

ПЕТУШКОВА ЕКАТЕРИНА ПАВЛОВНА

**Ассимиляция ацетата пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus* В10**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте фундаментальных проблем биологии Российской академии наук

Научный руководитель: доктор биологических наук **Цыганков Анатолий Анатольевич**

**Официальные оппоненты:**

**Ивановский Руслан Николаевич**, доктор биологических наук, профессор по специальности Микробиология, Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, биологический факультет, главный научный сотрудник.

**Груздев Денис Сергеевич**, кандидат биологических наук, Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Врио заведующего Лабораторией молекулярной диагностики (ЦКП «Биоинженерия»).

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Казанский институт биохимии и биофизики Казанского научного центра РАН

Защита состоится «    » января 2018 г. в    ч. минут на заседании диссертационного совета Д 002.121.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина» по адресу: 142290, Пушкино, пр-кт Науки, дом 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИБФМ РАН и на сайте <http://ibpm.ru>

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 2017 года.

Ученый секретарь  
Диссертационного совета,  
д.б.н.,  
эл. почта [alla@ibpm.pushchino.ru](mailto:alla@ibpm.pushchino.ru)

Кулаковская Татьяна Валентиновна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Фотосинтезирующие пурпурные несерные бактерии способны использовать ацетат и бутират в качестве источника углерода. Катаболизм этих субстратов происходит в цикле трикарбоновых кислот (ЦТК), при этом интермедиаты ЦТК затрачиваются на биосинтетические нужды клетки, и требуется их восполнение. Для многих микроорганизмов таким механизмом является *глиоксилатный цикл*, включающий два фермента - изоцитратлиазу (ЕС: 4.1.3.1) и малатсинтазу (ЕС: 4.1.3.2). У многих фототрофов еще в 1960 г. было продемонстрировано отсутствие активности изоцитратлиазы (ИЦЛ) (Kornberg, Lascelles, 1960). В недавнее время было показано, что пурпурные несерные бактерии *Rhodospirillum rubrum*, *Rhodobacter sphaeroides*, не имеющие гена ИЦЛ, могут использовать в качестве альтернативного пути *цитрамалатный цикл* (Ivanovsky et al. 1997; Filatova et al. 2005a), более того, для последней из них показана возможность функционирования *этилмалонил-КоА пути* (Alber et al. 2006).

Секвенирование полного генома пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* показало, что бактерия имеет гены изоцитратлиазы и малатсинтазы (Strnad et al., 2010). Однако литературные данные относительно функционирования этого пути в *Rba. capsulatus* противоречивы: наличие активности этих ферментов подтверждено рядом авторов (Kornberg, Lascelles, 1960; Nielsen et al. 1979; Willison, 1988; Blasco, 1991), тогда как другими авторами активность не обнаружена (Meister et al., 2005; Albers, Gottschalk, 1976). Таким образом, пути метаболизма ацетата *Rba. capsulatus* остаются неясными.

Следует отметить, что указанная бактерия является активным продуцентом водорода и рассматривается в качестве элемента биотехнологических систем получения водорода на свету (Цыганков, Хуснутдинова, 2015). Поскольку *Rba. capsulatus* относится к аноксигенным фотосинтетикам, для ее роста необходимо наличие более восстановленных доноров электронов, чем вода, например, органических кислот. Важным источником таких кислот являются продукты ферментации углеводсодержащих отходов (Текучева, Цыганков 2012), одним из которых является ацетат. Поэтому знание метаболизма ацетата у *Rba. capsulatus* позволит модифицировать ее метаболизм для существенного увеличения скорости выделения водорода.

**Цель и задачи исследования.** Цель работы заключалась в изучении особенностей ассимиляции ацетата пурпурной несерной бактерией *Rba. capsulatus* штамм В10, как через глиоксилатный шунт, так и альтернативные пути восполнения пула щавелевоуксусной кислоты (ЩУК) в ЦТК.

Для достижения этой цели решались следующие задачи:

- 1) Определить факторы, влияющие на измерение активности ИЦЛ в бесклеточных экстрактах *Rba. capsulatus* В10.
- 2) Изучить влияние физиологического состояния культуры на активность ИЦЛ у *Rba. capsulatus* В10.
- 3) С применением доступных баз данных, содержащих полный геном *Rba. capsulatus*, а также результаты транскриптомного анализа, идентифицировать гены,

вовлеченные в ацетатный метаболизм *Rba. capsulatus* B10, и выявить активные пути восполнения пула ЩУК.

**Научная новизна работы.** Показано, что ИЦЛ в бесклеточных экстрактах *Rba. capsulatus* B10 подвержена протеолизу, который можно предотвратить добавлением ингибиторов протеаз.

Впервые собрана и систематизирована информация о ферментах-аналогах для известных и новых путей восполнения пула ЩУК в ЦТК, отличающихся, в том числе, специфичностью к различным энантиомерам субстратов.

На основе собранной информации создана универсальная метаболическая схема путей восполнения пула ЩУК в ЦТК у прокариот.

Проведенный анализ показал, что ранее известные и новые пути восполнения пула ЩУК имеют как общие, так и вариабельные участки, а также, что образование интермедиатов ЦТК происходит через стадию образования четырех основных метаболитов (глиоксилата, пропионил-КоА, ФЕП и ПВК). Учитывая обнаруженные закономерности, впервые осуществлена классификация этих путей по образуемому в них метаболиту, через который происходит восполнение пула ЩУК и предшественников ЩУК в ЦТК.

Определено наличие у *Rba. capsulatus* генов, кодирующих ферменты, необходимые для функционирования путей восполнения пула ЩУК в ЦТК. Показано, что при фототрофном росте на ацетате в анаэробных условиях у *Rba. capsulatus* синтезируются транскрипты генов, необходимых для функционирования глиоксилатного цикла, цикла Кальвина-Бенсона, а также пути преобразования пирувата/фосфоенолпирувата (ПВК/ФЕП) С3-карбоксилирующими ферментами (пируваткарбоксилазой, ФЕП-карбоксикиназой, двумя малик-ферментами). Этилмалонил-КоА путь активен на транскрипционном уровне, но вместо ацетоацетил-КоА редуктазы функционируют альтернативные ферменты, катализирующие синтез кротонил-КоА.

Обнаружено, что у *Rba. capsulatus* имеются транскрипты генов, кодирующих ферменты, необходимые для образования глиоксилата за счет оксигеназной активности Рубиско. Учитывая, что в анаэробных условиях этот путь не активен, высказывается предположение, что он важен в случае кратковременного попадания пурпурных бактерий в аэробные условия для усиления дыхания и защиты фотосинтетического аппарата.

**Научно-практическое значение работы.** Созданная метаболическая схема путей восполнения пула интермедиатов ЦТК при росте с использованием ацетата является универсальной (не связана с метаболизмом какой-то конкретной бактерии) и, в совокупности с данными о ферментах-аналогах (представлены в тексте и таблицах), может служить первичной информацией для изучения метаболизма ацетата у прокариот, относящихся к различным систематическим группам.

Полученные данные о путях, детерминированных геномом *Rba. capsulatus*, существенно дополняют имеющиеся метаболические схемы ассимиляции ацетата этой бактерии, которые использовались для создания математических потоковых моделей анаэробного метаболизма у бактерий рода *Rhodobacter* (Голомысова, Иванов, 2011), что

позволит прогнозировать влияние различных факторов внешней среды на рост.

Знание особенностей метаболизма ацетата *Rba. capsulatus* позволяет предсказать ряд модификаций генома данной бактерии, которые могут привести к повышению эффективности преобразования ацетата в водород (один из видов экологически чистого энергоносителя) или увеличению производительности данной бактерией полигидроксиалканоатов (биodeградебельных пластиков).

**Основные положения, выносимые на защиту.** Обнаружено, что ИЦЛ подвергается протеолизу в процессе разрушения клеток. Отработан метод воспроизводимого определения ИЦЛ активности в бесклеточном экстракте *Rba. capsulatus*, включающий разрушение клеток в присутствии дитиотреитола (ДТ) и ингибиторов протеаз.

Впервые показано, что предыстория инокулята и фаза роста культуры являются основными факторами, влияющими на ИЦЛ активность ацетатных культур *Rba. capsulatus*.

На основе известных реакций сконструирована схема путей восполнения пула ЩУК в ЦТК прокариот.

На основе анализа баз данных определен генетический потенциал для функционирования путей восполнения пула ЩУК в ЦТК у *Rba. capsulatus*.

На транскрипционном уровне при фототрофном росте на ацетате в анаэробных условиях активны глиоксилатный цикл, цикл Кальвина-Бенсона, а также путь преобразования пирувата/ФЕП С3-карбоксилирующими ферментами (пируваткарбоксилазой, ФЕП-карбоксикиназой, двумя малик-ферментами); этилмалонил-КоА путь активен на транскрипционном уровне (кроме гена ацетоацетил-КоА редуктазы, функцию которой могут выполнять два фермента, катализирующих синтез кротонил-КоА).

Обнаружено, что при росте в фотогетеротрофных условиях на среде с ацетатом у *Rba. capsulatus* имеются транскрипты ферментов, необходимых для образования глиоксилата за счет оксигеназной активности Рубиско. Учитывая, что в отсутствие O<sub>2</sub> этот путь не активен, высказывается предположение, что данный набор реакций важен в случае кратковременного попадания бактерий в аэробные условия для усиления дыхания и защиты фотосинтетического аппарата от разрушения.

**Апробация работы.** Результаты работы были представлены на: Международной встрече «Photosynthesis in the post-genomic era: structure and function of photosystems» (Пушино, Россия, 2006); 11-ой и 14-ой международных Пушинских школах-конференциях молодых ученых «Биология - наука XXI века» (Пушино, Россия, 2007; 2010); Симпозиуме-конференции «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (Москва, Россия, 2009); 5-ом Всероссийском симпозиуме с международным участием «Автотрофные микроорганизмы» (Москва, Россия, 2015); Школе-конференции молодых ученых на базе Института фундаментальных проблем биологии РАН «Биосистема: от теории к практике» (Пушино, Россия, 2013); Международной конференции молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, Россия, 2013); Международной конференции «Изучение

фотосинтеза для устойчивого развития» («Photosynthesis Research for Sustainability» (Пушино, Россия, 2016), 1-ый Российский Микробиологический Конгресс (Пушино, 2017).

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 15-14-30007).

**Личный вклад соискателя.** Эксперименты по теме диссертации, а также их обработка были проведены автором самостоятельно. Автор участвовал в постановке задач и формулировке выводов.

**Публикации.** По материалам диссертации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, опубликованы 2 статьи. Опубликовано 9 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, а также разделов, где изложены результаты и их обсуждение. Работа включает выводы и список использованной литературы из 288 источников. Работа изложена на 132 страницах, содержит 21 рисунок и 12 таблиц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Обзор литературы** составляет первую часть диссертации. В нем рассмотрена общая характеристика и физиология пурпурных несерных бактерий с акцентом на отличительные особенности *Rba. capsulatus*. Представлено современное понимание углеродного метаболизма пурпурных несерных бактерий. Рассмотрены современные подходы изучения метаболизма бактерий. Показано практическое значение изучения метаболизма ацетата у *Rba. capsulatus*.

**Материалы и методы.** Для исследований использовали *Rba. capsulatus* штамм В10, полученный из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Культуру выращивали в фотогетеротрофных анаэробных условиях на среде Ормерода с ацетатом и лактатом в периодическом режиме с поддержанием рН или без него в фотобиореакторе на основе коаксиальных цилиндров или в плотно закрывающихся сосудах на свету при температуре 30<sup>0</sup>С. Культуру выращивали на среде с лактатом (40 мМ) или ацетатом (20 мМ) в качестве единственного источника углерода. Инокулят выращивали до стационарной фазы роста, которая наступала после исчерпания субстрата.

Клетки разрушали ультразвуком, крупные фрагменты осаждали на микроцентрифуге Eppendorf AG 22331 (12000 g, 2 мин). Полученный супернатант использовали для анализа. Содержание бактериохлорофилла *a* определяли спектрофотометрически, концентрацию ацетата в среде - с помощью газо-жидкостной хроматографии, лактата – спектрофотометрическим методом по восстановлению НАД в гидразин-глициновом буфере. Содержание гликогена определяли в клетках после их разрушения ультразвуком глюкозооксидазным методом. ИЦЛ активность определяли спектрофотометрически в аэробных условиях по методу Диксона и Корнберга. Определение белка проводилось по методу Лоури.

**Анализ информации об известных в настоящее время ферментах, которые могут быть задействованы в реакциях восполнения пула ЩУК.** По записям для

субстратов и продуктов биохимических реакций в базе данных Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) в разделе Compounds (Kanehisa et al. 2012) проанализирован известный в настоящее время набор ферментативных реакций, в которых участвуют предшественники метаболитов ЦТК.

**Определение генетического потенциала для функционирования выявленных и ранее известных путей восполнения пула ЦУК в *Rba. capsulatus*.** С целью определения генетического потенциала различных метаболических путей у *Rba. capsulatus* B10 в базе данных KEGG в разделе Pathway были найдены интересующие участки метаболизма. Затем в базе данных KEGG Organisms: Complete Genomes производили поиск гена в геноме *Rba. capsulatus* SB1003 (рифампицин-устойчивый штамм, полученный из *Rba. capsulatus* B10 (Yen, Marrs, 1976)). В случае отсутствия аннотированного гена проводили дополнительную проверку. Опираясь на данные базы UniProt (The UniProt Consortium, 2015), выбирали интересующий ген прокариотического организма, продукт которого наиболее охарактеризован (выполняемая функция подтверждена экспериментально), и при помощи программы Nucleotide BLAST проводили поиск гомологичного гена в геноме *Rba. capsulatus* SB1003. Одновременно с этим при помощи алгоритма tBLASTn (Altschul et al. 1997) проводили поиск с помощью аминокислотной последовательности белка, кодируемой данным геном по транслируемому в шести рамках считывания геному *Rba. capsulatus*. В случае отсутствия высоко гомологичных генов проверку повторяли, выбрав в качестве эталона менее охарактеризованные аннотированные последовательности, но из пурпурных бактерий. Использовали стандартные параметры работы данных алгоритмов.

Когда необходимый ген все же был найден, проводили поиск других ферментов, способных осуществлять катализ интересующей реакции, а также набор реакций, приводящих к синтезу нужного продукта из данного субстрата. Для этого по записям для субстратов и продуктов в базе данных KEGG Compounds определяли весь спектр ферментов, способных осуществлять образование искомого соединения. После этого поиск генов этих ферментов в геноме *Rba. capsulatus* проводили, как указано выше.

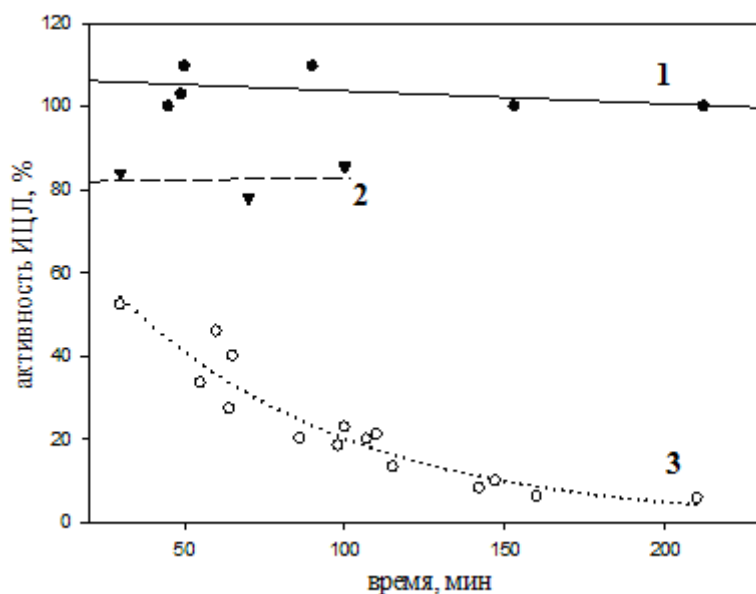
**Определение активности генов, вовлеченных в ацетатный метаболизм в культуре *Rba. capsulatus* штамм B10, на транскрипционном уровне.** Для анализа экспрессионного профиля культур *Rba. capsulatus*, выросших в анаэробных фототрофных условиях на среде с ацетатом, использовали данные экспериментов, размещенные в базе NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) с вводным номером GSE53303. В общей сложности авторами экспериментов (Erkal et al.) получены данные по транскрипции 4052 последовательностей открытых рамок считывания и 200 межгенных последовательностей с более чем 300 п.н. в 4 повторностях. Авторы анализировали данные при помощи программного обеспечения GeneSpring GX 11 («Agilent Technologies», США). Эта программа вычисляет  $p$ -значения детекции для каждого транскрипта. Значение  $p < 0,05$  указывает, что транскрипт обнаружен, при диапазоне 0,05–0,06 присутствие транскрипта считается неоднозначным, при  $p > 0,06$  транскрипты считаются отсутствующими в образце.

**Статистическая обработка экспериментальных данных.** Приведенные экспериментальные данные представляют собой результаты типичных независимых экспериментов из 3-5 проведенных, а также усредненные данные с 95% доверительным интервалом.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Метод определения ИЦЛ активности в *Rba capsulatus*.** Учитывая противоречивость данных по проявлению активности ИЦЛ в БЭ, нами проведено систематическое изучение влияния на нее способа разрушения клеток, присутствия восстановителя (ДТ) и добавления ингибиторов протеаз или бычьего сывороточного альбумина (БСА). Показано, что добавление ДТ в процессе разрушения приводило к увеличению активности ИЦЛ в БЭ, хотя не влияло на кинетику инактивации. При отсутствии добавок ИЦЛ активность быстро снижалась и через 3,5 часа практически исчезала (рисунок 1, кривая 3). Добавление ингибиторов протеаз приводило к стабилизации ИЦЛ активности, по крайней мере, в течение 3,5 часов (рисунок 1, кривая 1). Добавление БСА также приводило к стабилизации ИЦЛ активности, по крайней мере, в течение 100 мин (рисунок 1, кривая 2).

Таким образом, нами обнаружено, что при разрушении клеток в аэробных условиях ИЦЛ теряет активность вследствие окисления и протеолиза. С учетом полученных данных усовершенствован метод определения ИЦЛ активности в БЭ *Rba capsulatus*. Для сохранения ИЦЛ активности при разрушении и в процессе хранения БЭ необходимо присутствие ДТ и ингибиторов протеаз.



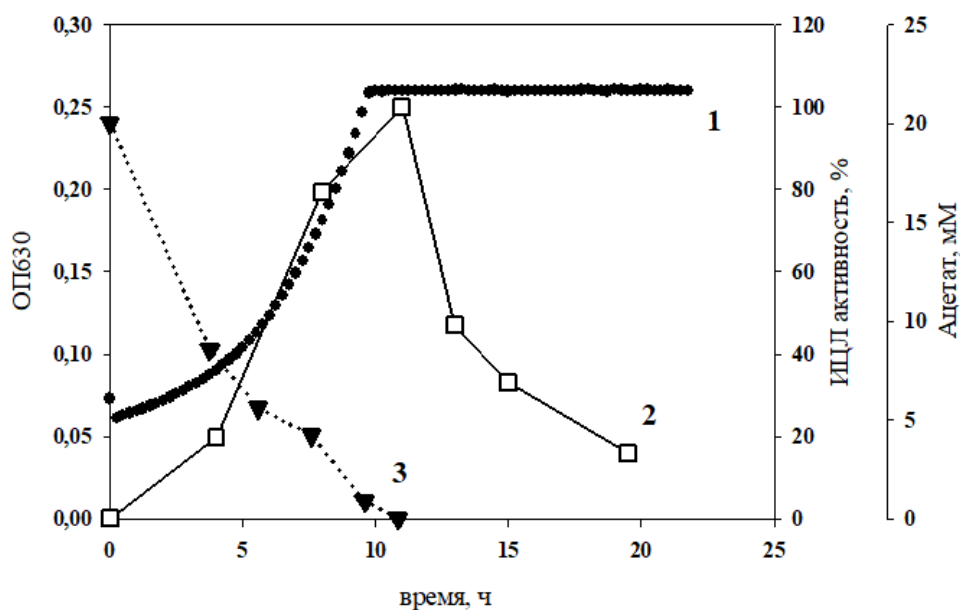
**Рисунок 1.** Изменение ИЦЛ активности в БЭ ацетатных культур *Rba capsulatus* при 20°C на воздухе. Образцы содержали 2,3-2,8 мг белка/мл и 5 мМ ДТ. 1 – добавлен ингибитор протеаз; 2 – добавлено 3,5-7,0 мг БСА, 3 – образец без добавок.

**Влияние условий культивирования на ИЦЛ активность *Rba capsulatus* В10.** Показано, что инокулят, выросший на лактате, не обладал ИЦЛ активностью (рисунок 2). ИЦЛ активность появлялась через 4 часа после начала роста на среде с ацетатом, достигала

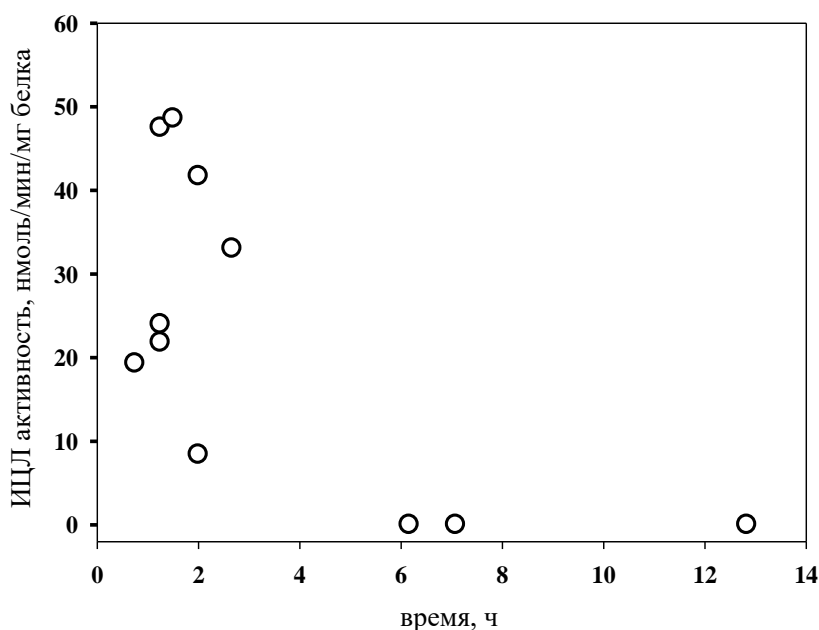


максимума в начале стационарной фазы роста культуры и далее снижалась до нуля (Рисунок 2). Это снижение может быть обусловлено действием протеаз, которые могут участвовать в деградации ряда ферментов в стационарной фазе роста или при переходе на субстрат, не требующий присутствия глиоксилатного шунта.

Несмотря на то, что закономерность изменения ИЦЛ активности наблюдалась во всех экспериментах, абсолютные величины активности фермента варьировали. Оказалось, что ИЦЛ активность зависела от возраста инокулята. Максимальная активность выявлялась в культуре, если инокулят был в начале (1-2 ч) стационарной фазы, вызванной исчерпанием лактата (Рисунок 3).



**Рисунок 2.** Зависимость ИЦЛ активности *Rba. capsulatus* от фазы роста культур при пересеве с лактата на ацетат:  
 1 – оптическая плотность (ОП<sub>630</sub>);  
 2 – ИЦЛ активность (% от максимальной);  
 3- концентрация ацетата в среде.

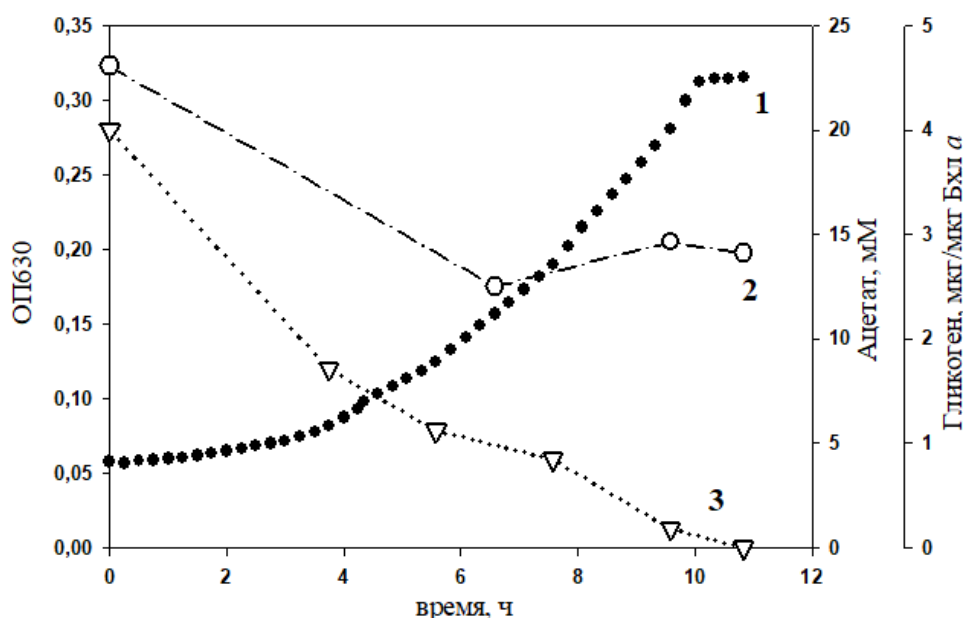


**Рисунок 3.** Зависимость максимальной ИЦЛ активности культуры *Rba. capsulatus*, растущей в присутствии ацетата, от времени пребывания инокулята, выросшего на среде с лактатом, в стационарной фазе.

С увеличением возраста инокулята, максимальное значение ИЦЛ активности (измеренное в начале стационарной фазы роста опытной культуры) снижалось, и если

инокулят находился в стационарной фазе более 5 часов, ИЦЛ активность в опытной культуре в начале стационарной фазы не обнаруживалась. Можно полагать, что в стационарной фазе в культурах *Rba. capsulatus* снижалось количество ферментов и регуляторных белков, находящихся в клетках. При этом с увеличением времени пребывания культур в стационарной фазе изменения становились все значительней.

Возможность роста культуры *Rba. capsulatus* В10 на ацетате без участия ИЦЛ-активности можно было бы объяснить использованием клеткой накопленных ранее запасных веществ. В клетках, выросших на среде с лактатом, основным запасным веществом является гликоген. Из глюкозы гликогена может образоваться ПВК, которая под действием пируваткарбоксилазы может приводить к образованию ЦУК, необходимой для функционирования ЦТК (Willison, 1988). На 1 моль глюкозы, полученной при разложении гликогена, для функционирования цикла Кребса возможно потребление 2 молей ацетата. Однако уменьшение количества глюкозы за 10 ч роста культуры составило 15 мкмоль/л, за это же время концентрация ацетата в среде снизилась с 20 до 1,2 мМ (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Содержание гликогена в клетках и ацетата в среде при пересеве культур *Rba. capsulatus* «с лактата на ацетат»:

- 1 – оптическая плотность культуры;
- 2 – содержание гликогена в клетках;
- 3 – концентрация ацетата в среде.

Таким образом, рост *Rba. capsulatus* с использованием ацетата без ИЦЛ не может быть объяснен использованием накопленного гликогена, следовательно, у данной бактерии имеются иные анаэробные пути, что подтверждается данными других авторов (Meister et al., 2005).

**Выяснение альтернативных путей восполнения пула ЦУК в *Rba. capsulatus* В10.** Нами был осуществлен поиск информации об альтернативных последовательностях реакций восполнения пула интермедиатов ЦТК, которые могли бы функционировать у *Rba. capsulatus* В10 на среде с ацетатом в отсутствие ИЦЛ. Анализ и систематизация отобранных реакций позволили создать единую метаболическую схему (Рисунок 5), включающую как ранее известные, так и неизвестные пути. К последним относятся образование глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы, с образованием

малата; синтез ПВК из ацетил-КоА и формиата с последующим карбоксилированием; образование *цис*-аконитата из ПВК и ацетил-КоА; образование фумарата с участием специфичного к (R)-изоформе субстрата малик-фермента. При составлении метаболической схемы (рисунок 5) было отмечено, что некоторые из рассматриваемых путей имеют общие реакции и переменные участки, а также выявлены ключевые метаболиты путей восполнения пула ЩУК (глиоксилат, пропионил-КоА, ПВК/ФЕП). Отмечено, что превращение ключевых метаболитов в звенья ЦТК может происходить не только в реакциях, которые принято считать частью конкретного анаэробического пути, но и в других последовательностях реакций. Поэтому традиционное представление реакций, приводящих к восполнению пула ЩУК, в виде конкретных путей и циклов кажется упрощенным. В связи с этим нами была разработана классификация всех метаболических путей, имеющих отношение к восполнению пула ЩУК, основанная на ключевых метаболитах, а не известных путях и циклах.

В соответствии с предлагаемой нами классификацией эти пути можно подразделить на четыре основных группы. Пути (I), в которых происходит образование глиоксилата (глиоксилатный цикл; путь с участием Рубиско в качестве оксигеназы). Пути (II), в которых происходит одновременно образование глиоксилата и пропионил-КоА (метиласпартатный, цитрамалатный циклы и этилмалонил-КоА путь). Пути (III), в которых происходит образование только пропионил-КоА (часть реакций 3-гидроксипропионатного цикла). Пути (IV), в которых образуются ПВК/ФЕП (образование ПВК из экзогенного ацетата и CO<sub>2</sub> с участием пируват:оксидо-редуктазы; из экзогенного ацетата и CO<sub>2</sub> с участием обратимой формиатдегидрогеназы и обратимой формиат-С-ацетилтрансферазы; образование ФЕП/ПВК за счет запасных углеводов в путях Энтнера–Дудорова и Эмбдена–Мейергофа–Парнаса; образование ФЕП/ПВК из интермедиатов цикла Кальвина–Бенсона).

Пути преобразования синтезированных глиоксилата, пропионил-КоА или ПВК/ФЕП в звенья ЦТК также переменны. Образовавшийся разными способами пропионил-КоА может преобразоваться до сукцинил-КоА (в метилцитратном или метилмалониловом путях) или до ПВК (путь окисления пропионил-КоА через лактат). Преобразование глиоксилата в интермедиаты ЦТК также может осуществляться разными путями (за счет двух малатсинтаз, отличающиеся стабильностью и активаторами; за счет образования малата через стадию образования (S)-малил-КоА). Образование из ПВК/ФЕП предшественников ЩУК возможно напрямую за счет шести различных анаэробических карбоксилирующих ферментов или через стадию образования фумарата с участием специфичного к (R)-изоформе субстрата обратимого декарбоксилирующего малик-фермента. Кроме того, превращение ПВК в интермедиаты ЦТК возможно также в гипотетическом пути образования *цис*-аконитата через стадию образования итаконата.

Поскольку одну и ту же реакцию часто способны осуществлять несколько ферментов, нами был уточнен набор ферментов для реакций полученной метаболической схемы, представленной на рисунке 5. Затем на основе существующей аннотации генома *Rba. capsulatus* SB1003 (рифампицин-резистентный штамм *Rba. capsulatus* B10 (Yen,

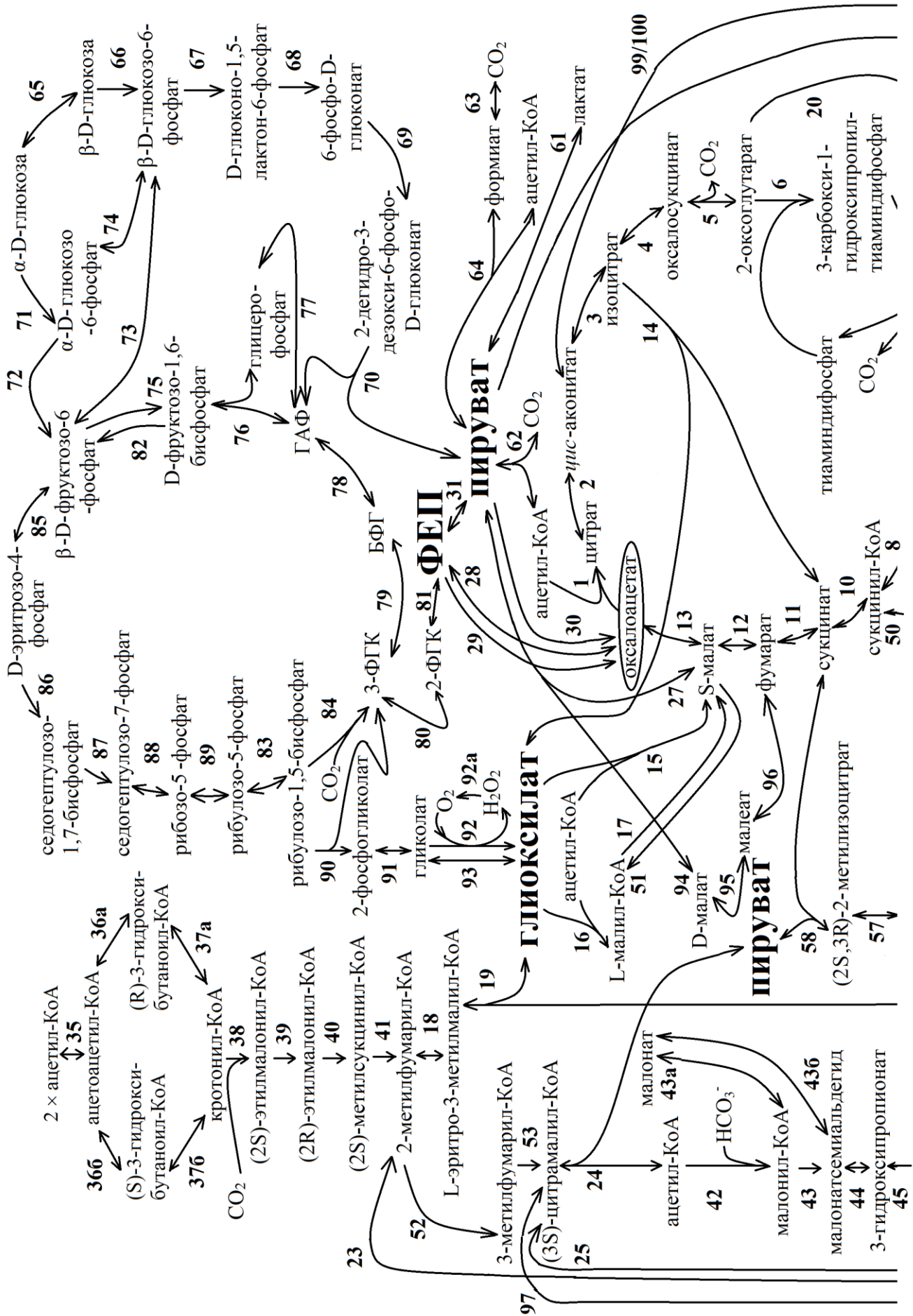
1976)) и последующего уточнения наличия интересующих генов из отобранного списка с помощью алгоритмов BLASTn и tBLASTn (см. Материалы и методы) были определены пути восполнения пула ЩУК, гены которых присутствуют в геноме *Rba. capsulatus*. Чтобы определить, какие из этих путей активны в фототрофных «ацетатных» культурах исследуемой бактерии, был осуществлен анализ транскрипционных профилей «ацетатных» фототрофных культур *Rba. capsulatus* SB1003 (см. Материалы и методы). Результаты проведенной работы структурированы в соответствии с предложенной нами классификацией по метаболитам.

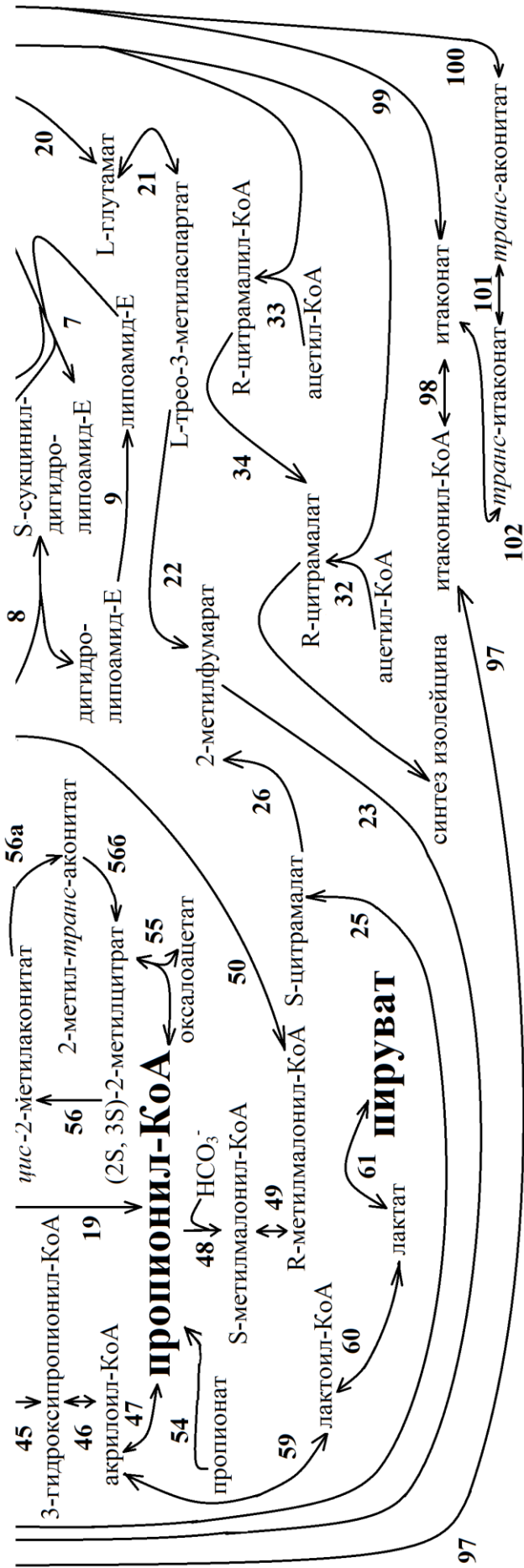
**I. Образование глиоксилата. Глиоксилатный цикл.** При наличии функционирующего цикла Кребса, что реализуется у *Rba. capsulatus*, наличие этого анаплеротического пути определяется функционированием двух дополнительных ферментов (рисунок 5 реакции 14 и 15) – изоцитратлиазы (EC: 4.1.3.1) и малатсинтазы (EC: 2.3.3.9). *Rba. capsulatus* обладает геном изоцитратлиазы (*aceA*, RCAP\_gcc03338) и двумя генами малатсинтазы (*aceB*, RCAP\_gcc03337; *glcB*, RCAP\_gcc00839). Транскрипты генов глиоксилатного цикла присутствовали в образцах ацетатных культур *Rba. capsulatus*, выращенных на среде с добавлением  $\text{NH}_4\text{Cl}$  в качестве источника азота.

**Путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы.** Реакции, входящие в этот путь, ранее не рассматривались с точки зрения возможного их участия в восполнении пула ЩУК (Рисунок 5, реакции 90-92/92-92а/93). Как известно, формы I и II Рубиско пурпурных несерных бактерий наряду с карбоксилазной активностью, считающейся основной, способны проявлять оксигеназную активность, окисляя рибулозобисфосфат до фосфогликолата и ФГК (Bowes et al., 1971; Tabita, 1988; Gibson, Tabita, 1977). ФГК может далее вступать в реакции цикла Кальвина, в котором Рубиско функционирует как карбоксилаза, а фосфогликолат превращается в гликолат. Последний либо выделяется в окружающую среду, либо, вступает в гликолатный путь (Рисунок 6), в котором из двух молекул гликолата происходит образование одной молекулы ФГК и выделение одной молекулы  $\text{CO}_2$ .

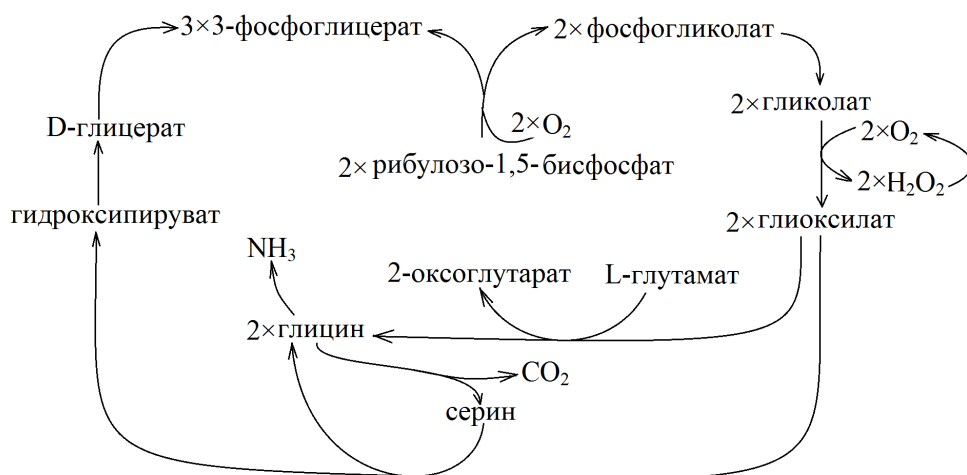
Глиоксилат, образовавшийся из гликолата в этом пути, может быть задействован для пополнения пула ЩУК. Более того, образование глиоксилата возможно и в отсутствие активного цикла Кальвина. В этом случае источником рибулозобисфосфата могли бы быть запасные углеводы. Данный процесс может быть актуален в кратковременный период адаптации к росту на ацетате, когда в ростовой среде присутствует кислород.

Образование глиоксилата из гликолата (реакции 92/92-92а или 93 рисунок 5) могут катализировать несколько различных ферментов: необратимая гликолатдегидрогеназа (реакция 92, гликолатоксидоредуктаза, EC: 1.1.99.14); необратимая (S)-2-гидроксикислота-оксидаза (EC: 1.1.3.15, реакция 92) в сочетании с каталазой (EC: 1.11.1.6, реакция 92а) или каталазой-пероксидазой (EC: 1.11.1.21, реакция 92а). Эта же реакция возможна с помощью ферментов, осуществляющих обратимые реакции (реакция 93): НАД-зависимой глиоксилатредуктазы (EC: 1.1.1.26/EC: 1.1.1.29, катализирует также превращение D-глицерата в гидроксипируват); НАДФ-зависимой глиоксилатредуктазы (EC:1.1.1.79).





**Рисунок 5.** Известные метаболические пути, способные к восполнению пула ЩУК (оксалоацетата) в ЦТК при использовании ацетата в качестве единственного источника углерода. Арабскими цифрами обозначены реакции. ЦТК (1–13); глиоксилатный цикл (1–3, 14, 15, 11–13); метиласпартагный цикл (1–4, 20–23, 18, 19); часть реакций цитрамалатного цикла (24–26, 23, 18, 19); часть реакций этилмалонил-КоА пути (35, 36а, 37а, 38–41, 18, 19); 3-гидроксипропионатный цикл (42–50, 10–12, 51, 16 и 42–47, 19, 18, 52, 53). Пути, в которых пропионил-КоА превращается в ЩУК – метилмалонил-КоА путь (48–50, 10–13), метилцитратный цикл (55–58, 11–13 и 27/30 и 31 в сочетании с 28/29), путь окисления пропионил-КоА через лактат (47, 59–61 и 27/30 и 31 в сочетании с 28/29). Пути образования ПВК из экзогенного ацетата (62 и 63, 64); путь Энтнера–Дудорова (65–70); путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса (71, 72, 75/82–81, 31); цикл Кальвина–Бенсона (83, 84, 79, 78, 77, 76, 82, 85–89). Анаэробные карбоксилазы: 27–30; Путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы (90–92/92–92а/93); путь образования из ПВК и ацетил-КоА *цис*-аконитата (24, 97–98, 99/100–102); путь образования формиата из пирувата через D-малат (94–96). Схема составлена на основе информации из базы данных KEGG Pathway.



**Рисунок 6.** Схема реакций фотодыхания (составлена на основе информации из базы данных KEGG Pathway).

В настоящее время сведений о характеристиках и активности необратимых ферментов с EC: 1.1.99.14 и EC: 1.1.3.15 в *Rba. capsulatus* в доступных информационных источниках не обнаружено, не известно: сколько субъединиц они включают. Однако в геноме исследуемой бактерии присутствуют следующие гены в соответствии с GenBank: железо-серной субъединицы гликолатдегидрогеназы (*glcF*, RCAP\_rcc02869), субъединица GlcE гликолатдегидрогеназы (*glcE*, RCAP\_rcc02870), субъединица GlcD гликолатдегидрогеназы (*glcD*, RCAP\_rcc02871). Последняя в соответствии с KEGG Orthology отнесена к EC: 1.1.3.15. У *E. coli* гены *glcD*, *glcE*, и *glcF*, кодирующие все три субъединицы, ответственны за гликолатоксидазную активность (Pellicer, et al., 1996). Каталаза (EC: 1.11.1.6) в геноме исследуемой бактерии отсутствует, но есть ген каталазы-пероксидазы (EC: 1.11.1.21, *katG*, RCAP\_rcc01738).

В геноме бактерии присутствует ген НАД-зависимой глиоксилатредуктазы (EC: 1.1.1.26, *guaR1*, RCAP\_rcc00524). Также имеется ген, без названия (RCAP\_rcc00798), продуктом которого в соответствии с GenBank является белок семейства D-изомер-специфичных 2-гидроксикилот-дегидрогеназ, а в соответствии с функциональной классификацией KEGG отнесенный к глиоксилат/гидроксипируватредуктазам A (EC: 1.1.1.79; 1.1.1.81).

Присутствие транскриптов Рубиско, фосфогликолатфосфатазы-2, глиоксилатредуктазы-1 и белка семейства D-изомер-специфичных 2-гидроксикилот-дегидрогеназ, в соответствии с функциональной классификацией KEGG отнесенного к глиоксилат/гидроксипируватредуктазам A, в исследуемых фототрофных ацетатных культурах *Rba. capsulatus* свидетельствует в пользу того, что рассматриваемый путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы активен на транскрипционном уровне. Транскрипты перечисленных генов присутствуют в образцах вне зависимости от вида источника азота в среде. В то же время в фототрофных анаэробных

условиях этот путь не может быть реализован вследствие отсутствия кислорода. Физиологическое значение наличия рассматриваемых генов и их транскриптов в фототрофных условиях может быть связано с тем, что пурпурные бактерии в природе могут переходить из анаэробных в аэробные условия. В этом случае они за счет Рубиско могут увеличить скорость дыхания, снижая внутриклеточное содержание кислорода и предохраняя фотосинтетический аппарат от светозависимой деградации. Кроме того, такой путь может помочь им быстро поглощать ацетат и расти с его использованием в присутствии кислорода.

**II. Образование глиоксилата и пропионил-КоА.** Известные пути, входящие в эту группу, направлены на образование 2-метилфумарил-КоА, из которого в общих для этих путей реакциях (рисунок 5, реакции 18 и 19) образуется глиоксилат и пропионил-КоА. Превращение 2-метилфумарил-КоА (мезаконил-КоА) в L-эритро-3-метилмалил-КоА (реакция 18) происходит под действием 2-метилфумарил-КоА-гидратазы (EC: 4.2.1.148). Далее L-эритро-3-метилмалил-КоА расщепляется на глиоксилат и пропионил-КоА под действием цитратлиазы (реакция 19). Ген 2-метилфумарил-КоА-гидратазы (ген *maoC*, RCAP\_gcc00730 (EC: 4.2.1.148)), так же как и ген цитратлиазы (ген *citE2*, RCAP\_gcc03164, β-субъединица-2 (EC: 4.1.3.34, 4.1.3.6)), присутствуют в геноме *Rba. capsulatus*. Транскрипты этих генов обнаруживались во всех образцах исследуемых фототрофных ацетатных культур *Rba. capsulatus*.

**Метиласпартатный цикл.** Последовательность реакций данного метаболического пути приведена на рисунке 5 (реакции 1-4, 20-23, 18, 19). Из образовавшихся в нем пропионил-КоА и глиоксилата далее синтезируются две молекулы ЩУК, одна из которых регенерирует первое звено метиласпартатного цикла. У *Rba. capsulatus* отсутствуют гены глутаматмутаза (EC: 5.4.99.1; рисунок 5, реакция 21) и метиласпартат-аммоний-лиазы (EC: 4.3.1.2; рисунок 5, реакция 22). Кроме того, реакция переноса коэнзима-А с сукцинил-КоА на 2-метилфумарат (мезаконат) с образованием 2-метилфумарил-КоА (рисунок 5, реакция 23), осуществляемая сукцинил-КоА:мезаконат КоА-трансферазой (EC: 2.8.3.-) (Khotmyakova, et al. 2011), не ассоциирована с продуктом какого-либо гена. В связи с этим нет возможности проверить присутствие гена этого фермента в геноме *Rba. capsulatus*. Поскольку в геноме не обнаружены гены глутаматмутаза и метиласпартат-аммоний-лиазы, данный путь не имеет потенциала для функционирования у *Rba. capsulatus*.

**Цитрамалатный цикл.** Последовательность реакций этого цикла отображена на рисунке 5, реакции 24–26, 23, 18, 19, причем сукцинил-КоА, полученный из пропионил-КоА, вступает в реакции 10–12, 27 или 10–13, 28, 31, поставляя ПВК для возобновления цикла.

Первая реакция данного пути – образование цитрамалата из ПВК и ацетил-КоА (рисунок 5, реакция 32) – может проходить напрямую при участии (R)-цитрамалатсинтазы (EC: 2.3.1.182), катализирующей конденсацию ацетил-КоА и ПВК до (R)-цитрамалата с высвобождением Коэнзима-А. Возможны и другие последовательности реакций образования цитрамалата из ацетил-КоА и ПВК. Первый не прямой путь получения



цитрамалата состоит из двух реакций. Сначала за счет обратимой (S)-цитрамалил-КоА-лиазы (EC: 4.1.3.25) синтезируется (S)-цитрамалил-КоА, который далее подвергается расщеплению с образованием (S)-цитрамалата за счет (S)-цитрамалат КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.11) или сукцинил-КоА:(S)-малат/(S)-цитрамалат КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.22, рисунок 5, реакции 24 и 25). Второй непрямым путем получения цитрамалата начинается с образования (R)-цитрамалил-СоА под действием обратимой (R)-цитрамалил-КоА-лиазы (EC: 4.1.3.46), который далее подвергается расщеплению с участием сукцинил-КоА:(R)-малат/(R)-цитрамалат КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.20) с образованием (R)-цитрамалата (рисунок 5, реакции 33 и 34). На данный момент известно, что (R)-цитрамалат является субстратом в альтернативном треонин-независимом пути синтеза изолейцина (Risso, et al., 2008; Feng, et al., 2010), а (S)-цитрамалат является субстратом в мезаконатном пути (Kato, Asano, 1997), и показано участие (S)-цитрамалил-СоА в реакциях 3-гидроксипропионатного цикла (Zarzycki, et al., 2009). Поэтому наш дальнейший анализ будет касаться только реакций, приводящих к образованию (S)-цитрамалата, а (R)-цитрамалат не включен в рассмотрение указанного на рисунке цикла.

В геноме *Rba. capsulatus* присутствует ген *citE2*, аннотированного в настоящее время в GenBank как  $\beta$ -субъединица-2 цитратлиазы (EC: 4.1.3.34, EC: 4.1.3.6), способная к осуществлению функции малил-КоА/(S)-цитрамалил-КоА-лиазы (EC: 4.1.3.25) с образованием (S)-цитрамалил-КоА в качестве самостоятельного фермента (Herter, et al., 2002), причем его транскрипты в ацетатных культурах обнаруживались. Однако анализ генома *Rba. capsulatus* показал, что для дальнейшего превращения (S)-цитрамалил-КоА в (S)-цитрамалат (рисунок 5, реакция 25) у бактерии нет ни гена, кодирующего (S)-цитрамалат КоА-трансферазу (EC: 2.8.3.11), ни гена, кодирующего сукцинил-КоА:(S)-малат/(S)-цитрамалат КоА-трансферазу EC: 2.8.3.22. Аналоги ферментов, способных осуществлять данную реакцию, в настоящее время неизвестны.

Последующее образование 2-метилфумарата из цитрамалата (рисунок 5, реакция 26) может осуществляться мезаконазой (EC: 4.2.1.34), способной катализировать прямую и обратную реакции гидратации 2-метилфумарата до (S)-цитрамалата; или обратимыми фумаразами класса I (EC: 4.2.1.2), т.к. известно, что они могут использовать в качестве субстрата не только фумарат, но и 2-метилфумарат (Kronen, Berg, 2015). Однако гены фумараз класса I (EC: 4.2.1.2) в геноме *Rba. capsulatus* отсутствуют, а аминокислотная последовательность мезаконазы (EC: 4.2.1.34) в настоящее время не установлена, поэтому для проверки возможности осуществления данной реакции в *Rba. capsulatus* требуются дополнительные исследования.

Таким образом, возможности функционирования цитрамалатного цикла у *Rba. capsulatus* не определены, поскольку в настоящее время нет данных о наличии ферментов для реакций образования 2-метилфумарата из (S)-цитрамалата и превращения (S)-цитрамалил-КоА в (S)-цитрамалат, а также отсутствуют сведения о способности получения (S)-цитрамалата из цитрамалил-КоА. Для получения более определенного вывода необходимы дополнительные исследования.

**Этилмалонил-КоА путь.** Вариант этого пути, характерного для пурпурной несерной бактерии *Rba. sphaeroides* (Alber, et al., (2006)), изображен на рисунке 5 (реакции 35, 36а, 37а, 38–41, 18, 19). Из образовавшихся в нем молекул глиоксилата и пропионил-КоА далее синтезируются 2 новых молекулы ЩУК. Все гены, кодирующие ферменты, катализирующие указанные реакции, присутствуют в геноме *Rba. capsulatus*. В фототрофных ацетатных культурах *Rba. capsulatus* с NH<sub>4</sub>Cl в качестве источника азота все эти гены, кроме ацетоацетил-КоА-редуктазы (EC: 1.1.1.36), экспрессировались в исследованных культурах.

**III. Образование пропионил-КоА.** К этой группе относится путь, состоящий из части реакций, присутствующих в **3-гидроксипропионатном** (Zarzycki, et al., 2009) и **3-гидроксипропионатном/4-гидроксибутирантном** (Berg, et al., 2007) **циклах**. Данные реакции были обнаружены у зеленой несерной бактерии *Cfl. aurantiacus* и описаны как часть 3-гидроксипропионатного цикла (Zarzycki, et al., 2009). Данный анаплеротический путь состоит из двух циклов, имеющих общие реакции (первый цикл рисунок 5, реакции 42–47, 19, 18, 52, 53, 24; второй цикл - реакции 42–50, 10–12, 51, 16). В результате полных двух циклов из 3 молекул бикарбоната образуется 1 молекула ПВК.

В геноме изучаемой бактерии имеются гены (*accA*, RCAP\_gcc03165; *accB*, RCAP\_gcc02601; *accC*, RCAP\_gcc02602; *accD*, RCAP\_gcc00236), кодирующие многосубъединичный фермент ацетил-КоА-карбоксилазу/карбоксилтрансферазу (EC: 6.4.1.2), которая выполняет карбоксилирование ацетил-КоА до малонил-КоА (реакция 42) и транскрипты которой присутствовали во всех образцах. Ген малонил-КоА-редуктазы (EC: 1.1.1.75, реакция 43) отсутствует в *Rba. capsulatus*, но образование малонат-семиальдегида из малонил-КоА может осуществляться и другим путем (рисунок 5, реакции 43а–43б). Из малонил-КоА под действием малонат КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.3) или за счет малонил-КоА-карбоксилазы (EC: 4.1.1.9), которая, как показано для *Pseudomonas ovalis* (Hsieh, Kolattukudy, 1994), способна выполнять функцию малонат КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.3), образуется малонат. Последний под действием малонат-семиальдегиддегидрогеназы (EC: 1.2.1.15) превращается в малонат-семиальдегид. В геноме *Rba. capsulatus* отсутствует ген малонат КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.3), для малонил-КоА-карбоксилазы (EC: 4.1.1.9) имеются гены (*mdcA*, RCAP\_rcp00130; *mdcB*, RCAP\_rcp00128; *mdcD*, RCAP\_rcp00129; *mdcE*, RCAP\_rcp00127), кодирующие 4 субъединицы фермента, но транскрипты последовательности RCAP\_rcp00130 отсутствовали во всех образцах ацетатных культур. Кроме того, возможность выполнения этим ферментом функции малонат КоА-трансферазы у *Rba. capsulatus* требует экспериментального подтверждения. Проверить присутствие в геноме бактерии малонат-семиальдегиддегидрогеназы (EC: 1.2.1.15) не представляется возможным, т.к. аминокислотная последовательность белка пока не установлена.

Реакция 44 осуществляется с участием 3-гидроксипропионатредуктазы (EC: 1.1.1.298), и данный фермент отсутствует в геноме бактерии. У *Rba. capsulatus* отсутствуют гены ферментов, осуществляющие реакции 45, 46 и 47 на рисунке 5. Эти

реакции могли бы осуществляться за счет альтернативных ферментов. Для превращения 3-гидроксипропионата в 3-гидроксипропионил-КоА (реакция 45) у бактерии вместо 3-гидроксипропионил-КоА-синтазы (ЕС: 6.2.1.36) имеется 3-гидроксипропионил-КоА-гидролаза (ЕС: 3.1.2.4, RCAP\_rcc01563). Реакцию 46 – превращение 3-гидроксипропионил-КоА в акрилоил-КоА – у бактерии может катализировать обладающая широкой субстратной специфичностью еноил-КоА-гидратаза (ЕС: 4.2.1.17, RCAP\_rcc00520, RCAP\_rcc02589, RCAP\_rcc03533; реакция 376) вместо 3-гидроксипропионил-КоА-дегидратазы (ЕС: 4.2.1.116). Превращение акрилоил-КоА в пропионил-КоА (реакция 47) может осуществлять многофункциональный фермент – среднепочечная ацил-КоА-дегидрогеназа (ЕС: 1.3.99.3; в соответствии с новой классификацией – ацил-КоА-дегидрогеназа, ЕС: 1.3.8.7), имеющаяся у *Rba. capsulatus*, RCAP\_rcc03306. В путях метаболизма β-аланина этот фермент выполняет функцию акрилил-КоА-дегидрогеназы вместо отсутствующих аналогов (ЕС: 1.3.1.84, акрилил-КоА-редуктазы (НАДФН); ЕС: 2.8.3.12, глутаконат КоА-трансферазы; ЕС: 1.3.1.95, акрилил-КоА-редуктазы (НАДН)). Транскрипты акрилил-КоА-дегидрогеназы присутствовали во всех образцах ацетатных культур.

Учитывая отсутствие значительного числа генов, относящихся к 3-гидроксипропионатному циклу в геноме *Rba. capsulatus*, а также то, что гены ферментов, теоретически способных выполнять аналогичные функции, не экспрессировались (α- и γ-субъединицы малонил-КоА-карбоксилазы (ЕС: 4.1.1.9)) или экспрессировались на уровне близком к пределу обнаружения (3-гидроксипропионил-КоА-гидролаза ЕС: 3.1.2.4, RCAP\_rcc01563) (реакция 43а, 45), можно полагать, что указанный цикл не участвует в восполнении пула ЦУК у *Rba. capsulatus*.

**Пути преобразования глиоксилата в малат.** В настоящее время известно два пути превращения глиоксилата в интермедиаты ЦТК, оба они приводят к образованию (S)-малата.

1) Наиболее известный классический путь – конденсация глиоксилата и ацетил-КоА до (S)-малата с участием классической **малатсинтазы (ЕС: 2.3.3.9)**. На данный момент охарактеризованы две малатсинтазы с ЕС: 2.3.3.9 (малатсинтазы А и G), которые отличаются стабильностью и природой ингибитора (Ornston, Ornston, 1969). *Rba. capsulatus* обладает генами малатсинтазы А (*aceB*, RCAP\_rcc03337) и малатсинтазы G (*glcB*, RCAP\_rcc00839). Транскрипты малатсинтазы G присутствовали во всех образцах ацетатных культур, малатсинтазы А – во всех образцах культур, кроме одного из культуры, выросшей на среде с добавлением глутамата.

2) Преобразование глиоксилата в малат может осуществляться с помощью последовательного действия **малил-КоА/(S)-цитрамалил-КоА-лиазы (ЕС: 4.1.3.24; 4.1.3.25) и (3S)-малил-КоА-тиоэстеразы (ЕС: 3.1.2.30)**. Первая катализирует образование L-малил-КоА, который далее под действием (3S)-малил-КоА-тиоэстеразы (ЕС: 3.1.2.30) превращается в (S)-малат (рисунок 5, реакции 16 и 17).

В геноме *Rba. capsulatus* присутствуют гены ферментов, способных к осуществлению данных реакций. Для реакции 16 – это  $\beta$ -субъединица-2 цитратлиазы (ЕС: 4.1.3.34; 4.1.3.6; RCAP\_rcc03164), а для реакции 17 –  $\beta$ -субъединица-1 цитратлиазы (ЕС: 4.1.3.34; 4.1.3.6; RCAP\_00727). Транскрипты генов этих ферментов детектировали во всех образцах ацетатных культур данной бактерии.

Таким образом, образование малата из глиоксилата у *Rba. capsulatus* возможно с использованием нескольких ферментов, и нужны дальнейшие исследования для выяснения какие из них участвуют в глиоксилатном цикле.

**Пути преобразования пропионил-КоА до сукцинил-КоА или ПВК.** В настоящее время известны 3 пути преобразования пропионил-КоА в интермедиаты ЦТК, идущие на восполнение пула ЩУК. В одном из них из пропионил-КоА образуется сукцинил-КоА (метилмалонил-КоА-путь (Zhang, et al., 2009)). В других (метилцитратный цикл и путь окисления через лактат) из пропионил-КоА образуется ПВК, который может превращаться в малат или ЩУК под действием одного из С3-карбоксилирующих ферментов.

**Метилмалонил-КоА путь.** В этом пути из пропионил-КоА в результате трех реакций образуется сукцинил-КоА (рисунок 5, реакции 48–50). Образование из пропионил-КоА S-метилмалонил-КоА могут осуществлять 2 фермента: пропионил-КоА-карбоксилаза (ЕС: 6.4.1.3) и метилмалонил-КоА-карбокситрансфераза (ЕС: 2.1.3.1), ген которой не обнаружен в геноме *Rba. capsulatus*. Гены ферментов, необходимых для осуществления реакций 49–50, присутствуют в изучаемом геноме (*rccA*, RCAP\_rcc00911 и *rccB*, RCAP\_rcc00906 – гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц пропионил-КоА-карбоксилазы (ЕС: 6.4.1.3), соответственно; RCAP\_rcc00538 – метилмалонил-КоА-эпимеразы (ЕС: 5.1.99.1); *bhbA*, RCAP\_rcc00912 – метилмалонил-КоА-мутаза (ЕС: 5.4.99.2)). Однако этот путь неактивен у исследуемых «ацетатных» культур *Rba. capsulatus*, т.к. в них отсутствовали транскрипты метилмалонил-КоА-мутазы (ЕС: 5.4.99.2, рисунок 5, реакция 50).

**Метилцитратный цикл.** Последовательность реакций этого пути отражена на рисунке 5 (реакции 55–58, 11–13, а также 54 при росте на пропионате), в них образуется ПВК и ЩУК, последняя замыкает цикл. ПВК под действием карбоксилаз может превратиться в новую молекулу ЩУК (см. ниже). Путь имеет две модификации: I (Brock, et al., 2002) и II (Gould, et al., 2006), которые отличаются ферментами, катализирующими реакцию 56. В метилцитратном цикле I данную реакцию катализирует метилцитратдегидратаза (ЕС: 4.2.1.79; рисунок 5, реакция 56), в метилцитратном цикле II образование из (2S,3S)-2-метилцитрата 2-метил-цис-аконитата осуществляется в результате двух реакций (рисунок 5, реакции 56a и 56b) через образование 2-метил-транс-аконитата с помощью 2-метилцитратдегидратазы (2-метил-транс-аконитат формирующей; ЕС: 4.2.1.117) и 2-метилаконитатизомеразы (ЕС: 5.2.1.-). В геноме *Rba. capsulatus* отсутствует ген *acnB* одного из ключевых ферментов метилцитратного цикла I и II (рисунок 5, реакция 57) – аконитатгидратазы/2-метилизоцитратгидратазы (ЕС: 4.2.1.3/ЕС: 4.2.1.99). Однако есть примеры, когда классическая аконитатгидратаза (ген *acnA*) также, как и аконитатгидратаза/2-метилизоцитратгидратаза (*acnB*), может выступать в роли

бифункционального фермента (Horswill, Escalante-Semerena, 2001). Для выявления такой возможности у аконитатгидратазы (*acnA*, RCAP\_rcc02150, реакция 2/3) *Rba. capsulatus* необходима экспериментальная проверка.

Наличие генов остальных ферментов метилцитратного цикла I (рисунок 5, реакции 55–56 и 58) в геноме бактерии (2-метилцитратсинтазы (ЕС: 2.3.3.5), RCAP\_rcc03348 – реакция 55; 2-метилцитратдегидратазы (ЕС: 4.2.1.79), RCAP\_rcc03347 – реакция 56; метилизоцитратлиазы (ЕС: 4.1.3.30); RCAP\_rcc03349 – реакция 58), свидетельствует в пользу возможного функционирования этого пути у данной бактерии. Учитывая отсутствие или неоднозначное присутствие транскриптов гена 2-метилцитратдегидратазы, можно сделать вывод, что метилцитратный цикл не активен у *Rba. capsulatus* в данных экспериментальных условиях.

**Путь окисления пропионил-КоА через лактат до ПВК с последующим карбоксилированием до малата или ЩУК.** В этом пути (рисунок 5, реакции 47, 59–61) образование пропионил-КоА в акрилоил-КоА (рисунок 5, обратимая реакция 47) может осуществлять среднепочечная-ацил-КоА-дегидрогеназа (ЕС: 1.3.99.3, RCAP\_rcc03306 (в соответствии с новой классификацией – ацил-КоА-дегидрогеназа (ЕС: 1.3.8.7), в путях метаболизма β-аланина выполняет функцию акрилил-КоА-дегидрогеназы). Гены других ферментов-аналогов (ЕС: 1.3.1.84, акрилил-КоА-редуктазы (НАДФН); ЕС: 2.8.3.12, глутаконат КоА-трансферазы; ЕС: 1.3.1.95, акрилил-КоА-редуктаза (НАДН)), способных к катализу реакции 47 в геноме *Rba. capsulatus* не найдены. Генов ферментов, осуществляющих реакцию 59 (лактоил-КоА-дегидрогеназы (ЕС: 4.2.1.54) и реакцию 60 (пропионат КоА-трансферазы (ЕС: 2.8.3.1)), в геноме *Rba. capsulatus* также не обнаружено.

Таким образом, в связи с отсутствием двух ключевых генов данного пути преобразования пропионил-КоА, рассматриваемый путь не может принимать участие в восполнении пула ЩУК у *Rba. capsulatus*.

**IV. Восполнение пула ЩУК за счет образования ПВК/ФЕП с их последующим карбоксилированием до малата или ЩУК, или образование из ПВК и ацетил-КоА цис-аконитата.** Восполнение интермедиатов ЦТК возможно также комбинацией путей образования 2-фосфоглицерата (2-ФГК), ФЕП или ПВК с путями их карбоксилирования до малата или ЩУК. Образование ПВК возможно при совместном функционировании путей образования пропионил-КоА и метилцитратного пути или пути окисления пропионил-КоА через лактат, а также в рассмотренных далее метаболических путях.

**Образование ПВК из экзогенного ацетата.** В геноме *Rba. capsulatus* обнаружены гены двух возможных путей образования ПВК непосредственно из ацетил-КоА (рисунок 5, реакции 62 или 63–64).

В первом пути (реакция 62) образование ПВК осуществляется в процессе конденсации ацетил-КоА и CO<sub>2</sub> за счет пируват:ферредоксин оксидоредуктазы (ЕС: 1.2.7.1, ген *nifJ* (RCAP\_rcc01728)). Однако в ацетатных культурах бактерии транскрипты этого гена отсутствовали или синтезировались на уровне близком к пределу обнаружения.

Во втором пути (реакции 63, 64) ПВК может синтезироваться из ацетил-КоА и формиата, который образуется из CO<sub>2</sub> за счет обратимой формиатдегидрогеназы (EC: 1.2.1.2; *fdhA*, RCAP\_rcc03035; *fdhB*, RCAP\_rcc03036; *fdhC*, RCAP\_rcc03037; *fdhE*, RCAP\_rcc03033). Конденсацию формиата и ацетил-КоА катализирует обратимая формиат-С-ацетилтрансфераза (EC: 2.3.1.54; *pflB*, RCAP\_rcc02866; *pflD*, RCAP\_rcc02211). Однако в ацетатных культурах этой бактерии, транскрипты субъединиц формиатдегидрогеназы отсутствовали или синтезировались на уровне близком к пределу обнаружения независимо от источника азота. Таким образом, синтез ПВК из ацетата *Rba. capsulatus* возможен, но в исследованных ацетатных культурах не реализуется.

**Образование ФЕП/ПВК за счет запасных углеводов (гликогена).** Использование запасных веществ для восполнения пула ЩУК – кратковременный процесс, определяемый объемом запасных веществ и скоростью образования у *Rba. capsulatus* достаточного количества ферментов, необходимых клетке при адаптации к новым условиям роста. В переходный (несколько часов) период теоретически возможно использование запасных веществ для роста с использованием только ацетата. *Rba. capsulatus* метаболизирует углеводы в пути Энтнера–Дудорова (рисунок 5, реакции 65–70) и гликолитическом пути (Эмбдена–Мейергофа–Парнаса; рисунок 5, реакции 71, 72, 75/82–81, 31). Одними из конечных метаболитов обоих путей являются ПВК и ФЕП. Гены всех необходимых ферментов указанных путей в геноме *Rba. capsulatus* имеются. Во всех образцах ацетатных культур исследуемых бактерий отсутствовали транскрипты гена, кодирующего один из ферментов пути Энтнера–Дудорова (6-фосфоглюконолактоназы (EC: 3.1.1.31), RCAP\_rcc02407 – реакция 68). Транскрипты остальных генов, кодирующих ферменты этого пути, присутствовали в образцах ацетатных культур.

В ацетатных культурах *Rba. capsulatus* транскрипты гена ключевого фермента пути гликолиза, 6-фосфофруктокиназы (EC: 2.7.1.11), RCAP\_rcc01137, рисунок 5, реакция 75, в части образцов отсутствовали. При этом во всех образцах обнаруживались транскрипты фруктозобифосфатазы (EC: 3.1.3.11; реакция 82), которая осуществляет обратную реакцию и определяет работу пути в сторону глюконеогенеза. Транскрипты генов, кодирующие остальные гликолитические ферменты присутствовали во всех образцах ацетатных культур.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что запасные углеводы не играют роли в восполнении пула ЩУК, что подтверждается и нашими экспериментальными данными.

**Образование ФЕП/ПВК из интермедиатов цикла Кальвина–Бенсона** (рисунок 5, реакции 83, 84, 79, 78, 77, 76, 82, 85–89), поскольку основным продуктом цикла в гетеротрофных условиях является 3-ФГК (Willison, 1993). Для преобразования синтезированного 3-ФГК в 2-ФГК, а затем в ФЕП и ПВК могут быть задействованы ферменты пути Эмбдена–Мейергофа–Парнаса (2,3-бисфосфоглицерат-независимая фосфоглицератмутаза, ФЕП-гидратаза и две пируваткиназы, соответственно). Из 6 фиксированных в цикле молекул CO<sub>2</sub> образуются 2 молекулы 2-ФГК. Гены, необходимые

для функционирования цикла Кальвина–Бенсона присутствуют в геноме *Rba. capsulatus*, их транскрипты присутствовали в образцах «ацетатных» культур этой бактерии.

#### **ПВК/ФЕП-карбоксилирующие ферменты (анаплеротические карбоксилазы).**

Для получения интермедиатов ЦТК из ПВК или других СЗ-кислот необходимо их карбоксилирование. Из шести известных ферментов, способных к выполнению реакций анаплеротического карбоксилирования, гены трех из них отсутствуют в геноме *Rba. capsulatus*: ФЕП-карбоксилаза (ЕС: 4.1.1.31; рисунок 5, реакция 29), ГТФ-зависимая ФЕП-карбоксикиназа (ЕС: 4.1.1.32; рисунок 5, реакция 28) и ФЕП-карбоксифосфорилаза (ЕС: 4.1.1.38; рисунок 5, реакция 28). Однако в исследуемом геноме присутствуют два гена (*maeB1* (RCAP\_gcc00443) и *maeB2* (RCAP\_gcc03496)), кодирующих малик-фермент (ЕС: 1.1.1.40) (реакция 27). Оба малик-фермента *Rba. capsulatus* (*maeB1* и *maeB2*) являются НАДФ<sup>+</sup>-зависимыми. Таким образом, можно полагать, что малик-фермент способен осуществлять карбоксилирование и у *Rba. capsulatus*. Уровень транскрипции обоих генов, кодирующих малик-ферменты в геноме *Rba. capsulatus*, был высоким в ацетатных культурах независимо от используемого источника азота.

Также в геноме *Rba. capsulatus* присутствует ген АТФ-зависимой ФЕП-карбоксикиназы (ЕС: 4.1.1.49, RCAP\_gcc02837), которая способна к осуществлению обратной реакции. Его транскрипты присутствовали во всех образцах. При этом уровень транскрипции ФЕП-карбоксикиназы был достаточно высоким независимо от источника азота.

*Rba. capsulatus* обладает биотин-содержащей пируваткарбоксилазой (ЕС: 6.4.1.1) (Modakt, Kelly, 1995), которую кодирует ген *pus* (RCAP\_gcc01203), его транскрипты присутствуют при росте на ацетате. Наличие малик-ферментов, ФЕП-карбоксикиназы, а также биотин-содержащей пируваткарбоксилазы позволяет утверждать, что пул ЩУК у *Rba. capsulatus* может восполняться путем карбоксилирования СЗ-соединений.

Таким образом, комбинация реакций синтеза ПВК и СЗ-кислот с их карбоксилированием является путем восполнения ЦТК интермедиатами.

**Образование цис-аконитата из ПВК и ацетил-КоА.** Последовательность реакций, связанная с метаболизмом итаконата (рисунок 5, реакции 24,97-98, 99/100-102) гипотетически, могла бы участвовать в восполнении ЦТК интермедиатами на уровне цис-аконитата. В геноме *Rba. capsulatus* отсутствуют все известные в настоящее время гены уникальных ферментов этого пути.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе проделанной работы были определены основные причины существовавших в литературе разногласий в отношении функционирования глиоксилатного цикла у пурпурной несерной бактерии *Rba. capsulatus*. Они заключаются в высокой лабильности ИЦЛ в окислительных условиях и под действием протеаз, как при разрушении клеток в аэробных условиях, так и, возможно, в целых клетках в стационарной фазе роста.

Оказалось также, что ИЦЛ активность зависит от физиологического состояния культуры, причем ее наличие не обязательно для роста на ацетате.

В результате проведенного поиска информации о последовательностях реакций, позволяющих пополнять пул интермедиатов ЦТК, были идентифицированы пути, которые ранее не рассматривались при изучении метаболизма ацетата. Известные и выявленные последовательности реакций были объединены в общую метаболическую схему, представленную на рисунке 5.

Анализ и систематизация собранной информации позволили разработать классификацию всех найденных путей. В соответствии с этой классификацией, пути подразделены на четыре основные группы по образуемому в них метаболиту, через который происходит образование ЩУК или звеньев ЦТК, предшествующих ЩУК.

- (I), с образованием глиоксилата.
- (II), с образованием глиоксилата и пропионил-КоА.
- (III), с образованием только пропионил-КоА.
- (IV), с образованием ПВК/ФЕП.

Установлены пути, гены для синтеза ферментов которых присутствуют у *Rba. capsulatus*. Используя общедоступные данные об экспрессионных профилях фототрофных «ацетатных» культур бактерии показано, гены каких из этих путей активны на транскрипционном уровне. Полученные результаты суммированы в таблице 1.

Таблица 1.

Возможные пути восполнения пула ЩУК в ЦТК у *Rba. capsulatus* B10.

№	Центральный метаболит	Путь	Наличие генов	Транскрипты генов
I	Глиоксилат	Глиоксилатный цикл	+	+
		Путь с участием Рубиско в качестве оксигеназы	+	+
II	Глиоксилат + пропионил-КоА	Метиласпартатный путь	-	-
		Цитрамалатный путь	+/-	+/-
		Этилмалони-КоА путь	+	+
III	Пропионил-КоА	Часть реакций 3-гидроксипропионатного пути	+/-	-
IV	ПВК/ФЕП	Образование ПВК из экзогенного ацетата и CO <sub>2</sub> с участием пируват:оксидоредуктазы	+	-
		Образование ПВК из экзогенного ацетата и CO <sub>2</sub> с участием обратимой формиатдегидрогеназы и обратимой формиат-С-ацетилтрансферазы	+	-



		Образование ФЕП/ПВК за счет запасных углеводов в путях Энтнера–Дудорова и Эмбдена–Мейергофа–Парнаса	+	-
		Образование ФЕП/ПВК из интермедиатов цикла Кальвина–Бенсона	+	+
<b>Дальнейшее преобразование центральных метаболитов в ЦУК и предшественники ЦУК</b>				
№	Центральный метаболит	Путь	Наличие генов	Транскрипты генов
I	глиоксилата в малат	с участием малатсинтаз	+	+
		с помощью последовательного действия малил-КоА/(S)-цитрамалил-КоА-лиазы и (3S)-малил-КоА-тиоэстеразы	+	+
II	преобразование ПВК/ФЕП до малата, фумарата или ЦУК	с помощью пируваткарбоксилазы	+	+
		ФЕП-карбоксикиназы	+	+
		ФЕП-карбоксилазы	-	-
		малил-фермента	+	+
		путь образования фумарата из ПВК	-	-
III	пропионил-КоА	Метилмалонил-КоА путь	+	-
		Метилцитратный цикл	+	-
		Путь окисления пропионил-КоА через лактат до ПВК	-	-

Необходимо обратить внимание, что в отношении цитрамалатного цикла наш анализ не позволил прийти к определенному заключению, что связано с недостатком информации о структуре ряда генов, продукты которых вовлечены в этот цикл.

Интересным является факт, что путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы имеет генетический потенциал у *Rba. capsulatus*. Более того, все необходимые для этого пути гены экспрессируются. Однако для его функционирования необходимо наличие высокой концентрации кислорода и малой концентрации углекислоты, что не реализуется в анаэробных фотогетеротрофных условиях.

Таким образом, полученные результаты указывают на наличие у *Rba. capsulatus* нескольких путей, способных осуществлять вклад в пополнение пула ЦУК, что позволяет объяснить рост *Rba. capsulatus* на ацетате в отсутствие активности ИЦЛ. Одновременную

активность всех четырех путей (таблица 1), транскрипты генов которых присутствуют в ацетатных фототрофных культурах *Rba. capsulatus*, можно объяснить их дополнительными функциями, способствующими оптимальному росту на ацетате. В этом случае глиоксилатный цикл является основным путем восполнения пула ЦУК, цикл Кальвина-Бенсона может способствовать поддержанию окислительно-восстановительного баланса и снижать отток интермедиатов ЦТК на синтез углеводов. Этилмалонил-КоА цикл является источником пропионил-КоА – основного звена при синтезе органических кислот с нечетным числом углеродных атомов. Путь синтеза глиоксилата с участием Рубиско в роли оксидазы может быть важен в кратковременных аэробных условиях, снижая количество кислорода в среде до уровней, не ингибирующих фотосинтез.

## ВЫВОДЫ

1) Обнаружено, что изоцитратлиаза подвергается протеолизу при разрушении клеток *Rba. capsulatus*. Отработан метод стабилизации изоцитратлиазы в бесклеточных экстрактах с одновременным добавлением дитиотреитола и ингибиторов протеаз.

2) Впервые показано, что активность изоцитратлиазы в культурах *Rba. capsulatus* зависит не только от используемого субстрата, но и от фазы роста культуры, а также от времени пребывания инокулята в стационарной фазе роста перед пересевом на среду с ацетатом и вида субстрата, на котором рос инокулят.

3) На основе проанализированной информации базы данных KEGG (разделы Pathway и Compounds) об известных биохимических реакциях с точки зрения их участия в образовании интермедиатов ЦТК сконструирована схема путей восполнения пула щавелевоуксусной кислоты в ЦТК у прокариот.

4) С помощью баз данных KEGG Organisms: Complete Genomes и Uniprot, а также алгоритмов Nucleotide BLAST и tBLASTn были определены имеющиеся у *Rba. capsulatus* гены, кодирующие ферменты путей восполнения пула щавелевоуксусной кислоты в ЦТК: глиоксилатного цикла, пути образования пропионил-КоА и глиоксилата в этилмалонил-КоА пути, пути образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы, пути образования пирувата с участием обратимых формиатдегидрогеназы и формиат-С-ацетилтрансферазы, пути образования пирувата за счет пируватсинтазы, пути образования пирувата/ФЕП из запасных углеводов (реакции гликолиза или пути Энтнера-Дудорова), для превращения пируват/ФЕП имеются гены С3-карбоксилирующих ферментов (пируваткарбоксилаза, ФЕП-карбоксикиназа, два декарбоксилирующих малик-фермента), для образования интермедиатов ЦТК из пропионил-КоА имеются гены метилмалонил-КоА пути и метилцитратного цикла, для преобразования глиоксилата в малат имеются гены двух различных путей (двух малатсинтаз или малил-КоА/(S)-цитрамалил-КоА-лиазы в сочетании с (3S)-малил-КоА-тиоэстеразой).

5) Используя базу данных NCBI Gene Expression Omnibus, содержащую результаты транскриптомных анализов, показано, что при фототрофном росте на среде с ацетатом в анаэробных условиях у *Rba. capsulatus* синтезируются транскрипты всех генов

глиоксилатного цикла, цикла Кальвина-Бенсона, пути преобразования пирувата/ФЕП С3-карбоксилирующими ферментами, этилмалонил-КоА пути и пути образования глиоксилата при участии Рубиско в качестве оксигеназы.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых переводных журналах, рекомендованных ВАК.

1) **Петушкова Е.П.**, Цыганков А.А. / Основные факторы, влияющие на изоцитратлиазную активность *Rhodobacter capsulatus* В10 в фототрофных условиях // Микробиология, 2011, том 80, №5, с. 606-611.

2) **Петушкова Е.П.**, Цыганков А.А. / Метаболизм ацетата пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* // БИОХИМИЯ, 2017, том 82, вып. 5, с. 786 – 807.

### Тезисы докладов на конференциях.

1) Elena V. Patrusheva, **Ekaterina P. Lavrinenco**, Anatoly A. Tsygankov / Purple non-sulfur bacterium has isocitrate lyase activity indeed // International Meeting «Photosynthesis in the post-genomic era: structure and function of photosystems» (Pushchino, 2006);

2) **Лавриненко Е.П.** / Определение изоцитратлиазы в пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* В10 // 11-я Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» 2007, с. 150.

3) **Петушкова Е.П.**, Цыганков А.А./ Изоцитратлиазная активность пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* В10 // Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» декабрь 2009, с. 148.

4) **Петушкова Е.П.**, Цыганков А.А./ Изоцитратлиазная активность пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* В10 // 14 Международная Пуцинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века» 2010, с. 333.

5) **Петушкова Е.П.** / Особенности проявления активности изоцитратлиазы в культуре *Rhodobacter capsulatus* штамм В10 // Международная конференция молодых ученых “Экспериментальная и теоретическая биофизика” 2013, с. 140.

6) **Петушкова Е.П.** / Влияние состава питательной среды на проявление активности изоцитратлиазы в культуре *Rhodobacter capsulatus* штамм В10 // Школа-конференция молодых ученых на базе института фундаментальных проблем биологии РАН “Биосистема: от теории к практике” 2013, с. 49.

7) **Петушкова Е.П.**, Цыганков А.А. / Экспрессия генов известных анаплеротических путей ассимиляции ацетата в бактерии *Rhodobacter capsulatus* // 5-ый Всероссийском симпозиум с международным участием «Автотрофные организмы» 2015, с. 65.

8) **Petushkova E. P.** and Tsygankov A. A. Peculiarities of acetate assimilation in purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus* В10. International Conference “Photosynthesis Research for Sustainability” in honor of Nathan Nelson and T. Nejat Veziroglu, June 19-25 2016, Pushchino, Russia, pp. 162.

9) Петушкова Е.П., Цыганков А.А./ Известные и новые анаэробные пути, необходимые бактериям, когда ацетат является единственным источником углерода // 1-ый Российский Микробиологический Конгресс 2017, с. 160.

### СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ - аденозиндифосфат  
АТФ – аденозинтрифосфат  
БФГ – 1,3-бисфосфоглицерат  
Бхл *a* – бактериохлорофилл *a*  
БЭ – бесклеточный экстракт  
ВЦТК – восстановительный цикл трикарбоновых кислот  
ГАФ – глицеральдегид-3-фосфат  
ДТ – дитиотреитол  
ИЦЛ – изоцитратлиаза  
КоА – коэнзим-А  
МС – малатсинтаза  
ОРС – открытая рамка считывания  
ПВК – пировиноградная кислота  
ПГА - полигидроксиалканаты  
Рубиско - рибулозобифосфаткарбоксилаза  
ФЕП – фосфоенолпируват  
ФГК – фосфоглицериновая кислота, 3-фосфоглицерат  
ЦТК – цикл трикарбоновых кислот/цикл Кребса  
ЩУК – щавелевоуксусная кислота