

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ**

«ВЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Биологический факультет

Кафедра микробиологии

Е. А. БЕССОЛИЦЫНА

БИОХИМИЯ
Конспект лекций
Модуль 4
Анаболизм

Учебно-методическое пособие

Киров

2011

УДК

К

Допущено к изданию методическим советом биологического факультета ФГБОУ ВПО «ВятГУ» в качестве учебно-методического пособия для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения

Рецензент

доцент кафедры биотехнологии ФГБОУ ВПО «ВятГУ»,

кандидат биологических наук

О. Н. Шуплецова

Бессолицына Е. А.

К

Биохимия конспект лекций модуль 4 «Анаболизм»: учебно-методическое пособие / Е. А. Бессолицына – Киров: ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011. – 63 с.

УДК

Учебно-методическое пособие предназначено для студентов направления 020400.62 «Биология» всех профилей подготовки, всех форм обучения для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Биохимия».

Тех. редактор Е. В. Кайгородцева

© ФГБОУ ВПО «ВятГУ», 2011

Фотосинтез

Процесс поглощения энергии света и трансформации ее в энергию химических связей.

Выделяют две фазы фотосинтеза: световая (собственно поглощение энергии света) и темновая (синтез углеводов и/или других компонентов клетки). Поглощение энергии света использует большое количество организмов, но наибольшее многообразие вариантов выявлено у бактерий. Но для всех вариантов характерно, то, что запасание энергии происходит по одной схеме: свет → энергия протонного градиента ($\Delta\mu\text{H}$) → АТФ.

Основные процессы световой фазы фотосинтеза связаны с пигментами фотосинтеза. По типу пигментов выделяют два типа фотосинтеза:

Бактериородопсиновый

С участием хлорофилла.

Оба типа встречаются только у прокариот.

Бактериородопсиновый фотосинтез

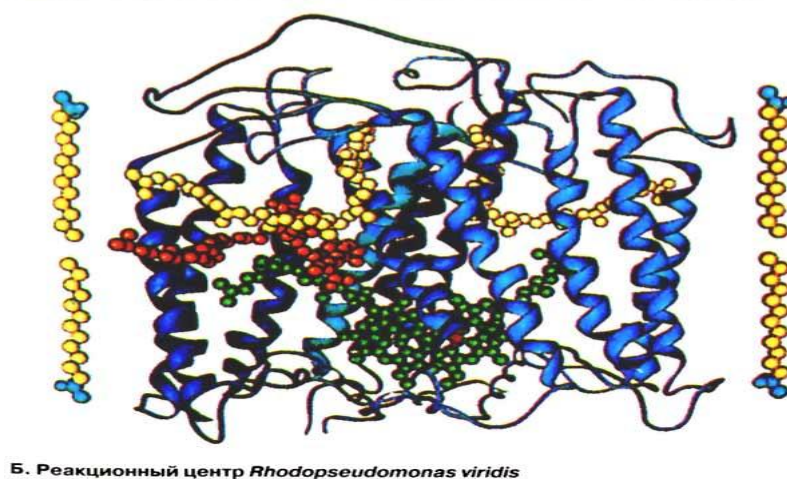
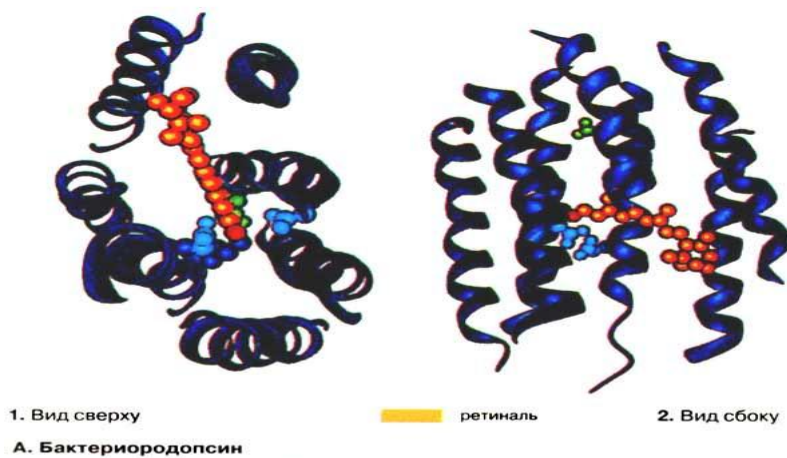


Рисунок 1: Бактериородопсин

В 1971 г. Остерхельт и Стокениус открыли ретинальсодержащий белок в мембранах экстремально галофильной бактерии *Halobacterium halobium*. В дальнейшем было продемонстрировано, что бактериородопсин функционирует как светозависимый H^+ -насос.

Бактериородопсин представляет собой одиночный полипептид массой 26 кДа, что значительно меньше, чем у всех других известных к настоящему времени $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов. Он локализован в специальных областях цитоплазматической мембраны *H. halobium*—так называемых пурпурных бляшках, достигающих 0.5

мкм в диаметре. Других белков в бляшках нет, так что бактериородопсин делает свое дело, так сказать, без помощников. Обычно его молекулы *in vivo* образуют тримеры. Однако и в мономерной форме бактериородопсин эффективен как протонный насос. Такие процессы, как межмолекулярный перенос окислительно-восстановительных эквивалентов или гидролиз ковалентных макроэргических связей, всегда наличествующие в других $\Delta\mu\text{H}$ -генераторах, в бактериородопсине не обнаружены.

Согласно современной точке зрения, механизм действия бактериородопсина состоит в следующем. Поглощение фотона остатком ретиналя, ковалентно связанным посредством альдиминной связи с ϵ -аминогруппой Lys-216 в молекуле бактериородопсина, вызывает изомеризацию ретиналя по типу полностью транс в 13-цис. Этот эффект сопровождается очень резкий кислотным сдвигом рК иминного азота Шиффова основания, который в трансизомере протонирован. В результате Шиффова основание теряет сродство к протону и депротонируется. Считается, что освобождающийся протон выделяется в виде иона H^+ в водную фазу снаружи клетки. Затем происходит темновая цис-транс-изомеризация, а рК Шиффова основания возвращается к исходному значению, т. е. сродство основания к протонам вновь возрастает. В результате Шиффова основание протонируется, причем для этой цели используется ион H^+ , поступающий изнутри бактериальной клетки. В результате под действием кванта света происходит перенос H^+ из цитоплазмы клетки во внешнюю среду, создается протонный градиент, который является источником энергии. Два кванта света позволяет перенести 2 протона, а энергия протондвижущей силы создаваемой градиентом в 2 моля протонов соответствует энергии синтеза одного моля АТФ. Данный вид фотосинтеза с одной стороны очень прост, что позволяет предположить, что данный вид фотосинтеза очень древен, с другой стороны этот процесс низко эффективен, именно поэтому этот тип фотосинтеза сохранился только у бактерий, обитающих в Мертвом море, где наблюдается высокая интенсивность активности солнечной радиации.

Может быть поэтому появился другой тип фотосинтеза — с участием бактериохорофила.

Фотосинтез с участием бактериохлорофила

Бактериохлорофил — это разновидность хлорофила, структура хлорофила высших растений будет рассмотрена ниже. Основная особенность хлорофила — это способность на свету быть восстановителем, а в темноте быть окислителем, это позволяет включать хлорофил в электрон-транспортные цепи. У фотосинтезирующих эубактерий известно больше десяти видов хлорофиллов. Хлорофиллы эубактерий, осуществляющих бескислородный фотосинтез (пурпурные и зеленые бактерии, гелиобактерии) получили общее название бактерио-хлорофиллов. Идентифицировано 6 основных видов бактериохлорофиллов: *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *g*. Все пурпурные бактерии содержат какую-либо одну форму бактериохлорофила: *a* или *b*. Небольшие различия в

химическом строении приводят к существенным изменениям в спектральных свойствах этих пигментов. Пурпурные бактерии, содержащие бактериохлорофилл *a*, могут поглощать свет с длиной волны до 950 нм. У видов, имеющих бактериохлорофилл *b*, максимум поглощения в красной части спектра сдвинут в длинноволновую область больше чем на 100 нм и приходится на 1020—1030 нм, а граница поглощения продвинута до 1100 нм. Дальше бактериохлорофилла *b* не поглощает ни один известный фотосинтетический пигмент. Основными хлорофилльными пигментами зеленых бактерий являются бактериохлорофиллы *c*, *d* или *e*, незначительно различающиеся между собой по спектрам поглощения. Кроме них в клетках всех зеленых бактерий в небольшом количестве содержится бактериохлорофилл *a*. Наличие этих бактериохлорофиллов позволяет зеленым бактериям использовать свет с длиной волны до 840 нм. Необычный бактериохлорофилл *g* с максимумом поглощения 790 нм обнаружен у облигатно анаэробных фотосинтезирующих бактерий *Heliobacterium chlorum* и *Heliobacillus mobilis*, выделенных в группу гелиобактерий. По организации электрон-транспортные цепи фотосинтезирующих бактерий бывают двух типов циклические и нециклические.

Циклическая фотосинтетическая цепь пурпурных фотосинтетических бактерий

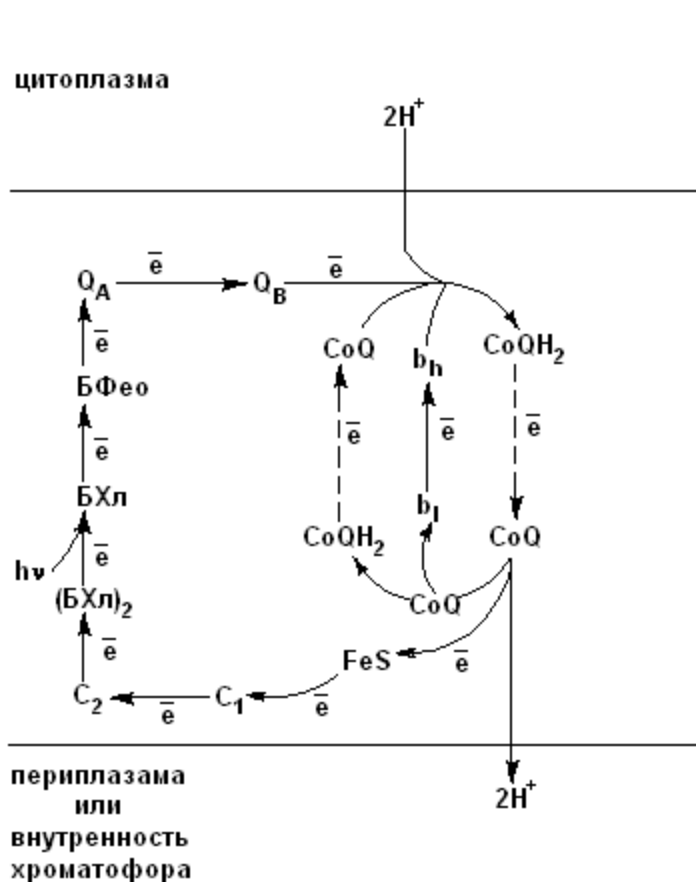


Рисунок 2: Схема организации циклической электрон-транспортной цепи бактерий

У пурпурных фотосинтезирующих бактерий (*Rhodospirillum rubrum*, *Rhodopseudomonas sphaeroides*, *Rps. viridis*, *Chromatium vinosum* и некоторых других) описан циклический светозависимый процесс, единственным полезным продуктом которого является $\Delta\mu\text{H}$. Этот процесс локализован в цитоплазматической мембране или в хроматофорах, мелких сферических мембранных пузырьках диаметром около 50 нм, взвешенных в цитозоле бактериальной клетки.

Свет поглощается магний-порфирином — бактериохлорофиллом, связанным с особым белком (этот комплекс называется светособирающей антенной), или дополнительными пигментами — каротиноидами,

локализованными в той же мембране и передающими энергию возбуждения на бактериохлорофилл антенны. Возбуждение мигрирует по молекулам антенного бактериохлорофилла, пока не достигнет так называемой специальной пары — димера бактериохлорофилла, связанного с другим белком.

Белок, о котором идет речь, содержит помимо димера две молекулы мономерного бактериохлорофилла, две молекулы бактериофеофитина, т. е. аналога бактериохлорофилла, лишённого иона Mg^{2+} , и две молекулы убихинона (CoQ) либо одну молекулу убихинона и одну молекулу менахинона. Весь этот комплекс носит название фотосинтетического реакционного центра. Количество реакционных центров обычно на два порядка меньше, чем антенного бактериохлорофилла.

Возбужденный димер бактериохлорофилла передает электрон убихинону (CoQ). Этот процесс ориентирован поперек мембраны и протекает в направлении ее цитоплазматической стороны. Он включает ряд промежуточных этапов, на которых происходит последовательное восстановление и окисление мономера бактериохлорофилла, бактериофеофитина и связанных мета(уби)хинонов. Чтобы восстановиться, CoQ должен присоединить два электрона и два протона. В стационарных условиях работы один из электронов поставляется реакционным центром, а другой — гемом *b* цитохрома *b*. Цитохромами называются гем-содержащие белки, катализирующие окислительно-восстановительные реакции. Цитохромы, имеющие идентичные гемы, но разные белковые части, обычно обозначают одной и той же буквой, но разными цифровыми индексами. Приняв электроны, CoQ присоединяет и протоны, которые черпаются из ближайшей водной фазы. Образовавшись, $CoQH_2$ перемещается в направлении противоположной стороны мембраны. Примерно на полпути от одной поверхности мембраны к другой $CoQH_2$ окисляется в семихионную форму посредством негемового железосульфопротеида, сокращенно обозначаемого FeS. $CoQH_2$ теряет при окислении два протона, которые затем переносятся в воду. Что касается электрона, перешедшего с $CoQH_2$, на FeS, то он используется в конечном итоге для восстановления димера бактериохлорофилла, окисленного на первом этапе цикла. В переносе электрона от FeS к $(BxL)_2^+$ участвуют цитохромы типа *c*. $CoQ\sim$, получающийся из $CoQH_2$ при потере последним одного - электрона и двух протонов, восстанавливает гем *b*. Гем *b1* передает электрон предварительно окисленному гему *bh*. Цикл завершается диффузией образованного CoQ к верхней поверхности мембраны. Общим итогом процесса оказывается генерация $\Delta\mu H$ вследствие переноса через мембрану двух ионов H^+ на каждый поглощенный фотон. Энергетика цикла оплачивается фотонами, поглощенными бактериохлорофиллом. Последний, перейдя в возбужденное состояние под действием света, резко изменяет свой редокс-потенциал, который становится около —950 мВ вместо 440 мВ в невозбужденном состоянии. Все дальнейшие реакции переноса электронов протекают с выделением энергии,

будучи направленными в сторону положительных редокс-потенциалов.

Таким образом под действием света электроны с хлорофила поступают в электронтранспортную цепь, и поток электронов происходит от наибольшего восстановителя бактериохлорофила на свету, к наибольшему окислителю бактериохлорофила в темноте. То есть цикл замыкается, а за счет активности метакхинона который переносит не только электроны, но и два протона, в результате происходит перенос протонов из цитоплазмы в периплазму (участок между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой, можно считать в окружающую среду) или в просвет хроматофора. Создается протонный градиент, перенос двух протонов на один квант света обеспечивает протондвижущую силу, энергия соответствует энергии синтеза одной АТФ.

Нециклическая светозависимая редокс - цепь зеленых бактерий

Зелеными фотосинтезирующими бактериями-анаэробами используется другой механизм. Он устроен таким образом, что свет одновременно вызывает генерацию $\Delta\mu\text{H}$ и восстановление NAD^+ сероводородом.

Механизм, о котором идет речь, представляет собой простейший вариант так называемой нециклической фотосинтетической редокс-

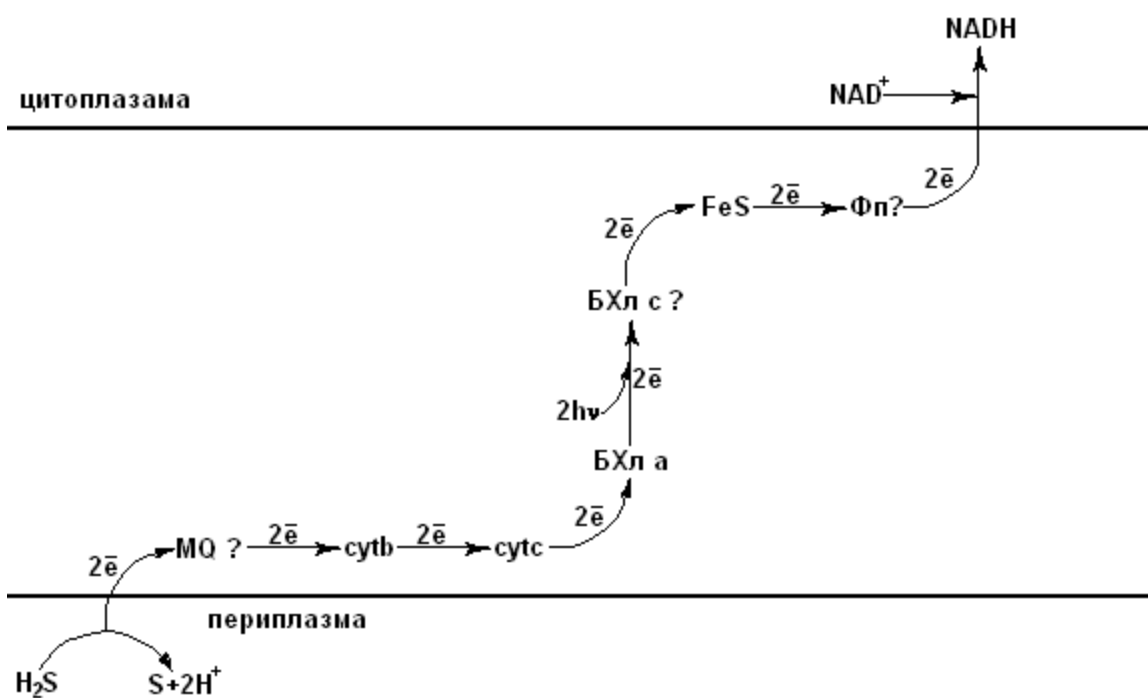


Рисунок 3: Схема организации нециклической электрон-транспортной цепи фотосинтеза у бактерий

цепи. Ряд стадий переноса электронов в этой цепи остается неясным. Твердо установлено, что свет вызывает фотоокисление БХл, относящегося к типу *a*, подобно БХл пурпурных бактерий. Неизвестно, в димерной или олигомерной форме находится БХл. Непосредственным окислителем для БХл *a* служит, по-видимому, другая молекула БХл. Показано, что первичный стабильный акцептор электронов у *Chlorobium* имеет редокс-потенциал -540 мВ, напоминая в этом отношении ферредоксин в фотосистеме I хлоропластов. Он

дает сигнал электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), типичный для FeS-протеидов ($g = 1,94$).

От FeS-компонента (или компонентов — их может быть два) электроны переносятся к NAD^+ . По аналогии с другими системами такого типа можно предположить участие в этом процессе флавинсодержащего белка. Фотоокисленный БХл *a* восстанавливается донорным сегментом редокс-цепи, берущей начало от H_2S . Этот участок содержит цитохром типа *b* и, по-видимому, два цитохрома типа *c*. Считается вероятным участием MQ и каких-то еще редокс-компонентов.

В. Д. Самуиловым была показана светозависимая генерация $\Delta\Psi$ мембранными фрагментами зеленых бактерий, сорбированными на плоской фосфолипидной мембране. Вероятная природа этого эффекта может объясняться, как и в случае других хлорофиллсодержащих $\Delta\mu\text{H}$ -генераторов, переносом электронов поперек мембраны. Если перенос электронов происходит так, то он должен приводить к освобождению ионов водорода во внешнюю среду из-за окисления H_2S до *S* электронодонорным сегментом редокс-цепи, который, как предполагается, расположен вблизи внешней поверхности цитоплазматической мембраны. На противоположной (внутренней) стороне мембраны должно происходить поглощение ионов H^+ , так как NAD^+ восстанавливается бактериохлорофилльной системой, транспортирующей электроны, но не протоны. Чтобы образовать NADH из NAD^+ , присоединение двух электронов должно сопровождаться присоединением одного протона.

Итак, на внешней поверхности мембраны зеленой бактерии имеет место следующий процесс:

$\text{H}_2\text{S} + 2\text{БХла}^+ \rightarrow \text{S} + 2\text{H}^+ + 2\text{БХла}$, в то время как события, происходящие на противоположной стороне мембраны, описываются как

$\text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{Ae} \rightarrow \text{NADH} + 2\text{A}$ где БХла^+ — свободный радикал фотоокислительного бактериохлорофилла типа *a*, а *Ae* — восстановленная форма первичного акцептора. Таким образом, схема переноса электронов у зеленых бактерий предполагает, что и генерация $\Delta\mu\text{H}$, и восстановление NAD^+ осуществляются одной и той же светозависимой редокс-цепью. К сожалению, энергетика зеленых бактерий изучена слишком фрагментарно, чтобы утверждать, что приведенная схема полностью верна. Поэтому нет возможности вдаваться в детали рассматриваемого механизма, а придется ограничиться его самым общим описанием, приведенным выше. То есть поток электронов идет от бактериохлорофилла на молекулу NADH и на данной части электрон-транспортной цепи бактериохлорофилл восстановитель, но в темноте окисленная форма бактериохлорофилла становится окислителем и притягивает на себя электроны с H_2S , через дополнительную часть электрон-транспортной цепи. Одним из продуктов является NADH восстановительный эквивалент.

Вторым продуктом является протонный градиент. Механизм генерации происходит иначе, не за счет переноса протонов. Электрон-транспортная цепь локализована в цитоплазматической мембране, в цитоплазме происходит уменьшение концентрации протонов, за счет соединения с NAD и образования NADH, в периплазме наоборот происходит увеличение концентрации протонов, за счет расщепления H_2S до S и $2H^+$. В результате разница по концентрации протонов между двумя компартментами составляет 3 моля протонов, что соответствует 1,5 молям АТФ. Это и еще дополнительный восстановительный эквивалент (NADH) делает данный тип фотосинтеза более выгодным чем описанные ранее. Следует отметить, что схема, применима лишь к анаэробным зеленым бактериям. В то же время известно, что зеленые бактерии, относящиеся к факультативным аэробам, имеют циклическую редокс-цепь, напоминающую таковую пурпурных бактерий.

У цианобактерий механизм фотосинтеза сходен с высшими растениями и поэтому будет рассмотрен в следующей главе.

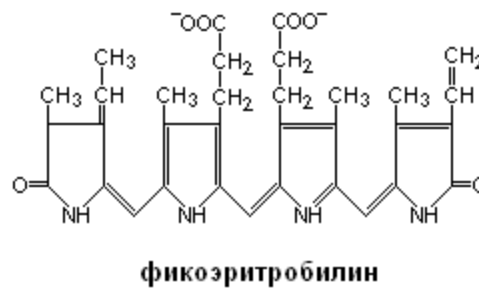
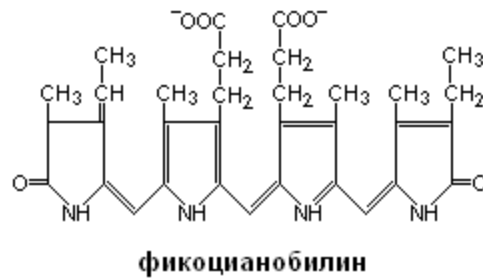
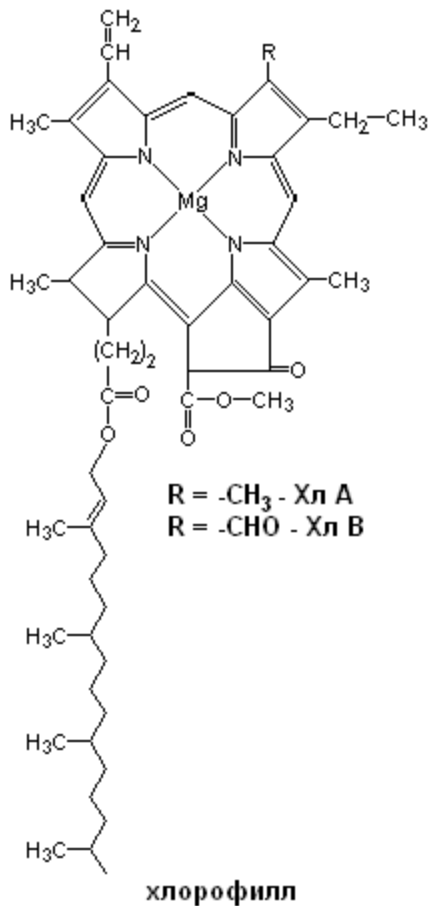
Фотосинтез у высших растений

Весь процесс происходит на мембранах тилакоидов в хлоропластах. Основными участниками являются пигменты фотосинтеза. Они участвуют в поглощении энергии света и переводе их в энергию химических связей. Собственно пигменты фотосинтеза являются основными участниками процесса фотосинтеза. В фотосинтезе высших растений выявляют две фазы: световая и темновая. В ходе световой фазы происходит поглощение световой энергии и перевод ее в энергию связей АТФ. В темновой фазе происходит перевод энергии менее стабильных связей АТФ в более устойчивую форму – углеводы.

Пигменты фотосинтеза

В поглощении света участвуют растительные пигменты - это важнейший компонент аппарата фотосинтеза. Пигменты пластид относятся к трем классам веществ: хлорофиллам, фикобилинам и каротиноидам.

Структура хлорофиллов. Хлорофилл — сложный эфир дикарбоновой кислоты хлорофиллина, у которой



одна карбоксильная группа этерифицирована остатком метилового спирта, а другая — остатком одноатомного непредельного спирта фитола. Четыре пиррольных кольца (I — IV) соединены между собой метановыми мостиками (α , β , γ , δ), образуя порфириновое

Рисунок 4: Структура некоторых пигментов фотосинтеза

ядро. Наружные атомы углерода в тетрапиррольном цикле обозначены цифрами 1 — 10. Атомы азота пиррольных колец четырьмя координационными связями взаимодействуют с атомом магния. В структуре порфиринового ядра есть также циклопентановое кольцо (V), образованное остатком кетопропионовой кислоты и содержащее химически активную карбонильную группу у C_9 и метилированную карбоксильную группу у C_{10} . Структура, состоящая из тетрапиррольного и циклопентанового колец, получила название форбина. Боковая цепь IV пиррольного кольца включает в себя пропионовую кислоту, связанную сложноэфирной связью с полиизопреновым непредельным спиртом фитолом ($C_{20}H_{39}OH$). У 1, 3, 5 и 8-го углеродов пиррольных колец имеются метальные группы, у 2-го — винильная, у 4-го — этильная группа. Порфириновое кольцо представляет собой систему из девяти пар конъюгированных (сопряженных) чередующихся двойных и одинарных связей с 18 делокализованными π -электронами. Хлорофилл *b* отличается от хлорофилла *a* тем, что у 3-го углерода вместо метильной находится формильная ($-CHO$) группа. Структура хлорофилла, лишённая фитола, называется хлорофиллидом. При замещении атома магния протонами в молекуле хлорофиллов образуются соответствующие *феофетины*. У высших растений и

водорослей обнаружены хлорофиллы *a*, *b*, *c*, *d*. Все фотосинтезирующие растения, включая все группы водорослей, а также цианобактерии, содержат хлорофиллы группы *a*. Хлорофилл *b* представлен у высших растений, у зеленых водорослей и эвгленовых. У бурых и диатомовых водорослей вместо хлорофилла *b* присутствует хлорофилл *c*, а у многих красных водорослей — хлорофилл *d*.

Физико-химические свойства хлорофиллов. В твердом виде хлорофилл *a* представляет собой аморфное вещество сине-черного цвета. Температура плавления хлорофилла *a* 117 — 120 °С. Хлорофиллы хорошо растворимы в

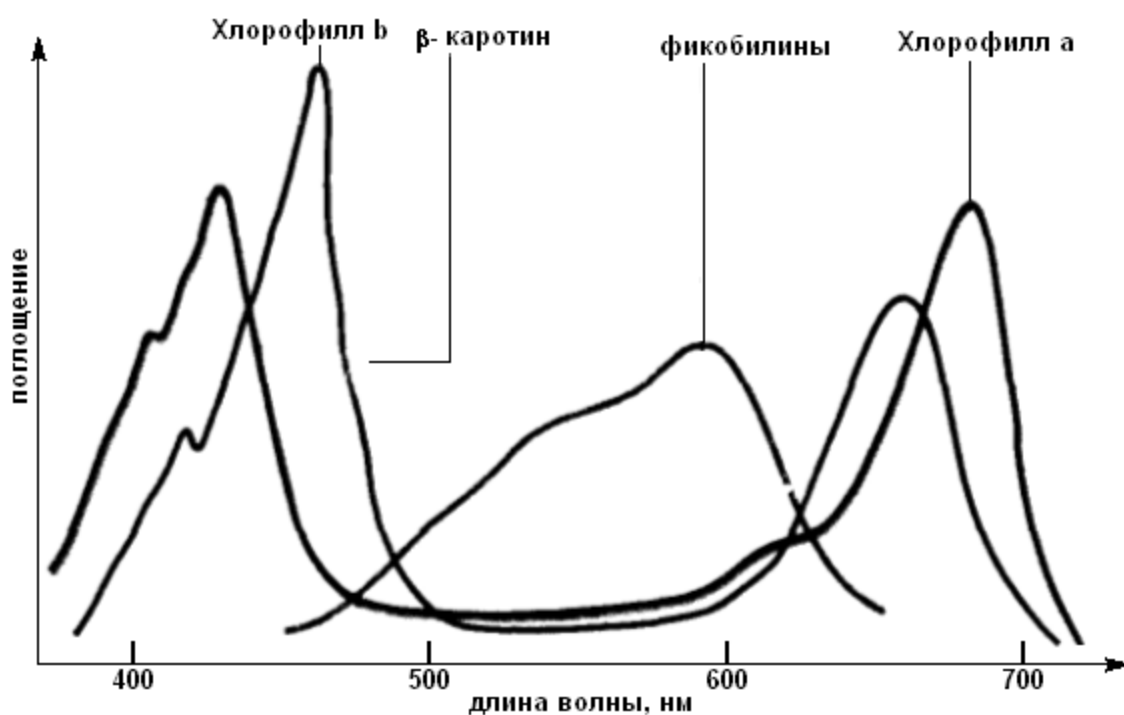


Рисунок 5: Спектры поглощения пигментов фотосинтеза

этилов
ом
эфире,
бензол
е,
хлоро
форме,
ацетон
е,
этилов
ом
спирте
, плохо
раство
римы
в
петрол
ейном
эфире
и

нерастворимы в воде. Раствор хлорофилла *a* в этиловом эфире имеет сине-зеленый цвет, хлорофилла *b* — желто-зеленый. Резко выраженные максимумы поглощения хлорофиллов лежат в красной и синей частях спектра. В этиловом эфире максимумы поглощения хлорофиллов группы *a* в красной части спектра — в пределах 660 — 663 нм, в синей — 428 — 430 нм, хлорофилла *b* — соответственно в пределах 642 — 644 и 452 — 455 нм. Хлорофиллы очень слабо поглощают оранжевый и желтый свет и совсем не поглощают зеленые и инфракрасные лучи. Растворы хлорофиллов в полярных растворителях обладают яркой флуоресценцией (люминесценцией). В этиловом эфире у хлорофилла *a* наблюдается рубиново-красная флуоресценция с максимумом 668 нм, у хлорофилла *b* — 648 нм, т. е. максимумы флуоресценции в соответствии с правилом Стокса несколько сдвинуты в более длинноволновую часть спектра по отношению к максимумам поглощения. Агрегированный хлорофилл и хлорофилл в нативном состоянии (в живом листе) флуоресцируют слабо. Растворы хлорофиллов способны также к фосфоресценции (т. е. длительному

послесвечению), максимум которого лежит в инфракрасной области.

Механизмы флуоресценции и фосфоресценции, в том числе молекул хлорофилла, достаточно хорошо изучены. Наиболее устойчивы те состояния атомов и молекул, в которых валентные электроны занимают самые низкие энергетические уровни и распределены по ним согласно принципу Паули. Наконец, энергия возбужденного состояния может быть использована на фотохимические реакции. В этом случае флуоресценции и фосфоресценции хлорофилла не наблюдается. Структура молекулы хлорофилла, отобранная в процессе эволюции из многих других органических пигментов, прекрасно приспособлена к своим функциям сенсibilизатора фотохимических реакций. В ее состав входят 18 делокализованных π -электронов (представленных в структурной формуле хлорофилла в виде 18-членного кольца из конъюгированных двойных связей), что делает молекулу хлорофилла легко возбудимой при поглощении квантов света. Еще Тимирязев предположил, что хлорофилл способен к окислительно-восстановительному превращению. Впервые реакция фотовосстановления хлорофилла была осуществлена в модельных опытах А. А. Красновским в 1948 г. Хлорофилл, растворенный в пиридине, в анаэробных условиях под действием света восстанавливается аскорбиновой кислотой или другими донорами электронов. При этом образуется восстановленная («красная») форма хлорофилла с максимумом поглощения при 525 нм: После выключения света реакция идет в обратном направлении. Фотовосстановленный хлорофилл в свою очередь может восстанавливать различные акцепторы электронов. В той же модельной системе, но с добавлением акцептора электронов хлорофилл при освещении действует как сенсibilизатор: В этих условиях происходит восстановление NAD^+ , рибофлавина, хинона, Fe^{3+} , кислорода. Эти реакции получили название «реакций Красновского». Таким образом, молекула хлорофилла может выступать не только в роли первичного акцептора электрона, но и в роли его первичного донора. Из всего сказанного следует, что молекула хлорофилла благодаря структурным и физико-химическим особенностям способна выполнять три важнейшие функции: 1) избирательно поглощать энергию света, 2) запасать ее в виде энергии электронного возбуждения, 3) фотохимически преобразовывать энергию возбужденного состояния в химическую энергию первичных фотовосстановленных и фотоокисленных соединений.

Сине-зеленые водоросли (цианобактерии), красные морские водоросли и некоторые морские криптозоаны помимо хлорофилла *a* и каротиноидов содержат пигменты фикобилины. Наиболее известные представители фикобилинов — фикоэритробилины и фикоцианобилины. Первые преобладают у красных водорослей и определяют их цвет, вторые — у синезеленых.

Структура и свойства фикобилинов.

По структуре **фикобилины** (от греч. «*phycos*» — водоросль и лат. *bilis* — желчь) относятся к группе желчных пигментов — билинов (у животных представитель этой группы — билирубин). Это тетрапирролы с открытой

цепью, имеющие систему конъюгированных двойных и одинарных связей. В своем составе они не содержат атомов магния или других металлов, а также фитола.

У фикоцианобилина пиррольные кольца соединены между собой метановыми мостиками. I и IV пирролы имеют по одной карбонильной группе. Пиррольные кольца содержат следующие боковые радикалы: четыре метальных (у C1, 3,6,7)' винильную (у C2), этильную (у C8) и два остатка пропионовой кислоты (у C4 и C5). Фикобилины являются хромофорными группами фикобилипротеинов — глобулиновых белков, с которыми в отличие от хлорофиллов они связаны прочными ковалентными связями. Фикобилипротеины делятся на три основные группы: 1) фикоэритрины — белки красного цвета с максимумом поглощения от 498 до 568 нм, 2) фикоцианины — сине-голубые белки с максимумами поглощения от 585 до 630 нм, 3) аллофикоцианины — синие белки с максимумами поглощения. Фикобилипротеины водорастворимы, в клетках водорослей они локализованы в **фикобилисомах** — гранулах, расположенных на наружной поверхности фотосинтетических ламелл.

Максимумы поглощения света у фикобилинов находятся между двумя максимумами поглощения у хлорофилла: в оранжевой, желтой и зеленой частях спектра. Значение такого распределения максимумов поглощения становится понятным, если вспомнить оптические свойства воды, которая поглощает, прежде всего, длинноволновые лучи. На глубине 34 м в морях и океанах полностью исчезают красные лучи, на глубине 177 м - желтые, на глубине 322 м — зеленые и, наконец, на глубину свыше 500 м не проникают даже синие и фиолетовые лучи. В связи с таким изменением качественного состава света в верхних слоях морей и океанов обитают преимущественно зеленые водоросли, глубже — сине-зеленые и еще глубже - водоросли с красной окраской. В. Т. Энгельман назвал это явление **хроматической комплиментарной адаптацией** водорослей.

Структура и свойства каротиноидов

Каротиноиды — жирорастворимые пигменты желтого, оранжевого, красного цвета — присутствуют в хлоропластах всех растений. Они входят также в состав хромопластов в не зеленых частях растений, например в корнеплодах моркови, от латинского наименования которой (*Daucus carota* L.) они и получили свое название. В зелёных листьях каротиноиды обычно незаметны из-за присутствия хлорофилла, но осенью, когда хлорофилл разрушается, именно каротиноиды придают листьям характерную желтую и оранжевую окраску. Каротиноиды синтезируются также бактериями и грибами, но не животными организмами. В настоящее время известно около 400 пигментов, относящихся к этой группе. К каротиноидам относятся три группы соединений: 1) оранжевые или красные пигменты каротины ($C_{40}H_{56}$); 2) желтые ксантофиллы ($C_{40}H_{56}O_2$ и $C_{40}H_{56}O_4$); 3) каротиноидные кислоты — продукты окисления каротиноидов. Все каротиноиды — полиеновые соединения, производные полиизопрена, относящиеся к группе терпенов. Основные каротиноиды пластид

высших растений и водорослей — β -каротин, лютеин, виолаксантин и неоксантин.

Каротиноиды — обязательные компоненты пигментных систем всех фотосинтезирующих организмов. Они выполняют ряд функций, главные из которых: 1) участие в поглощении света в качестве дополнительных пигментов, 2) защита молекул хлорофиллов от необратимого фотоокисления. Возможно, каротиноиды принимают участие в кислородном обмене при фотосинтезе. Важное значение каротиноидов как дополнительных пигментов, поглощающих свет в сине-фиолетовой и синей частях спектра, становится очевидным при рассмотрении распределения энергии в спектре суммарной солнечной радиации на поверхности Земли. Максимум этой радиации приходится на сине-голубую и зеленую части спектра (480—530 нм). В естественных условиях доходящая до поверхности Земли суммарная радиация складывается из потока прямой солнечной радиации на горизонтальную поверхность и рассеянной радиации неба. Рассеивание света в атмосфере происходит благодаря аэрозольным частицам (капли воды, пылинки и т. д.) и флуктуациям плотности воздуха (молекулярное рассеяние). Спектральный состав суммарной радиации в области 350 — 800 нм при безоблачном небе в течение дня почти не меняется. Объясняется это тем, что увеличение доли красных лучей в прямой солнечной радиации при низком стоянии Солнца сопровождается увеличением доли рассеянного света, в котором много сине-фиолетовых лучей. Атмосфера Земли в значительно большей степени рассеивает лучи коротковолновой части спектра (интенсивность рассеяния обратно пропорциональна длине волны в четвертой степени), поэтому небо выглядит голубым. При отсутствии прямого солнечного света (пасмурная погода) увеличивается доля сине-фиолетовых лучей. Эти данные указывают на важность коротковолновой части спектра при использовании наземными растениями рассеянного света и возможность участия каротиноидов в фотосинтезе в качестве дополнительных пигментов. В модельных опытах показана высокая эффективность переноса энергии света от каротиноидов к хлорофиллу а, причем этой способностью обладают молекулы каротинов, но не ксантофиллов.

Вторая функция каротиноидов - защитная. Впервые данные о том, что каротиноиды могут защищать молекулы хлорофилла от разрушения, были получены Д. И. Ивановским (1913). В его опытах пробирки, содержащие одинаковый объем раствора хлорофилла и разные концентрации каротиноидов, выставлялись на 3 ч на прямой солнечный свет. Оказалось, что чем больше каротиноидов было в пробирке, тем в меньшей степени разрушался хлорофилл. В дальнейшем эти данные получили многочисленные подтверждения. Так, бескаротиноидные мутанты хламидомонады на свету в атмосфере кислорода погибают, а в темноте при гетеротрофном способе питания нормально развиваются и размножаются. У мутанта кукурузы, у которого отсутствовал синтез каротиноидов, образующийся хлорофилл в аэробных условиях при сильном освещении быстро разрушался. В отсутствие кислорода хлорофилл не разрушался. Менее ясна роль каротиноидов в кислородном обмене при

фотосинтезе. У высших растений, мхов, зеленых и бурых водорослей осуществляется светозависимое обратимое дезэпоксилирование ксантофиллов. Примером такого превращения может служить виолаксантиновый цикл. Значение виолаксантинового цикла остается невыясненным. Возможно, он служит для устранения излишков кислорода. Каротиноиды у растений выполняют и другие функции, несвязанные с фотосинтезом. В светочувствительных «глазках» одноклеточных жгутиковых и в верхушках побегов высших растений каротиноиды, контрастируя светом, способствуют определению его направления. Это необходимо для фототаксиса у жгутиковых и фототропизма у высших растений.

Световая фаза фотосинтеза

На световой фазе фотосинтеза происходит поглощение света молекулами хлорофилла *a* с участием дополнительных пигментов (хлорофилла *b*, каротиноидов, фикобилинов) и трансформация энергии света в химическую энергию АТФ и восстановленного NADPH. Все эти процессы осуществляются в фотохимически активных мембранах хлоропластов и представляют собой сложную систему фотофизических, фотохимических и химических реакций, природа которых в настоящее время в значительной степени расшифрована. В состав ламелл хлоропластов входят пять многокомпонентных белковых комплексов: фотосистемы I и II, дополнительный светособирающий комплекс, цитохромный комплекс, включающий цитохромы *b₆* и *f*, и АТФ-азный комплекс, участвующий в синтезе АТФ. Все они функционируют, взаимодействуя друг с другом.

Впервые идею о существовании в хлоропластах двух фотосистем высказал Р. Эмерсон (1957), изучая влияние света на квантовый выход фотосинтеза у хлореллы. Под **квантовым выходом фотосинтеза** понимается количество выделившегося O_2 или связанного CO_2 на 1 квант поглощенной энергии. Было показано, что квантовый выход высок при освещении хлореллы красными лучами с длиной волны 660 — 680 нм. Использование красного света с большей длиной волны приводило к снижению квантового выхода, а при 700 нм фотосинтез почти прекращался, хотя эта часть спектра еще поглощается хлорофиллом. Однако если хлореллу одновременно освещали коротковолновым (650 нм) и длинноволновым (700 нм) красным светом, то суммарный эффект (Σ) был выше, чем при действии каждого красного света в отдельности. Это явление получило название **эффекта усиления Эмерсона**. Отсюда возникло предположение, что в хлоропластах взаимодействуют две пигментные системы. Предположение Эмерсона о двух пигментных системах подтвердилось в последующих работах, в которых из мембран хлоропластов с помощью детергентов (поверхностно-активных веществ, диссоциирующих гидрофобные связи), дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы и других приемов удалось выделить и изучить белковые комплексы фотосистемы I (ФС I) и фотосистемы II (ФС II).

Фотосистемы состоят из двух основных частей: фрагмента электрон-транспортной цепи, в центре которой располагается реакционный центр, и светособирающего или антенного комплекса. В основе всего лежит реакционный центр, это молекула хлорофилла, которая является донором электронов в электрон-транспортной цепи, то есть возбуждение этой молекулы хлорофилла вызывает поток электронов в электрон-транспортной цепи. В случае фотосистемы I реакционный центр — молекула хлорофилла P700 (максимум поглощения этой молекулы при длине волны 700 нм), для фотосистемы II — хлорофилл P680 (максимум поглощения этой молекулы при длине волны 680 нм). Прежде всего необходимо разобраться с антенными комплексами, которые обслуживают реакционный центр, то есть энергия с пигментов антенного комплекса поступает на реакционный центр. Эмерсон и Арнольд показали, что в хлоропластах растений на каждый реакционный центр приходится от 200 до 400 молекул хлорофилла, функции которых связаны с поглощением света и передачей энергии возбужденного состояния на реакционные центры. Молекулы хлорофилла *a* и дополнительные пигменты — хлорофилл *b*, каротиноиды, фикобилины — входят в состав антенных, или светособирающих, комплексов (ССК). Эти комплексы увеличивают площадь поглощения света, если сравнивать поток солнечных лучей с каплями дождя, то набрать под дождем больший объем воды проще, используя тазик, а не бутылку с узким горлом. Также присутствует временной фактор, продолжительность синглетного возбужденного состояния исчисляется 10^{-12} - 10^{-9} с, и даже на прямом солнечном свете 1 квант света поглощается молекулой хлорофилла не чаще одного раза за 0,1 с. Большую часть времени молекула хлорофилла «простаивает». Поэтому роль пигментов антенных комплексов состоит в том, чтобы собирать и передавать энергию квантов на небольшое количество молекул реакционных центров P680 и P700, которые и осуществляют фотохимические реакции. Аналогично отдельные капли дождя ударяют в крышу и, сливаясь, создают постоянный ток воды в водостоке. Передача (миграция) энергии по пигментам антенных комплексов происходит по принципу **индуктивного резонанса** (без флуоресценции и переноса заряда). Прежде чем обсуждать природу индуктивного резонанса необходимо обсудить понятие возбужденного или синглетного состояния молекулы, именно этому необходимо лирическое отступление.

Лирическое отступление или что такое возбужденное состояние

Прежде чем обсуждать возбужденное состояние молекулы, нужно как это ни странно обсудить вообще возбужденное состояние. В случае собаки понятие возбужденного состояния объясняется просто: если собака в покое, она или спит, или тихо передвигается по квартире, если собака возбуждена она прыгает, лает, быстро бежит из угла в угол. Можно предположить, что возбуждение собаки никак не связано с возбуждением молекулы, но если рассматривать с точки зрения энергии, то сходство проявляется явно. Если собака возбуждена, то она тратит больше энергии, одно дело лежать, другое прыгать. Теперь нужно вернуться к молекулам и атомам, каждая молекула состоит из атомов, а

структура атомов в составе молекулы сохраняется, если не придирается к различным механизмам. Наиболее простой моделью структуры атома является планетарная модель или модель Бора, где протоны и нейтроны образуют ядро атома или звезду в системе, а электроны вращаются вокруг на определенных орбитах как планеты. Конечно модель Бора считают слишком упрощенной, но в данном случае усложнять большого смысла нет. С другой стороны электрон обладает корпускулярно-волновым дуализмом, то есть частица и волна в одном. Так как электрон является еще и волной, то он обладает определенными колебаниями, которые описываются уравнением Шредингера, которое описывает не только частоту колебаний, но и энергию электрона. Эта энергия соответствует определенному уровню или орбите, что определяется уравнением Шредингера. Квант света — это то же энергия когда молекула его поглощает, то электрон получает дополнительную энергию, и, следовательно, уравнение Шредингера меняется, энергия электрона увеличивается, и как следствие электрон переходит на другую более дальнюю орбиту или на новый подуровень. Этот процесс увеличения энергии электронов и называется возбужденным состоянием. Но это состояние существует очень не долго, и электрон возвращается на основной уровень или орбиту, в результате выделяется энергия либо в виде тепла, либо в виде света (флюорисценция). Выделяется меньше энергии чем было поглощено, коэффициент полезного действия (КПД) не отменен. Так как выделяется меньше энергии, то выделяемый свет обладает меньшей энергией, а, следовательно, большей длиной волны, это связано с формулой:

$$E=h/\lambda,$$

где h – постоянная Планка, λ - длина волны.

Теперь можно вернуться к переносу энергии с помощью индуктивного резонанса. При поглощении света молекулой антенного комплекса молекула, поглотившая квант света, переходит в возбужденное состояние, и электроны данной молекулы переходят в возбужденное состояние, и электроны начинают колебания на более высоком уровне. Так как молекулы хлорофиллов в светособирающем комплексе располагались таким образом, что электронные плотности этих молекул перекрывались. Колебания электронов в возбужденной молекуле вызвало колебание следующей молекулы. В данном случае механизм аналогичен двум шарикам соединенным пружинкой, колебания одного шарика вызывает колебания второго, соединенного в первым пружинкой. Молекулы перекрываются, колебания электронов должны вызывать колебания электронов следующей молекулы. Второй параметр необходим для возможности возбудить следующую молекулу в цепи. Соответственно энергия выделяемая или энергия флуоресценции должна перекрываться по значениям с энергией возбуждения или энергией, поглощаемой молекулой акцептором, то есть спектром поглощения. Таким образом, спектры флуоресценции предшествующей молекулы и поглощения последующей должны пересекаться, только такое сочетание возможно для передачи энергии путем индуктивного резонанса.

В антенных комплексах перенос энергии осуществляется в ряду:
каротин (400 — 550 нм) → хлорофилл *b* (650 нм) → хлорофиллы *a* (660 — 675 нм) → P_{680} (ФС II).

Скорость резонансного переноса энергии от молекулы к молекуле 10^{-10} – 10^{-9} с, Эффективность переноса между молекулами хлорофилла достигает 100, а между молекулами каротина и хлорофилла — лишь 40%.

У сине-зеленых и красных водорослей резонансная передача энергии происходит в следующем порядке:

фикоэритрин (570 нм) → фикоцианин (630 нм) → аллофикоцианин (650 и 670 нм) → хлорофилл *a* (670 — 680 нм).

Вся эта энергия поступает на реакционные центры фотосистем, которые объединены в общую электрон-транспортную цепь фотосинтеза.

Собственно в мембранах тилакоидов располагается фотосинтетическая система.

Вторая часть фотосистем — это электрон-транспортная цепь, в состав которой входит реакционный центр. Прежде чем обсуждать поток электронов по двум фотосистемам и комплексу их связывающему необходимо рассмотреть их состав.

Фотосистема I

Фотосистема I из хлоропластов включает, по крайней мере, четыре различных полипептида с молекулярными массами 83,2; 82,5, 18 и 15 кДа. Опыты с антителами показали, что субъединица I значительно выступает из мембраны. Отмечена ее организующая роль в сборке остальных субъединиц фотосистемы I. Расшифрованы первичные структуры двух крупных полипептидов фотосистемы I. Показана их гомология, достигающая 45%. Есть указания, что Хл700, и промежуточные акцепторы электронов A_0 и A_1 связаны с двумя крупными субъединицами, а FeS_x, FeS_a и FeS_b — с мелкими гидрофобными субъединицами фотосистемы I. Первичным светоиндуцированным процессом, происходящим в фотосистеме I, служит сдвиг электронов от Хл700 роль которого, по-видимому, играет димер Хл *a*, к промежуточному акцептору A_0 . Есть основания полагать, что функцию A_0 выполняет другой Хл *a*. Почти ничего не известно о природе следующего редокс-центра — A_1 . Может быть, его роль играет витамин К1. Считается, что окислительно-восстановительные потенциалы A_0 и A_1 , более отрицательны, чем потенциалы первичного стабильного акцептора FeS_x (— 0,73 В). Судя по оптическим и месбауэровским спектрам, FeS_x представляет собой кластер, содержащий четыре иона железа и четыре иона сульфида. Кроме этого компонента, в фотосистеме I находят еще два 4Fe — 4S-кластера: FeS_a и FeS_b Их редокс-потенциалы равны соответственно — 0,53В и — 0,58В.

Вероятная последовательность реакций в этой части редокс-цепи следующая: $\text{FeSx} \rightarrow \text{FeSB} \rightarrow \text{FeSA}$. Последний компонент служит, по-видимому, восстановителем ферредоксина, водорастворимого FeS-белка (11 кДа), который принимает участие в переносе электронов на флавопротеид, восстанавливающий NADP^+ (34 кДа).

Другой водорастворимый переносчик электронов — медьсодержащий белок пластоцианин — играет роль восстановителя фотоокисленного Хл700. В первичной структуре пластоцианина обнаружена гомология с субъединицей II цитохромоксидазы - конечного фермента дыхательной цепи, содержащего медь и железо. Пластоцианин имеет высокое сродство к фотосистеме I. По-видимому, прочно связанный пластоцианин ответствен за быстрое (20 мкс) восстановление Хл700. Кроме того, описан и в 10 раз более медленный процесс восстановления Хл700 пластоцианином.

Восстановителем пластоцианина является цитохром *f*, принадлежащий комплексу *b/f*. Последний осуществляет перенос электронов от фотосистемы II к фотосистеме I.

Существует альтернативный способ функционирования фотосинтетической редокс-цепи в хлоропластах, а именно циклический перенос электронов с участием фотосистемы I и комплекса *b/f*, но без фотосистемы II. Такой механизм *in vitro* можно продемонстрировать, блокировав фотосистему II диуроном и добавив искусственный переносчик электронов ФМС. В некоторых условиях циклический перенос электронов можно наблюдать и *in vivo*. Предполагается, что в этом случае восстановительные эквиваленты транспортируются от ферредоксина не к NADP , а назад к Хл700. В этом процессе принимают участие PQ и комплекс *b₆/f*. Предполагается, что ферредоксин восстанавливает PQ, так что фотосистема II становится не нужной для регенерации восстановленного Хл700. Подобный механизм аналогичен циклической светозависимой редокс-цепи пурпурных бактерий, образующей $\Delta\mu\text{H}$ без фотолиза воды и восстановления NADP^+ . Нет сомнений, что фотосистема I способна генерировать $\Delta\mu\text{H}$. Этот комплекс был встроен в протеолипосомы, которые на свету образовывали $\Delta\mu\text{H}$ до 3 единиц. Чтобы активировать циклический перенос электронов, в инкубационную среду добавили ФМС и аскорбат. Включение очищенной H^+ -АТФ-синтазы в те же протеолипосомы давало систему, катализирующую фотофосфорилирование. Механизм генерации $\Delta\mu\text{H}$ фотосистемой I, по всей вероятности, подобен таковому бактериальными реакционными центрами. Как было показано при измерении $\Delta\psi'$ по каротиноидному сдвигу и путем прямой регистрации в системе протеолипосомы коллодиевая пленка, наносекундная вспышка лазера вызывает очень быструю 100 нс генерацию $\Delta\psi'$, которая гораздо быстрее всех процессов, происходящих в фотосистеме I, кроме переноса электронов на этапе $\text{Хл700} \rightarrow \text{FeSx}$. Эта $\Delta\psi'$ составляет большую часть электрогенного ответа, все прочие этапы переноса электронов в фотосистеме I могут внести лишь сравнительно малый вклад в трансформацию энергии на

этом участке фотосинтетической редокс-цепи. Такие соотношения вряд ли удивительны, если учесть хорошо известные факты, касающиеся локализации в мембране компонентов фотосистемы I. Показано, что пластоцианин, восстанавливающий фотосистему I, смотрит внутрь тилакоида, а ферредоксин и ферредоксин-NADP⁺-редуктаза, окисляющие ее, обращены наружу. Поэтому транспорт восстановительных эквивалентов через фотосистему I должен быть направлен поперек мембраны. Электрические измерения показывают, что фотосистема I, подобно бактериальным реакционным центрам, осуществляет электрически не компенсированный трансмембранный перенос электронов. Итак, фотосистема I может быть описана в первом приближении Митчеловой электрон-транспортной «полупетлей». Однако нельзя исключить, что дальнейшие количественные исследования могут выявить какие-то медленные электрогенные стадии, обусловленные движением протонов, а не электронов. Напомним, что в реакционных центрах пурпурных бактерий 5% общей ΔΨ генерируется за счет переноса протонов, а не электронов.

Фотосистема II

Фотосистема II состоит из пяти типов полипептидов с молекулярными массами 56 кДа; 52, 39,5; 39; 9,5 и 4,5 кДа. Хл680, входящий в состав фотосистемы II, относится к группе хлорофиллов *a*. Возможно, что Хл680 является димером. Раньше считалось, что он связан с тяжелыми субъединицами фотосистемы II. Однако это предположение было поколеблено после выяснения аминокислотных последовательностей. Оказалось, что субъединицы массами 39 и 39,5 кДа похожи на M- и L-субъединицы комплекса бактериальных центров. Подобно этим субъединицам, они несут центры связывания первичного и вторичного хинонов (в этом случае — P_{OA} и P_{qb}). Субъединица 39 кДа специфически связывает гербициды. Две наиболее легкие субъединицы (9,5 и 4,5 кДа) образуют цитохром типа *b* с максимумом пика при 559 нм (цитохром b₅₅₉). Каждая из субъединиц содержит по одному гистидину, образующему координационную связь с гемом. Отличительной чертой фотосистемы II является очень высокий редокс-потенциал основной формы пигмента. Он равен +1,1 В. Вот почему Хл680 может служить акцептором электронов для воды (редокс-потенциал пары H₂O/O₂ при нейтральном рН равен + 0,82В). В то же время редокс-потенциал возбужденного Хл680 лежит в отрицательной области (менее — 0,6 В). Промежуточным акцептором электронов между Хл680 и первичным стабильным акцептором служит Феофетин (редокс-потенциал — 0,61 В). Первичный стабильный акцептор является хиноном (P_{QA}), который как-то связан с негемовым железом. Еще одна молекула связанного хинона (P_{QB}) участвует в дальнейшем переносе электронов по фотосинтетической редокс-цепи. Как и у пурпурных бактерий, этот этап блокируется офенантролином. Нет ясности в вопросе о том, что за компонент служит первичным донором электронов для Хл680. Это гипотетическое соединение Z восстанавливает Хл680 за времена порядка 50 — 500 нс. Есть косвенные указания, что окисленная форма Z — это дважды прото-нированный катион семихинона. В качестве восстановителя Z используется система расщепления

воды С.Р.В. Она действует таким образом, что расщепление двух молекул H_2O приводит к восстановлению четырех Хл680 через компонент Z и образованию одной молекулы O_2 и четырех ионов H. Четыре интермедиата были постулированы в этом четырехквантовом процессе. Их природа во многом остается неизвестной. С. Р. В. включает полипептиды с массами 34, 23 и 16 кДа и, по-видимому, еще какой-то один белок. С.Р.В. содержит четыре иона Mn- Последние принимают участие в переносе электронов. Роль цитохрома b559 обнаруженного в фотосистеме II, также остается загадкой. Есть предположение, что он участвует в особом циклическом переносе электронов вокруг фотосистемы II. Механизм генерации $\Delta\mu H$ фотосистемой II может, по-видимому, быть описан по аналогии с более изученным комплексом бактериальных центров и фотосистемой I. Вероятно, и в этом случае также происходит трансмембранный светозависимый перенос электронов (от Хл680 к PQA, расположенному по другую сторону гидрофобного барьера).

PQH₂-пластоцианин-редуктаза

Система реакций Q-цикла катализируется в хлоропластах PQH₂- пластоцианин-редуктазой (комплексом b/f). Комплекс содержит по крайней мере четыре полипептида.

Три из них снабжены редокс-центрами. Это цитохром *f* (32 кДа), двугемовый цитохром *b*, (23 кДа) и FeS-белок (20 кДа). Четвертая субъединица (17 кДа) прямо не участвует в переносе электронов. Оба гема в цитохроме *b* характеризуются спектральным максимумом при 563 нм. Они отличаются по редокс-потенциалам. Гемы *b_l* и *b_h* соответственно — 150 мВ и — 30 мВ.

Сравнение аминокислотной последовательности цитохрома *b* из хлоропластов шпината с таковыми цитохромов *b* из митохондрий животных, растений и грибов выявило сходство в первых (считая от N-конца) 200 остатках. В то же время налицо и явное различие, состоящее в том, что цитохром *b* существенно короче (211 остатков), чем митохондриальные цитохромы *b*, (380 — 385 остатков). При этом обнаруживается гомология между субъединицей IV (17 кДа) комплекса b/f и остатками 260 — 353 митохондриального цитохрома. Поэтому можно полагать, что некая функция, присущая C-концевой части митохондриального цитохрома *b*, в хлоропластах выполняется субъединицей IV. Спектр цитохрома *f* имеет максимум поглощения при 555 нм. Редокс-потенциал этого цитохрома равен + 365 мВ. Средний диаметр комплекса *b/f* порядка 8,5 нм. Комплекс склонен димеризоваться. Полагают, что в природной мембране комплекс существует в виде димера.

Следует отметить, что PQH₂-пластоцианин-редуктаза является медленным и наиболее уязвимым звеном фотосинтетической редокс-цепи. Вход в Q-цикл от фотосистемы II блокируется мощным гербицидом дихлорфенилдиметилтиомочевинной. Определенные этапы Q-цикла чувствительны к ДБТХ и HQNO. Последние два яда тормозят Q-цикл также в митохондриях и бактериях. В то же время антимицин А, типичный ингибитор комплекса *bcl* видимо, не влияет на нециклическую редокс-цепь в тилакоидах. Однако он блокирует циклический перенос электронов. Ингибиторный анализ редокс-цепи тилакоидов осложняется существованием путей переноса электронов альтернативных главной нециклической цепи. Наряду с циклическим переносом электронов вокруг фотосистемы I, а также, возможно, и фотосистемы II две фотосистемы могут быть связаны друг с другом и без участия Q-цикла. Для этого достаточно предположить, что в некоторых условиях оба электрона, поступающие на PQ, поставляются фотосистемой II, и оба электрона, снимаемые с PQH₂, акцентируются фотосистемой I. Такое предположение не кажется чем-то невозможным, если учесть, что Хл680 — сильный восстановитель, а Хл700 мощный окислитель. Как показали Иванов и соавт. отношение Н/е повышается с 2 до 3 при адаптации хлоропластов к сильному свету. Авторы полагают, что этот эффект обусловлен подключением Q-цикла, который, по их мнению, не функционирует у неадаптированных

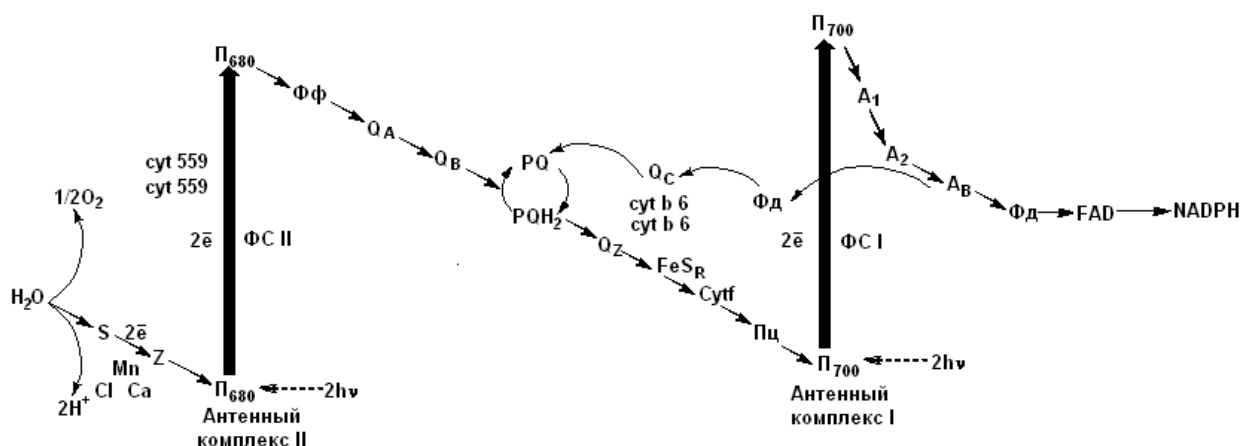


Рисунок 6: Схема циклического и нециклического транспорта электронов в электрон-транспортной цепи ф хлоропластах

хлоропластов. Как предполагает Рич, Q-цикл включается только, при условии, что приток электронов к комплексу *b6/f* происходит быстрее, чем их отток. Именно в этих условиях анион-радикал PQ (образованный при восстановлении FeS посредством PQH₂ имеет достаточно времени, чтобы покинуть FeS, достичь цитохрома *b* и восстановить гем *b*, прежде чем FeS вновь окислится под действием цитохрома *f*. Если же, например, образующийся цитохром f²⁺ окисляется так быстро, что цитохром f³⁺ успевает окислить восстановленный FeS раньше, чем PQ покинул FeS, то, по Ричу, PQ отдает свой электрон на FeS, а не на *b* и Q-цикл отключается. В ходе окислительно-восстановительных реакций участников этой электрон-транспортной цепи осуществляется транспорт электронов. Выявляют два типа транспорта электронов:

нециклический и циклический.

Транспорт электронов (циклический и нециклический)

В фотосистеме I хлорофилл Хл700 под действием кванта света возбуждается и передает электроны на мономерный хлорофилл а (A0), который является большим окислителем, затем происходит перенос на аналог витамина К (A1), затем электроны последовательно передавались на три 4Fe-4S кластера FeSx, FeSB, FeSA, то есть перенос происходил с одного FeS белка на другой, затем перенос происходит на ферредоксин растворимый FeS белок, а с него электроны переходят на флавопритеин точнее на FAD⁺, образованием FADH₂, с FADH₂ электроны и протоны переносятся на NADP⁺, и образуется NADPH. Но так как электроны перемещаются от хлорофилла Хл700 на NADP⁺, следовательно образуются NADPH и окисленная форма Хл700. Восстановление в темноте Хл700 происходит за счет пластоциана, растворимого медьсодержащего белка, обеспечивающего связь между комплексом *b6/f* и фотосистемой I. Следовательно восстановление пластоциана происходит за счет окисления коферментов комплексом *b6/f*. Образовавшиеся в результате окисленные формы восстанавливаются с помощью восстановленной формы пластохинона или PQH₂, восстановленный пластохинон является донором электронов для комплекса *b6/f*. Пластохинон переносит не только электроны, но и протоны. Для пластохинона донором протонов является окружающая среда, а вот донором электронов фотосистема II. Фотосистема II является можно сказать «надстройкой» для возможного использования универсального донора электронов, самого распространенного вещества на планете, а точнее воды. И так, что происходит в фотосистеме II. В фотосистеме II реакционный центр или хлорофилл Хл680 под действием кванта света возбуждается и передает электроны на феофетин, с которого электроны передаются на метакхинон А, а с него на метакхинон В, все эти коферменты находятся в составе фотосистемы II, именно с метакхинона электроны передаются на пластохинон, а протоны поступают из среды. Пластохинон обеспечивает связь между фотосистемой II и комплексом *b6/f*. Окисленная форма хлорофилла Хл680 восстанавливается с помощью комплекса фотолиза воды. Комплекс фотолиза воды обеспечивает электронами реакционный центр фотосистемы II. В хлорофилах под действием света происходит переход от положительного к отрицательному окислительно-восстановительному потенциалу, в случае остальных компонентов системы, происходило увеличение окислительно-восстановительного потенциала, суммарно схема напоминает букву Z. Впервые принцип Z-схемы был предложен Р. Хиллом и Ф. Бендаллом (1960) и экспериментально подтвержден работами Л. Дюйзенса (1961). В настоящее время Z-схема, или схема нециклического транспорта электронов при фотосинтезе является общепризнанной и непрерывно пополняется новыми деталями. Продуктами в данном случае являются NADPH и протонный градиент, соответствующий 2,5 молям АТФ на два кванта света (по одному на каждую фотосистему). Механизмы генерации протонного градиента между стромой хлоропласта и просветом тилакоида трех типов: первое — в системе фотолиза воды образуется два протона из молекулы

воды в просвете тилакоида, второе — перенос двух протонов в просвет тилакоида за счет активности платохинона, третье — поглощение протонов при образовании NADPH в строме хлоропласта. В результате образуется разность концентраций протонов между стромой и просветом тилакоида в 5 протонов, что соответствует 2,5 АТФ. Таким образом продукты нециклического транспорта электронов при фотосинтезе: кислород, NADPH и протонный градиент соответствующий 2,5 АТФ. Если сравнить с другими типами фотосинтеза, то можно предположить, что это наиболее энергетически выгодный тип фотосинтеза в отличие от других типов фотосинтеза.

Помимо нециклического типа транспорта электронов, присутствует еще и циклический тип транспорта электронов. Данный тип транспорта электронов часто встречается при применении гербицидов (средств от сорных растений). В циклическом транспорте работает фотосистема I. Возбуждение хлорофилла 700 вызывает поток электронов, который доходит до ферредоксина, затем электроны с ферредоксина поступают на пластохинон, а затем на комплекс *b6/f*, с которого электроны поступают на пластоциан, с которого электроны переходят на хлорофилл Хл700, это замыкает цикл. Данный поток электронов обеспечивает только генерацию протонного градиента за счет переноса протонов пластоцианом, что соответствует одной молекуле АТФ, которая и является единственным продуктом циклического транспорта. Это менее выгодно, но при появлении гербицидов отключается фотосистема II, и это позволяет клетке функционировать, пусть и не в стандартных условиях.

Регуляция световой фазы фотосинтеза

В биоэнергетике хорошо известны такие регуляторные явления, как фотосинтетический контроль (в хлоропластах) и дыхательный контроль (в митохондриях). Их проявление состоит в том, что скорости переноса электронов в фотосинтетической цепи электронного транспорта хлоропластов и дыхательной цепи митохондрий зависят от соотношения между количеством субстратов и продуктов реакции синтеза АТФ ($\text{АДФ} + \text{Ф}_\text{H} \rightarrow \text{АТФ} + \text{H}_2\text{O}$). При избытке субстратов этой реакции (АДФ и Ф_H) скорости переноса электронов поддерживаются на максимальных уровнях. В этих условиях идет интенсивный синтез молекул АТФ. После того как наступает истощение молекул АДФ и появляется избыток АТФ, скорость электронного транспорта замедляется. Торможение электронного транспорта, обусловленное образованием избыточного количества конечного продукта (АТФ), связывают с переходом хлоропластов и митохондрий соответственно в состояния фотосинтетического и дыхательного контроля. Ключевую роль в явлениях фотосинтетического и дыхательного контроля играют процессы протонного транспорта, сопряженного с реакциями синтеза АТФ. Механизмы этих явлений в хлоропластах и митохондриях имеют сходную природу, поэтому рассмотрим лишь процессы регуляции электронного переноса и синтеза АТФ в хлоропластах.

Как уже отмечалось работа фотосинтетической цепи электронного транспорта

приводит к накоплению ионов водорода внутри тилакоидов и, следовательно, к уменьшению внутритилакоидного рН. Специальные измерения показали, что значение рН внутритилакоидного пространства (pH_{in}) при освещении хлоропластов может понижаться на 2,5—3 единицы рН. Закисление внутритилакоидного пространства вызывает торможение электронного транспорта. Это происходит на самом медленном участке в цепи переноса электронов от воды к $NADP^+$ — на стадии окисления пластохинола. Скорость окисления пластохинола зависит от концентрации ионов водорода внутри тилакоидов: чем выше их концентрация (ниже значение pH_{in}), тем медленнее происходит окисление QH_2 . Связано это с тем, что переносу электронов от пластохинола (QH_2) и его полувосстановленной формы пласто-семихинона (QH^*) к b/f-комплексу предшествуют стадии диссоциации протона во внутритилакоидный объем. Заряженные формы пластохинола (QH) и пласто-семихинона (Q^*) являются непосредственными донорами электрона для b/f-комплекса. Реакции диссоциации, в ходе которых образуются активные формы восстановленного пластохинона QH и Q^* , зависят от рН внутри тилакоидов. По мере увеличения концентрации ионов водорода во внутритилакоидном пространстве вероятность диссоциации протона уменьшается, так как в этом случае за счет повышенного давления протонов равновесие в реакциях сдвигается влево, то есть в сторону образования неактивных протонированных форм пластохинола (QH_2) и пласто-семихинона (QH^*). Именно поэтому накопление ионов водорода внутри тилакоидов вызывает замедление скорости электронного транспорта. Данная схема накопления восстановленных форм пластохинона скорее является сигналом для того, что фотосистемы работают не согласованно. Накопление восстановленных форм пластохинонов указывает на то, что активность фотосистемы I меньше, чем фотосистемы II.

Почему скорость работы цепи электронного транспорта зависит от содержания АДФ и АТФ в хлоропластах? Ответ на этот вопрос заключается в том, что молекулы АДФ и АТФ, которые сами непосредственно не взаимодействуют с цепью электронного транспорта, влияют на выход протонов из тилакоидов наружу через АТФ-синтазный комплекс. Реакции синтеза АТФ, как уже отмечалось, сопряжены с переносом протонов через АТФ-синтазу. При избытке молекул АДФ скорость работы АТФ-синтазного комплекса велика. Это значит, что наряду с поступлением протонов внутрь тилакоидов происходит их интенсивный выход наружу через АТФ-синтазу. Поэтому в условиях синтеза АТФ не происходит столь сильного закисления внутри тилакоидного пространства, которое могло бы вызвать торможение электронного транспорта. После истощения запаса молекул АДФ синтез АТФ практически останавливается, а вместе с этим резко снижается скорость выхода протонов наружу. При этом, однако, цепь переноса электронов работает, поэтому протоны продолжают поступать внутрь тилакоидов. Поскольку при отсутствии АДФ канал быстрого выхода протонов наружу через АТФ-синтазу практически закрыт, то после истощения АДФ концентрация протонов внутри тилакоидов

увеличится и соответственно значение внутритилакоидного рН (pH_{in}) дополнительно понизится. Как было сказано выше, уменьшение pH_{in} замедляет окисление пластохинола и тем самым тормозит перенос электронов между ФС2 и ФС1.

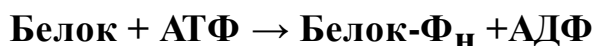
Таким образом, в условиях, когда в хлоропластах имеется избыток субстратов фосфорилирования (АДФ и Фн), скорость электронного транспорта поддерживается на высоком уровне и соответственно при этом велика скорость синтеза АТФ. В то же время если потребность в синтезе АТФ мала (в хлоропластах имеется избыток АТФ), то работа цепи электронного транспорта замедляется. После того как запасы АТФ в хлоропластах будут исчерпаны (например, за счет гидролиза АТФ в реакциях цикла Кальвина) и появится избыток молекул АДФ, включатся в работу АТФ-синтазные комплексы, в результате чего уменьшится концентрация ионов водорода внутри тилакоидов и снова возрастет скорость электронного транспорта.

Одним из наиболее распространенных механизмов регуляции биохимических реакций является химическая модификация ферментов, влияющая на их каталитическую активность. В хлоропластах имеются два эффективных способа регуляции активности белков фотосинтетического аппарата:

1. фосфорелирование белков;
2. редокс-регуляция путем восстановления тиоловых (сульфгидрильных) групп аминокислот, входящих в состав белков.

Фосфорелирование белков как способ регуляции распределения энергии света

Фосфорелирование белков играет важную роль в регуляции активности различных ферментов. Фосфорелирование белков происходит в результате переноса фосфатной группы с молекулы АТФ на одну из аминокислот регулируемого белка:



Ферменты, катализирующие эту реакцию, называются протеинкиназами. Присоединение к полипептидной цепи фосфата, несущего отрицательные заряды, может вызвать структурные перестройки белка, влияющие на его активность. В учебниках и современных руководствах по биохимии и молекулярной биологии клетки можно найти многочисленные примеры того, каким образом реакции фосфорелирования участвуют в регуляции метаболических процессов. Не являются исключением и процессы фотосинтеза.

В 1977 году Дж. Беннет обнаружил, что после освещения хлоропластов в присутствии АТФ фосфорелируется один из полипептидов, входящих в состав так называемого лабильного светособирающего комплекса хлоропластов. Впоследствии было установлено, что это явление может иметь непосредственное отношение к регуляции распределения энергии света между

ФСІ и ФСІІ. В хлоропластах для согласования совместной работы двух фотосистем должен существовать механизм, обеспечивающий оптимальное распределение энергии поглощаемого света между светособирающими антеннами комплексов ФСІ и ФСІІ. Необходимость существования такого механизма очевидна. Действительно, если, например, светособирающая антенна ФСІІ получает существенный избыток квантов света по сравнению с ФСІ, то эффективность использования энергии света в ФСІІ будет невелика. В этом случае за счет более частого срабатывания реакционных центров ФСІІ на участке цепи электронного транспорта между ФСІІ и ФСІ накопится избыток восстановленных переносчиков, которые не будут успевать окисляться редко работающими реакционными центрами ФСІ. Этого можно избежать, если изменить соотношение между размерами свето-собирающих антенн ФСІ и ФСІІ, увеличив размер антенны ФСІ за счет уменьшения антенны ФСІІ. Для регуляции распределения света в хлоропластах наряду с основными светособирающими пигментными комплексами, жестко связанными с ФСІ и ФСІІ, имеется лабильный (подвижный) светособирающий комплекс 2 (сокращенно ССК2). Этот комплекс выполняет роль дополнительной антенны, предназначенной для усиления светосбора одной из фотосистем. В хлоропластах комплексы ФСІ и ФСІІ находятся в мембранах тилакоидов гран и межгранных тилакоидов. Однако распределены они между этими тилакоидами неравномерно. Основная часть комплексов ФСІ локализована в межгранных тилакоидах, в то время как большинство комплексов ФСІІ находится в тилакоидах гран. Предполагается, что в условиях низкой освещенности ССК2 располагаются в основном в тилакоидах гран рядом с ФСІІ, благодаря чему общий размер светособирающей антенны ФСІІ увеличен. Однако в определенных условиях, когда возникает необходимость увеличить эффективность работы ФСІ, этот лабильный светособирающий комплекс покидает ФСІІ и, перемещаясь в плоскости мембраны в сторону межгранных тилакоидов, стыкуется с ФСІ. Сигналом для срабатывания механизма, вызывающего перемещение ССК2, служит образование избытка восстановленных переносчиков в цепи электронного транспорта между фотосистемами. Такой избыток может возникать, например, при более частом срабатывании реакционных центров ФСІІ по сравнению с ФСІ. Перемещение ССК2 к ФСІ помогает хлоропластам разгрузить цепь переноса электронов между фотосистемами за счет более частого срабатывания ФСІ.

Механизм перераспределения ССК2 между светособирающими антеннами ФСІІ и ФСІ связан с фосфорелированием одной из субъединиц этого комплекса. Переполнение цепи электронного транспорта служит сигналом для включения в работу протеинкиназы — фермента, катализирующего перенос фосфата с молекулы АТФ на ССК2. В результате такой модификации ССК2 теряет связь с ФСІІ. Предполагается, что фосфорелированный комплекс выталкивается из тилакоидов гран, где сосредоточена большая часть ФСІІ, и перемещается в межгранные тилакоиды, обогащенные комплексами ФСІ. Силы, вытесняющие фосфорелированные комплексы ССК2 из гран, имеют электростатическую

природу. После присоединения к ССК2 отрицательно заряженного фосфата им становится энергетически невыгодно находиться вблизи друг от друга в тилакоидах гран, которые тесно примыкают друг к другу. Поэтому фосфорелированные комплексы ССК2 перемещаются в межгранные тилакоиды, которые пространственно разнесены. В результате такой структурной реорганизации размеры светособирающей антенны ФСII уменьшаются, а ФСI увеличиваются. Этим достигается оптимальное распределение поглощаемой энергии света между фотосистемами, когда скорость поступления электронов от ФСII оказывается согласованной с частотой срабатывания реакционных центров ФСI. Описанный механизм позволяет фотосинтетическому аппарату хлоропластов адекватно реагировать на изменения условий освещения. Если в ходе работы хлоропластов возникнет необходимость увеличить размеры светособирающей антенны ФСII (например, в ответ на изменение интенсивности или спектрального состава света, падающего на лист), то в работу включится протеинфосфатаза — фермент, катализирующий отщепление фосфата от белков. После этого дефосфорилированные комплексы ССК2 могут снова переместиться в тилакоиды гран, где сосредоточено большинство ФС2. Таким образом, своевременное включение различных ферментов — протеинкиназы и протеинфосфатазы — позволяет хлоропластам оптимизировать распределение энергии света между светособирающими антеннами ФСI и ФСII.

Редокс-регуляция фотосинтетических ферментов

Другой механизм регуляции фотосинтеза связан с изменением окислительно-восстановительного состояния (редокс-состояния) белков фотосинтетического аппарата. Ключевым ферментом цикла Кальвина—Бенсона является рибулозодифосфат-карбоксилаза (сокращенно РДФК, в научной литературе последних лет РДФК чаще встречается под названием RUBISCO, от *ribulosebiphosphatecarboxylase*). Особенностью этого фермента является то, что катализируемая им реакция карбоксилирования рибулозо-1-5-дифосфата является самой медленной стадией в цикле фиксации углекислоты. Характерно, что общее количество РДФК на Земле превышает количество любого другого белка. Активность РДФК контролируется состоянием ее тиоловых групп. РДФК находится в неактивном состоянии, когда тиоловые группы окислены (при этом они образуют —S—S— мостики), или в активном состоянии, когда тиоловые группы восстановлены (находятся в состоянии —SH). В темноте РДФК неактивна. При освещении хлоропластов РДФК переходит в активное состояние.

Посредником между цепью электронного транспорта хлоропластов, служащей источником электронов для активации РДФК, является специальный белок — тиоредоксин. Тиоредоксины имеются не только у растений, они широко распространены в животном и бактериальном царствах. Тиоредоксины подвержены окислительно-восстановительным превращениям в клетке за счет изменения входящих в их состав тиоловых групп ($—S—S— + 2e^- + 2H^+ \rightarrow 2 —$

SH). В хлоропластах тиоредоксин восстанавливается, принимая два электрона от двух восстановленных молекул ферредоксина. Данная реакция катализируется специальным ферментом — ферредоксин-тиоредоксинредуктазой. Восстановленный тиоредоксин окисляется, отдавая, в свою очередь, электроны молекуле РДФК. Таким образом, при переходе от темноты к свету, когда в хлоропластах начинает работать цепь переноса электронов и образуются восстановленные молекулы ферредоксина, происходит активация РДФК (ферредоксин → тиоредоксин → РДФК). В результате активации РДФК скорость потребления углекислоты в цикле Кальвина—Бенсона возрастает, поэтому стадия фиксации углекислоты перестает лимитировать работу цепи электронного транспорта. Активации РДФК способствуют также другие факторы: изменение рН и содержания ионов Mg^{2+} в строме хлоропластов, которые происходят при освещении листа.

В чем заключается биологический смысл регуляции активности РДФК в зависимости от условий освещения? Возможно, это связано с некоторыми особенностями газообмена у растений. РДФК, как известно, обладает способностью катализировать фотодыхание в хлоропластах. Не исключено, что изменение активности РДФК при смене условий освещения позволяет ограничить фотодыхание — процесс, снижающий скорость фотосинтеза и влияющий на продуктивность растений.

Восстановленный тиоредоксин может активировать в хлоропластах и другие ферменты. К их числу относится АТФ-синтаза — фермент, катализирующий синтез и гидролиз молекул АТФ. АТФ-синтаза представляет собой белковый ансамбль, который состоит из двух крупных белковых фрагментов: локализованного в мембране фактора сопряжения CF_0 и выступающего наружу (в сторону стромы) белкового комплекса (фактор сопряжения CF_1). Реакции синтеза АТФ происходят поочередно в трех β -субъединицах фактора сопряжения CF_1 , которые вместе с тремя гомологичными им α -субъединицами образуют шарообразную структуру. В состав CF_1 входят также три субъединицы меньшей молекулярной массы. Одна из них (субъединица γ) имеет продолговатую форму. Эта субъединица пронизывает насквозь глобулу CF_1 и выступает в сторону мембраны, проникая внутрь CF_0 . Две другие минорные субъединицы, как полагают некоторые исследователи, находятся в центре и на периферии фактора сопряжения CF_1 . В результате работы цепи электронного транспорта концентрация протонов внутри тилакоидов возрастает. Мембранный фрагмент АТФ₀синтазы (CF_0) выполняет роль протонпроводящего канала, по которому ионы водорода из внутреннего пространства тилакоидов подводятся к определенным функциональным группам. Поток протонов через ансамбль CF_0 — CF_1 , направленный из тилакоидов в строму, обеспечивает работу АТФ-синтазы.

Как и в случае РДФК, активность АТФ-синтазы зависит от редокс-состояния входящих в ее состав тиоловых групп. Естественно, также возникает вопрос:

зачем нужно регулировать активность АТФ-синтазы? Не проще ли постоянно иметь в хлоропластах высокоактивный фермент, способный сразу же после начала освещения синтезировать АТФ? Оказывается, нет. Дело в том, что наряду с АТФ-синтазной активностью (образование АТФ) этот фермент обладает еще способностью гидролизовать АТФ (АТФ-азная активность). Поскольку для расщепления АТФ ферменту не требуется энергии, то гидролиз АТФ может происходить в темноте. Очевидно, что с энергетической точки зрения в темноте растению невыгодно иметь активную АТФ-азу, которая напрасно расходовала бы запас молекул АТФ, накопленных во время освещения. Поэтому в темноте АТФ-синтаза хлоропластов обычно находится в неактивном состоянии.

С началом освещения, когда в хлоропластах появляются условия для синтеза АТФ, необходимо привести АТФ-синтазу в активное состояние. Первым сигналом для активации АТФ-синтазы служит появление в цепи электронного транспорта восстановленных переносчиков на акцепторном участке ФС1. Восстановленные молекулы ферредоксина служат донорами электронов для тиоредоксина, который, в свою очередь, изменяет окислительно-восстановительное состояние АТФ-синтазы. Взаимодействуя с АТР-синтазой, тиоредоксин восстанавливает —S—S— мостики субъединицы γ , в результате чего фермент переходит в активное состояние. Для активации АТФ-синтазы необходимо также, чтобы в ней произошли определенные структурные изменения, которые затрагивают относительно небольшую субъединицу, выполняющую регуляторные функции. Структурные изменения, активирующие АТФ-синтазу, происходят в результате энергизации тилакоидной мембраны при освещении хлоропластов. В темноте АТФ-синтаза дезактивируется. Переключение между неактивным и активным состояниями АТФ-синтазы происходит сравнительно быстро (несколько секунд — десятков секунд), что наряду с другими регуляторными механизмами способствует достижению максимальной эффективности синтеза АТФ.

Запасенная энергия в виде макроэргических связей АТФ и восстановительных эквивалентов NADPH не может сохраняться длительное время, и появляется необходимость переводить эту энергию в более стабильные соединения. Именно на это направлены реакции темновой фазы фотосинтеза.

Темновая фаза фотосинтеза

В результате фотохимических реакций в хлоропластах создается необходимый уровень АТФ и NADPH. Эти конечные продукты световой фазы фотосинтеза стоят на входе в темновую фазу, где CO_2 восстанавливается до углевода. Однако сами по себе АТФ и NADPH не в состоянии восстановить CO_2 . Очевидно, и темновая фаза фотосинтеза — сложный процесс, включающий большое количество реакций. Кроме того, существуют различные пути восстановления CO_2 . В настоящее время известны так называемые C_3 -путь и C_4 -путь фиксации CO_2 , фотосинтез по типу толстянковых (CAM-метаболизм) и фотодыхание.

Если у бактерий сложно отследить единый путь утилизации АТФ и NADPH, поэтому единого пути выявить не удалось, следовательно, единого пути темновой фазы фотосинтеза у бактерий выявить не удалось. В отличие от бактерий у растений есть один путь для синтеза органических веществ из неорганических, прежде всего введение неорганического углерода из углекислого газа в органические молекулы, и это C_3 -путь или цикл Кальвина. Очень важно рассмотреть этот цикл и историю его открытия.

Этот способ ассимиляции CO_2 , присущий всем растениям, в 1946—1956 гг. был расшифрован американским биохимиком М. Кальвином и его сотрудниками. Прежде всего, была поставлена задача: обнаружить первичный продукт фотосинтеза и выяснить, какое соединение служит акцептором CO_2 . Для решения первого вопроса были использованы одноклеточные зеленые водоросли (хлорелла и др.) и меченый $^{14}CO_2$. Углекислый газ несущий изотоп углерода в составе углекислого газа может быть маркером, если CO_2 связался с другой органической молекулой, наличие изотопа в молекуле могут свидетельствовать о том, что молекула носитель изотопа является продуктом ассимиляции. Фотосинтезирующие водоросли помещали в среду, содержащую $^{14}CO_2$, на разные промежутки времени, затем клетки быстро фиксировали, экстрагировали из них спирторастворимые вещества и определяли содержание ^{14}C в различных соединениях после их разделения с помощью хроматографии. Оказалось, что после экспозиции в течение 1 мин ^{14}C включался в C_3 — C_7 -сахара и фосфосахара, в органические кислоты (яблочную, щавелевоуксусную, ФЕП), в аминокислоты (аланин, аспарагиновую кислоту). То есть время экспозиции слишком велико, и происходило распространение встроенного углерода по большому количеству реагентов. Именно для этого время экспозиции было сокращено до 0,1—2 с, и после повторения эксперимента с измененным временем экспозиции светом, большая часть метки обнаруживалась в фосфоглицериновой кислоте, в ее карбоксильной группе. Следовательно, 3-фосфоглицериновая кислота (ФГК) является первичным продуктом фотосинтеза. Второй вопрос — природа первичного акцептора CO_2 . Сначала предположили, что таким акцептором является какое-либо двухуглеродное соединение. Однако введение в инкубационную среду винилфосфата, фосфогликольальдегида и других веществ с C_2 не приводило к увеличению содержания радиоактивной метки из CO_2 в ФГК. Тогда схему опыта видоизменили следующим образом. Было сделано предположение, что если использовать акцептор при большом количестве донора. Если уменьшить количество донора, то в результате излишки акцептор остается в излишке, которое может быть детектировано. Водоросли экспонировали на свету при высокой (1 %-ной) концентрации CO_2 , затем резко снижали его концентрацию до 0,003%. Расчет был на то, что в условиях дефицита CO_2 быстро накопится

именно то соединение, которое служит акцептором CO_2 . С помощью двумерной хроматографии удалось установить, что при отсутствии возможности карбоксилирования в клетках кратковременно возрастает концентрация рибулозо-1,5-дифосфата (рибулозо-1,5-бисфосфата). Отсюда возникло предположение, что первичная фиксация CO_2 происходит следующим образом: $\text{C}_5 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{C}_6 \rightarrow 2\text{C}_3$. Для проверки этой гипотезы в бесклеточный экстракт из листьев шпината или клеток хлореллы вносили меченный по ^{32}P рибулозо-1,5-дифосфат. На свету в экстракте появлялась радиоактивная ФГК. На основании полученных данных процесс первичной фиксации CO_2 можно разделить на три этапа:

1. карбоксилирование;
2. фаза восстановления;
3. фаза регенерации первичного акцептора диоксида углерода и синтеза конечного продукта фотосинтеза.

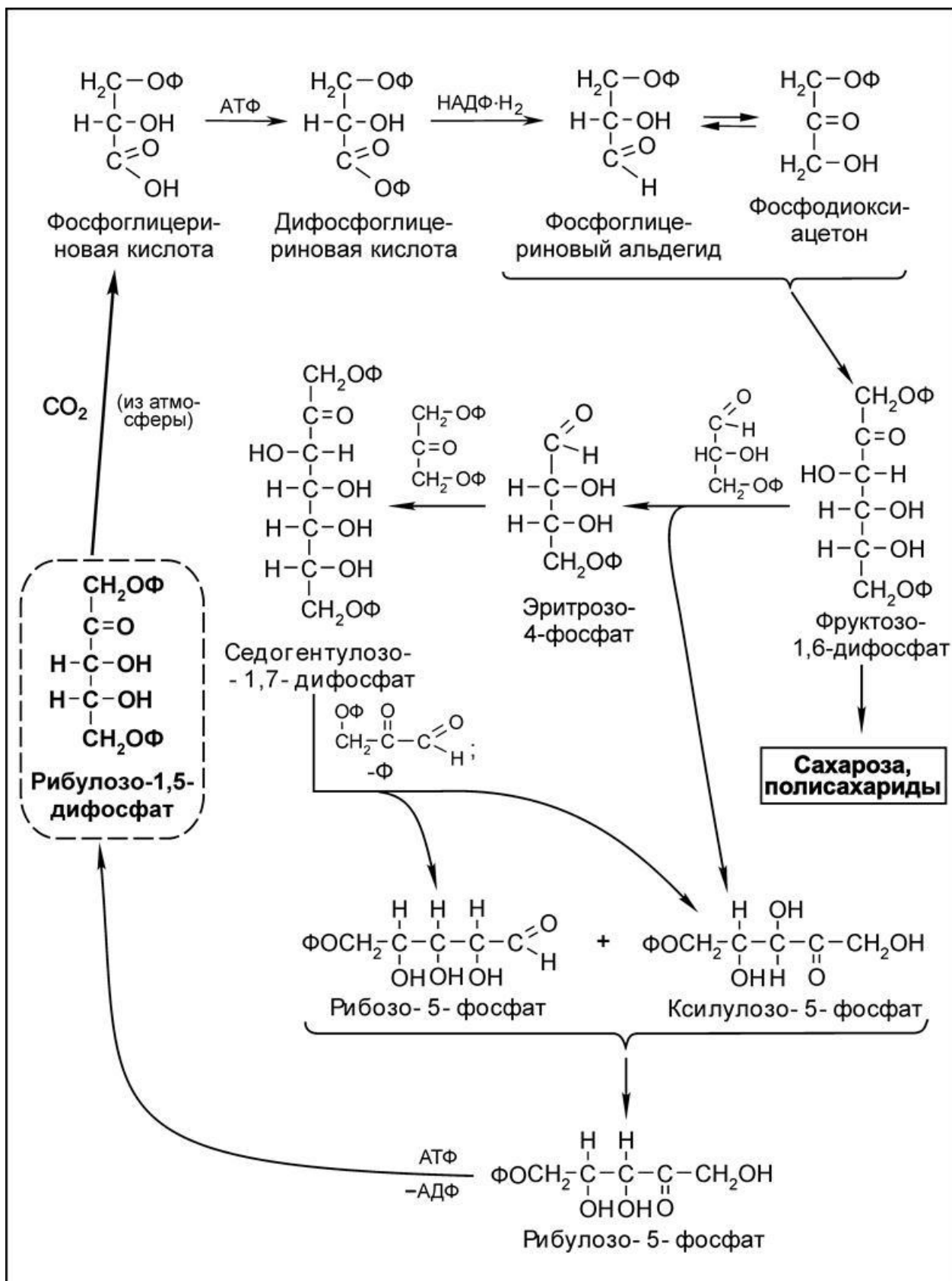


Рисунок 7: Схема реакций цикла Кальвина. Ферменты указаны в тексте

1. Карбоксилирование. К молекуле рибулозо-1,5-дифосфата присоединяется CO_2 с помощью рибулозодифосфаткарбоксилазы (RUBISCO). Полученный продукт очень нестабилен и легко распадается на две триозы: 2 молекулы 3-фосфо-глицериновой кислоты (3-ФГК).

2. Фаза восстановления. Две молекулы 3-ФГК восстанавливаются до 3-фосфоглицеринового альдегида (3-ФГА) в два этапа. Сначала происходит фосфорелирование 3-ФГК при участии АТФ и фосфоглицераткиназы до 1,3-дифосфоглицериновой кислоты, а затем восстановление 1,3-ФГК с помощью NADPH и дегидрогеназы фосфоглицеринового альдегида. Образовавшийся глицероальдегид-3-фосфат является триозой (трехуглеродным моносахаридом), то есть процесс синтеза моносахарида можно считать завершенным, при чем одна из образовавшихся молекул содержит атом углерода неорганического происхождения из углекислого газа, но триозы не стабильны, кроме того необходимо замкнуть цикл. Для этого необходима третья фаза.

3. Фаза регенерации первичного акцептора диоксида углерода и синтеза конечного продукта фотосинтеза. В результате описанных выше реакций при фиксации трех молекул CO_2 и образовании шести молекул восстановленных 3-фосфотриоз пять из них используются затем для регенерации рибулозо-5-фосфата, а один — для синтеза глюкозы. 3-ФГА под действием триозофосфатизомеразы изомеризуется в фосфодиоксиацетон. При участии альдолазы 3-ФГА и фосфодиоксиацетон конденсируются с образованием фруктозо-1,6-дифосфата, у которого отщепляется один фосфат с помощью фруктозо-1,6-дифосфатазы. В дальнейших реакциях, связанных с регенерацией первичного акцептора CO_2 , последовательно принимают участие транскетолаза и альдолаза. Транскетолаза катализирует перенос содержащего два углерода гликолевого альдегида от кетозы на альдозу. Молекулы рибулозо-5-фосфата фосфорилируются с участием АТФ и фосфоррибулозокиназы, в результате чего образуются молекулы рибулозо-1,5-дифосфата.

Таким образом, для синтеза одной молекулы глюкозы в цикле Кальвина необходимы 12 NADPH и 18 АТФ, которые поставляются в результате фотохимических реакций фотосинтеза.

Регуляция темновой фазы фотосинтеза

Регуляция осуществляется на уровне активности рибулозобифосфат карбоксилазы. Регуляция происходит двумя путями.

Регуляция за счет изменения рН

В темноте фермент находится в условиях меньшего рН чем оптимальный (около 7,5-8,3), на свету происходит протонкачка протонов из стромы в просвет тилакоидов, и в результате защелачивание стромы, рН стромы становится оптимальным для фермента и он начинает работать на максимуме.

Red/Ox регуляция

При переходе от темноты к свету, когда в хлоропластах начинает работать цепь переноса электронов и образуются восстановленные молекулы ферредоксина, происходит активация РДФК (ферредоксин → тиоредоксин → РДФК). В результате активации РДФК скорость потребления углекислоты в цикле Кальвина—Бенсона возрастает.

Фермент риблозобифосфаткарбоксилаза имеет меньшее сродство к CO_2 , чем к O_2 , это сложилось эволюционно. В результате реакции с O_2 запускается процесс фотодыхания, не дающий синтеза углеводов, требующий энергии для регенерации пентозы.

Высокая активность фотодыхания приводит к снижению эффективности темновой фазы фотосинтеза.

Для уменьшения доли фотодыхания растения используют две стратегии:

- Разделение фермента и субстратов в пространстве (путь Хетча и Слека).
- Разделение фермента и субстратов во времени crassulacean acid metabolism или САМ-путь.

Оба пути являются «надстройкой» для изоляции RUBISCO от нежелательного субстрата.

Но в любой из путей входит цикл Кальвина или C_3 -путь темновой фазы.

C_4 -путь метаболизма

В работах Л. А. Незговоровой (1956—1957 гг.), было установлено, что при коротких экспозициях листьев кукурузы на свету ^{14}C из $^{14}\text{CO}_2$ обнаруживается в аспарагиновой кислоте. В дальнейших исследованиях как советских, так и зарубежных специалистов эти представления были развиты, что привело к открытию **C_4 -пути углерода в фотосинтезе**. Так, в 1960 г. Ю. С. Карпилов, а в 1963 г. И. А. Тарчевский и Ю. С. Карпилов представили данные о раннем образовании яблочной кислоты в листьях кукурузы. Г. П. Корчак и др. (1965) впервые показали, что дикарбоновые кислоты (яблочная и аспарагиновая) являются первичными продуктами фиксации CO_2 у сахарного тростника. Затем эти соединения через 3-ФГК и гексозофосфаты превращаются в сахара. Как новый тип фиксации CO_2 , принципиально отличающийся от цикла Кальвина, этот цикл впервые описали австралийские ученые М. Д. Хетч и К. Р. Слэк (1966). К группе растений с C_4 -путем фотосинтеза относятся сахарный тростник, кукуруза, сорго и др. Листья этих растений содержат два разных типа хлоропластов: хлоропласты обычного вида — в клетках мезофилла и большое количество крупных хлоропластов, часто не имеющих гран,— в клетках, окружающих проводящие пучки (обкладка). CO_2 , диффундирующий в лист через устьица, попадает в цитоплазму клеток мезофилла, где при участии ФЕП-карбоксилазы вступает в реакцию с ФЕП, образуя щавелево-уксусную кислоту (оксалоацетат). Затем уже в хлоропластах оксалоацетат восстанавливается до яблочной кислоты (малата) за счет NADPH, образующего в ходе световой фазы фотосинтеза. Щавелевоуксусная кислота в присутствии NH_4 может превращаться также в аспартат. Затем малат (или аспартат) переносится в хлоропласты клетки обкладки сосудистого пучка, где он декарбоксилируется малик-энзимом (малатдегидрогеназой декарбоксилирующей) до пирувата и

CO₂.

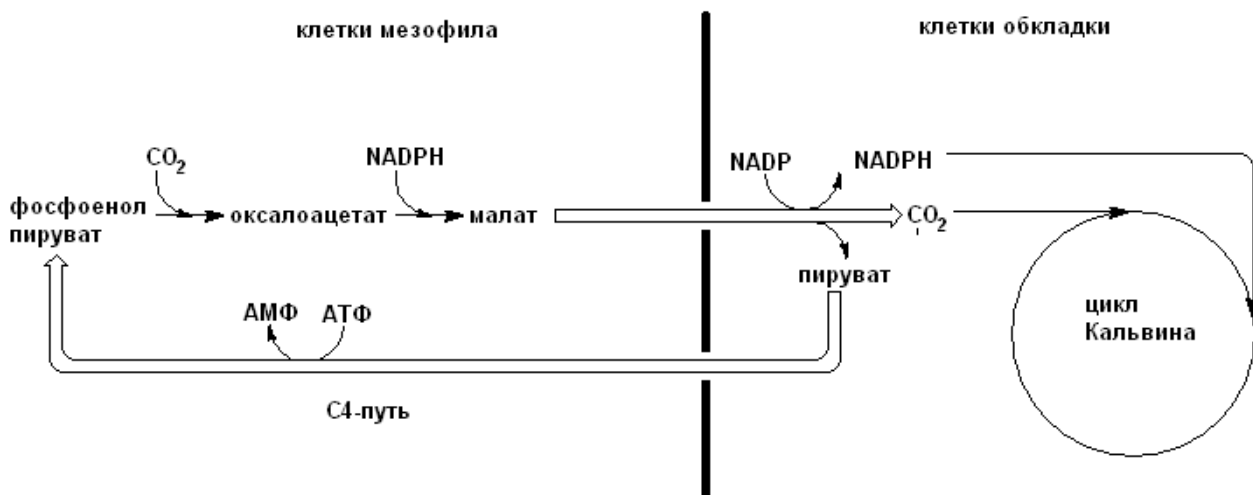


Рисунок 8: Схема реакции C₄-пути метаболизма

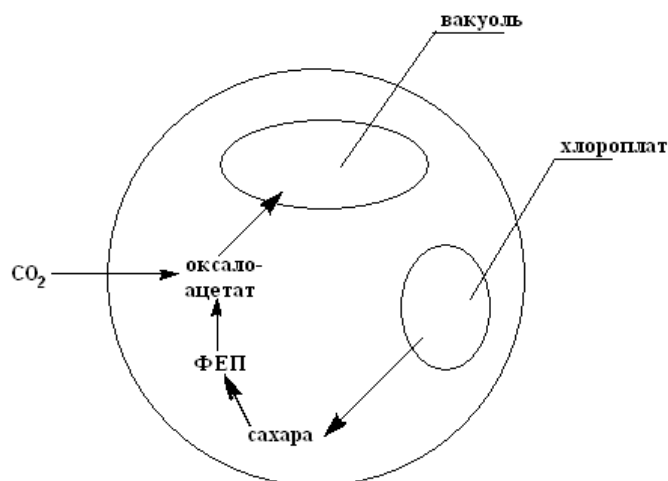
Как уже отмечалось, в хлоропластах обкладки отсутствуют граны, а, следовательно, слабо представлена ФС II, необходимая для нециклического транспорта электронов, однако в них в изобилии накапливается крахмал. Объясняется это тем, что в хлоропластах обкладки используется поставляемый малик-энзимом NADPH, а также тот CO₂, который образовался при окислительном декарбоксилировании малата (или аспартата). В этих хлоропластах в процессе циклического фотофосфорилирования синтезируется большое количество АТФ и фиксация CO₂ осуществляется по типу цикла Кальвина. У некоторых растений с C₄-путем фотосинтеза (амарант, лебеда) яблочная кислота декарбоксилируется в митохондриях клеток обкладки с восстановлением NAD. Возникающий при расщеплении малата в хлоропластах клеток обкладки пируват перемещается назад в хлоропласты клеток мезофила, где может снова превращаться в первичный акцептор CO₂ — ФЕП. Такая компартментация процессов позволяет растениям с C₄-путем осуществлять фотосинтез даже при закрытых устьицах, так как хлоропласты клеток обкладки используют малат (аспартат), образовавшийся ранее, как донор CO₂. C₄-растения могут также использовать CO₂, возникающий при фотодыхании. Закрывание устьичных отверстий в наиболее жаркое время дня сокращает потери воды за счет испарения (транспирации). Не удивительно поэтому, что к C₄-растениям относятся многие виды засушливой тропической зоны. Растения с C₄-путем фотосинтеза, как правило, устойчивы к засолению. Эффективность использования воды, т. е. отношение массы ассимилированного CO₂ к массе воды, израсходованной при транспирации, у C₄-растений зачастую вдвое выше, чем у C₃-растений. Таким образом, C₄-растения имеют преимущества перед C₃-растениями в засушливых местах обитания благодаря высокой интенсивности фотосинтеза даже при закрытых устьицах. Фиксация CO₂ с

участием ФЕП и образование малата (аспартата) служит как бы насосом для поставки CO_2 в хлоропласты обкладки, функционирующие по C_3 -пути.

САМ-путь метаболизма

Суккуленты (роды *Crassula*, *Bryophyllum* и др.) также приспособились

ночь устьища открыты



день устьища закрыты

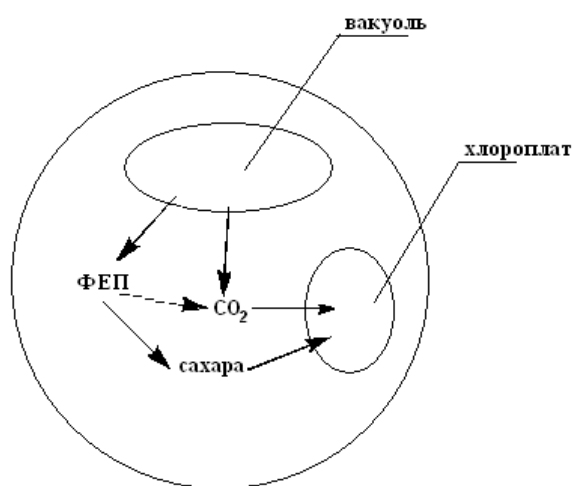


Рисунок 9: Схема реакций САМ-пути

осуществлять фотосинтез в условиях резко засушливого климата. Для них характерен суточный цикл метаболизма C_4 -кислот с образованием яблочной кислоты ночью. В соответствии с английским выражением *crassulacean acid metabolism* (САМ) этот тип фотосинтеза часто сокращенно называют **САМ-метаболизм**. Устьища этих растений днем обычно закрыты, что предотвращает потерю воды, и открываются ночью. CO_2 поступает в листья, где при участии содержащейся в цитоплазме ФЕП-карбоксилазы взаимодействует с фосфоенолпируватом, образуя оксалоацетат. Источником ФЕП служит крахмал. То же самое происходит и с CO_2 , который освобождается в клетках в процессе дыхания. Образовавшийся оксалоацетат восстанавливается под действием NADH -зависимой малатдегидрогеназы до яблочной кислоты, которая накапливается в вакуолях клеток листа. Это приводит к закислению клеточного сока в ночное время. Как и у C_4 -растений, оксалоацетат может быть источником аспартата, однако этот путь здесь менее выражен. Днем в условиях высокой температуры, когда устьища закрыты, малат транспортируется из вакуолей в цитоплазму и там декарбоксилируется при участии малатдегидрогеназы декарбоксилирующей (малик-энзима) с образованием CO_2 и пирувата. CO_2 поступает в хлоропласты и включается в них в цикл Кальвина, участвуя в синтезе сахаров. Таким образом, у растений с фотосинтезом по типу толстянковых много общего с C_4 -путем фотосинтеза. Однако при САМ-метаболизме фиксация CO_2 с образованием малата (ночью) и декарбоксилирование малата с высвобождением CO_2 и пирувата (днем) разделены во времени. У C_4 -растений эти же реакции разграничены в

пространстве: первая протекает в хлоропластах мезофилла, вторая — в клетках обкладки. При достаточном количестве воды ряд растений с метаболизмом по типу толстянковых могут вести себя как C_3 -растения. В свою очередь некоторые растения с C_3 -путем фотосинтеза при недостатке воды проявляют черты САМ-метаболизма.

Биосинтез углеводов, жирных кислот и аминокислот

Фотосинтез является основным процессом превращения неорганического соединения в органические. Таким образом, именно через углеводный обмен происходит вход в процессы анаболизма, то есть совокупности реакций биосинтеза органических веществ. И действительно логичным является начинать обзор процессов биосинтеза с анаболизма углеводов. При чем уже показано, что не только автотрофы, но и гетеротрофы способны синтезировать углеводы из неуглеводных предшественников.

Глюконеогенез

Синтез глюкозы из неуглеводных предшественников — это процесс, называемому глюконеогенезом. Этот метаболический путь имеет очень важное значение, поскольку некоторые ткани, и в частности мозг, в высшей степени зависят от глюкозы как первичного топлива. Дневная потребность мозга взрослого человека в глюкозе составляет примерно 120 г, т. е. на долю мозга приходится большая часть общей потребности организма в глюкозе (160 г). В жидкостях тела присутствует около 20 г глюкозы, и примерно 190 г глюкозы может быть легко получено из гликогена, ее резервной формы. Таким образом, «прямых» резервов глюкозы вполне достаточно для удовлетворения потребности в ней в течение одного дня. При более длительном голодании для обеспечения жизнеспособности организма глюкоза должна образовываться из неуглеводных источников. Важную роль играет глюконеогенез также в периоды интенсивной физической нагрузки.

Основными неуглеводными предшественниками глюкозы служат лактат, аминокислоты и глицерол, Лактат образуется в работающей скелетной мышце, когда скорость гликолиза превосходит скорость превращений в цикле трикарбоновых кислот и в дыхательной цепи. Аминокислоты происходят из белков, поступающих с пищей, а при голодании образуются в результате распада белков скелетных мышц. В результате гидролиза триацилглицеролов в жировых клетках образуются глицерол и жирные кислоты. Глицерол служит предшественником глюкозы, тогда как жирные кислоты не могут превращаться в организме животных в глюкозу. По пути глюконеогенеза происходит превращение пирувата в глюкозу. Включение метаболитов в этот путь происходит в основном на уровне пирувата, оксалоацетата и дигидроксиацетонфосфата. Главным местом глюконеогенеза служит печень. Этот процесс протекает также в коре почек, но общее количество глюкозы, образующейся в почках, составляет лишь 1/10 такового и печени, что объясняется меньшей массой почечной ткани. Очень незначительный

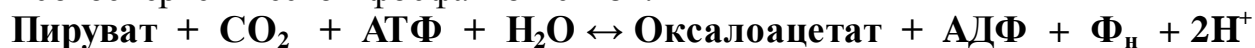
глюконеогенез имеет место в мозгу, а также в скелетной и сердечной мышцах. Скорее всего глюконеогенез в печени и почках обеспечивает такое содержание глюкозы в крови, при котором мозг и мышцы могут извлекать из крови достаточные количества глюкозы для удовлетворения своих метаболических потребностей.

При гликолизе глюкоза превращается в пируват, при глюконеогенезе пируват превращается в глюкозу.

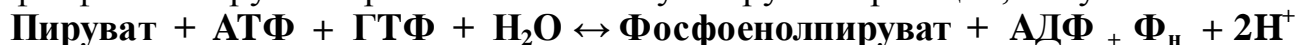
Однако глюконеогенез - это отнюдь не обращение гликолиза. Он должен идти по иному пути, поскольку термодинамическое равновесие гликолиза сдвинуто далеко в сторону образования пирувата. В обычных условиях, существующих в клетках, фактическое значение ΔG для образования пирувата из глюкозы составляет около -20 ккал/моль. Уменьшение свободной энергии при гликолизе происходит в основном на трех необратимых стадиях, катализируемых гексокиназой, фосфофруктокиназой и пируваткиназой.

Путь глюконеогенеза обходит эти фактически необратимые реакции гликолиза при помощи следующих новых этапов:

Фосфоенолпируват образуется из пирувата через оксалоацетат. Вначале происходит карбоксилирование пирувата в оксалоацетат с потреблением одной молекулы АТФ. Затем оксалоацетат подвергается декарбоксилированию и фосфорилированию с образованием фосфоенолпирувата за счет второй высокоэнергетической фосфатной связи.



Первая реакция катализируется пируват-карбоксилазой, вторая - фосфоенолпируват-карбоксикиназой. Суммируя эти реакции, получается



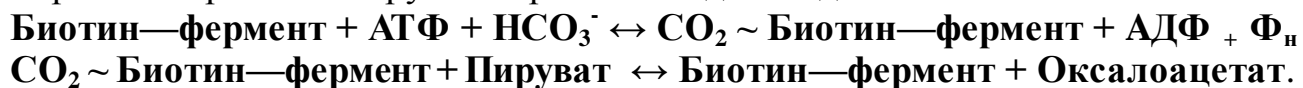
Данный путь образования фосфоенолпирувата из пирувата термодинамически выгоден, поскольку ΔG^0 равно + 0,2 ккал/моль, в отличие от + 7,5 ккал/моль для реакции, катализируемой пируваткиназой. Это значительно более благоприятное значение ΔG^0 обусловлено участием в процессе дополнительной высокоэнергетической фосфатной связи. Кроме того именно через оксалоацетат в реакции глюконеогенеза вступают глюкогенные аминокислоты. Их углеродные скелеты поступают в цикл трикарбоновых кислот, окисляются до оксалоацетата, возможно именно поэтому существует цепь реакций регенерации оксалоацетата, хотя естественно это не единственная причина. Так как практически все реакции глюконеогенеза происходят в цитозоле, пируваткарбоксилаза располагается в митохондриальном матриксе, необходимо транспортировать оксалоацетат в гиалоплазму, в данном процессе как «надстройка» участвует малатный челночный механизм который также необходим.

Обнаружение того факта, что в митохондриях происходит образование оксалоацетата из пирувата, привело Мертона Аттера (Merton Utter) к открытию в 1960 г. пируват-карбоксилазы. Этот фермент представляет особый интерес из-за его каталитических и аллостерических свойств. Пируваткарбоксилаза содержит ковалентно присоединенную простетическую группу, биотин,

который функционирует в качестве переносчика активированного CO_2 . Карбоксильный конец биотина связан амид-ной связью с ϵ -аминогруппой специфического остатка лизина.

Заметим, что биотин присоединен к пируват-карбоксилазе длинной гибкой цепью, сходной с цепью, связывающей липоамид в пируват-дегидрогеназном комплексе.

Карбоксилирование пирувата протекает в две стадии:



Карбоксильная группа в промежуточном продукте карбоксибиотин—фермент связана с атомом N-1 биотинового кольца.

В этом промежуточном продукте карбоксильная группа активирована. ΔG^0 для ее отщепления



составляет — 4,7 ккал/моль, что обуславливает способность карбоксибиотина к переносу CO_2 на акцепторы без дополнительного потребления свободной энергии. Активированная карбоксильная группа переносится затем с карбоксибиотина на пируват с образованием оксалоацетата. Длинная гибкая цепь между биотином и ферментом сообщает этой простетической группе способность поворачиваться от одного активного центра фермента (АТР-бикарбонатный участок) к другому (пируватному участку).

Пируват-карбоксилаза активируется при участии ацетил-СоА

Активность пируват-карбоксилазы зависит от присутствия ацетил-СоА. В отсутствие связанного с ферментом ацетил-СоА (или другого близкого к нему ацил-СоА) биотин не карбоксилируется. Вторая частичная реакция не зависит от ацетил-СоА. Аллостерическая активация пируват-карбоксилазы при участии ацетил-СоА представляет собой важный физиологический механизм контроля. Оксалоацетат, продукт пируват-карбоксилазной реакции, является одновременно и стехиометрическим промежуточным продуктом глюконеогенеза, и каталитическим промежуточным продуктом цикла трикарбоновых кислот. Высокое содержание ацетил-СоА служит сигналом необходимости большего количества оксалоацетата. Если имеет место избыток АТФ, оксалоацетат потребляется в процессе глюконеогенеза. В условиях недостатка АТФ оксалоацетат включается в цикл трикарбоновых кислот, конденсируясь с ацетил-СоА.

Таким образом, пируват-карбоксилаза не только имеет важное значение для глюконеогенеза, но играет также критическую роль в поддержании необходимой концентрации промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот. Указанные промежуточные продукты должны все время восполняться, поскольку они потребляются при некоторых биосинтетических реакциях, например при синтезе гема. Эта роль пируват-карбоксилазы получила название анаплеротической, что означает восполняющая, компенсирующая.

Пируват-карбоксилаза - митохондриальный фермент, тогда как другие ферменты глюконеогенеза находятся в цитоплазме. Оксалоацетат, продукт пируват-карбоксилазной реакции, переносится через митохондриальную мембрану в форме малата.

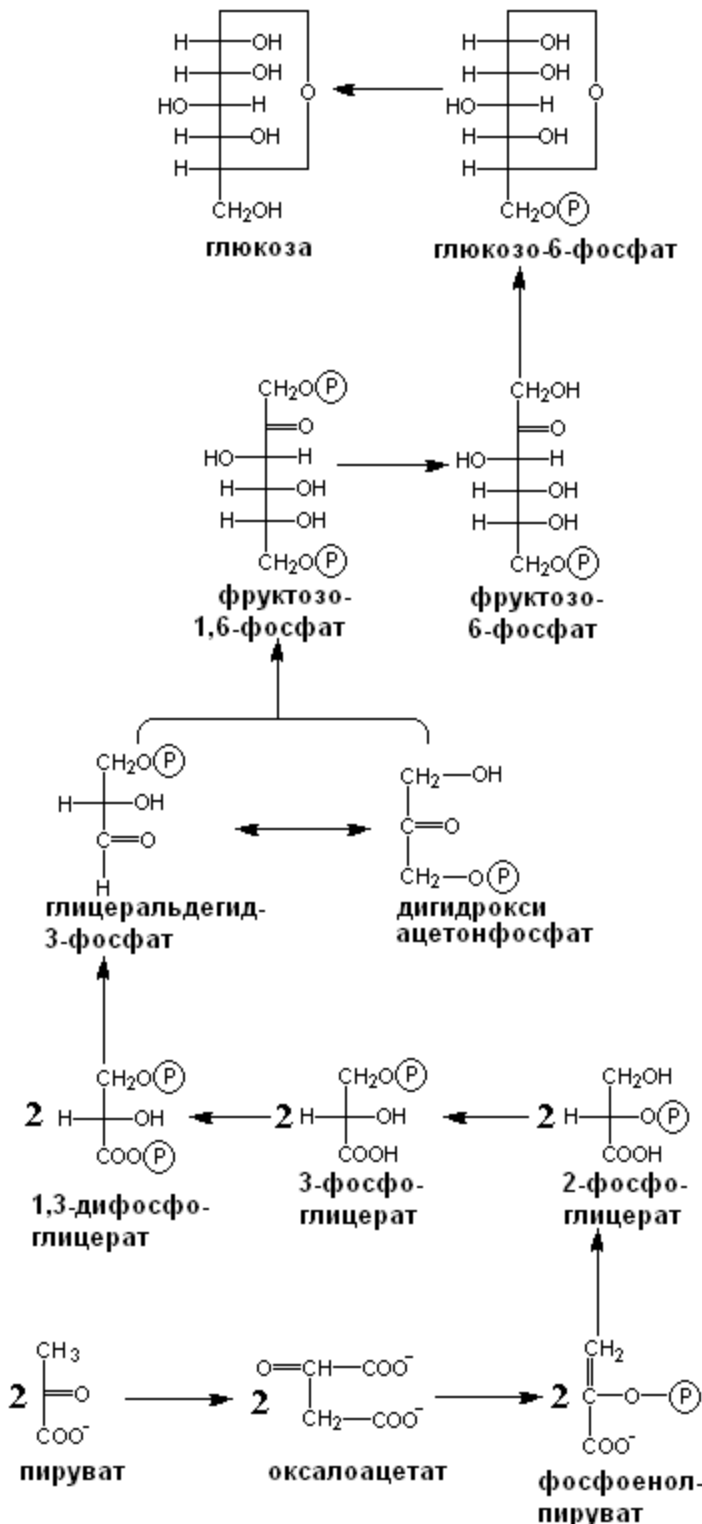


Рисунок 10: Схема реакций глюконеогенеза. Дополнительные продукты и ферменты указаны в в тексте

фосфоглицерат, в ходе данной реакции происходит присоединение воды. Эта реакция является обратной реакцией гликолиза, которая обратима, а ферменты

мембрану в форме малата. Его восстановление в малат происходит в митохондриях под действием NADH -зависимой малат-дегидрогеназы.

Образующийся при этом малат транспортируется переносчиком через митохондриальную мембрану и вновь окисляется в оксалоацетат NAD^+ -зависимой малат-дегидрогеназой цитозоля.

Оксалоацетат подвергается в цитозоле одновременно декарбоксилированию и фосфорилированию под действием

фосфоенолпируват-карбоксикиназы.

На этой стадии происходит отделение CO_2 , присоединившегося к пирувату под действием пируват-карбоксилазы.

Реакция фосфорилирования становится энергетически возможной благодаря одновременному декарбоксилированию.

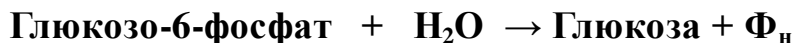
Процессы декарбоксилирования часто приводят в движение реакции, которые в ином случае были бы высокоэндергоническими.

Фосфоенолпируват под действием енолазы превращается в 2-

могут катализировать как прямую, так обратную реакцию. 2-фоглицерат под действием изомеразы превращается в 3-фосфоглицерат, снова обратная реакция гликолиза, катализируемая ферментом гликолиза. Под действием 3-фосфоглицераткиназы происходит перенос фосфатной группы с АТФ на 3-фосфоглицерат, и в результате образуется 1,3-бифосфоглицерат, реакция формально является обратной реакции гликолиза, но фермент другой. Затем под действием глицеральдегидфосфатдегидрогеназы происходит восстановление 1,3-бифосфоглицерата до глицероальдегид-3-фосфата. Донором протонов и электронов является молекула NADH, которая окисляется до NAD⁺. Фосфатная группа с 1,3-бифосфоглицерата отщепляется в раствор. Затем под действием триозофосфат изомеразы одна из молекул глицероальдегид-3-фосфата превращается в диоксиацетонфосфат. Это тоже обратимая реакция гликолиза. В результате глицероальдегид-3-фосфат и диоксиацетонфосфат конденсируются в 1,6-фруктозобифосфат под действием альдолазы, это тоже реакция обратная гликолизу, аналогичная реакция происходит и в цикле Кальвина (природа в очередной раз подтверждает тот факт, что нет необходимости изобретать что-то новое, когда уже существует готовое решение). Фруктозо-6-фосфат образуется из фруктозо-1,6-бисфосфата путем гидролиза фосфатного эфира при С-1. Этот экзергонический гидролиз катализируется фруктозо-1,6-бисфосфатазой.



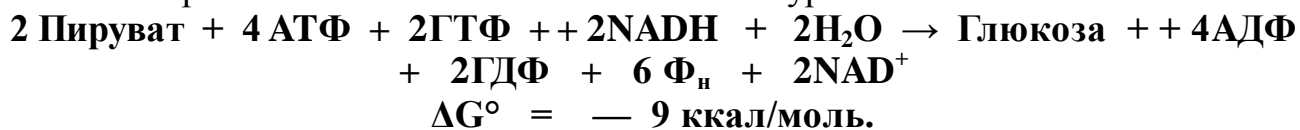
Затем фруктозо-6-фосфат изомеризуется под действием изомеразы до глюкозо-6-фосфата. Это тоже реакция обратная гликолиза. Глюкоза образуется путем гидролиза глюкозо-6-фосфата, реакции, катализируемой глюкозо-6-фосфатазой.



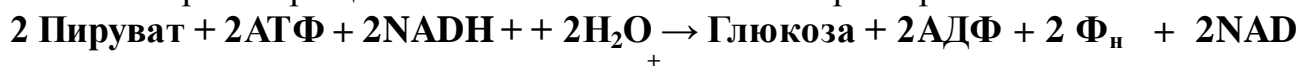
Глюкозо-6-фосфатаза связана с эндоплазматическим ретикулумом и действует на субстрат, локализованный в цитозоле. В мозгу и мышцах этого фермента нет, и поэтому глюкоза не выводится из этих органов.

Энергетика глюконеогенеза

Стехиометрия глюконеогенеза описывается уравнением



Стехиометрия обращения гликолиза носит иной характер:



Необходимо заметить, что для синтеза глюкозы из пирувата путем глюконеогенеза используется шесть высокоэнергетических фосфатных связей, тогда как в процессе превращения глюкозы в пируват при гликолизе образуются только две молекулы АТФ. Таким образом, избыточная «цена» глюконеогенеза равна четырем высокоэнергетическим фосфатным связям в расчете на одну молекулу глюкозы, синтезируемой из пирувата. Для превращения энергетически неблагоприятного процесса (обращение гликолиза, $\Delta G^\circ = + 20$

ккал/моль) в энергетически благоприятный (глюконеогенез, $\Delta G^\circ = -9$ ккал/моль) требуются четыре лишние высокоэнергетические фосфатные связи. Рассматривая это энергетическое различие между гликолизом и глюконеогенезом под другим углом зрения, напомним, что вклад одного эквивалента АТФ изменяет константу равновесия реакции примерно в 10^8 раз. Следовательно, вклад четырех дополнительных высокоэнергетических связей при глюконеогенезе изменяет эту константу в 10^{32} раз, - что делает превращение пирувата в глюкозу термодинамически выгодным.

Регуляция глюконеогенеза

Глюконеогенез и гликолиз координируются таким образом, что когда активность одного из этих путей находится на относительно низком уровне, другой путь является высокоактивным. В случае одновременной высокой активности обеих последовательностей реакций происходил бы гидролиз четырех Фн (два АТФ + два ГТФ) на каждый цикл реакции. В условиях, существующих в клетке, и гликолиз, и глюконеогенез представляют собою высокоэкзергонические процессы, так что термодинамических барьеров для осуществления таких циклов нет. Тот факт, что активность этих двух процессов никогда не достигает высокого уровня одновременно, обуславливается скорее всего соответствующей регуляцией отдельных ферментов каждого процесса. Например, АМФ стимулирует фосфофруктокиназу, но ингибирует фруктозо-1,6-бисфосфатазу. Цитрат оказывает на эти ферменты противоположное действие. Следовательно, фосфорилирование фруктозо-6-фосфата, этап, лимитирующий скорость гликолиза, усиливается при низком энергетическом заряде клетки. Напротив, при высоком энергетическом заряде и избытке промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот происходит гидролиз фруктозо-1,6-бисфосфата и стимулируется глюконеогенез. Пируваткиназа и пируваткарбоксилаза также регулируются реципрокно. Фруктозо-1,6-бисфосфат стимулирует, а АТФ ингибирует пируваткиназу, тогда как пируваткарбоксилаза стимулируется ацетил-СоА и подавляется АДФ. Таким образом, обогащение клеток печени топливными молекулами и АТФ благоприятствует превращению пирувата в фосфоенолпируват и глюконеогенезу,

Субстратные циклы и их функция

Пара реакций, таких, как фосфорилирование фруктозо-6-фосфата во фруктозо 1,6-бисфосфат и обратный гидролиз последнего до фруктозо-6-фосфата, называется субстратным циклом. Как уже упоминалось, в большинстве клеток эти реакции никогда не осуществляются с максимально возможной скоростью одновременно в силу реципрокного аллостерического контроля. Однако исследования с применением изотопной метки показали, что в ходе глюконеогенеза имеет место фосфорилирование фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-бисфосфат. Ограниченное функционирование таких циклов обнаружено и в случае других пар противоположно направленных необратимых реакций. Наличие таких циклов объясняли несовершенством метаболической регуляции, и субстратные циклы называли иногда бесполезными, или

холостыми, циклами. Однако в настоящее время представляется более вероятным, что субстратные циклы имеют определенное биологическое значение. Одна из возможностей состоит в том, что эти циклы амплифицируют биологические сигналы. Предположим, что скорость превращения А в В равняется 100, а В в А-90, так что начальный «чистый» выход реакции составляет 10. Примем, что аллостерический эффектор повышает скорость реакции $A \rightarrow B$ на 20% (до 120) и реципрокно снижает скорость реакции $B \rightarrow A$ на 20% (до 72). Новый «чистый выход» равен 48. Таким образом, изменение на 20% скоростей противоположно направленных реакций приводит к повышению «чистого выхода» процесса на 480%. Другая потенциальная биологическая роль субстратных циклов состоит в том, чтобы генерировать тепло, продуцируемое при гидролизе АТФ. Ярким примером такого феномена служат шмели, которым для полета необходимо поддерживать температуру грудного отдела около 30°C. Шмели способны поддерживать такую высокую температуру грудного отдела и осуществлять поиск пищи даже при температуре всего 10°C, потому что их летательная мышца обладает высокой активностью и фосфофруктокиназы, и фруктозобисфосфатазы. Поскольку эта фруктозобисфосфатаза не ингибируется АМФ, есть основание думать, что данный фермент специально предназначен для генерирования тепла. В летательной мышце медоносной пчелы в отличие от мышцы шмеля фруктозобис-фосфатазная активность почти отсутствует, и в соответствии с этим пчела не может летать при низкой окружающей температуре. Слишком большая скорость цикла фруктозо-6-фосфат \leftrightarrow фруктозо-1,6-бисфосфат может вызывать избыточное образование тепла. Такое состояние, называемое злокачественной гипертермией, вызывается анестетиком галотаном у чувствительной к нему линии свиней.

Основным сырьем для глюконеогенеза является лактат, образованный активной скелетной мышцей. В сокращающейся скелетной мышце при анаэробных условиях скорость образования пирувата в ходе гликолиза превышает скорость его окисления в цикле трикарбоновых кислот. Более того, скорость образования NADH при гликолизе выше, чем скорость его окисления в дыхательной цепи. Продолжение гликолиза зависит от наличия NAD^+ для окисления глицеральдегид-3-фосфата, а генерирование NAD^+ осуществляется лактат-дегидрогеназой, которая, восстанавливая пируват в лактат, окисляет NADH в NAD^+ .

Лактат - это тупик в метаболизме. Для дальнейших метаболических превращений он должен быть сначала снова превращен в пируват. Единственная цель восстановления пирувата в лактат-это регенерирование NAD^+ , необходимого для осуществления гликолиза в активной скелетной мышце. Плазматические мембраны большинства клеток обладают высокой проницаемостью для лактата и пирувата. Оба соединения диффундируют из активной скелетной мышцы в кровь и переносятся в печень. При этом переносится значительно больше лактата, чем пирувата, из-за высокого значения отношения $[NADH]/[NAD^+]$ в сокращающейся скелетной мышце. Лактат, поступивший в печень, окисляется в пируват, чему благоприятствует низкое отношение $[NADH]/[NAD^+]$ в цитозоле печени, Пируват затем

превращается в печени в глюкозу по пути глюконеогенеза. Глюкоза поступает далее в кровь и поглощается скелетными мышцами, Таким образом печень снабжает глюкозой сокращающиеся мышцы, которые получают АТФ в результате гликолитического превращения глюкозы в лактат. Затем происходит синтез глюкозы из лактата в печени. Эти превращения составляют цикл Кори., Описанные процессы облегчаются различиями в каталитических свойствах лактат-дегидрогеназ в мышцах и печени. Лактат-дегидрогеназа представляет собою тетрамер из субъединиц мол. массой 35 кДа. Существуют два вида полипептидных цепей, обозначаемых М и Н, которые могут образовывать пять типов тетрамеров: M_4 , M_3N_1 , M_2N_2 , M_1N_3 и N_4 . Эти формы называются изоферментами (или изозимами). Изофермент M_4 обладает значительно большим сродством к пирувату, чем изофермент N_4 , остальные изоферменты имеют промежуточную активность. Изоферменты лактат-дегидрогеназы подвергались интенсивному изучению, однако причина существования множественных форм фермента до сих пор является загадкой.

Полученная в результате глюкоза или переправляется в другие органы и ткани для обеспечения энергетического обмена. Как известно у поступившей в организм глюкозы не один путь – катаболитический. Глюкоза используется в построении других моносахаридов и их производных. Но прежде всего она запасается в виде гликогена – основного запасяющего полисахарида животных, грибов и бактерий.

Биосинтез гликогена

У животных гликоген синтезируется практически во всех тканях, но особенно активны в этом отношении печень и скелетные мышцы. Начинается синтез гликогена из свободной глюкозы с гексокиназной реакции, т.е. с фосфорилирования глюкозы, в результате которого образуется глюкозо-6-фосфат. На следующем этапе глюкозо-6-фосфат обратимо превращается в глюкозо-1-фосфат в реакции, катализируемой фосфоглюкомутазой. Таким образом для синтеза гликогена необходимо активировать молекулу глюкозы и для этого также используется молекула АТФ. Далее следует ключевая реакция биосинтеза гликогена, отсутствующая в процессе его расщепления. Эта реакция представляет собой образование уридиндифосфатглюкозы (UDP-глюкозы), катализируемое глюкозо-1-фосфат-уридилтрансферазой. Реакция вынуждена идти слева направо под действием пирофосфатазы, гидролизующей пирофосфат (PP_i) до ортофосфата (P_i). Ранее было рассмотрено, что УДФ-глюкоза играет роль промежуточного продукта при синтезе витамина С, а также одной из активных форм при метаболизме моносахаридов. Она же служит и непосредственным донором глюкозильных групп при ферментативном образовании гликогена; перенос глюкозильных групп от УДФ-глюкозы на нередуцирующий конец разветвленной молекулы гликогена катализируется ферментом, который носит название гликоген-синтазы. В этой реакции образуется новая α (1→4)-связь между 1-м углеродным атомом добавляемого остатка глюкозы и 4-м углеродным атомом конечного остатка глюкозы данной боковой цепи гликогена. Общее равновесие этих трех реакций

сильно сдвинуто в сторону синтеза гликогена. Гликоген-синтазе требуется в качестве затравки α (1 \rightarrow 4)-полиглюкозная цепь, или ветвь молекулы гликогена, состоящая не менее чем из четырех глюкозных остатков, к которым фермент последовательно присоединяет глюкозильные группы с нередуцирующего конца. Роль УТФ- и УДФ-глюкозы в биосинтезе гликогена и многих других углеводов выяснил аргентинский биохимик Луис Лелуар. За эти работы он был удостоен в 1970 г. Нобелевской премии. Выше уже было показано, что другими примерами биосинтеза углеводов и их производных, в которых промежуточными продуктами тоже служили нуклеозид-дифосфатсахара. Гликоген-синтаза неспособна катализировать образование α (1 \rightarrow 6)-связей, находящихся в точках ветвления цепей гликогена. Существует специальный «ветвящий» фермент - гликозил-(4 \rightarrow 6)—трансфераза. Он катализирует перенос концевой олигосахаридного фрагмента, состоящего из 6 или 7 остатков глюкозы, с нередуцирующего конца одной из боковых цепей, насчитывающей не менее 11 остатков, на 6-гидроксильную группу остатка глюкозы той же или другой цепи гликогена, расположенного ближе к внутренней части молекулы, в результате чего образуется новая боковая цепь. После этого гликоген-синтаза может добавлять к этой боковой цепи новые остатки глюкозы. Биологический смысл ветвления заключается в повышении растворимости гликогена и в увеличении числа нередуцирующих концов у его молекул, что делает гликоген более доступным для действия гликоген-фосфорилазы и гликоген-синтазы. Крахмал в растениях синтезируется таким же путем, но донором глюкозильных групп служит при этом не УДФ-глюкоза, а АДФ-глюкоза.

У человека известен ряд генетических болезней, связанных с нарушением синтеза или распада гликогена. Одним из первых был описан случай хронического увеличения печени у 8-летней девочки, у которой наблюдались также различного рода нарушения обмена. Девочка умерла от гриппа. Вскрытие показало, что ее печень была в 3 раза больше нормы; в ней содержалось огромное количество гликогена: на долю его приходилось почти 40% сухого веса органа. Выделенный из печени гликоген в химическом отношении оказался вполне нормальным, однако, когда кусочек ткани печени гомогенизировали и инкубировали в буфере, этот гликоген так и остался интактным ни лактат, ни глюкоза не образовались. Когда же к гликогену добавили суспензию, приготовленную из ткани нормальной печени, то очень быстро произошло его расщепление до глюкозы. На основании этой биохимической проверки исследователи пришли к выводу, что у больной был нарушен процесс расщепления гликогена (эту болезнь часто называют болезнью Гирке по имени описавшего ее врача). Сначала предполагалось, что дефектным ферментом была в этом случае глюкозо-6-фосфатаза, поскольку больная печень не образовывала глюкозы; однако отсутствие образования лактата указывало на то, что дефект затрагивал либо гликоген-фосфорилазу, либо дебранчинг-фермент [α (1 \rightarrow 6)-глюкозидазу]. Позже исследователи укрепились во мнении, что в этом классическом случае была затронута именно α (1 \rightarrow 6)-глюкозидаза. Вследствие этого в молекулах гликогена, находящихся в печени, могли расщепляться с образованием глюкозы или лактата только внешние боковые цепи, и, значит,

накапливалось много молекул гликогена, которые уже не могли расщепляться дальше; в сущности, от молекулы оставалась ее «сердцевина» (или «остаточный декстрин»), но в этом случае необычно крупная. К настоящему времени известно не менее 12 различных видов врожденных нарушений синтеза или расщепления гликогена. В каждом из таких случаев затронут определенный фермент. Особо серьезные нарушения, обычно приводящие к смерти, связаны с недостаточностью глюкозо-6-фосфатазы, $\alpha(1\rightarrow 6)$ -глюкозидазы и ветвящего фермента. Летальны также генетические дефекты, затрагивающие пируваткарбоксилазу и фосфоенолпируваткарбокскиназу, т. е. ферменты, катализирующие ранние этапы глюконеогенеза.

Почти все ткани позвоночных содержат галактозилтрансферазу - фермент, катализирующий перенос D-галактозильных групп на N-ацетилглюкозамин. Эта реакция у животных является одним из этапов в биосинтезе углеводной части галактозосодержащих гликопротеинов. Однако в период лактации D-галактоза в молочной железе играет роль предшественника в другом биосинтетическом процессе, а именно в синтезе лактозы, или молочного сахара, который представляет собой дисахарид D-галактозы и D-глюкозы. В лактирующей молочной железе галактозил-трансфераза участвует в синтезе лактозы весьма необычным образом. Во время беременности в молочной железе, как и в большей части других тканей, присутствует галактозилтрансфераза, очень активная, если акцептором галактозильных групп служит N-ацетилглюкозамин, и почти совсем неактивная, если роль акцептора играет D-глюкоза. Однако после родов, с началом лактации, специфичность галактозилтрансферазы меняется: теперь она катализирует с очень большой скоростью перенос D-галактозильных групп на D-глюкозу, что приводит к образованию лактозы. Этот «новый» фермент называют лактозосинтазой. Изменение специфичности галактозилтрансферазы вызывается образованием особого присутствующего в молоке белка - α -лактальбумина. Функция α -лактальбумина долгое время была неизвестной. Теперь выяснилось, что он представляет собой модификатор фермента; синтез α -лактальбумина в молочной железе, регулируемый гормонами, вызывающими лактацию, приводит к образованию лактальбумин-галактозилтрансферазного комплекса, т.е. лактозосинтазы. Таким образом, включение синтеза лактозы в молочной железе под действием гормона происходит в результате образования особой субъединицы лактозосинтазы, изменяющей специфичность фермента

Синтез липидов

Липиды — это группа соединений с гидрофобными свойствами. Большинство липидов содержат в составе молекул жирные кислоты. Жирные кислоты не только один из основных компонентов большинства липидов, но и один из основных источников энергии при окислении триацилглицеридов (основной источник энергии у животных). Поэтому можно считать, что процессы биосинтеза жирных кислот являются очень важным аспектом в процессах анаболизма.

Биосинтез жирных кислот

Путь синтеза жирных кислот - это отнюдь не обращение пути их расщепления. Он представляет собою новую последовательность реакций, что служит еще одним примером различий путей синтеза и расщепления в биологических системах. Рассмотрим некоторые важные особенности пути биосинтеза жирных кислот.

1. Синтез происходит в цитозоле в отличие от распада, который протекает в митохондриальном матриксе.

2. Промежуточные продукты синтеза жирных кислот ковалентно связаны с сульфгидрильными группами ацилпереносщего белка (АПБ), тогда как промежуточные продукты расщепления жирных кислот связаны с коферментом А.

3. Многие ферменты синтеза жирных кислот у высших организмов организованы в мультиферментный комплекс, называемый синтетазой жирных кислот. В противоположность им ферменты, катализирующие расщепление жирных кислот, по-видимому, не склонны к ассоциации.

4. Растущая цепь жирной кислоты удлиняется путем последовательного присоединения двухуглеродных компонентов, происходящих из ацетил-СоА. Активированным донором двухуглеродных компонентов на стадии элонгации служит малонил-АПБ. Реакция элонгации запускается высвобождением CO_2 .

5. Роль восстановителя при синтезе жирной кислоты выполняет NADPH,

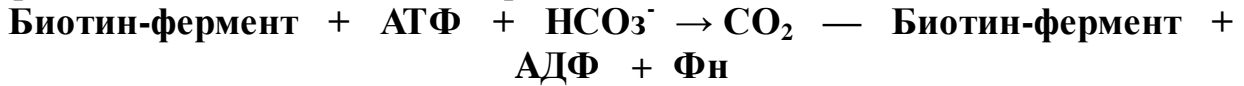
6. Элонгация под действием комплекса синтетазы жирных кислот останавливается на этапе образования пальмитата (C_{16}). Дальнейшая элонгация и введение двойных связей осуществляются другими ферментными системами.

Синтез малонилкофермента А, промежуточного продукта биосинтеза жирных кислот

Обнаруженная Сэли Уейкил (Salih Wakil) потребность в бикарбонате для биосинтеза жирных кислот оказалась ключом к раскрытию механизма этого процесса. Действительно, синтез жирных кислот начинается с карбоксилирования ацетил-СоА в малонил-СоА. Эта необратимая реакция представляет собою решающий этап в синтезе жирных кислот.

Синтез малонил-СоА катализируется ацетил-СоА-карбоксилазой, содержащей в качестве простетической группы биотин. Карбоксильная группа биотина ковалентно присоединяется к ϵ -аминогруппе остатка лизина, как это имеет место в пируваткарбоксилазе. Еще одно общее свойство ацетил-СоА-карбоксилазы и пируваткарбоксилазы заключается в том, что карбоксилирование ацетил-СоА происходит в две стадии. Сначала за счет АТФ образуется в качестве промежуточного продукта карбоксибиотин. Активированная CO_2 -группа в составе этого промежуточного продукта затем

переносится на ацетил-СоА с образованием малонил-СоА.



$\text{СО}_2 - \text{Биотин-фермент} + \text{Ацетил-СоА} \rightarrow \text{Малонил-СоА} + \text{Биотин-фермент}$.
Связывание субстратов с ферментом и освобождение продуктов происходят со специфической последовательностью. Ацетил-СоА - карбоксилаза

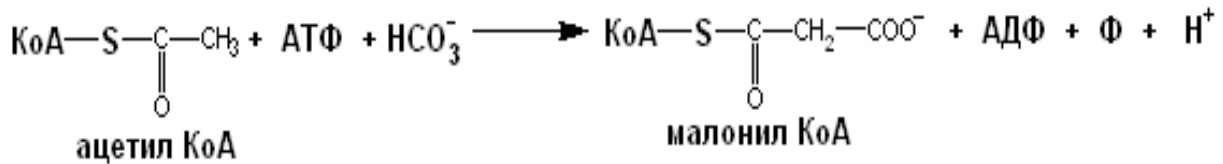


Рисунок 11: Схема реакции синтеза малонил-СоА

представляет пример механизма реакции по типу «пинг-понга», когда освобождение одного или более продуктов реакции происходит до того, как все субстраты будут связаны. Ацетил-СоА-карбоксилаза из *E. coli* была разделена на субъединицы, катализирующие частичные реакции. Биотин ковалентно присоединяется к небольшому белку (22 кДа), называемому карбоксибиотин-переносящий белок. Карбоксилирование биотинового компонента в образованном комплексе катализируется второй субъединицей - биотинкарбоксилазой. Третьим компонентом системы является транскарбоксилаза, которая катализирует перенос активированного CO_2 от

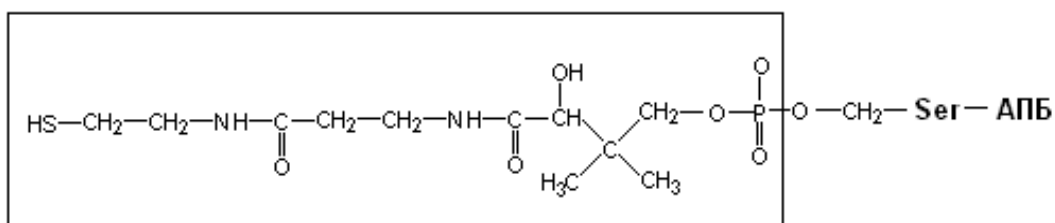


Рисунок 12: Структура коэнзима А и ацилпереносящего белка

карбоксибиотина на ацетил-СоА. Длина и гибкость связи между биотином и переносящим его белком обуславливают возможность перемещения

активированной карбоксильной группы от одного активного центра ферментного комплекса к другому, как это имеет место в пируват-карбоксилазе. У эукариот ацетил-СоА-карбоксилаза существует в виде лишённого ферментативной активности протомера (450 кДа) или в виде активного нитевидного полимера. Их взаимопревращение регулируется аллостерически, как и следовало ожидать, поскольку ацетил -Со А - карбоксилаза катализирует первый решающий этап в синтезе жирных кислот. Ключевым аллостерическим активатором служит цитрат, который сдвигает равновесие в сторону активной волокнистой формы фермента. Оптимальная ориентация биотина по отношению к субстратам достигается в волокнистой форме. В противоположность цитрату пальмитоил-СоА сдвигает равновесие в сторону неактивной протомерной формы. Таким образом, пальмитоил-СоА, конечный продукт, ингибирует первый решающий этап в биосинтезе жирных кислот. Регуляция ацетил-СоА-карбоксилазы у *E.coli* резко отличается от таковой у эукариот. У бактерий жирные кислоты являются, прежде всего, предшественниками фосфолипидов, а не резервным топливом, и поэтому контроль их синтеза носит другой характер. Цитрат не оказывает действия на ацетил-СоА-карбоксилазу *E.coli*. Активность транскарбоксилазного компонента системы регулируется гуаниновыми нуклеотидами, которые координируют синтез жирных кислот с ростом и делением бактерий.

П. Рой Вагелос (P. Roy Vagelos) обнаружил, что промежуточные продукты синтеза жирных кислот связаны с ацилпереносящим белком (АПБ), а именно с сульфгидрильным концом фосфопантетеиновой группы. При расщеплении жирных кислот этот компонент является частью СоА, тогда как при их синтезе он связан с остатком серина в АПБ. Эту одиночную полипептидную цепь из 77 остатков можно рассматривать как гигантскую простетическую группу, «макро-СоА».

Синтез жирных кислот идет циклически, в ходе каждого цикла происходит присоединение двухуглеродного фрагмента.

Цикл элонгации в синтезе жирных кислот

Ферментная система, катализирующая синтез насыщенных длинноцепочечных жирных кислот из ацетил-СоА, малонил-СоА и NADPH, называется синтетазой жирных кислот. У высших организмов она присутствует в виде мультиферментного комплекса. В отличие от этого у бактерий ферментные компоненты синтетаз жирных кислот бывают диссоциированы при разрушении клеток. Доступность этих изолированных ферментов облегчила изучение стадий синтеза жирных кислот. На самом деле реакции, обеспечивающие синтез жирных кислот у высших организмов, очень сходны с таковыми у бактерий.

Фаза элонгации в синтезе жирных кислот начинается с образования ацетил-АПБ и малонил-АПБ. Эти реакции катализируются ацетил-трансацилазой и малонил-трансацилазой.



Малонил-трансацилаза высокоспецифична, тогда как ацетил-трансацилаза может переносить и ацильные группы, отличные от ацетильного компонента, хотя и со значительно меньшей скоростью. Жирные кислоты с нечетным числом углеродных атомов синтезируются, начиная с пропионил-АПБ, который в свою очередь образуется из пропионил-СоА под действием ацетил-трансацилазы.

Ацетил-АПБ и малонил-АПБ взаимодействуют с образованием ацетоацетил-АПБ. Эта реакция конденсации катализируется ацил-малонил-АПБ-конденсирующим ферментом.

Ацетил-АПБ + Малонил-АПБ → Ацетоацетил-АПБ + АПБ + CO₂.
 В приведенной реакции конденсации происходит образование четырехуглеродного компонента из двухуглеродного и трехуглеродного компонентов и высвобождается CO₂. Почему четырехуглеродный компонент

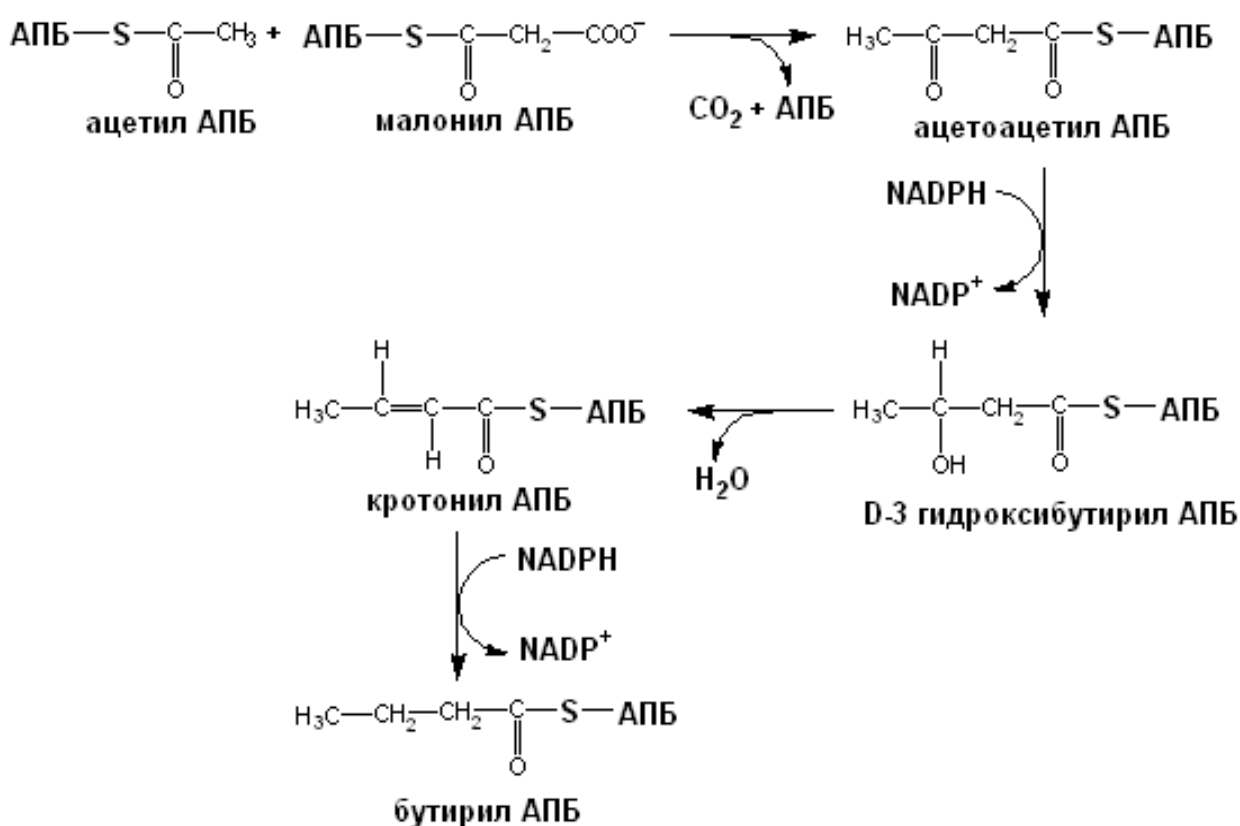
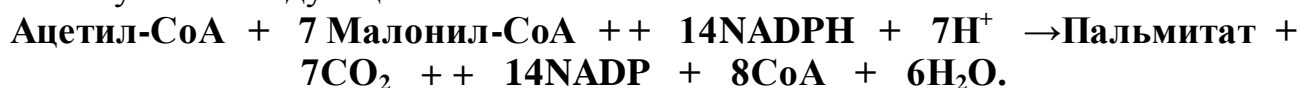


Рисунок 13: Схема реакций цикла синтеза жирной кислоты. Ферменты, участвующие в процессе, указаны в тексте

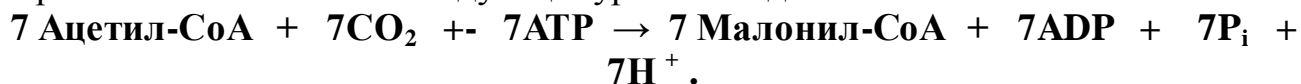
образуется не из двух двухуглеродных фрагментов? Иными словами, почему в качестве реагентов выступают ацетил-АПБ и малонил-АПБ, а не две молекулы ацетил-АПБ? Ответ заключается в том, что равновесие реакции чрезвычайно неблагоприятно для синтеза ацетоацетил-АПБ из двух молекул ацетил-АПБ. Напротив, равновесие реакции благоприятно для участия в этом синтезе малонил-АПБ, поскольку декарбоксилирование последнего приводит к существенному снижению свободной энергии. В действительности, реакция конденсации запускается АТФ, хотя АТФ и не принимает в ней прямого участия, а используется для образования богатого энергией субстрата при

карбоксилировании ацетил-СоА в малонил-СоА. Свободная энергия, запасенная в малонил-СоА в результате реакции карбоксилирования, высвобождается при декарбоксилировании, сопровождающем образование ацетоацетил-АПБ. Хотя HCO_3^- требуется для синтеза жирных кислот, его углеродный атом не появляется в образующемся продукте. Все углеродные атомы жирных кислот, содержащих четное их количество, происходят из ацетил-СоА. Следующие три стадии синтеза жирных кислот состоят в восстановлении оксогруппы при С-3 в метиленовую группу. Сначала ацетоацетил-АПБ восстанавливается в D-3-гидроксибутирил-АПБ. Эта реакция отличается от соответствующей реакции при расщеплении жирных кислот двумя особенностями: 1) образуется преимущественно D-, а не L-эпимер и 2) восстанавливающим агентом служит NADPH, тогда как в качестве окисляющего агента при β -окислении используется NAD^+ . Это различие иллюстрирует общий принцип, согласно которому в реакциях биосинтеза расходуется NADPH, тогда как в результате энергодающих реакций происходит генерирование NADH. Далее D-3-гидроксибутирил-АПБ дегидратируется с образованием кротонил-АПБ, представляющего собою транс- Δ^2 -еноил-АПБ. Конечным этапом цикла является восстановление кротонил-АПБ в бутирил-АПБ. NADPH вновь играет роль восстановителя, тогда как в соответствующей реакции β -окисления окислителем служит FAD^+ . В результате последних трех реакций - восстановления, дегидратирования и второго восстановления происходит превращение ацетоацетил-АПБ в бутирил-АПБ, которое завершает первый цикл элонгации. Во втором цикле синтеза жирных кислот бутирил-АПБ конденсируется с малонил-АПБ, давая C_6 - β -оксоацил-АПБ. Эта реакция подобна конденсации ацетил-АПБ с малонил-АПБ в первом цикле, приводящей к образованию C_4 - β -оксоацил-АПБ. В результате восстановления, дегидратации и второго восстановления C_6 - β -оксоацил-АПБ превращается в C_6 -ацил-АПБ, который может вступать в третий цикл элонгации. Описанные циклы элонгации продолжаются вплоть до образования C_{16} -ацил-АПБ. Этот промежуточный продукт не может служить субстратом для конденсирующего фермента и гидролизует-ся с образованием пальмитата и АПБ.

Если полностью охарактеризовать суммарную формулу синтеза пальмитата, то получится следующее:



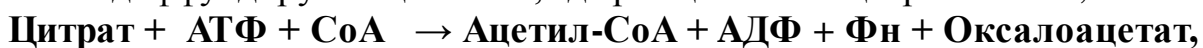
При этом использовано следующее уравнение для синтеза малонил-СоА:



Синтетазы жирных кислот у эукариот в отличие от таковых у бактерий представляют собою совершенно определенный мульти-ферментный комплекс, Комплекс, выделенный из дрожжей, обладает массой в 2300 кДа и на электронной микрофотографии имеет вид эллипсоида длиной 250 А и поперечным диаметром 210 А. Он состоит только из двух видов полипептидных цепей, каждая из которых кодируется одним геном. Субъединица А (185 кДа) содержит ацилпереносящий белок, конденсирующий фермент и β -оксоацил —

редуктазу, тогда как субъединица В (175 к Да) содержит ацетилтрансацилазу, малонил-трансацилазу, β -гидроксиацил — дегидратазу и еноилредуктазу. Синтетаза жирных кислот у млекопитающих (400 кДа) также образована двумя видами субъединиц, подобных таковым у дрожжей. На самом деле, многие мультиферментные комплексы эукариот состоят из полифункциональных белков, в которых различные ферменты ковалентно связаны в единую полипептидную цепь. Преимущество такой организации — возможность координирования синтеза различных ферментов. Кроме того, мультиферментный комплекс, состоящий из ковалентно соединенных ферментов, является более стабильным, чем комплекс, образованный нековалентными связями. Линен (Lippen) предположил, что удлиняющаяся цепь жирной кислоты переносится от АПБ к конденсирующему ферменту и обратно в каждом цикле элонгации. Первая транслокация освобождает место для транспортируемого малонильного компонента, вторая — происходит на стадии конденсации. Интересно отметить, что аналогичные транслокации имеют место при синтезе белков.

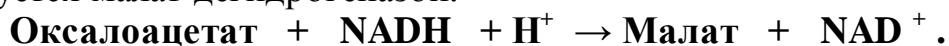
Синтез пальмитата требует наличия 8 молекул ацетил-СоА, 14 NADPH и 7 АТФ. Жирные кислоты синтезируются в цитозоле, тогда как ацетил-СоА образуется из пирувата в митохондриях. Следовательно, для синтеза жирных кислот необходимо, чтобы ацетил-СоА был перенесен из митохондрий в цитозоль. Однако митохондрии непроницаемы для ацетил-СоА. Напомним, что карнитин переносит только длинноцепочечные жирные кислоты. Обход этого барьера для ацетил-СоА осуществляется при помощи цитрата, переносящего ацетильные группы через внутреннюю митохондриальную мембрану. Цитрат образуется в митохондриальном матриксе путем конденсации ацетил-СоА и оксалоацетата. Затем он диффундирует в цитозоль, где расщепляется цитрат-лиазой;



Таким образом, ацетил-СоА и оксалоацетат переносятся из митохондрий в цитозоль с использованием одной молекулы АТФ.

Источники NADPH для синтеза жирных кислот

Оксалоацетат, образованный в результате переноса ацетильной группы в цитозоль, затем должен быть возвращен в митохондрии. Внутренняя митохондриальная мембрана непроницаема для оксалоацетата. Следовательно, необходимы реакции, идущие в обход этого препятствия. Очень важно, что в ходе этих реакций генерируется значительная часть NADPH, необходимого для синтеза жирных кислот. Первая реакция состоит в восстановлении оксалоацетата до малата с участием NADH. Она происходит в цитозоле и катализируется малат-дегидрогеназой.



Вторая реакция — окислительное декарбоксилирование малата NADP⁺-зависимой малат-дегидрогеназой (декарбоксилирующей), называемой также «яблочным» ферментом. С этой реакцией мы встречаемся впервые.



Образовавшийся пируват легко диффундирует в митохондрии, где он карбоксилируется в оксалоацетат под действием пируват-карбоксилазы.

Пируват + CO₂ + АТФ + H₂O → Оксалоацетат + АДФ + Фн +- 2H⁺
Суммируя эти три реакции, получается



Таким образом, на каждую молекулу ацетил-СоА, которая переходит из митохондрий в цитозоль, образуется одна молекула NADPH. Следовательно, при переходе восьми молекул ацетил-СоА в цитозоль в процессе синтеза пальмитата образуются восемь **NADPH**. Еще шесть NADPH, требующиеся для этого процесса, генерируются в пентозофосфатном пути.

Синтез других жирных кислот

Продуктом реакции, катализируемой синтетазой жирных кислот, является пальмитат. У эукариот жирные кислоты с более длинной цепью образуются путем реакций элонгации, которые катализируются ферментными системами, связанными с мембранами эндоплазматического ретикулула (известными также как микросомные системы). Двухуглеродные фрагменты присоединяются к карбоксильному концу и насыщенных, и ненасыщенных жирных кислот. Микросомные системы катализируют также введение двойной связи в СоА-производные жирных кислот с длинной цепью. Например, при превращении стеароил-СоА в олеоил-СоА введение двойной *цис*-Δ⁹-связи осуществляется оксидазой, использующей молекулярный кислород и NADH (или NADPH).

Из олеата в результате сочетания реакций элонгации и десатурации могут быть образованы различные ненасыщенные жирные кислоты. Например, олеат может быть удлинен до 20 :1 *цис*- Δ¹¹кислоты. У млекопитающих нет ферментов, катализирующих введение двойных связей в цепь жирной кислоты далее 9-го углеродного атома. Поэтому у них не могут синтезироваться линолеат (18:2 *цис*-Δ^{9,12}) и линоленат (18:3 *цис*- Δ^{9,12,15}). Линолеат и линоленат - две незаменимые жирные кислоты. Линолеат и линоленат, поступающие с пищей, служат исходными соединениями для синтеза ряда других ненасыщенных жирных кислот. Ненасыщенные жирные кислоты у млекопитающих являются производными пальмитолеата (16:1), олеата (18:1), линолеата (18:2) или линолената (18:3). По числу метиленовых углеродов между ω-СН₃-группой ненасыщенной жирной кислоты и ближайшей двойной связью можно определить ее предшественника.

Регуляция синтеза жирных кислот

Синтез жирных кислот достигает максимального уровня в условиях избытка углеводов и низкого содержания жирных кислот. При этом большую роль играют как механизмы кратковременного контроля, так и механизмы долговременного контроля. Наиболее важным кратковременным регулятором синтеза жирных кислот является концентрация цитрата в цитозоле. Как уже упоминалось, цитрат стимулирует ацетил-СоА—карбоксилазу, фермент, катализирующий решающий этап в синтезе жирных кислот. Содержание цитрата находится на высоком уровне, когда и ацетил-СоА, и АТФ присутствуют в избытке. Напомним, что изоцитрат-дегидрогеназа ингибируется высоким энергетическим зарядом. Следовательно, высокое содержание цитрата

говорит о доступности двухуглеродных фрагментов и АТФ для синтеза жирных кислот. Пальмитоил-СоА, который накапливается при избытке жирных кислот, является антагонистом цитрата в его действии на ацетил-СоА-карбоксилазу. Кроме того, пальмитоил-СоА подавляет функцию переносчика, осуществляющего транспорт цитрата из митохондрий в цитозоль, а также ингибирует генерирование NADPH под действием глюкозо-6-фосфат - дегидрогеназы.

Долговременная регуляция опосредуется изменениями скорости синтеза и деградации ферментов, участвующих в синтезе жирных кислот, Этот тип регуляции известен также как адаптивный контроль, У животных, получающих в течение нескольких дней после голодания богатую углеводами и бедную жиром диету, наблюдается резкое увеличение количества ацетил-СоА-карбоксилазы и синтетазы жирных кислот в печени.

Синтез липидов

Синтезом жирных кислот анаболизм липидов не ограничивается. Жирные кислоты практически не встречаются в свободном виде, за исключением эйкозаноидов.

Основными молекулами липидов являются глицеринсодержащие и

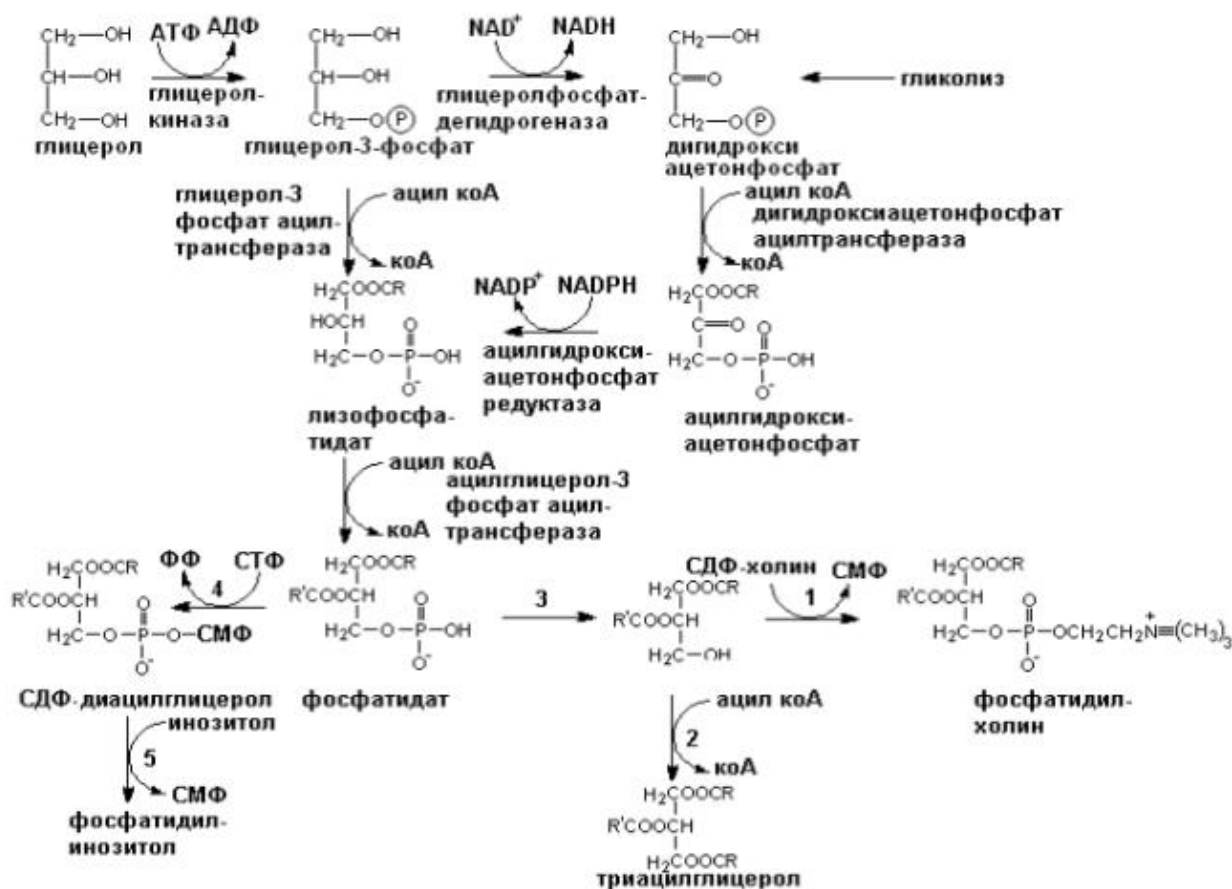


Рисунок 14: Схема реакций биосинтеза глицеринсодержащих липидов и фосфолипидов.

Синтез триацилглицеридов и фосфолипидов осуществляется сходным путем.

Перед образованием ацилглицеролов глицерол и жирные кислоты должны быть активированы при участии АТФ. Глицеролкиназа катализирует фосфорелирование глицерола, в результате образуется глицерол-3-фосфат. Глицеролтрифосфат может образовываться двумя путями. В ходе гликолиза он возникает из дигидроксиацетонфосфата под действием цитоплазматического NAD-зависимого фермента глицеролфосфатдегидрогеназы. Кроме того, глицеролфосфат может образоваться из глицерола под действием глицеролкиназы. Другими предшественниками триацил-глицеролов служат CoA-производные жирных кислот, образующиеся при помощи ацил-CoA-синтетазы. На первом этапе биосинтеза триацил-глицеролов происходит ацилирование двух свободных гидроксильных групп глицеролфосфата двумя молекулами Co-A-производных жирных кислот с образованием диацилглицерол-3-фосфата. Диацилглицерол-3-фосфат (чаще его называют фосфатидной кислотой) встречается в клетках лишь в следовых количествах, однако он является важным промежуточным продуктом в биосинтезе липидов. В ходе синтеза триацилглицеролов фосфатидат гидролизуется фосфатидат-фосфатазой с образованием 1,2-диацилглицерола. Диацилглицерол, взаимодействуя с третьей молекулой CoA-производной жирной кислоты, превращается затем в триацилглицерол. Формирование каждой эфирной связи триацилглицеролов требует значительного количества свободной энергии. Для того чтобы возникла эфирная связь, жирная кислота сначала должна активироваться путем образования эфира с Co-A; для этой реакции необходима энергия двух высокоэнергетических фосфатных связей, так как она протекает благодаря пирофосфатному расщеплению АТФ и последующему гидролизу образовавшегося пирофосфата.

Фосфатидная кислота также является предшественником и фосфолипидов. Фосфоглицеролы фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин - основные компоненты мембранных липидов, также синтезируются из 1,2-диацилглицеролов. В процессе формирования фосфоглицеролов к их молекулам присоединяются специфические «голова» в результате еще не рассмотренной нами промежуточной ферментативной реакции. В ходе синтеза фосфатидилэтанолamina фосфоэтанолaminная голова присоединяется к хвосту молекулы путем взаимодействия диацил-глицерола с цитидиндифосфатэтанолaminом, который образуется из трех предшественников: этанолamina, АТФ и цитидинтрифосфата. Вначале под действием этанолamin-киназы происходит образование фосфоэтанолamina. Фосфоэтанолamin реагирует затем с ЦТФ, образуя цитидиндифосфатэтанолamin и пирофосфат. Эту реакцию катализирует фосфоэтанолamin-цитидилтрансфераза. Собственно это участие ЦТФ в метаболизме липидов. Присоединение полярной головы к диацилглицеролу с образованием фосфатидилэтанолamina осуществляется при помощи фермента этанолamin-аминфосфотрансферазы: Подобно тому как АТФ переносит активированные фосфатные группы, а ЦДФ-глюкоза - глюкозильные группы, ЦДФ-этанолamin переносит активированные фосфоэтанолaminные группы. В данном случае мы видим еще один пример того, каким образом

нуклеотиды могут выполнять функцию переносчиков определенных химических группировок в метаболизме клеток. Цитидиновые нуклеотиды специфичны для данной реакции: никакие другие нуклеозид-5-трифосфаты не могут заменить ЦТФ в животных тканях. Ключевую роль цитидиновых нуклеотидов в биосинтезе липидов.

Сфингомиелины синтезируются другим путем. Сфингомиелины представляют собой фосфолипиды, в состав которых входят жирная кислота, фосфатная группа, холин и сложный аминспирт— сфингозин. Сфингомиелины не содержат глицерол. Сфингозин синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме. После активации путем взаимодействия с пиридоксальфосфатом аминокислота серии вступает в реакцию с пальмитоил-СоА. В результате этой реакции образуется 3-кетосфинганин и освобождается CO_2 . Сфингозин образуется после двух окислительно-восстановительных реакций, первая из которых протекает с участием NADPH в качестве донора водорода, а вторая катализируется флавопротеинсодержащим ферментом, подобным ацил-СоА-дегидрогеназе, участвующей в β -окислении. Церамид (N-ацилсфингозин) является интермедиатом в биосинтезе сфингомиелина и образуется при взаимодействии сфингозина с ацил-СоА. Ацильная группа чаще всего представлена длинноцепочечной насыщенной или моноеновой кислотой. Сфингомиелин образуется в результате реакции церамида с ЦДФ-холином или фосфатидилхолином. В последнем случае реакция аналогична одной из реакций биосинтеза фосфатидилхолина. Гликофинголипиды представляют собой гликолипиды, в состав которых входит церамид, состоящий из сфингозина и остатка жирной кислоты, и один или несколько остатков сахаров. Во многих гликофинголипидах обнаружены главным образом C_{24} -жирные кислоты, например в состав гликофинголипидов мозга входят лигноцериновая, цереброновая и нервоновая кислоты. Лигноцериновая кислота ($\text{C}_{23}\text{H}_{47}\text{COOH}$) синтезируется из ацетил-СоА. Цереброновая кислота является 2-гидроксипроизводным лигноцериновой кислоты, из которой она и образуется. Мононенасыщенная нервоновая кислота ($\text{C}_{23}\text{H}_{45}\text{COOH}$) образуется путем удлинения цепи олеиновой кислоты.

Простейшие гликофинголипиды—галактозилцерамид (GalCer) и глюкозилцерамид (GlcCer). Gal-Cer является главным липидом миелина, а GlcCer— основным гликофинголипидом мембран клеток других тканей и предшественником большинства более сложных гликофинголипидов.

Биосинтез гликофинголипидов катализируется ферментным препаратом, полученным из мозга молодых крыс. Уридиндифосфогалактозоэпимераза,

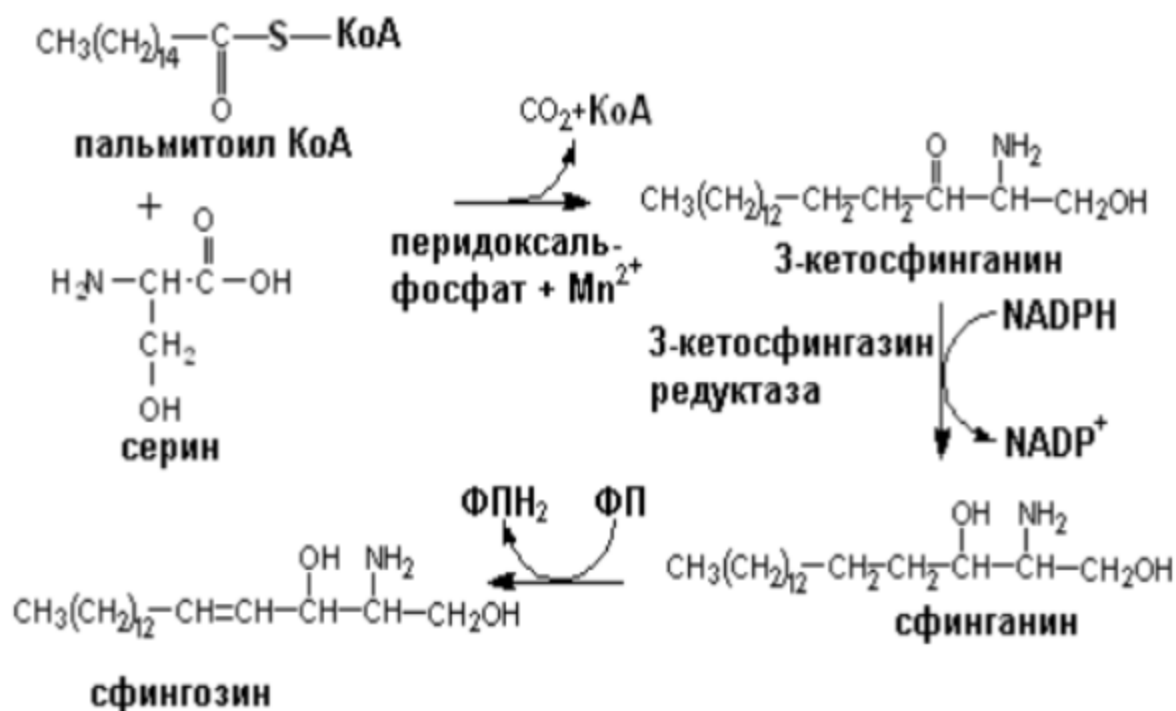


Рисунок 15: Схема реакций синтеза сфингозина

использующая в качестве субстрата уридин-дифосфатглюкозу (UDPGlc), катализирует эпимеризацию глюкозного фрагмента в галактозный; в результате образуется УДФ-галактоза (UDPGal). Реакция, происходящая в мозгу, подобна соответствующей реакции, протекающей в печени и молочной железе. Галактозилцерамид синтезируется из церамида и UDPGal. Сульфогалактозилцерамид образуется в результате реакции галактозилцерамида с 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфатом (ФАФС, «активный сульфат»). ФАФС участвует также в биосинтезе других суфолипидов, а именно суфо(галакто)глицеролипидов и суфостероидов. Ганглиозиды синтезируются из церамида путем последовательного присоединения активированных сахаров, поставляемых, например, UDPGlc и UDP-Gal, и одной из сиаловых кислот, как правило, N-ацетилнейраминовой кислоты. Таким образом, может образоваться большое число ганглиозидов с возрастающими молекулярными массами. Большинство ферментов, катализирующих перенос остатков сахаров от нуклеотидсахаров (гликозилтрансферазы), находятся в аппарате Гольджи. Ряд заболеваний характеризуется накоплением в избыточных количествах данных липидов в клетках, чаще всего в нервных. Эти заболевания можно разделить на 3 группы: 1) болезни, обусловленные истинной демиелинизацией нервных волокон, 2) сфинголипидозы, 3) лейкодистрофии. При рассеянном склерозе, который относится к первой группе заболеваний, наблюдается уменьшение содержания как фосфолипидов (в частности, этаноламинплазмалогена), так и сфинголипидов в белом веществе мозга; в результате белое вещество по составу становится похожим на серое. В

белом веществе обнаруживаются эфиры холестерина, отсутствующие в норме, а спинномозговая жидкость характеризуется повышенным содержанием фосфолипидов. Сфинголипидозами называют группу наследственных заболеваний, проявляющихся чаще всего в детском возрасте. Эти заболевания относятся к большой группе лизосомных болезней. Болезни накопления липидов характеризуются рядом постоянных признаков: 1) в тканях накапливаются сложные липиды, структурным компонентом которых является церамид; 2) скорость синтеза запасаемого липида сравнима со скоростью его биосинтеза у здоровых людей; 3) при этих заболеваниях наблюдается недостаток специфического фермента в лизосомах, необходимого для гидролиза липида; 4) степень снижения активности фермента во всех тканях одинакова. С учетом всех вышеизложенных признаков были разработаны специальные методы диагностики данных заболеваний. Стало возможным также выявлять гетерозиготных носителей дефектных генов, ответственных за развитие этих заболеваний, и определять сфинголипидострофию у плода. Множественная недостаточность сульфатаз приводит к накоплению сульфогалактозилцерамида, сульфостероидов и протеогликанов из-за одновременного недостатка ацилсульфатаз А, В, С и стероидсульфатазы.

Отдельный интерес представляет синтез холестерина. Холестерол - это не только важный компонент некоторых клеточных мембран и липопротеинов плазмы крови, но и предшественник многих других биологически важных стероидов-желчных кислот и различных стероидных гормонов. Так же как и длинноцепочечные жирные кислоты, холестерол синтезируется из ацетил-СоА, однако в этом случае ацетильные группы соединяются друг с другом иначе. Этот вывод был сделан на основе результатов экспериментов, в которых животным скармливали ацетат, меченный радиоактивным углеродом (^{14}C) по метальной группе, и ацетат, меченный тем же изотопом по карбоксильной группе. Из тканей животных, в пищу которых добавляли меченые молекулы этих двух типов, был выделен меченый холестерол. Путем его последовательного расщепления при помощи известных химических реакций были получены характерные продукты. Определение радиоактивности этих продуктов позволило установить места локализации в молекуле холестерина атомов углерода, происходящих из метальных и карбоксильных групп. Результаты этих пионерских экспериментов, проведенных Конрадом Блоком, Робертом Вудвордом и другими исследователями, показаны на рисунке. Полученная информация послужила ключом для выяснения последовательности ферментативных реакций в процессе биосинтеза холестерина, протекающего в несколько этапов. На первом этапе в результате трех приведенных ниже реакций образуется мевалоновая кислота. В ходе последующих реакций, составляющих второй этап биосинтеза холестерина, к мевалонату присоединяются три фосфатные группы, после чего фосфорилированный мевалонат теряет карбоксильную группу и два атома водорода; в результате получается Δ^3 -изопентенилпирофосфат - активированная форма изопреновой единицы. Шесть изопентенильных групп затем объединяются, теряя свои пирофосфатные группы, и образуют

углеводород сквален, состоящий из 30 атомов углерода, 24 из которых соединены в цепочку, а остальные 6 входят в состав метальных боковых групп. Впервые сквален был выделен из печени акул (рода *Squalus*). На третьем этапе биосинтеза холестерина происходит серия сложных ферментативных реакций, в результате которых линейная молекула сквалена превращается в циклическое соединение ланостерол, содержащее четыре типичных для стероидов конденсированных кольца. В ходе четвертой (заключительной) серии реакций ланостерол превращается в холестерол. За расшифровку этого необычного биосинтетического пути, наиболее сложного из всех известных, американец Конрад Блок, немец Феодор Линен и англичанин Джон Корнфорт были в 1961 г. удостоены Нобелевской премии. Регуляция биосинтеза холестерина - это также очень сложный процесс. Лимитирующей стадией служит реакция на раннем этапе биосинтеза холестерина - превращение гидроксиметилглутарил-СоА в мевалонат. Эту реакцию катализирует сложный регуляторный фермент - гидроксиметил-глутарил-СоА - редуктаза, активность которого в зависимости от условий может меняться на два порядка. Этот фермент ингибируется конечным продуктом данного биосинтетического пути - холестеролом, а также мевалонатом. Гидроксиметилглутарил-СоА—редуктаза локализуется в эндоплазматическом ретикулуме; она может находиться как в фосфорелированном (неактивном), так и в нефосфорелированном (активном) состоянии. Биосинтез холестерина регулируется также концентрацией специфического белка - переносчика стеролов; этот белок связывает нерастворимые в воде промежуточные продукты биосинтеза и таким образом делает их более доступными для последующих ферментативных реакций. Скорость биосинтеза холестерина зависит не только от содержания в тканях холестерина и других стероидов; она меняется также при голодании, в зависимости от режима питания и при образовании злокачественных опухолей. Биосинтез холестерина ингибируется специфическими холестеролсодержащими липопротеинами плазмы при их связывании с соответствующими рецепторами на поверхности клеток.

Биосинтез аминокислот

Как и в случае окисления процессы биосинтеза аминокислот можно подразделить на два направления: синтез углеродного скелета и введение аминогруппы.

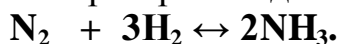
Животные вводят аминогруппы при синтезе своих аминокислот из поглощенных в результате переаминирования. Растения способны вводить неорганический азот в виде солей аммония эту реакцию осуществляет глутамат-дегидрогеназа. Этот процесс будет рассмотрен более подробно ниже. Но значительно важнее сначала рассмотреть переход молекулярного азота в органические молекулы. Не зря азот называют нейтральным, этот процесс очень сложен и требует детального рассмотрения.

Фиксация N_2 и образование NH_4

Атомы азота аминокислот, пуринов, пиримидинов и других биологических

молекул происходят из NH_4^+ . Высшие организмы неспособны включать N_2 в органические соединения. Это превращение – азотфиксация - осуществляется только бактериями и сине-зелеными водорослями (цианобактериями). Некоторые из этих микроорганизмов, а именно бактерии *Rhizobium*, заражают корни бобовых растений и образуют корневые клубеньки, в которых и происходит азотфиксация. Взаимоотношения между бактериями и растением носят характер симбиоза.

Энергия связи $\text{N}=\text{N}$ составляет 225 ккал/моль. Эта связь весьма устойчива к химическим воздействиям. Ведь Лавуазье назвал этот элемент из-за его инертности «азот», что означает «безжизненный». Промышленный процесс азотфиксации был разработан Фрицем Габером (Fritz Haber) в 1910 г. и используется в настоящее время при производстве удобрений:



Эту реакцию обычно проводят в присутствии железа в качестве катализатора при температуре около 500°C и давлении 300 атм. Неудивительно поэтому, что биологический процесс азотфиксации осуществляется сложным ферментом. Нитрогеназный комплекс, катализирующий эту реакцию, состоит из белковых компонентов двух типов: редуктазы, которая поставляет электроны с высокой восстановительной способностью, и собственно нитрогеназы, которая использует эти электроны для восстановления N_2 до NH_4 . Оба компонента представляют собой железосеропротеины (Fe-S-белки), в которых железо связано с атомом серы остатка цистеина и с неорганическим сульфидом. Нитрогеназный компонент комплекса содержит, кроме того, один или два атома молибдена, поэтому раньше его называли Мо Fe-белком, Его субъединичная структура $\alpha_2 \beta_2$, а мол. масса 200 кДа, Редуктазный компонент - (называемый также Fe-белком) состоит из двух идентичных полипептидов. Его мол. масса ~ 65 кДа. В нитрогеназном комплексе один или два Fe-белков связаны с Мо-Fe-белком.

Для превращения N_2 в NH_4 под действием нитрогеназного комплекса необходимы АТФ и мощный восстановитель. У большинства азотфиксирующих микроорганизмов источником электронов с высоким потенциалом для этой шестиелектронной реакции служит восстановленный ферредоксин, переносчик электронов, который мы уже рассматривали при обсуждении фотосинтеза. Регенерирует ли затем восстановленный ферредоксин путем фотосинтеза или в результате окислительных процессов, зависит от организма. Реакции, катализируемые нитрогеназным комплексом, имеют следующую стехиометрию;

$$\text{N}_2 + 6e + 12\text{АТФ} + 12\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_4^+ + 12\text{АДФ} + 12\text{Фн} + 4\text{H}^+,$$

Проведенные недавно исследования нитрогеназы свидетельствуют о следующей последовательности реакций. Сначала восстановленный ферредоксин отдает электроны редуктазному компоненту комплекса, На втором этапе АТФ связывается с редуктазой и сдвигает ее окислительно-восстановительный потенциал с - 0,29 до — 0,40 В путем изменения ее конформации, Это увеличение восстановительной способности редуктазы позволяет ей переносить электроны на нитрогеназный компонент. На третьей стадии происходит перенос электронов, гидролизуется АТФ и редуктаза

отделяется от нитрогеназного компонента. Наконец, N_2 связывается с нитрогеназным компонентом комплекса и восстанавливается до NH_4 . Поскольку источники энергии для химического производства аммиака по методу Габера истощаются и становятся все дороже, специалисты проявляют всевозрастающий интерес к увеличению азотфиксации микроорганизмами. Один из возможных подходов состоит в том, чтобы гены, необходимые для азотфиксации, ввести в растения, не относящиеся к бобовым, например в злаки. Трудность, которую предстоит преодолеть, состоит в исключительной чувствительности нитрогеназного комплекса к инактивации в присутствии кислорода. Бобовые растения поддерживают чрезвычайно низкую концентрацию O_2 в корневых клубеньках путем связывания O_2 с леггемоглобином. Еще одна проблема на пути создания новых азотфиксирующих видов - необходимость необычайно быстрого образования АТФ. Ведь азотфиксирующие бактерии в корнях бобовых растений потребляют примерно пятую часть всего АТФ, который образуется в растении. Существует и другой подход - увеличение скорости азотфиксации в клетках сине-зеленых водорослей которые образуют собственный АТФ путем фотосинтеза и поэтому не зависят от энергетических реакций симбиотического партнера.

NH_4^+ включается в аминокислоты через глутамат и глутамин

Следующий этап введения азота в биологические молекулы - включение NH_4^+ в аминокислоты. Глутамат и глутамин играют в этом процессе ключевую роль, α -Аминогруппа большинства аминокислот переносится от α -аминогруппы глутамата в результате реакции трансаминирования. Еще один важный донор азота, глутамин, отдает азот своей боковой цепи при биосинтезе ряда важных соединений.

Глутамат синтезируется из NH_4^+ и α -оксоглутарата, промежуточного продукта цикла трикарбоновых кислот, под действием глутамат-дегидрогеназы. Мы уже встречались с этим ферментом в разделе, посвященном распаду аминокислот. Когда реакция идет в направлении биосинтеза, используется NADPH в качестве восстановителя; когда же реакция является катаболической, в ней участвует NAD^+ в качестве окислителя:



Ион аммония вводится в глутамин под действием глутамин-синтетазы. Эта реакция амидирования сопряжена с гидролизом АТФ. Регуляция глутамин-синтетазы играет важнейшую роль в регуляции всего азотистого обмена.

Глутамат-дегидрогеназа и глутамин-синтетаза присутствуют во всех организмах. У большинства прокариот имеется, кроме того, глутамат-синтаза, катализирующая восстановительное аминирование α -оксоглутарата. Донор азота в этой реакции — глутамин; в результате реакции образуются две молекулы глутамата:



Если фактором, ограничивающим скорость реакции, является содержание в клетке NH_4^+ , то большая часть глутамата образуется путем последовательных реакций, катализируемых глутамин-синтетазой и глутамат-синтазой. Суммарная

реакция описывается следующим уравнением;



Обратите внимание, что стехиометрия этой реакции отличается от реакции, катализируемой глутамат-дегидрогеназой: здесь гидролизуется АТФ. Почему этот более дорогой путь иногда используется *E.coli*. Ответ заключается в том, что K_m глутамат-дегидрогеназы для NH_4^+ высока (1 мМ), поэтому фермент не насыщается субстратом при недостаточной концентрации NH_4^+ . Глутамин-синтетаза имеет, наоборот, чрезвычайно высокое сродство к NH_4^+ .

Аминокислоты синтезируются из промежуточных продуктов цикла трикарбоновых кислот и других важных метаболитов.

До сих пор рассматривалось превращение N_2 в NH_4^+ и включение NH_4^+ в состав глутамата и глутамина. Теперь обратимся к биосинтезу других аминокислот. Бактерии, например *E.coli*, могут синтезировать все двадцать аминокислот, входящие в основной набор, тогда как в организме человека образуется лишь половина из них. Аминокислоты, которые должны попадать в организм с пищей, называются незаменимыми, а остальные - заменимыми. Эти названия отражают потребность организма при определенных условиях. Например, в цикле мочевины синтезируется достаточно аргинина, чтобы удовлетворить потребности организма взрослого, но не растущего ребенка. Недостаточное содержание хотя бы одной аминокислоты приводит к отрицательному азотистому балансу. При этом в организме больше белка разрушается, чем синтезируется, и потому больше азота выводится, чем усваивается.

Пути биосинтеза аминокислот разнообразны. Однако они обладают одним важным общим свойством: углеродный скелет аминокислот происходит из промежуточных продуктов гликолиза, пентозофосфатного пути или цикла трикарбоновых кислот. Кроме того, ситуация упрощается тем, что аминокислоты подразделяются всего лишь на шесть биосинтетических семейств.

Заменимые аминокислоты синтезируются с помощью весьма простых реакций, тогда как пути биосинтеза незаменимых аминокислот очень сложны. Однако в данном случае немаловажным фактором является процесс биосинтеза углеводных скелетов аминокислот. Как и в случае их распада существует двадцать путей синтеза аминокислот. При чем в зависимости от наличия ферментов обеспечивающих тот или иной путь синтеза аминокислот аминокислоты для конкретного организма делятся на заменимы (способны синтезироваться организмом) и незаменимые (неспособны синтезироваться организмом). Следует заметить, что чем сложнее путь биосинтеза, тем чаще эта аминокислота становится незаменимой. В общем, полностью независимыми в вопросе биосинтеза аминокислот являются микроорганизмы, но в зависимости от их места обитания возможны вариации. Но, несмотря на все многообразие можно выделить шесть семейств биосинтеза аминокислот. Причем выделение осуществляется по предшественникам данных аминокислот. Первое - α -кетоглутарат через глутамат является предшественником глутамина пролина и

аргинина. Второе – оксалоацетат через аспартат является предшественником аспарагина, метионина, изолейцина и лизина. Третье – пируват становится предшественником валина, аланина, лейцина. Четвертое – из рибозо-5-фосфат образуется гистидин, пятое – из 3-фосфоглицерата образуются цистеин, и глицин (в данном процессе активно участвует уже упоминавшийся тетрагидрофолат). Шестое – образование из эритрозо-4-фосфата и фосфоенол пирувата триптофана, тирозина и фенилаланина, который легко затем преобразуется в тирозин. Следовало бы заметить, что чем сложнее путь биосинтеза, тем вероятнее, что данная аминокислота будет незаменимой. Но наличие путей окисления и взаимо превращения аминокислот, позволяет сделать заменимой аминокислоту (чаще незаменимую) за счет реакций окисления и взаимопревращения при наличии ее предшественницы, например фенилаланин – тирозин. Этот факт указывает еще на один аспект вопроса. В некоторых случаях пути биосинтеза являются обращением путей распада. Особенно это характерно для аминокислот с одно-двух этапными путями биосинтеза. То есть если в биосинтезе углеводов и жирных кислот полное обращение не возможно, то для некоторых аминокислот данный процесс вполне реален. Стоит заметить, что такая ситуация может быть связана с низким энергетическим выходом при катаболизме аминокислот. Небольшие изменения свободной энергии с большей легкостью претерпевают обращение. Хотя конечно это не касается ароматических аминокислот, чьи синтез и распад достаточно сложны.

Регуляция биосинтеза аминокислот

Скорость синтеза аминокислот зависит главным образом от количества ферментов биосинтеза и от их ферментативной активности. Перейдем теперь к регуляции ферментативной активности. Первая необратимая реакция пути биосинтеза, которая называется направляющей реакцией, или решающим этапом (решающей реакцией),- обычно важный участок регуляции. Конечный продукт пути (Z) часто ингибирует фермент, катализирующий первую решающую реакцию ($A \rightarrow B$). Регуляция такого рода необходима для сохранения строительных блоков и метаболической энергии.

Активность глутамин-синтетазы регулируется путем аденилирования. Регуляция глутамин-синтетазы *E. coli* – впечатляющий пример кумулятивного ингибирования по типу обратной связи. Напомним, что глутамин синтезируется из глутамата, NH_4^+ и АТФ. Глутамин-синтетаза состоит из 12 субъединиц с мол. массой 50 кДа каждая, уложенных в два параллельных гексагональных кольца. Этот фермент - ключевой регуляторный элемент метаболизма, поскольку он, как показали Эрл Стэдтман (Earl Stadtman) и его коллеги, регулирует поток азота. Амидная группа глутамина - источник азота в биосинтезе ряда соединений, например триптофана, гистидина, карбамоилфосфата, глюкозамин-6-фосфата, ЦТФ и АМФ. Глутамин-синтетаза кумулятивно ингибируется каждым из этих конечных продуктов метаболизма глутамина, а также аланином и глицином. Видимо, в молекуле этого фермента имеются участки связывания для каждого из этих ингибиторов. Ферментативная активность глутамин-синтетазы почти полностью подавляется при связывании всех восьми конечных

продуктов.

Еще одно важное свойство глутамин-синтетазы - обратимая ковалентная модификация, изменяющая ее активность.