.
16. Molina I., Pellicer M.T., Badia J., Aguilar J., Baldoma L., Eur. J. Biochem., 1994, Vol. 224, pp. 541–548.
17. Sauer U., Eikmanns B.J., FEMS Microbiology Reviews, 2005, Vol. 29, pp. 765–794.
18. Nuiry I.I., Cook P.F., Biochim. Biophys. Acta., 1985, Vol. 829, pp. 295–298.
19. Bricker T.M., Zhang S., Laborde S.M., Mayer P.R., Frankel L.K. and Moroney J.V., J. Bacteriol., 2004, Vol. 186, pp. 8144–8148.
20. Martínez-Luque M., Castillo F., Blasco R., Curr. Microbiol., 2001, Vol. 43, pp. 154-157.
21. Drevland R.M., Waheed A., Graham D.E., J. Bacteriol., 2007, Vol. 189, pp. 4391-4400.
22. Gray C.T., Kornberg H.L., Biochim. Biophys. Acta., 1960, Vol. 42, pp. 371-372.
23. Steiger M.G., Blumhoff M.L., Mattanovich D., Sauer1 M., Front Microbiol., 2013, Vol. 4, pp. 1-5.
24. Geiser E., Przybilla S.K., Friedrich A., Buckel W., Wierckx N., Blank L.M., Bölker M., Microb Biotechnol., 2016, Vol. 9, pp. 116-126.
25. Berg I.A., Filatova L.V., Ivanovsky R.N., FEMS Microbiology Letters., 2002, Vol. 216, pp. 49-54.
26. Witzel F., Goetze F., Ebenhoeh O., FEBS J., 2010, Vol. 277, pp. 931-950.
27. Andrews T.J., Whitney S.M., Manipulating ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants, In: Collings A.F., Critchley C. (eds) Wiley-VCH. Weinheim, 2005, pp. 243–261.
28. McKinlay J.B., Harwood C.S., PNAS, 2010, Vol. 107, pp. 11669–11675.