

ПЕТУШКОВА Екатерина Павловна

**АССИМИЛЯЦИЯ АЦЕТАТА ПУРПУРНОЙ НЕСЕРНОЙ БАКТЕРИЕЙ  
*RHODOBACTER CAPSULATUS B10***

Специальность: 03.02.03 – микробиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
А.А. Цыганков

Автор посвящает свою работу горячо любимому и глубокоуважаемому папе, *Лавриненко Павлу Николаевичу*, который с раннего детства прививал любовь к природе, интерес к познанию окружающего мира и к науке.

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
Актуальность проблемы .....	7
Цель и задачи исследования.....	7
Научная новизна работы.....	8
Научно-практическое значение работы.....	9
Апробация работы.....	9
Публикации.....	9
Структура диссертации.....	9
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Систематическое положение <i>Rba. capsulatus</i> .....	11
1.2. Общая характеристика и физиология пурпурных несерных бактерий. Отличительные особенности <i>Rba. capsulatus</i> .....	11
1.2.1. Рост на свету в анаэробных условиях.....	13
1.2.2. Рост в темноте.....	14
1.2.3. Характеристика фотосинтетического аппарата пурпурных несерных бактерий.....	15
1.2.4. Потребляемые источники азота, серы. Необходимые витамины.....	17
1.3. Углеродный метаболизм пурпурных несерных бактерий.....	18
1.3.1. Гетеротрофный метаболизм.....	18
1.3.2. Автотрофная фиксация CO <sub>2</sub> .....	20
1.3.3. Запасные вещества.....	24
1.3.4. Углеродный метаболизм и окислительно-восстановительный баланс клетки.....	25
1.3.5. Рост на среде с ацетатом.....	25
1.3.5.1. Регуляция работы глиоксилатного цикла.....	33
1.4. Современные подходы изучения метаболизма бактерий.....	36
1.4.1. Определение схемы метаболизма на основе первичной автоматической аннотации генома.....	39
1.4.2. Протеомика.....	40
1.4.3. Метаболомный анализ.....	41
1.4.4. Транскриптомный анализ. Экспрессионные профили бактерии.....	42
1.5. Практическое значение изучения метаболизма ацетата в <i>Rba. capsulatus</i> .....	43
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	45
2.1. Объект исследования. Ростовые среды.....	45

2.2. Периодическое культивирование.....	46
2.3. Периодическое культивирование с рН-статированием.....	46
2.4. Определение фаз роста культуры (спектрофотометрическое).....	46
2.5. Измерение интенсивности падающего света.....	46
2.6. Получение бесклеточных экстрактов (БЭ).....	47
2.7. Биохимические анализы.....	47
2.7.1. Определение концентрации бактериохлорофилла <i>a</i> .....	47
2.7.2. Определение концентрации оргкислот в культуральной жидкости.....	47
2.7.3. Определение содержания гликогена в клетках.....	47
2.7.4. Определение ферментативной активности ИЦЛ в БЭ.....	47
2.7.5. Определение концентрации белка в БЭ.....	48
2.8. Методы обработки баз данных.....	48
2.8.1. Анализ информации об известных в настоящее время ферментах, которые могут быть задействованы в реакциях восполнения пула ЦУК.....	48
2.8.2. Определение генетического потенциала для функционирования выявленных и ранее известных путей восполнения пула ЦУК в <i>Rba. capsulatus</i> .....	48
2.8.3. Определение активности генов, вовлеченных в ацетатный метаболизм <i>Rba. capsulatus</i> , на транскрипционном уровне.....	49
2.9. Статистическая обработка экспериментальных данных.....	50
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	51
3.1. Метод определения ИЦЛ активности в <i>Rba capsulatus</i> .....	51
3.2. Влияние условий культивирования на ИЦЛ активность в фотогетеротрофных культурах <i>Rba. capsulatus</i> .....	53
3.2.1. ИЦЛ активность в разных фазах роста культур <i>Rba. capsulatus</i> .....	53
3.2.2. Влияние рН ростовой среды на ИЦЛ активность в культурах <i>Rba. capsulatus</i> ...57	
3.2.3. Влияние интенсивности света на ИЦЛ активность в культурах <i>Rba. capsulatus</i> .58	
3.2.4. ИЦЛ активность в культурах <i>Rba. capsulatus</i> при смене ростового субстрата с ацетата на лактат.....	59
3.3. Выяснение альтернативных глиоксилатному шунту путей восполнения пула ЦУК в <i>Rba. capsulatus</i> .....	62
I. Образование глиоксилата.....	64
Глиоксилатный цикл.....	64
Путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы...68	
II. Образование глиоксилата и пропионил-КоА.....	72

<i>Метиласпартатный цикл</i> .....	72
<i>Цитрамалатный цикл</i> .....	76
<i>Этилмалонил-КоА путь</i> .....	77
III. Образование пропионил-КоА.....	78
<i>Часть реакций 3-гидроксипропионатного цикла</i> .....	78
Пути преобразования глиоксилата в малат.....	83
Пути преобразования пропионил-КоА до сукцинил-КоА или ПВК.....	84
<i>Метилмалонил-КоА путь</i> .....	84
<i>Метилцитратный цикл</i> .....	87
<i>Путь окисления пропионил-КоА через лактат до ПВК с последующим карбоксилированием до малата или ЦУК</i> .....	87
IV. Образование ПВК/ФЕП.....	88
<i>Образование ПВК из экзогенного ацетата</i> .....	88
<i>Образование ФЕП/ПВК за счет запасных углеводов (гликогена)</i> .....	92
<i>Образование ФЕП/ПВК из интермедиатов цикла Кальвина–Бенсона</i> .....	92
ПВК/ФЕП-карбоксилирующие ферменты (анаплеротические карбоксилазы) и путь образования из ПВК фумарата.....	96
Образование <i>цис</i> -аконитата из ПВК и ацетил-КоА.....	97
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	100
ВЫВОДЫ.....	106
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	107
БЛАГОДАРНОСТИ.....	130
СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	131
Статьи в рецензируемых переводных журналах, рекомендованных ВАК.....	131
Тезисы докладов на конференциях.....	131

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ - аденозиндифосфат	ТМАО – триметил-N-оксид
АТФ – аденозинтрифосфат	ФАД – флавинадениндинуклеотид
БФГ – 1,3-бисфосфоглицерат	ФЕП – фосфоенолпируват
Бхл <i>a</i> – бактериохлорофилл <i>a</i>	ФГК – фосфоглицериновая кислота, 3- фосфоглицерат
БЭ – бесклеточный экстракт	ЦТК – цикл трикарбоновых кислот/цикл Кребса
ВЦТК – восстановительный цикл трикарбоновых кислот	ЩУК – щавелевоуксусная кислота, оксалоацетат
ГАФ – глицеральдегид-3-фосфат	GEO – Gene Expression Omnibus
ДМСО – диметилсульфоксид	KEGG – Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
ДТ – дитиотреитол	LN1 – коровая светособирающая антенна
ИЦДГ - изоцитратдегидрогеназа	LN2 – периферийная светособирающая антенна
ИЦЛ – изоцитратлиаза	<i>Chlorobium (Chl.)</i>
КА – карбоангидраза	<i>Chloroflexus (Cfl.)</i>
кДНК – кодирующая ДНК	<i>Rhodobacter (Rba.)</i>
КоА – коэнзим-А	<i>Rhodospirillum (Rsp.)</i>
кРНК – кодирующая РНК	<i>Rhodopseudomonas (Rps.)</i>
МС – малатсинтаза	<i>Blastochloris (Blc.)</i>
НАДФН – никотинамид- адениндинуклеотидфосфат	
ОРС – открытая рамка считывания	
ПВК – пировиноградная кислота	
ПГА – полигидроксиалканоаты	
Рубиско - рибулозобифосфаткарбоксилаза	
РЦ – реакционный центр фотосинтеза	

## ВВЕДЕНИЕ

**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* B10.

2) Изучить влияние физиологического состояния культуры на активность ИЦЛ у *Rba. capsulatus* B10.

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 переменные 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).

**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-ом Российском Микробиологическом Конгрессе (Пушино, 2017).

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

**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.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Систематическое положение *Rba. capsulatus*.

По классификации, основанной на результатах анализа 16S рРНК и других молекулярно-биологических исследований, царство (домен) *Bacteria* разделено на ряд филумов (типов) (<http://www.bacterio.net/~classifphyla.html>). Фототрофные представители присутствуют в нескольких из них. Пурпурные бактерии и аэробные бактериохлорофилл *a*-образующие фототрофные бактерии включены в филум *Proteobacteria*, зелёные несерные бактерии (нитчатые аноксигенные фототрофные бактерии) - в филум *Chloroflexi*, зелёные серобактерии - в филум *Chlorobi*, гелиобактерии (филум *Firmicutes*), кандидат в семейство *Acidobacterium* аэробных фототрофных бактерий – *Chloracidobacterium thermophilum* (Bryant, et al., 2007) (филум *Acidobacteria*) и цианобактерии (филум *Cyanobacteria*).

Пурпурные бактерии, осуществляющие аноксигенный фотосинтез, на основании способности окислять сероводород и накапливать при этом серу были подразделены “пурпурные несерные бактерии” и “пурпурные серные бактерии”. В дальнейшем пурпурные бактерии были подразделены на три семейства: *Rhodospirillaceae*, *Chromatiaceae* и *Ectothiorhodospiraceae*. К первому семейству отнесены все пурпурные несерные бактерии.

Филум *Proteobacteria* подразделяется на 7 классов: *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Epsilonproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Oligoflexia* и *Zetaproteobacteria*. Большая часть исследованных пурпурных несерных бактерий относятся к *Alphaproteobacteria* (порядок *Rhizobiales* (семейства *Bradyrhizobiaceae*, *Rhodobiaceae*), порядок *Rhodobacterales* (семейство *Rhodobacteraceae*), порядок *Rhodospirillales* (семейство *Rhodospirillaceae*) и лишь часть представителей отнесены к *Betaproteobacteria* (порядок *Burkholderiales* и порядок *Rhodocyclales* (семейство *Rhodocyclaceae*). Представители пурпурных серных бактерий включены в *Gammaproteobacteria*. В соответствии с этой классификацией систематическое положение вида *Rhodobacter capsulatus* выглядит следующим образом: Царство *Bacteria*, Филум *Proteobacteria*, Класс *Alphaproteobacteria*, Порядок *Rhodobacterales*, Семейство *Rhodobacteraceae*, Род *Rhodobacter*, Вид *Rhodobacter capsulatus*.

### 1.2. Общая характеристика и физиология пурпурных несерных бактерий. Отличительные особенности *Rba. capsulatus*.

Представители пурпурных бактерий являются одноклеточными Грам-отрицательными организмами, размеры которых составляют 1-20 мкм в длину и 0,3-6 мкм в

ширину. Основным способом размножения пурпурных бактерий является бинарное деление (некоторые виды размножаются почкованием).

Для представителей рода *Rhodobacter* характерны овальные или палочковидные клетки диаметром 0,5-1,2 мкм. Среди них имеются как подвижные (*Rba. capsulatus*), так и неподвижные формы. Подвижные формы имеют полярные жгутики. Бактерии данного рода могут образовывать капсулы и слизь. Клетки некоторых видов рода *Rhodobacter* могут не расходиться после деления, образуя цепочки клеток (Определитель бактерий Берджи, 1997) или агрегаты из клеток, объединенные выделенной в окружающую среду слизью. Как правило, это наблюдается в условиях воздействия неблагоприятных ростовых факторов (рН среды, избыточное освещение клеток, высокие концентрации органических кислот в среде и т.п.). При наступлении благоприятных условий роста такие культуры, например, *Rba. capsulatus* В10, вновь становятся однородными, состоящими из отдельных клеток. *Rba. capsulatus* склонны формировать цепочки клеток намного больше, чем у *Rba. sphaeroides* или *Rps. gelatinosus* (Weaver et al., 1975). У большинства рассмотренных авторами штаммов *Rba. capsulatus* наблюдалась "зигзагообразное" расположение клеток в цепях (как правило, в стационарной фазе роста культуры на минеральной среде при рН около 8.5), способность к образованию цепей зависела от состава питательной среды. У некоторых штаммов клеточные цепочки были прямыми или «подвижными», а не зигзагообразными. У *Rba. capsulatus* В10 на синтетической среде наблюдалась «зигзагообразная», а на пептон-дрожжевой среде – прямая форма цепи клеток (Weaver et al., 1975).

Бактерии рода *Rhodobacter* размножаются путем бинарного деления. Кроме того, для большинства природных штаммов *Rba. capsulatus* показана возможность горизонтального переноса генетической информации с участием фагоподобных частиц, называемых агентами переноса генов, которые не проявляют вирулентности по отношению к другим видам пурпурных бактерий (Marrs, 1974; Weaver et al., 1975; Lang, Beatty, 2001). Эти частицы имеют «головку» диаметром 30 нм с короткими выступами и «хвост» (длиной 30-50 нм и диаметром 6 нм) с отростками и чехликом (Yen et al. 1979). Они содержат только хромосомную ДНК бактерии-донора длиной около 4,5 тысяч пар оснований.

Оптимальная температура для роста большинства пурпурных несерных бактерий 30-32<sup>0</sup>С. Исключение составляют виды, выделенные из термальных источников, имеющие температурный оптимум 40-50<sup>0</sup>С (Горленко и др., 1985; Resnick, Madigan, 1989; Favinger et al., 1989; Statwald-Demchick et al., 1990), а также из микробных матов антарктического озера, имеющие температурный оптимум 18<sup>0</sup>С (Sattley, Madigan, 2006). Оптимальная температура для роста представителей рода *Rhodobacter* 25-35<sup>0</sup>С (Определитель бактерий Берджи, 1997).

Большинство пурпурных несерных бактерий имеют оптимум роста в нейтральной области pH – от 6.8 до 7.2. Только три микроорганизма, принадлежащие к двум родам ПНСБ, имеют оптимум роста при пониженных значениях pH. *Rhodoblastus acidophilus* (ранее *Rhodopseudomonas acidophila*) имеет pH оптимум 5,8 ед. (Pfennig, 1969). pH оптимум *Rhodoblastus sphagnolica* около 5,2-5,5 ед. (Kulichevskaya et al., 2006; Medová, 2013). Для *Rhodopila globiformis* (Pfennig, 1974; Madigan, 2003) pH-оптимум находится в диапазоне 4,8-5,6 ед. и зависит от углеродного субстрата. Диапазон pH среды, при котором сохраняется максимальная скорость роста *Rba. capsulatus*, составляет 6,6-7,6 ед. (Цыганков и др. 1982).

Пурпурные несерные бактерии предпочитают богатые органикой воды и болотистые почвы, при этом редко образуют скопления, придающие воде окраску. Иногда развиваются в прибрежных морских водах. Ряд представителей характеризуется ростом при наличии некоторой солености среды, которая может колебаться от пресной воды до 20% NaCl (Imhoff, 2001). У *Rba. capsulatus* отсутствует потребность в присутствии NaCl в среде (Определитель бактерий Берджи, 1997).

Пурпурные несерные бактерии имеют широкие метаболические возможности: они способны расти на свету и в темноте, в анаэробных и аэробных условиях, осуществляя разные энергетические процессы (фотосинтез, анаэробное и аэробное дыхание). При этом они могут вести себя как автотрофы и как гетеротрофы, осуществляя фиксацию молекулярного азота в отсутствие связанных форм азота.

### **1.2.1. Рост на свету в анаэробных условиях.**

Пурпурные несерные бактерии способны к аноксигенному фотосинтезу (процесс, протекающий без выделения O<sub>2</sub>) за счет наличия фотосистемы второго типа. В результате этого процесса происходит преобразование и запасание энергии света в энергию химической связи молекул АТФ. При этом в качестве доноров электронов пурпурные несерные бактерии могут использовать различные соединения.

1) При фотогетеротрофном росте органические соединения используются и в качестве доноров для фотосинтетического транспорта электронов и в качестве источника углерода.

2) Фотоавтотрофный рост возможен при использовании в качестве донора электронов молекулярного водорода ( $\text{CO}_2 + 2\text{H}_2 \rightarrow (\text{CH}_2\text{O}) + \text{H}_2\text{O}$ ) (Гоготов, 1989), в некоторых случаях – металлов (Ehrenreich, Widdel, 1994).

3) Фотоавтотрофный рост возможен в присутствии малых концентраций сульфида. *Rba. capsulatus*, *Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum* используют сульфид, который окисляется до молекулярной серы, появляющейся в среде, что является заключительным этапом окисления сульфида у этих видов бактерий (Hansen, Imhoff, 1985; Hansen, Van Gemerden, 1972). При

этом рост *Rba. capsulatus* полностью прекращается при концентрации сульфида 2 мМ (Hansen, Van Gernerden, 1972). Надо отметить также, что данная бактерия не обладает способностью окислять тиосульфат до сульфата (Определитель бактерий Берджи, 1997).

У *Rba. sulfidophilus*, *Rps. palustris*, и *Rps. sulfoviridis* сульфид окисляется до сульфата без образования в качестве промежуточного продукта элементарной серы (Hansen and Gernerden, 1972, Neutzling et al., 1984). Кроме того, внеклеточная элементарная сера может являться промежуточным продуктом окисления тиосульфата, как это наблюдается у *Rba. veldkampii*, *Rba. adriaticus* (Hansen and Imhoff, 1985; Neutzling et al., 1984; Brune, 1995; Glaeser and Overmann, 1999).

### 1.2.2. Рост в темноте.

1) в аэробных условиях:

а) Главным энергетическим процессом у пурпурных бактерий в темноте в присутствии молекулярного кислорода является аэробное дыхание (Кондратьева, Гоготов, 1976). Органические вещества при этом используются и в качестве окисляемых субстратов, и как основные источники углерода. Окисление органических соединений позволяет бактериям синтезировать АТФ в результате мембранного (окислительного) фосфорилирования, связанного с функционированием электрон-транспортной системы (Zannoni, 1995).

б) При окислении пурпурными бактериями в аэробных темновых условиях роста некоторых органических веществ может иметь место субстратное фосфорилирование, но его роль в таких условиях обычно значительно меньше, чем при брожении.

2) в анаэробных условиях:

а) За счет брожения отдельных сахаров или ПВК – процесса, не связанного с электронтранспортным фосфорилированием, но обеспечивающего получение энергии за счет субстратного фосфорилирования. Однако рост в результате брожения обычно идет очень медленно с образованием небольшого количества биомассы (Madigan, Gest, 1978; Schultz, Weaver, 1982).

б) На средах, содержащих ацетат, сукцинат и некоторые другие органические соединения, которые брожению не подвергаются, рост возможен за счет окисления этих субстратов при анаэробном дыхании с использованием вместо  $O_2$  других неорганических или органических акцепторов электронов (Zannoni, 1995). В качестве акцепторов электронов могут служить ТМАО или ДМСО, нитрат (в этом случае процесс называют нитратным дыханием),  $CO_2$ . Осуществлять нитратное дыхание способны некоторые штаммы. При этом использовать нитраты как источник азота они не способны. Штаммы *Rba. capsulatus*,

восстанавливающие нитраты до  $N_2$ , одновременно могут его фиксировать и обеспечивать тем самым свою потребность в азоте (Dunstan et al., 1982).

3) в микроаэробных условиях:

*Rba. captulatus* способны переключаться с фотосинтеза на рост в темноте в хемолитоавтотрофных условиях, окисляя при этом молекулярный водород, но лишь при небольшом содержании молекулярного кислорода - не больше 10-15% в газовой фазе (Madigan and Gest, 1979). При этом в среде наблюдаются следовые количества кислорода (Seifert, Pfennig, 1979). Это связано с тем, что кислород репрессирует синтез и подавляет активность гидрогеназы, катализирующей окисление молекулярного водорода, а также рибулозобисфосфаткарбоксилазы. Кроме того, молекулярный кислород ингибирует их активность.

Установлено, что пурпурные бактерии, как серные, так и несерные, образуют супероксиддисмутазу и каталазу, то есть ферменты, которые играют важную роль в защите клеток от токсичного воздействия продуктов, образующихся в присутствии молекулярного кислорода (супероксида и перекиси водорода) (Кондратьева Е.Н., 1996).

**1.2.3. Характеристика фотосинтетического аппарата пурпурных несерных бактерий.** Ключевое событие световой стадии фотосинтеза происходит в реакционных центрах фотосинтеза (РЦ), когда в процессе разделения зарядов энергия излучения преобразуется в химическую энергию. Разделение зарядов осуществляется в результате возбуждения бактериохлорофилла РЦ при поглощении им определённого кванта энергии. Непосредственное попадание фотона, несущего необходимую для возбуждения энергию, в бактериохлорофилл РЦ маловероятно. Повышение эффективности процесса обеспечивают дополнительные структуры – светособирающие антенны (пигмент-белковые комплексы), которые осуществляют захват фотонов разных длин волн и направляют энергию возбуждения в РЦ.

Фотосинтетический аппарат пурпурных бактерий локализован во внутрицитоплазматических мембранах, имеющих различную форму (везикул, ламелл или трубочек), что является систематическим признаком. Он состоит из РЦ, а также двух типов светособирающих антенн и переносчиков электронов, образующих фотосинтетическую электронтранспортную цепь. Вблизи РЦ располагаются коровая антенна (LH1), образующая вокруг РЦ незамкнутое кольцо (Driscoll et al., 2014). На периферии расположены LH2-периферийные антенны.

В настоящее время обнаружено три типа устройства фотосинтетического аппарата среди представителей пурпурных бактерий (Cogdell and Roszak, 2014). У *Rba. sphaeroides* РЦ

существует в форме димера из двух РЦ-LH1 (Qian et al. 2013), каждый из мономеров содержит белок PufX. Присутствие белка PufX необходимо для сборки активного димерного комплекса: у мутантов с делецией кодирующего его гена формируется замкнутое LH1-кольцо, а комплекс РЦ-LH1 – в виде мономера (Siebert et al. 2004). Описанные мутанты лишены способности к осуществлению фотосинтетического роста (Recchia et al., 1998). Авторы предполагают, что промежутки в LH1 кольце необходимы для проникновения убихинона, который обеспечивает связь между РЦ и цитохромом *bc<sub>1</sub>*-комплекса.

У пурпурной несерной бактерии *Rps. palustris* (Roszak et al. 2003) РЦ существует в форме мономера РЦ-LH1 и содержат белок W (аналог белка PufX) (второй тип устройства фотосинтетического аппарата). Кольцо LH1 у данной бактерии, также как у *Rba. sphaeroides*, не замкнутое.

Третий тип устройства фотосинтетического аппарата продемонстрирован у пурпурной серной бактерии *Thermochromatium tepidum* (Niwa et al. 2014). У нее РЦ существует в форме мономера РЦ-LH1 и не содержат никаких белков аналогичных белкам PufX или W (тем не менее, каналы в LH1-кольце присутствуют, оно незамкнутое).

На белках светособирающих антенн располагаются молекулы бактериохлорофилла и каротиноидов. При этом для внешних комплексов LH2 характерны более коротковолновые формы пигментов (800 - 850 нм), а для внутреннего комплекса LH1 – более длинноволновые (около 880 нм). Бактериохлорофилл реакционного центра (РЦ) имеет ещё более длинноволновый максимум поглощения. Подобное строение обеспечивает поглощение фотонов в LH2 и направленную миграцию через LH1 на РЦ. Основной фотосинтетический пигмент пурпурных бактерий – бактериохлорофилл *a*; кроме того, у *Blastochloris viridis* имеется бактериохлорофилл *b* (Roszak et al., 2012). Из каротиноидов у пурпурных бактерий наиболее часто встречаются спириллоксантин, родопин, родопинал, сфероиден, окенон (Bentley and Thiessen, 1957).

РЦ пурпурных бактерий устроены аналогично РЦ фотосистемы II цианобактерий, акцепторами электронов в которой являются феофетин и хиноны (Tholozan et al., 1990). В процессе аноксигенного фотосинтеза происходит светозависимый циклический поток электронов между РЦ и *bc<sub>1</sub>*-комплексом через пул убихинонов и цитохром *c<sub>2</sub>*. В результате световая энергия запасается в виде трансмембранного градиента протонов, который далее может преобразовываться в АТФ с помощью АТФ-синтазы. Синтез таких энергетических эквивалентов, как НАДН/НАДФН, осуществляется с помощью обратного переноса электронов с затратой АТФ, при окислении органических соединений или в цикле Кребса (Кондратьева, 1996). Флавины присутствуют у пурпурных несерных бактерий в форме

флавиномононуклеотида (ФМН) и флавинаденидинуклеотида (ФАД). Также присутствуют в клетках ферредоксины (Bandell et al., 1997).

Несмотря на цикличность фотосинтеза, для его осуществления необходим постоянный линейный поток электронов, обеспечивающийся присутствующими в среде донорами электронов (Horne et al., 1996). В качестве доноров электронов, как описывалось выше, могут выступать органические соединения, водород, сероводород.

На синтез фотосинтетического аппарата влияет свет. При пониженной интенсивности света количество LH2 в клетке возрастает (Niederman, 2013), а также возрастает количество РЦ (Gregor, Klug, 1999). Мутантные штаммы *Rba. sphaeroides* без LH2 способны расти только при очень высокой интенсивности света (Cogdell et al., 1999). Свет также влияет на регуляцию синтеза бактериохлорофилла *a* (Бхл *a*), он не требуется для его синтеза, но высокие интенсивности света значительно подавляют синтез бактериохлорофилла (Патрушева и др., 2007). У *Rba. sphaeroides* PpsR белок способен подавлять синтез белков LH1, а также Бхл *a* при высокой интенсивности света (Gomelsky, Kaplan, 1995). Модулирующее действие на влияние белка PpsR оказывает белок CryB (Niederman, 2013).

Однако последние исследования показывают, что связь синтеза дополнительной периферийной антенны с получением энергии индивидуальной клеткой не так очевидна. Показано, что при пониженной интенсивности света образуется больше внутрицитоплазматических мембран с большим содержанием LH2. Но наряду с этим имеются отдельные участки мембран, в которых есть только LH2, но нет РЦ, т.е. эти комплексы не могут передать энергию возбуждения для разделения зарядов и последующего использования в метаболизме (Bahatyrova et al., 2004). Кроме того у *Rba. sphaeroides* при высокой и низкой интенсивностях света синтезируются разные LH2 комплексы (Woronowicz et al., 2012).

Основным внешним сигналом, вызывающим репрессию синтеза бактериохлорофилла у пурпурных несерных бактерий, является кислород (Zhu, Hearst, 1986).

#### **1.2.4. Потребляемые источники азота, серы. Необходимые витамины.**

*Rba. capsulatus* в биосинтетических целях использует сульфат, который в результате ассимиляционной сульфатредукции превращается в сульфид, который далее используется для синтеза цистеина (Кондратьева, 1996). Лучшим источником азота для большинства видов пурпурных бактерий является аммоний. *Rba. capsulatus* может использовать также пептон и дрожжевой экстракт, пурины, аденин, гуанин, гипоксантин, ксантин, а также мочевую кислоту. Некоторые штаммы *Rba. capsulatus* способны к диссимиляционной нитратредукции, но не могут использовать нитрат как единственный источник азота (Dunstan

et al., 1982): нитрат восстанавливается до  $N_2$ , который может быть использован как источник азота только при наличии активной нитрогеназы. Отдельные представители способны к использованию нитрата (Sato et al., 1976). Некоторые штаммы в качестве источников азота используют нитриты (Кондратьева, 1996).

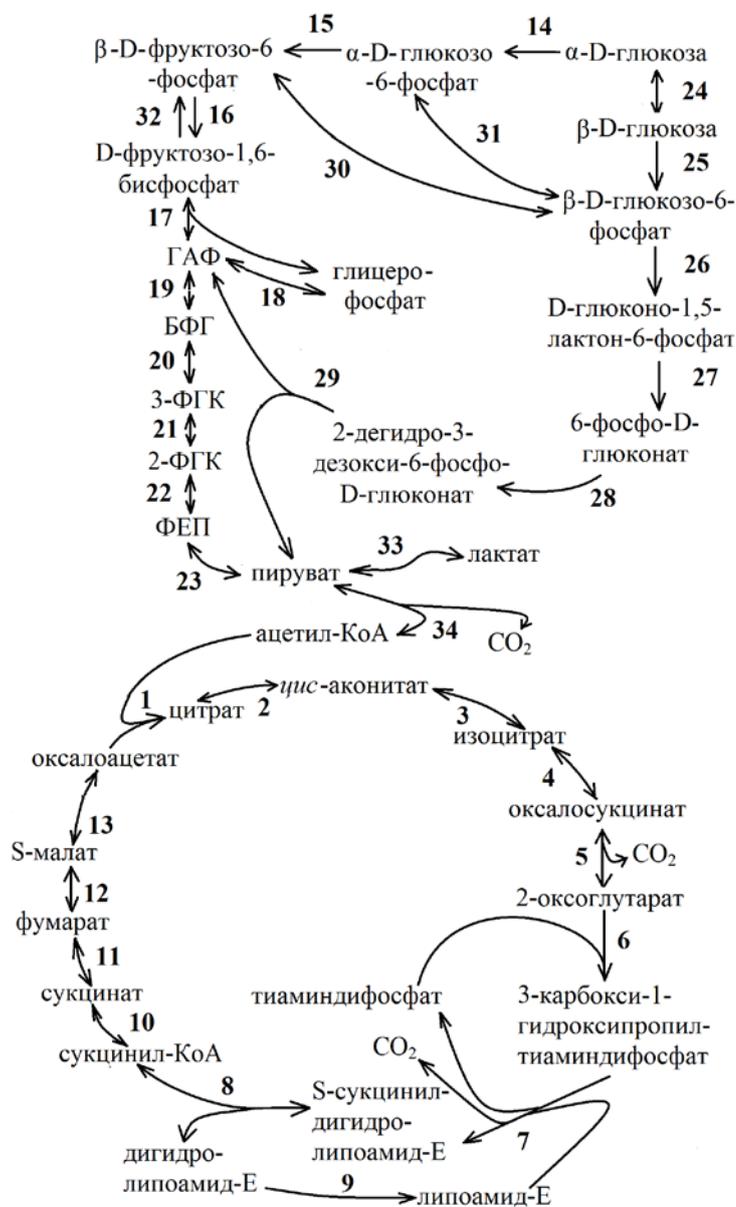
Пурпурные несерные бактерии являются ауксотрофами: проявляют потребность в тиамине, никотиновой кислоте, биотине, а также в *p*-аминобензойной кислоте (Кондратьева, 1996). *Rba. capsulatus* может расти на минеральной среде, в которой в качестве источника витаминов достаточно присутствия только тиамина (Weaver et al., 1975).

### **1.3. Углеродный метаболизм пурпурных несерных бактерий.**

**1.3.1. Гетеротрофный метаболизм.** У большинства хемотрофных, аэробных и факультативно анаэробных бактерий гликолиз (путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса) или путь Энтнера-Дудорова и ЦТК — главные пути центрального метаболизма (рисунок 1). Первые два являются основными путями распада углеводов до фосфоенолпирувата (ФЕП), ПВК и ацетил-КоА, таким образом, происходит обеспечение клетки энергией и стандартными строительными блоками для синтеза клеточных компонентов. Органические кислоты и субстраты, метаболизируемые через ацетил-КоА (например, ацетат, жирные кислоты, этанол), ассимилируются через ЦТК. Последний также выполняет две функции — катаболизм и анаболизм: катализируя полное окисление ацетил-КоА до  $CO_2$ , дает восстановительные эквиваленты для формирования АТФ в процессе дыхания, и в то же время обеспечивает биосинтетические процессы углеродными предшествующими метаболитами и НАДФН.

Хорошими углеродными субстратами для роста *Rba. capsulatus* В10 являются глюкоза, фруктоза, сахароза, рибоза, маннит, сорбит, ПВК, сукцинат, фумарат, малат, пропионат, также проявляется рост на галактозе, пропаноле, но не на маннозе, цитрате, глюконате, глицерине, этаноле, тартрате, пеларгонате (Weaver et al., 1975). У *Rba. capsulatus* глюкоза метаболизируется в пути Энтнера-Дудорова (Eidels, Preiss, 1970), фруктоза – в пути Эмбдена-Мейергофа-Парнаса (Conrad, Schlegel, 1974). Эта бактерия способна использовать короткоцепочечные (Eidels, Preiss, 1970; Muller, 1933; Weaver et al., 1975) и длинноцепочечные жирные кислоты в качестве единственного источника углерода. При этом скорость роста *Rba. capsulatus* обратно пропорциональна длине углеродной цепи одноосновной жирной кислоты, используемой в качестве субстрата, а допустимая концентрация субстрата увеличивается с уменьшением длины углеродной цепи (Kranz et al., 1997), исключение составляют такие токсичные соединения, например, как формиат. На

двухосновных жирных кислотах таких, как малат и сукцинат (являющихся промежуточными звеньями ЦТК) скорость роста выше (Цыганков, Гоготов, 1990), чем на среде с ацетатом.



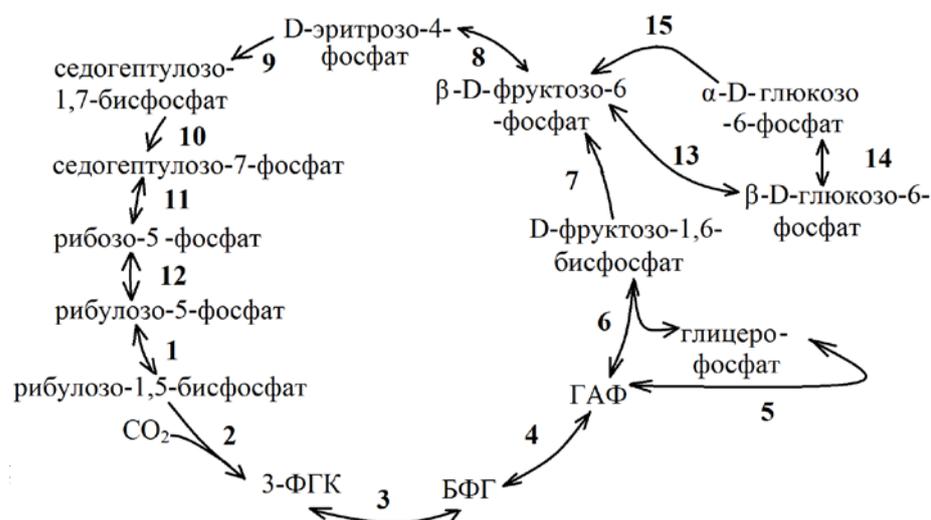
**Рисунок 1.** Основные пути гетеротрофного метаболизма прокариот (схема составлено на основе базы данных KEGG Pathway). ЦТК – реакции 1-13; путь Эмбдена-Мейергофа-Парнаса – реакции 14-23; путь Энтнера-Дудорова – реакции 24-29 и 19-23; реакции брожения 33 и 34 (эта реакция может осуществляться пируватдегидрогеназным комплексом и обратимой пируват:оксидоредуктазой).

При этом показано, что при наличии в среде нескольких видов органических кислот (ацетат, пропионат, лактат, бутират и изобутират) *Rba. capsulatus* B10 использует не все кислоты одновременно. Сначала бактерия потребляет C2-C3 соединения, и лишь после их исчерпания – бутират и изобутират (Laurinavichene et al., 2008). При выращивании на смеси лактата и ацетата *Rba. capsulatus* DSM1710 сначала потребляет лактат, а затем, после его

исчерпания – ацетат (Sevinc et al., 2012). ЦТК в *Rba. capsulatus* активен при росте и в фототрофных и в темновых аэробных условиях, и его активность зависит от типа присутствующего в среде источника углерода (Eidels, Preiss, 1970б).

### 1.3.2. Автотрофная фиксация CO<sub>2</sub>.

Основной путь ассимиляции углекислоты в автотрофных условиях – восстановительный пентозофосфатный цикл (цикл Кальвина-Бенсона, рисунок 2). В этом цикле происходит фиксация диоксида углерода с образованием C<sub>6</sub>-соединений. Из ферментов, осуществляющих реакции этого метаболического пути, уникальными, т.е. функционирующими только в этом цикле, являются рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа (Рубиско), фосфорилбулокиназа и седогептулозобисфосфатаза (McFadden, Shively, 1991).



**Рисунок 2.** Цикл Кальвина-Бенсона – реакции 1-12 (схема составлена на основе информации базы данных KEGG Pathway).

Лишь один фермент осуществляет реакцию фиксации CO<sub>2</sub> в цикле Кальвина-Бенсона – Рубиско. В настоящее время в микроорганизмах обнаружены ферменты, отличающиеся от классической формы Рубиско растений. Выделяют четыре основные формы Рубиско (Tabita et al., 2007). Форма I, II и III Рубиско проявляют карбоксилазную и оксигеназную активности, но в потенциально различных физиологических целях. Форма III выделена в отдельную категорию, так как обнаружена только у архей, которые обладают уникальной древней эволюционной историей. К белкам формы IV относят Рубиско-подобные белки (RubisCO-like protein, RLP), катализирующие реакции, которые важны для метаболизма серы. Во многих организмах функция RLP неизвестна.

*Rba. sphaeroides* имеет две формы Рубиско. Форма I состоит из 8 больших и 8 малых субъединиц, которые кодируют гены *rbcL* и *rbcS* соответственно. Форма II представляет собой гексамер, который состоит только из больших субъединиц, кодируемых либо геном *rbcL*, либо геном *rbcR* (Tabita, 1988). Две формы Рубиско также присутствуют в *Rba. capsulatus* (Gibson, Tabita, 1977) и *Rps. palustris* (Joshi et al., 2009). Они кодируются генами *cbbLS* (форма I Рубиско) и *cbbM* (форма II Рубиско). В отличие от этих бактерий, *Rsp. rubrum* имеет только форму II Рубиско, которая состоит из двух субъединиц, кодируемых геном *cbbM* (Tabita, 1988; Kusian, Bowien, 1997). Удивительно, что этот белок в состоянии функционировать не только как Рубиско, но и в качестве энолазы в пути утилизации метионина (a methionine salvage pathway, MSP), но только в анаэробных условиях (Singh, Tabita, 2010; Dey et al., 2015).

Форма I Рубиско и *Rba. sphaeroides* и *Rba. capsulatus* проявляет максимальную карбоксилазную активность при pH 8.0, в то время как активность формы II Рубиско этих бактерий при pH 8.0 составляет только 50-60% от активности этого же фермента, наблюдаемой при pH 7.2 (Gibson, Tabita, 1977). Авторы также продемонстрировали, что, как и у *Rba. sphaeroides*, только форма I Рубиско *Rba. capsulatus* ингибируется 6-фосфоглюконатом.

У *Rba. sphaeroides*, *Rba. capsulatus* и *Rps. palustris* гены формы I и формы II Рубиско расположены в *cbbI* и *cbbII* оперонах, соответственно (Kusian, Bowien, 1997). Регуляция *cbb* оперонов этих бактерий интенсивно изучалась (Chen et al., 1991; Falcone et al., 1988; Gibson, Tabita, 1993; Joshi et al., 2009; Romagnoli, Tabita, 2006; Tabita, 1988; Vichivanives et al., 2000). Показано, что транскрипция *cbb* оперонов активируется с помощью транскрипционного регулятора Lys-R-типа, (CbbR (Gibson, Tabita, 1993; Paoli et al., 1998)), которому в качестве ко-индукторов, возможно, необходимы рибулозо-1,5-бисфосфат или его производные (Dangel et al., 2005; Dubbs et al., 2004; Smith, Tabita, 2002; Tichi, Tabita, 2002). Кроме того, экспрессия *cbb* оперонов также регулируется двухкомпонентной глобальной регуляторной системой RegB/RegA, которая также ответственна за регуляцию процессов фиксации азота, водородного метаболизма и производства энергии в *R. capsulatus* и *R. sphaeroides* (Du et al., 1998; Dubbs, Tabita, 2004; Elsen et al., 2000; Elsen et al., 2004; Joshi, Tabita, 1996; Qian, Tabita, 1996; Sganga, Bauer, 1992; Vichivanives et al., 2000). В *Rps. palustris* нет регуляторной системы RegB/RegA. Вместо этого три белка CbbRRS системы действуют как система сигнала трансдукции, которая регулирует транскрипцию *cbb* оперонов (Romagnoli, Tabita, 2006). В свою очередь, в *Rsp. rubrum* отсутствуют и RegB/RegA и CbbRRS системы. Кроме того, в *Rsp. rubrum* ген *cbbM* расположен не в одном опероне с другими *cbb* генами, как у

других организмов (Dubbs, Tabita, 2004; Paoli et al., 1995; Shively et al., 1998). В этой бактерии основным регулятором *cbb* оперона (*cbbEFPT*) является CbbR - положительный транскрипционный регулятор (Wang et al., 2011).

Мутантные штаммы *Rba. sphaeroides* (с инактивированными методом транспозонного мутагенеза генами), которые синтезируют либо форму I либо форму II Рубиско, были способны к фотоавтотрофному росту, хотя медленнее, чем дикий тип (Falcone et al., 1988). Мутант *Rsp. rubrum*, в котором цикл Кальвина-Бенсона заблокирован устранением его ключевого фермента, Рубиско (ген *cbbM*), не только не растет в фотоавтотрофных условиях, но также плохо растет в фотогетеротрофных условиях (Wang et al. 2010).

Рубиско, помимо реакции карбоксилирования, может осуществлять реакцию окисления рибулозобисфосфата до ФГК и фосфогликолата (Bowes et al., 1971). Этим объясняется выделение в среду в присутствии молекулярного кислорода гликолата, который образуется из рибулозобисфосфата (Bowes et al., 1971). У цианобактерий и водорослей гликолат либо выделяется в среду, либо под действием фермента гликолатоксидазы окисляется до глиоксилата, который через сериновый путь способен превращаться в глицерат (Bowes et al., 1971). В гликолатном пути 1 молекула ФГК образуется из двух молекул гликолата, при этом происходит выделение молекулы CO<sub>2</sub>. Таким образом, при функционировании Рубиско как оксигеназы происходит поглощение кислорода и выделение углекислоты. Светозависимое поглощение кислорода и выделение углекислоты принято называть фотодыханием (McFadden, Shively, 1991). Однако, у большинства пурпурных бактерий кислород оказывает ингибирующее действие как на активность Рубиско, так и на ее синтез (Tabita, 1988). Исключением является *T. roseopersicina* BBS (Кондратьева, 1989б, Kondratieva, et al., 1981).

Уровень активности ферментов цикла Кальвина-Бенсона различен в разных условиях выращивания бактерий и снижается в присутствии органических субстратов (Anderson, Fuller, 1967; Кондратьева и др., 1989а). Но в отдельных случаях пурпурные несерные бактерии фиксируют в значительном количестве углекислоту в рассматриваемом цикле независимо от присутствия органических соединений. Например, при фотогетеротрофном росте *Rps. palustris* на среде с ацетатом 22% ацетатного углерода преобразуется в CO<sub>2</sub> и 67% этого CO<sub>2</sub> фиксируется в клеточный материал через рибулозобисфосфаткарбоксилазу (McKinlay, Harwood, 2010). Продемонстрировано также, что уровень ферментов формы I значительно увеличивается во время фотоавтотрофного роста или во время роста на очень восстановленном субстрате, таком как бутират, и в *Rba. sphaeroides* (Weaver, Tabita, 1983) и в *Rba. capsulatus* (Shively et al., 1984).

На синтез и активность рибулозобисфосфаткарбоксилазы оказывает влияние

концентрация углекислоты в среде: количество фермента в клетках возрастает при увеличении содержания бикарбоната (Sarles, Tabita, 1983). Организмы должны иметь надежную и эффективную систему управления внутриклеточным pH и концентрацией CO<sub>2</sub>, чтобы вести фиксацию углерода (Codd, Kuenen, 1987). Преобразование пассивно диффундирующего CO<sub>2</sub> в бикарбонат важно для транспортировки CO<sub>2</sub> в клетку, поскольку углекислый газ плохо растворим в водном растворе, но способен свободно проникать через липидные слои клеточной мембраны, поэтому часто проникает внутрь клетки и обратно. Карбонат-ион отрицательно заряжен и хорошо растворим в водном растворе, но плохо растворим в жирах. Для его проникновения в клетку необходима транспортная система (Smith, Ferry, 2000; Marcus et al., 2005). Некоторые организмы, такие как цианобактерии, развили эффективный механизм (карбоксисомы), позволяющий увеличить концентрацию CO<sub>2</sub> и, следовательно, эффективность его фиксации (Badger, Price, 2003; Vonacsi et al., 2012). У организмов, в которых отсутствуют карбоксисомы, функцию такой системы выполняют совокупность скоординированно действующих карбоангидраз (КА) и ферментов, осуществляющих реакции карбоксилирования (в фотоавтотрофных условиях, прежде всего, это Рубиско) (Pohlmann et al. 2006).

КА возникли до расхождения доменов архей и бактерий (Grishin, 1995). Исходя из того, что β- и γ-КА находятся в глубоких ветвях архей и организмов, способных к фотолитоавтотрофии с использованием древних CO<sub>2</sub> – фиксирующих путей, предполагают, что эти пути зависят от карбоангидраз, необходимых для эффективной фиксации CO<sub>2</sub> аналогично эволюционно более ранним фотосинтетическим организмам, в которых КА необходимы для эффективного транспорта CO<sub>2</sub> в клетку и повышения концентрации CO<sub>2</sub> около активного сайта CO<sub>2</sub>-фиксирующего фермента рибулозобифосфаткарбоксилазы (Badger, Price, 1994; Price et al., 1998; Kaplan, Reinhold, 1999). Некоторые «CO<sub>2</sub>-фиксирующие» ферменты, такие как пируваткарбоксилаза и ФЕП-карбоксилаза используют HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (Jitrapakdee, Wallace, 1999). Таким образом взаимопревращение CO<sub>2</sub> и HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> может быть важно с точки зрения регуляции углеродного метаболизма и является еще одной потенциальной ролью КА.

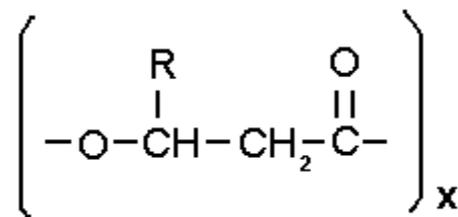
У *Rba. capsulatus*, *Rba. sphaeroides*, *Rsp. rubrum* обнаружили карбоангидразы β- и γ-классов и детектировали специфическую активность этих ферментов в БЭ (Smith et al., 1999). Из *Rsp. rubrum* была выделена КА и были охарактеризованы некоторые ее свойства (Gill et al., 1984). Авторы отметили, что фермент цитоплазматический и что обнаруживается только в фотосинтетически выращенных клетках. У *Rps. palustris* идентифицирована α-карбоангидраза и показана ее активность, фермент экспрессируется в различных анаэробных

условиях независимо от присутствия CO<sub>2</sub> или бикарбоната, но не экспрессируется в аэробных условиях роста (Puskás et al., 2000).

**1.3.3. Запасные вещества.** Пурпурные бактерии способны на средах с ацетатом накапливать полигидроксиалканаты (ПГА) и запасные полисахариды (Кондратьева, Красильникова, 1989; Mas, Van Gemerden, 1995). Кроме того, анализ генома *Rps. palustris* показал, что эта пурпурная несерная бактерия может накапливать еще один вид веществ – трегалозу (McKinlay et al., 2014). Трегалоза представляет собой дисахарид, образованный α-1,1-гликозидной связью между двумя молекулами α-глюкозы, она также является осмопротектором (позволяет выживать организмам при высокой солености среды).

В зависимости от характера источника углерода, который имеется в среде, пурпурные бактерии часто накапливают преимущественно либо гликан, либо ПГА.

ПГА являются полиэфирами различных гидроксиалканоев (Holmes, 1995). Обычно состоят из (R)-β-гидроксильных жирных кислот с гидроксильной группой в положениях 3, 4, 5 или 6. В составе ПГА обнаружено более 100 различных мономеров (рисунок 3), что обуславливает существование большого разнообразия биodeградируемых полимеров с различными свойствами. Молекулярная масса ПГА варьирует от 500 до 1000 кДа. Все составляющие их мономерные блоки находятся в D(-) конфигурации благодаря стереоспецифичности биосинтетических ферментов (Reddy et al., 2003).



**Рисунок 3.** Химическая структура ПГА, синтезируемых бактериями: ПГА обычно состоят из (R)-β-гидроксильных жирных кислот, где группа 'R' изменяется от метила (C1) до триглицерила (C13)

Подробнее классификация ПГА и их физические характеристики описаны в литературных источниках (Zinn et al., 2001; Abe, Doi, 2002). Ключевые биосинтетические пути для ПГА-продукции рассмотрены в обзоре (Jingnan et al., 2009). В естественных организмах-продуцентах ПГА-полимер накапливается в виде гранул, которые окружены специфическими липидами и белками (Uchino et al., 2007; Steinbuchel et al., 1995). Uchino и др. предположили, что гранулы в естественных ПГА-продуцентах действуют как «органеллы» (Uchino et al., 2007), которые вовлечены в процесс одновременно производства и деградации за счет биосинтетической активности ПГА-синтаз и тиротической активности ПГА-деполимераз. Рекombинантные неестественные ПГА-продуценты, в которых экспрессируются гены для поставки ПГА-мономеров и ПГА-синтаза, накапливают ПГА в виде телец включения, состоящих только из ПГА. Ферменты и гены,

имеющие отношение к синтезу ПГА, и их организация, регуляция в *Rba. capsulatus* описаны в ряде работ (Kranz et al., 1997; Ulbrich et al., 2002).

Мономеры, используемые для синтеза другого запасного вещества (гликогена) – это гексозы, которые образуются по пути глюконеогенеза из ФЕП (Evans, 1965, Merrick, 1978) или в цикле Кальвина-Бенсона. Общим предшественником для синтеза гликогена во всех организмах является глюкозо-1-фосфат, превращающийся у прокариот в АДФ-глюкозу в реакции, катализируемой АДФ-глюкозофосфорилазой; другие два фермента катализируют образование  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6-связей (Merrick, 1978, Ormerod, Sirevag, 1983). Превращение ацетата в ФЕП, первичный предшественник для синтеза гексоз, происходит либо через реакции цикла Кребса, либо через карбоксилирование ацетил-КоА в пируватсинтазной реакции (Кондратьева и др., 1989). Гликоген синтезируется в значительном количестве при использовании пурпурными бактериями диоксида углерода, ПВК, малата, лактата и ряда других органических соединений, легко превращающихся в ФЕП (Willison et al., 1984; Eidels, Preiss, 1970).

**1.3.4. Углеродный метаболизм и окислительно-восстановительный баланс клетки.** При изучении углеродного метаболизма пурпурных несерных бактерий необходимо учитывать, что некоторые его пути задействованы для достижения других целей, нежели образование конкретных углеродных соединений.

В 1933 Мюллер сообщил, что для фотогетеротрофного роста пурпурных несерных бактерий на субстратах более восстановленных, чем биомасса, необходимо присутствие  $\text{CO}_2$  (Muller, 1933). Он предположил, что  $\text{CO}_2$  необходим в качестве акцептора избыточных электронов, отток которых в итоге позволяет бутирату быть окисленным до окислительно-восстановительного состояния биомассы. В 1977 другими авторами продемонстрировано, что *Rba. capsulatus* способна к росту на бутирате и без  $\text{CO}_2$ , в условиях, когда клетки осуществляют фиксацию  $\text{N}_2$ , которая обеспечивает отток электронов в составе выделяемого побочного продукта реакции  $\text{H}_2$  (Hillmer, Gest, 1977). Позже Ричардсон и др. показали, что добавление других альтернативных акцепторов электронов, таких как ДМСО, дает возможность *Rba. capsulatus* расти фотогетеротрофно на бутирате без добавления  $\text{CO}_2$  (Richardson et al. 1988).

Затрата электронов на синтез запасных веществ за счет окисления восстановительных эквивалентов также способствует поддержанию окислительно-восстановительного баланса клетки (Yilmaz et al., 2010).

### **1.3.5. Рост на среде с ацетатом.**

При использовании ацетата в качестве единственного источника углерода из ЦТК происходит отток его промежуточных звеньев на биосинтетические нужды клетки. Поддержание пула ЩУК достигается с помощью **глиоксилатного цикла**, который является наиболее распространенным путем восполнения пула ЩУК в ЦТК (Kornberg, Krebs, 1957). В условиях функционирующего цикла Кребса (рисунок 4, реакции 1-13) наличие этого анаплеротического пути определяется функционированием двух дополнительных ферментов – изоцитратлиазы (ЕС: 4.1.3.1) и малатсинтазы (ЕС: 2.3.3.9) (рисунок 4, реакции 14 и 15).



**Рисунок 4.** Схема ЦТК (реакции 1-13) и глиоксилатного шунта (реакции 14 и 15), составлена на основе информации базы данных KEGG Pathway.

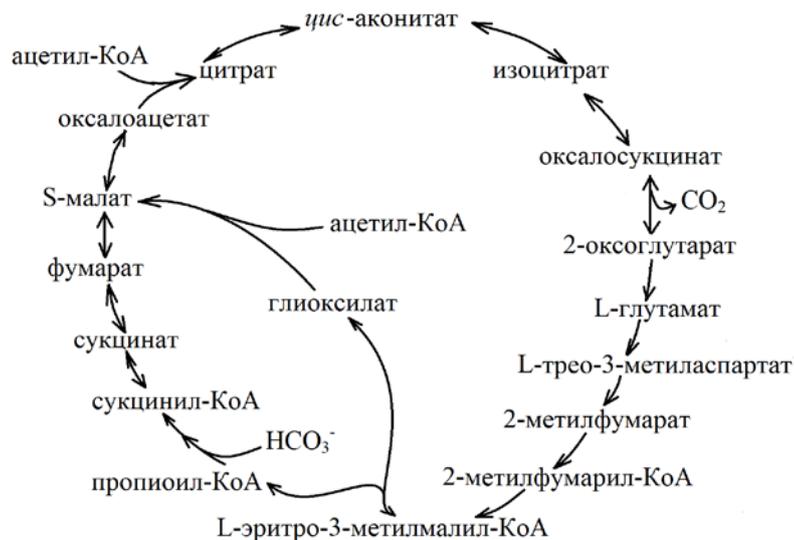
В одном полном обороте глиоксилатного цикла образуется две молекулы-предшественника ЩУК (глиоксилат и сукцинат), одна из которых обеспечивает поддержание содержания оксалоацетата, затраченного в первых реакциях цикла. Считалось, что глиоксилатный шунт не может функционировать в анаэробных условиях роста (Iuchi et al., 1989; Iuchi, Lin, 1988). Однако он активен в анаэробных бактериях, включая фототрофов, при соблюдении двух условий: обязательно присутствие в качестве кофактора ферредоксина и возможность образования ПВК (в некоторых случаях и  $\alpha$ -кетоглутарата) за счет реакций восстановительного карбоксилирования (Adman et al., 1973; Buchanan, Arnon, 1970).

Вместе с тем существует большое количество бактерий, неспособных к синтезу ключевых ферментов глиоксилатного шунта и восполняющих пул ЩУК другими анаплеротическими путями. Среди пурпурных бактерий к таковым относятся *Rsp. rubrum*, *Rba. sphaeroides* и *Phaeospirillum fulvum* (Filatova et al., 2005). В их геномах отсутствуют гены ИЦЛ – ключевого фермента глиоксилатного цикла. К настоящему времени известны несколько других анаплеротических путей, восполняющих пул ЩУК: метиласпартатный и

цитрамалатный циклы, этилмалонил-КоА путь. Теоретически при росте на ацетате анаболическую функцию могут выполнять пути автотрофной фиксации CO<sub>2</sub>; 3-гидроксипропионатный цикл, восстановительный ЦТК, цикл Кальвина–Бенсона, 3-гидроксипропионатный/4-гидроксibuтиратный цикл, дикарбоксилат/4-гидроксibuтиратный цикл. Еще один, шестой, из известных путей автотрофной фиксации CO<sub>2</sub>, восстановительный ацетил-КоА путь (Ljungdahl, 1986). В этом пути происходит образование ацетил-КоА, соответственно в восполнение пула ЩУК этот путь не вносит вклада. На момент проведения исследований не было информации о функционировании в пурпурных несерных бактериях этих путей фиксации CO<sub>2</sub> (за исключением цикла Кальвина-Бенсона). Но в условиях роста на среде с ацетатом для пополнения пула ЩУК, как правило, не требуется функционирования всех ферментов того или иного пути фиксации CO<sub>2</sub> – достаточно только его части.

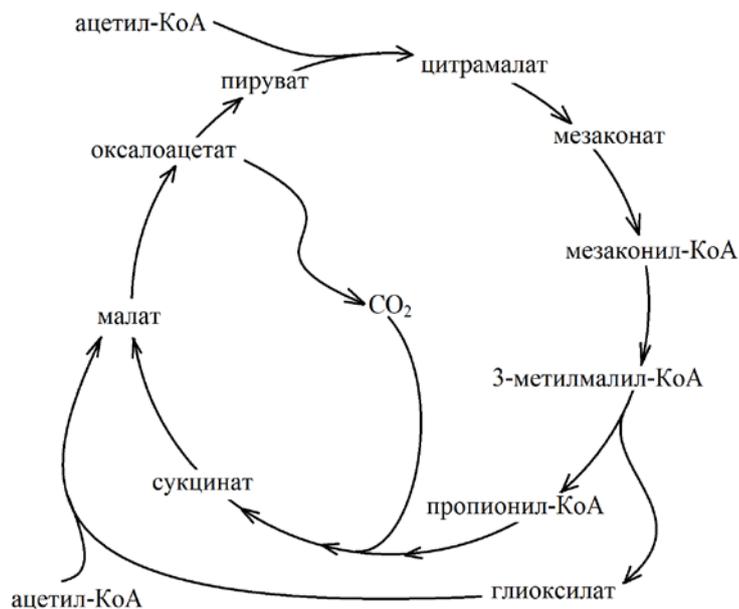
**Метиласпартатный цикл.** (Ueda et al. 1981; Shimizu et al. 1984; Khomyakova et al. 2011) Последовательность реакций данного метаболического пути, продемонстрированного в *Haloarcula marismortui*, приведена на рисунке 5.

В нем глутамат изомеризуется в метиласпартат, метиласпартат далее через ряд промежуточных соединений распадается с образованием глиоксилата и пропионил-КоА. Пропионил-КоА карбоксилируется до сукцината (пропионил-КоА карбоксилазой), сукцинат через реакции ЦТК окисляется до оксалоацетата, регенерируя акцептор ацетата и замыкая цикл. Уникальными в этом метаболическом пути являются реакции, осуществляемые ферментами: глутаматмутазой (ЕС: 5.4.99.1), метиласпартат-аммоний-лиазой (ЕС: 4.3.1.2) и сукцинил-КоА:мезаконат КоА-трансферазой (ЕС: 2.8.3.-) (Khomyakova et al. 2011). Глутаматмутаза преобразует L-глутамат в L-трео-3-метиласпартат. Метиласпартат-аммоний-лиаза осуществляет образование из L-трео-3-метиласпартата мезаконата и аммония. Сукцинил-КоА:мезаконат КоА-трансфераза осуществляет перенос КоА от сукцинил-КоА на мезаконат с образованием сукцината и 2-метилфумарил-КоА (Khomyakova et al. 2011).



**Рисунок 5.** Схема метиласпаратного цикла (Khomuyakova et al. 2011).

**Цитрамалатный цикл** показан у пурпурных несерных бактерий *Rsp. rubrum* (Ivanovsky et al. 1997) и *Rba. sphaeroides* 2R (Filatova et al. 2005a). Последовательность реакций этого цикла отображена на рисунке 6. В этом пути ацетил-КоА и ПВК под действием цитрамалатсинтазы конденсируются в цитрамалат, который с участием мезаконазы (ЕС: 4.2.1.34) превращается в мезаконат.



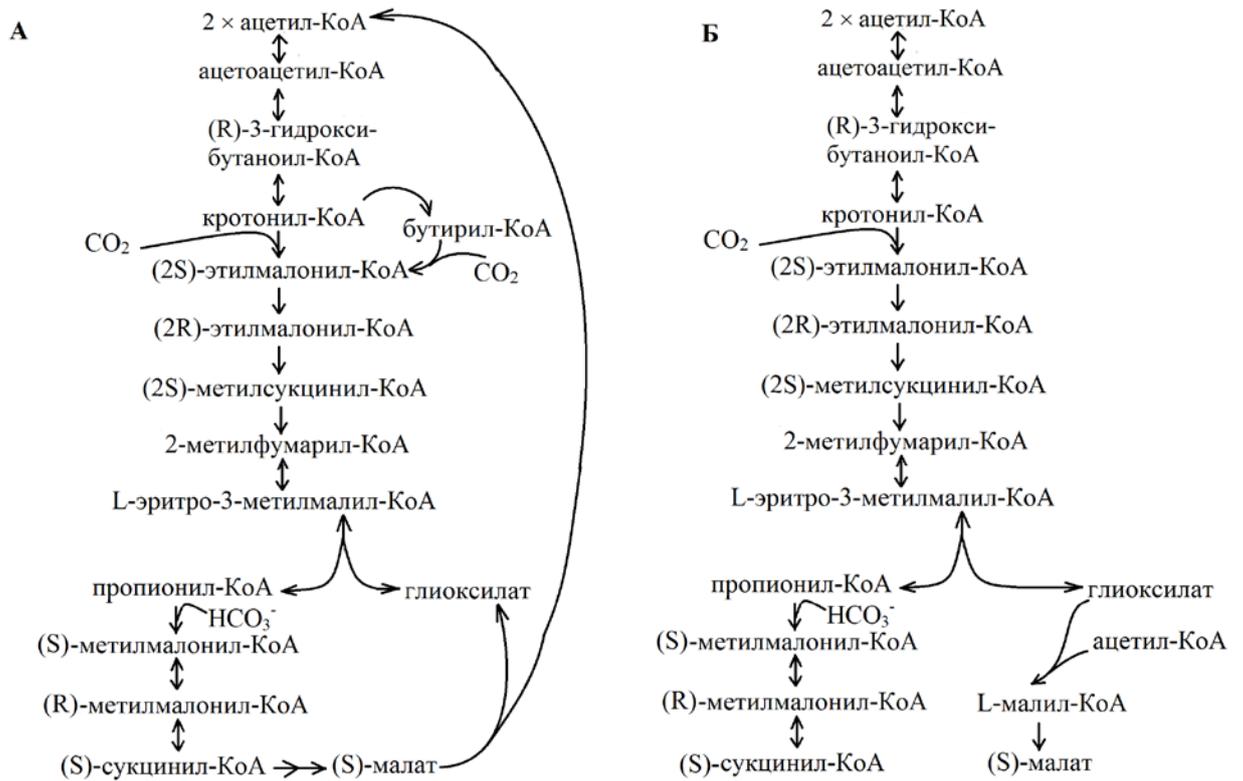
**Рисунок 6.** Схема цитрамалатного цикла (Филатова, 2005).

Последний превращается в мезаконил-КоА, который далее превращается в метилмалил-КоА. Метилмалил-КоА расщепляется на глиоксилат и пропионил-КоА.

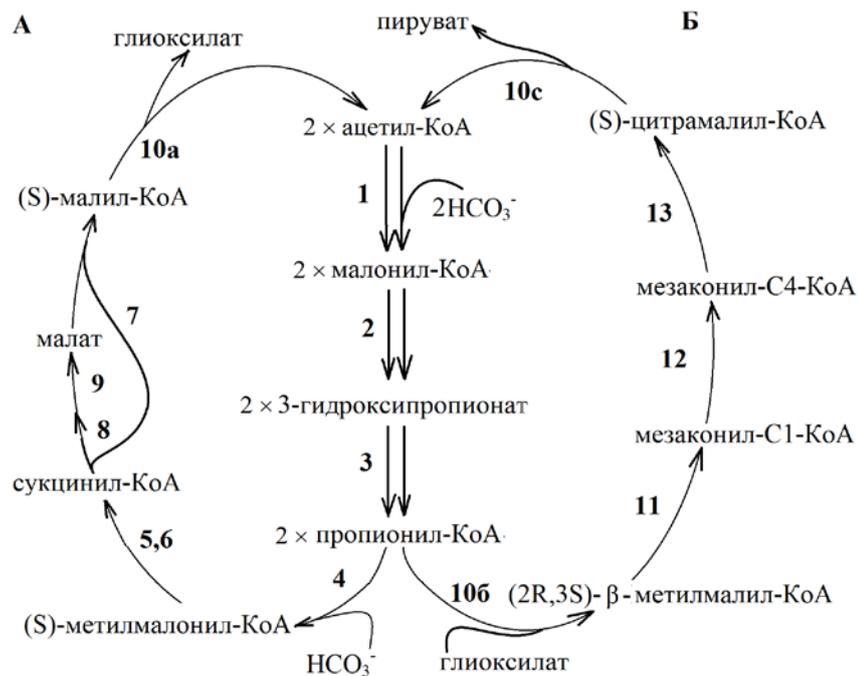
Глиоксилат может вовлекаться в ЦТК через малатсинтазную реакцию, образовавшийся в результате малат обеспечивает биосинтетические потребности клеток в C4-субстратах. В свою очередь, пропионил-КоА в ходе ряда реакций со стадией образования сукцинил-КоА преобразуется в ПВК, который замыкает цикл.

**Этилмалонил-КоА путь** (этилмалониловый путь) был обнаружен у некоторых метилотрофов (Korotkova et al. 2002; Peyraud et al. 2009; Smejkalová et al. 2010). В результате функционирования этого цикла из ацетил-КоА и 2 молекул CO<sub>2</sub> образуется 2 молекулы глиоксилата, КоА и Н<sup>+</sup> (рисунок 7А). Произведенный глиоксилат может быть далее преобразован в ФЕП через сериновый путь, который ассимилирует одну углеродную единицу через N<sup>5</sup>, N<sup>10</sup>-метилен-тетрагидрофолат (Erb et al. 2007). Вариант этого пути, характерного для пурпурной несерной бактерии *Rba. sphaeroides* (Alber et al. 2006), изображен на рисунке 7Б. В отличие от пути *M. extorquens* AM1, в варианте этилмалонил-КоА пути *Rba. sphaeroides* образовавшийся глиоксилат конденсируется с ацетил-КоА с образованием малил-КоА, который далее гидролизуется до малата и КоА. Таким образом, в этилмалонил-КоА цикле пурпурной несерной бактерии из 3 молекул ацетил-КоА и двух молекул CO<sub>2</sub> образуется одна молекула малата и одна молекула сукцинил-КоА.

**3-гидроксипропионатный цикл** (рисунок 8), обнаруженный у зеленой несерной бактерии *Chloroflexus aurantiacus* (Strauss et al. 1993), также может участвовать в восполнении ЦТК. Данный анаплеротический путь состоит из двух циклов (Zarzycki et al. 2009), имеющих общие реакции (первые три). В первом цикле из ацетил-КоА в результате ряда реакций образуется S-малил-КоА (рисунок 8А), который расщепляется на ацетил-КоА (возвращается в цикл) и глиоксилат. Глиоксилат преобразуется далее в реакциях второго цикла 3-гидроксипропионатного пути (рисунок 8Б) с образованием (3S)-цитрамалил-КоА. Последний на завершающем этапе расщепляется с образованием ПВК и ацетил-КоА. В результате полного оборота двух циклов в автотрофных условиях роста из 3 молекул бикарбоната образуется 1 молекула ПВК. Если рассматривать 3-гидроксипропионатный путь как способ восполнения ЦТК при фотоассимиляции ацетата, то такое восполнение возможно за счет образования в первом цикле 3-гидроксипропионатного пути сукцинил-КоА.

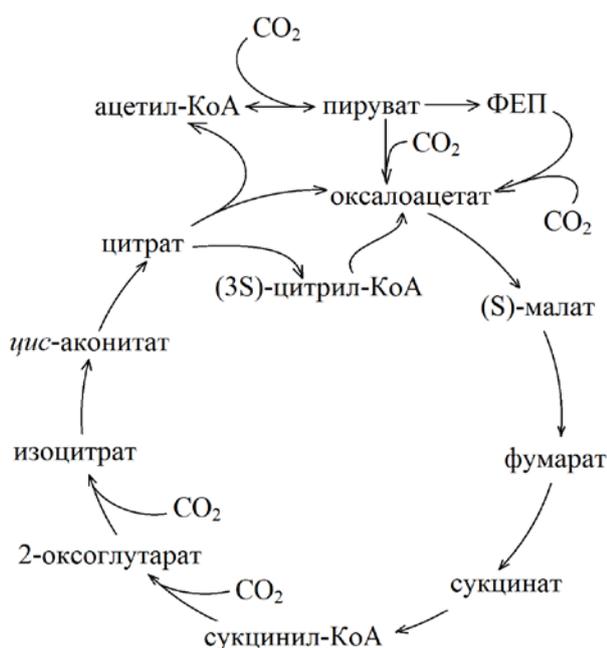


**Рисунок 7.** Схема этилмалонил-КоА пути: А – вариант пути, продемонстрированный в *M. extorquens* AM1; Б – вариант пути, продемонстрированный в *Rba. sphaeroides* (Tang et al., 2011).



**Рисунок 8.** Схема 3-гидроксипропионатного цикла (Zarzycki et al. 2009).

**Восстановительный цикл трикарбоновых кислот (ВЦТК, рисунок 9)** функционирует у бактерий, не обладающих полным набором ферментов ЦТК (зеленых серных бактерий (Evans et al. 1966a), пурпурных серных бактерий (Kondratieva et al., 1981), использующих ВЦТК как путь автотрофной фиксации  $\text{CO}_2$  и путь ассимиляции ацетата. Он является, по сути, работающим в обратную сторону окислительным ЦТК. Анаэробную функцию выполняет последовательность, начинающаяся с восстановительного карбоксилирования ацетил-КоА до ПВК, катализируемого ферредоксин-зависимой пируватсинтазой. ПВК превращается в ФЕП и далее в ЩУК. В результате полного оборота этого цикла в автотрофных условиях фиксируются четыре молекулы  $\text{CO}_2$  с образованием одной молекулы ЩУК.



**Рисунок 9.** Схема восстановительного ЦТК (Tang et al. 2011).

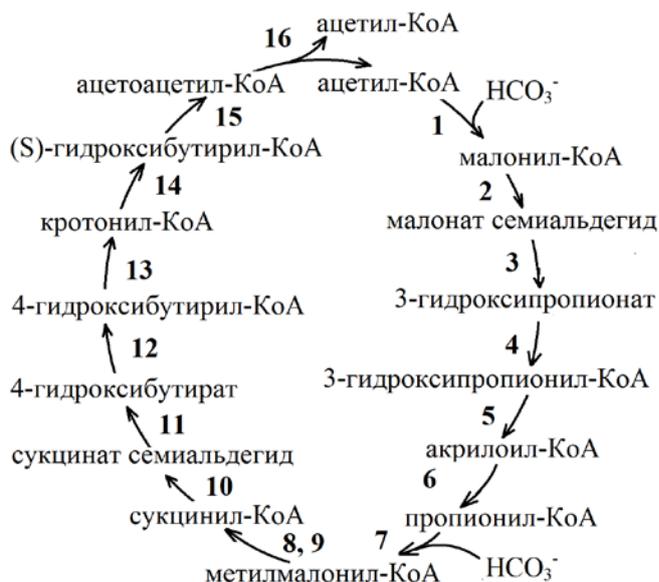
Одним из ключевых ферментов пути является 2-оксоглутаратсинтаза (ЕС: 1.2.7.3; 1.2.7.11), которая катализирует образование 2-оксоглутарата из сукцинил-КоА и  $\text{CO}_2$ . Уникальными также являются ферменты, катализирующие АТФ-зависимое образование ацетил-КоА и оксалоацетата из цитрата (заменяет необратимую цитратсинтазу, работающую в окислительном ЦТК). У зеленых серных бактерий (Antranikian et al., 1982; Wahlund, Tabita, 1997; Kanao et al., 2001) и представителей  $\epsilon$ -Proteobacteria (Campbell et al., 2003; Hügler et al., 2005; Takai et al. 2005) эта реакция осуществляется обратимой АТФ-зависимой цитратлиазой (ЕС: 2.3.3.8). В *Hydrogenobacter thermophilus* та же реакция осуществляется последовательно двумя разными ферментами - цитрил-КоА-синтетазой и цитрил-КоА-лигазой (Aoshima et al., 2004). Первый из этих ферментов катализирует АТФ-зависимое формирование цитрил-КоА

из цитрата и коэнзима-А, второй – последующее расщепление цитрил-КоА на ацетил-КоА и оксалоацетат.

При росте на среде с ацетатом для восполнения пула ЦУК достаточно функционирования из этого цикла пируват:ферредоксин оксидоредуктазы в сочетании с карбоксилирующими ферментами.

**Цикл Кальвина–Бенсона** (рисунок 2) может служить источником субстрата для С3-карбоксилаз: образующийся в этом метаболическом пути 3-ФГК под действием ферментов гликолитического пути может превращаться в ФЕП и ПВК. Далее они могут карбоксилироваться до малата или оксалоацетата.

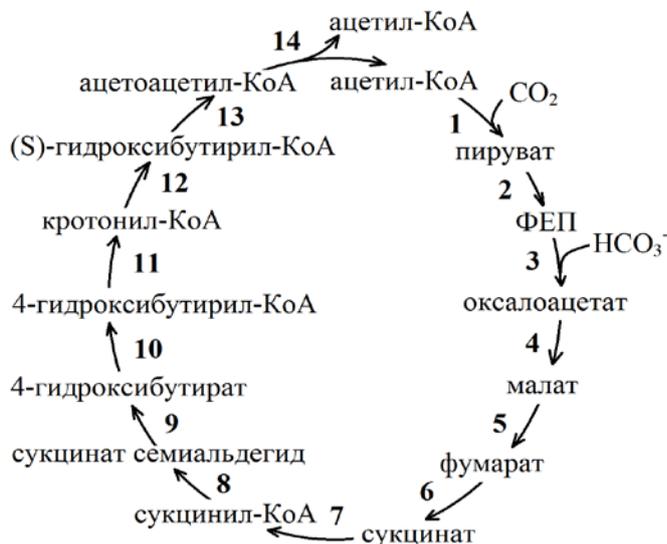
**3-гидроксипропионатный/4-гидроксибутиратный цикл** был найден в *Metallosphaera sedula* (Berg et al., 2007). Этот метаболический путь (рисунок 10) начинается с реакции карбоксилирования ацетил-КоА до малонил-КоА. Некоторые промежуточные звенья и реакции карбоксилирования этого пути совпадают с реакциями 3-гидроксипропионатного цикла.



**Рисунок 10.** Схема 3-гидроксипропионатного/4-гидроксибутиратного цикла (схема составлена на основе информации базы данных KEGG Pathway).

Один полный поворот этого цикла в автотрофных условиях роста приводит к образованию двух молекул ацетил-КоА, одна из которых повторно используется в цикле, другая используется для биосинтеза материала клетки. При наличии экзогенного ацетата для восполнения пула ЦУК достаточно функционирования общих с 3-гидроксипропионатным циклом ферментов.

**Дикарбоксилат/4-гидроксибутиратный цикл**, названный по его промежуточным звеньям: сукцинату (своего рода дикарбоксилат) и гидроксибутирату (рисунок 11). Этот цикл был найден только у *Ignicoccus hospitals*, строго анаэробных гипертермофильных археях (Huber et al., 2008).



**Рисунок 11.** Схема дикарбоксилат/4-гидроксибутиратного цикла (схема составлена на основе информации базы данных KEGG Pathway).

Первая половина цикла, от ацетил-КоА до сукцинил-КоА, соответствует ВЦТК (рисунок 9); последняя половина цикла, от сукцинил-КоА до двух молекул ацетил-СоА, соответствует 3-гидроксипропионатному/4-гидроксибутиратному циклу (рисунок 8). При ассимиляции ацетата в качестве единственного источника углерода для восполнения пула ЩУК достаточно функционирования, как и в случае ВЦТК, пируват:ферредоксин оксидоредуктазы в сочетании с карбоксилирующими ферментами.

### 1.3.5.1. Регуляция работы глиоксилатного цикла.

В *E. coli* регулирование работы конкурирующих за изоцитрат глиоксилатного цикла и ЦТК осуществляется на уровне ИЦД и изоцитратдегидрогеназы (ИЦДГ, ЕС: 1.1.1.42) за счет инактивации последней частичным фосфорилированием (Garnak, Reeves, 1979a; Garnak, Reeves, 1979b). У большинства бактерий ИЦДГ является НАДФ-зависимым ферментом. Бактерии, имеющие НАД-зависимую ИЦДГ, неспособны к росту на ацетате и либо имеют недостаток в дыхательной цепи, либо неполный ЦТК (Chen, Gadal, 1990). Способные к росту на ацетате бактерии используют НАДФ-зависимые ферменты, чтобы синтезировать молекулы НАДФН, необходимые для биосинтеза (Walsh, Koshland, 1984; Walsh, Koshland, 1985). Но бактерии, способные к фотогетеротрофному росту на ацетате синтезируют до 90% НАДФН из других ко-факторов (например, НАДН), образуемых за счет АТФ из пути

циклического переноса электронов. Это наблюдали у пурпурной несерной бактерии *Rps. palustris* использующей глиоксилатный цикл при ассимиляции ацетата (McKinlay, Harwood, 2010). Продемонстрировано также, что НАДФ<sup>+</sup> может защитить активный сайт ИЦДГ от атаки несколькими протеазами (Garland, Nimmo, 1984).

Механизм обратимой инактивации ИЦДГ фосфорилированием подробно рассмотрен в обзоре (Cozzzone, 1998). В этом случае реакцию фосфорилирования и дефосфорилирования катализирует фермент ИЦДГ киназа/фосфатаза с ЕС 2.7.11.5 (LaPorte, Koshland, 1982). В *E. coli* этот фермент также проявляет активность АТФазы (Stueland et al. 1987). Известно много метаболитов, которые влияют на активность ИЦДГ киназы/фосфатазы *in vitro*. Ингибируют киназу и активируют фосфатазу следующие метаболиты: АДФ, АМФ, изоцитрат, оксалоацетат,  $\alpha$ -кетоглутарат, ФЕП, 3-ФГК и ПВК (El-Mansi et al. 1985.; LaPorte, Koshland, 1983; Nimmo, Nimmo, 1984). АТФ, как ко-субстрат для киназы и активатор для фосфатазы, а также НАДФН, который ингибирует обе активности, являются исключениями из вышеприведенного списка. Ингибирование киназ изоцитратом имеет сигмоидальный характер, воздействие других перечисленных веществ – гиперболический. Каждый из рассматриваемых ингибиторов киназы может полностью подавлять киназную активность, а активность фосфатазы повышать в 2-3 раза. Другие соединения: цитрат, фруктозо-6-фосфат, глиоксилат и НАДФ<sup>+</sup> ингибируют киназу, но оказывают слабое воздействие на фосфатазу.

Эти же или другие метаболиты могут оказывать влияние на активность ИЦЛ и малатсинтазы (MacKintosh, Nimmo, 1988). При изучении чистого препарата ИЦЛ из *E. coli* ML 308 показано, что ФЕП и сукцинат оказывают неконкурентное ингибирующее действие на фермент относительно изоцитрата, однако в концентрациях больших, чем наблюдавшиеся физиологические концентрации. Более детальные кинетические исследования показали, что ФЕП скорее ведет себя как аналог сукцината и в аллостерические эффекты не вовлечен (Ashworth, Kornberg, 1963). Эти результаты, первоначально продемонстрированы на ферменте из *Pseudomonas indigofera* (Williams et al. 1971). Кроме того, вероятно, нет никакой корреляции и между внутриклеточными уровнями оксалоацетата, ПВК, цитрата или изоцитрата и активностью ферментов глиоксилатного шунта (Lakshmi, Helling, 1978). Гликолат, аналог глиоксилата, оказывает конкурентное ингибирующее действие на ИЦЛ относительно глиоксилата и неконкурентное относительно сукцината (MacKintosh, Nimmo, 1988). 3-ФГК является конкурентным ингибитором в изоцитратлиазной реакции, его внутриклеточная концентрация при росте на ацетате равна 2.5 мМ, что достаточно для существенного влияния на деятельность ИЦЛ, и при рН 7.3 приведет к увеличению К<sub>м</sub> для фермента с 63  $\mu$ М до 0.26 мМ (MacKintosh, Nimmo, 1988). Имеются литературные данные о

регуляции работы глиоксилатного цикла в *E. coli* на уровне транскрипции и трансляции (Cozzone, 1998). В *E. coli* и *S. typhimurium* продемонстрирована возможность участия в активации экспрессии генов метаболизма ацетата (ИЦЛ, МС, ИЦДГ) репрессора фруктозного регулона FruR, который является плеотропным транскрипционным регулятором. Он управляет экспрессией нескольких главных путей, включенных в углеродный и энергетический метаболизм (Chin et al. 1989; Geerse et al. 1989a; Geerse et al. 1989b). К этим путям относятся гликолиз, ЦТК, глиоксилатный шунт, глюконеогенез и электронный транспорт, а также путь Энтнера-Дудорова и пентозофосфатный путь (Saier et al. 1996). FruR управляет экспрессией нескольких генов негативно или положительно. В отношении генов глюконеогенеза и ИЦЛ, МС, ИЦДГ киназы/фосфатазы он проявляет себя как активатор экспрессии (Chin et al. 1989; Ramseier et al., 1995).

Регуляция функционирования глиоксилатного цикла и ЦТК в *Rba. capsulatus* за счет инактивации ИЦДГ частичным фосфорилированием не представляется возможной, так как по результатам секвенирования полного генома бактерии (Strnad et al., 2010) гена ИЦДГ киназы/фосфатазы бактерия не имеет. Также у *Rba. capsulatus* отсутствуют гены транскрипционного репрессора IclR, белка *YjaC* (предположительно, подавляет активность ИЦЛ и МС), обнаруженных в *E. coli* (Cozzone, 1998). Обсуждается возможность метаболической регуляции активности ИЦДГ и ферментов глиоксилатного цикла в данной бактерии. Из литературных источников известно, что ИЦЛ *Rba. capsulatus* - индуцибельный фермент: его активность появляется в присутствии ацетата как единственного источника углерода (Nielsen et al. 1979). ИЦЛ активность отсутствует при росте культуры на малате как в фототрофных, так и в темновых аэробных условиях роста (Kornberg, Lascelles, 1960), а уже проявившаяся активность ИЦЛ подавляется при добавлении малата в ростовую среду (Nielsen et al. 1979). Также *in vitro* показано, что ИЦЛ подвержена аллостерической регуляции. 2-оксоглутарат, оксалоацетат, ПВК, глиоксилат и АДФ приводят к снижению активности ИЦЛ, ацетил-КоА – к частичному снижению. В то же время ацетат, сукцинат и D,L-малат не оказывают влияния на активность ИЦЛ (Blasco et al. 1991). Кроме того, проводились эксперименты по влиянию подавления процессов фотосинтеза в ацетатных культурах *Rba. capsulatus* на ИЦЛ активность. Исходя из этих результатов, было предположено, что освещенность может быть регуляторным фактором для глиоксилатного цикла, но требуются дополнительные исследования в этом направлении (Blasco et al. 1991).

Показано, что другая пурпурная бактерия *Rps. palustris* использует глиоксилатный путь при фототассимиляции ацетата в стадии активного роста культуры, а при переходе в стационарную фазу роста даже при наличии ацетата в ростовой среде метаболизирует его

через ЦТК (McKinlay et al., 2014). НАДФ<sup>+</sup>-зависимая ИЦДГ этой бактерии незначительно отличается от НАДФ<sup>+</sup>-зависимых ИЦДГ из фотоавтотрофной бактерии *Chlorobium limicola* и гетеротрофной *E. coli* (Lebedeva et al. 2002). ИЦДГ *Rps. palustris*, как и фермент из *Chl. limicola*, осуществляет и реакцию окислительного декарбоксилирования изоцитрата до 2-оксоглутарата и реакцию восстановительного карбоксилирования 2-оксоглутарата до изоцитрата. *In vitro* продемонстрировано, что продукты реакции (2-оксоглутарат для прямой реакции и изоцитрат для обратной реакции), являются мощными ингибиторами изоцитратдигидрогеназной и 2-оксоглутараткарбоксилазной реакций, соответственно (Lebedeva et al. 2002). Эффект бикарбонат-иона, НАДФ<sup>+</sup>, и НАДФН на прямую и обратную реакцию ИЦДГ менее выражен. Такие интермедиаты ЦТК, как ФЕП, 2- и 3-ФГК, ПВК, а также аминокислоты (аспартат, аланин и аспарагин), гликолат, ацетат и пропионат не оказывают влияния на активность ИЦДГ ни в одном из направлений осуществляемой реакции. Глиоксилат и оксалоацетат, добавленные по отдельности в концентрации 2.5 мМ незначительно ингибируют ИЦДГ *Chl. limicola* и *Rps. palustris*. В то же время при совместном добавлении они проявляют себя как мощные ингибиторы (Lebedeva et al. 2002). Таким образом, наблюдаемая чувствительность ИЦДГ к воздействию рассмотренных метаболитов свидетельствует в пользу возможной метаболитной регуляции потока вещества через глиоксилатный путь или ЦТК в пурпурных несерных бактериях и на уровне ИЦДГ.

Таким образом, на активность ИЦДГ оказывают влияние и факторы внешней среды и внутриклеточные метаболиты.

#### **1.4. Современные подходы к изучению метаболизма бактерий.**

В настоящее время накоплен большой массив экспериментальных данных, которые нуждаются в систематизации и комплексном анализе для того, чтобы понять принципы организации живого и способность организмов к адаптации при изменении условий окружающей среды. Полностью расшифрованы и аннотированы геномы различных микроорганизмов. Для некоторых видов бактерий уже получены данные протеомного и транскриптомного анализа при выращивании в разных условиях. Накоплены данные о функциональной активности выделенных из различных видов организмов ферментов. Для интерпретации уже накопленных и вновь получаемых экспериментальных данных служит относительно новая дисциплина под названием системная биология.

Важным этапом системного анализа микроорганизма является реконструкция его метаболической карты, то есть сбор и визуализация всех потенциальных биохимических процессов клетки. Экспериментальные данные об активности ферментов и данные метаболомного анализа, взятые в совокупности с протеомными, транскриптомными и

геномными данными позволяют реконструировать максимально приближенные к реальным объектам модели метаболизма. Построение точных моделей метаболизма является необходимым условием для прогнозирования поведения микроорганизма в различных условиях роста (Wodke et al., 2013).

Существует два основных подхода к реконструкции карт метаболизма (Francke et al., 2005). Один направлен на составление схемы метаболизма, исходя из первоначальных данных аннотирования генома, и последующее уточнение наличия ферментативных реакций. Второй алгоритм, который на данный момент используется исследователями чаще, состоит из первоначального уточнения функций ферментов и последующей реконструкции метаболических путей.

Наиболее информативным является первый алгоритм, заключающийся в построении схемы на основе первичной аннотации, так как он включает все возможные реакции, катализируемые ферментами (Francke et al., 2005). Этот алгоритм выполняется в два этапа.

*Первый этап реконструкции метаболизма* заключается в создании метаболической схемы на основе автоматической аннотации генома бактерии. Почти все доступные последовательности генома в настоящее время систематически обработаны с помощью автоматизированных программ, которые идентифицируют кодирующие последовательности и функционально аннотируют гены (предполагаемым ферментам присваивают соответствующие катализируемые ими реакции) (Bork et al., 1998; Whisstock, Lesk, 2003).

Затем с помощью информации, предоставленной фермент-ориентированными базами биохимических данных (BRENDA (Barthelmes et al. 2007), SwissProt (Boutet et al., 2007)) выявляются данные о дополнительных активностях аннотированных ферментов и их способности катализировать различные биохимические превращения в метаболическом пути.

Базы метаболических путей, содержащие описание биохимии метаболических процессов, позволяют выяснить все биохимические реакции, в которых участвует тот или иной метаболит и определить взаимосвязь между реакциями. К таким базам данных относятся, например, базы EcoCyc (описывает метаболизм кишечной палочки (Karp et al., 2002)) или UM-BDD (описывает пути катаболизма у разных видов бактерий (Ellis et al., 2006)).

Реконструкцию схемы метаболизма также можно проводить, используя уже имеющиеся реконструкции родственных организмов. Часто реакции группируются в метаболические пути или модули, которые сохраняются у нескольких организмов.

*Второй этап реконструкции* заключается в проверке «назначенных» согласно аннотации реакций (включает поиск ферментативных «пробелов» в метаболических путях; поиск аннотированных ферментов, способных катализировать реакции, соответствующие «пробелам» в схеме; проверку возможности утилизации или выведения всех конечных продуктов; описание транспортной системы, ответственной за импорт необходимых субстратов). Существуют несколько минимальных требований к детализации, необходимой для реконструкции полной модели метаболизма бактерий. Во-первых, метаболические пути должны быть представлены в соответствии с особенностями физиологии исследуемого организма, что требует хороших знаний физиологии микроорганизма. Во-вторых, основные пути метаболизма должны быть ферментативно завершенными. При отсутствии аннотированного фермента в метаболическом пути постулируют соответствующую активность в клетке, которая в ходе дальнейшего анализа будет подтверждена или опровергнута. Для поиска такого гена используют филогенетический анализ ферментов, анализ слияния и порядка генов в кодирующих рамках, и экспериментальные данные протеомного и транскриптомного исследований. Однако существует глобальная проблема, требующая решения перед проведением заполнения метаболических пробелов в путях: не всегда ясно, должна ли быть назначена ферментативная активность в клетке, или же метаболические реакции протекают по обходному пути. Для решения такого вопроса исследователи обращаются к данным о механизмах протекания реакций в близкородственных организмах и о физиологии исследуемого организма. Наиболее надежными данными, из которых можно сделать вывод о возможности протекания того или иного превращения в клетке, являются экспериментальные доказательства соответствующей биохимической активности. Получить информацию о синтезируемых в ходе реакции соединениях можно проводя, например, описанное в следующем подразделе, метаболомное исследование (Osterman, Overbeek, 2003). В дополнение к полученной уточненной модели, в схеме должны быть определены обратимость и локализация реакций. Некоторые метаболические или ферментативные базы данных предоставляют информацию о типе реакций (UniPathway, KEGG, EcoCyc). Если информация о типе реакции недоступна, то на основании данных об энергии Гиббса, а также исходя из наличия энергетических эквивалентов (НАДН или АТФ), включенных в реакции, можно предположить обратимость реакции (Ma, Zeng, 2003; Kummel et al., 2006). Для построения точной метаболической модели необходимо также учитывать клеточные системы транспорта метаболитов. Транспорт метаболитов может быть описан с помощью инструментов сравнительной геномики, которые идентифицируют транспортные ферменты на основании данных о

транспортных системах микроорганизмов (например, TransportD (Ren et al., 2004)). Тем не менее, методы автоматического аннотирования вряд ли способны определить наличие специфических белков-переносчиков в клетке. Данные о переносимых через мембрану метаболитах часто получают, используя информацию о физиологии микроорганизма и способности потреблять питательные субстраты. Реконструкция метаболизма обеспечивает платформу для визуализации и анализа метаболомных данных.

#### **1.4.1. Первичная автоматическая аннотация генома.**

Аннотация генома – это процесс маркировки генов, тРНК и других объектов в последовательности ДНК (Свердлов, 2009). Три кодона (TAG, TGA, TAA) не кодируют аминокислот, а являются сигналами окончания трансляции, поэтому определить конец гена несложно. Однако кодон ATG не только указывает на начало гена, но и встречается в середине, где кодирует аминокислоту метионин. Кроме того, кодон ATG может встретиться и в случайном месте вне гена. Поэтому распознавание гена – это непростая задача.

Самым простым способом распознавания генов является поиск протяженных открытых рамок считывания (ОРС). От каждого потенциального стоп-кодона последовательность просматривается по три нуклеотида справа налево до тех пор, пока не встретится предыдущий стоп-кодон. Гены могут находиться только внутри таких открытых рамок, поскольку стоп-кодон не может встретиться внутри гена. Тем самым проблема сводится к тому, чтобы отличить стартовые кодоны ATG от внутренних и располагающихся в межгенных промежутках. Узнавание стартовых кодонов стало менее затруднительным после того, как стало известно, что в ДНК на расстоянии 5-10 кодонов до стартового кодона есть сайт связывания рибосом на молекуле мРНК прокариот, названная в честь обнаруживших ее ученых – последовательность Шайна-Дальгарно (Kapp, Lorsch, 2004). Но эта последовательность часто выражена слабо, и абсолютно надежного правила для определения стартовых кодонов сформулировать не удастся. Однако оказывается, что есть другие характеристики, которые можно использовать при распознавании (Гельфанд, 1998). Но эти соображения, хорошо работающие при анализе бактериальных геномов, не срабатывают в случае с геномами многоклеточных организмов – в этом случае в основе для распознавания ОРС лежат другие признаки и закономерности (Гельфанд, 1998).

Более сильным подходом является сравнение последовательностей родственных генов из разных геномов. Сравнительный подход позволяет не только размечать белок-кодирующие участки, но и предсказывать функции белков. Для этого новые белки сравнивают с белками, функции которых были исследованы экспериментально (например, с помощью алгоритма PSI-BLAST = Position-Specific Iterated-BLAST (Tian, Skolnick, 2003))

или ищут в геноме организма последовательности генов, кодирующие искомым известный белок (например, с помощью алгоритма tBLASTn (Altschul et al. 1997)). Алгоритм tBLASTn производит поиск аминокислотной последовательности против транслированного в шести рамках считывания генома. При высоком уровне сходства можно ожидать тождества функций, при среднем сходстве - близости функций и, наконец, при отдаленном родстве угадываются только самые общие функциональные или структурные свойства.

Однако даже гомологичные последовательности (последовательности, имеющие общее происхождение), которые имеют большой процент идентичности, не всегда кодируют белки с одинаковой функцией. Это связано с тем, что в одном случае белки-гомологи могут являться ортологами – последовательностями, возникшими из одного общего предшественника в процессе видообразования и имеющие, как правило, одну и ту же функцию. В другом случае – паралогами: последовательностями, возникшими из одного общего предшественника в результате дупликации одного гена в одном организме, которые, как правило, имеют разные функции. Поэтому всегда требуется экспериментальное или иное подтверждение функциональной активности гомологичных последовательностей.

#### **1.4.2. Протеомика.**

Термин «proteome» был предложен в 1995 году Марком Уилкинсом (Marc Wilkins) и соавторами (Wilkins et al., 1996) для описания полного набора белков, кодируемых геномом, чуть позже, в 1997 году, Питером Джеймсом был введен в оборот и термин «proteomics» (James, 1997). Сегодня протеомику можно определить как совокупность технологий, направленных на крупномасштабное изучение структур, пост-трансляционных модификаций и взаимодействий белков в живых организмах. Основной задачей протеомики является количественная оценка изменений количества белков в клетках, тканях или целом организме при воздействии на них различных внешних факторов (Anderson, Anderson, 1998).

Преимуществом протеомики перед исследованиями на уровне генома является тот факт, что наличие какого-либо гена в организме не означает, что с него производится транскрипция, а наличие транскрипта не означает, что с него происходит трансляция, а даже если происходит, то транскрипт не позволяет однозначно говорить о структуре белка, его созревании и локализации. Исследование протеома позволяет подтверждать наличие предсказанных при помощи поиска открытых рамок считывания белков в клетке, обнаруживать варианты альтернативного сплайсинга.

В основе этой области исследований лежат базы данных сиквенсов геномов, 2-D PAGE (двумерный гель-электрофорез в полиакриламиде), ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография), масс-спектрометрия (как основной инструментальный метод

анализа белков и пептидов) и биоинформатика, коррелирующая результаты масс-спектрометрического анализа со структурами белков, транслированными из геномных баз данных (Демидов, Пельтек, 2014).

Для изучения пространственной организации аминокислот в структуре белка (вторичная и третичная структура белка) широко используются спектроскопические методы (метод кругового дихроизма и метод инфракрасной спектроскопии и др.). Методы ЯМР и рентгеноструктурный анализ дают наиболее полную и подробную информацию и третичной структуре белка и позволяют исследовать структуру белка с разрешением до 1-3 Å. Данные о третичной структуре белка дают важную информацию о функциях, выполняемых данным белком, при этом зачастую белки со схожими функциями обладают сходной пространственной структурой. Методы ультрацентрифугирования и гель-фильтрации позволяют исследовать четвертичную структуру белка. Использование комбинации описанных приемов позволяет подробно охарактеризовать структуру и свойства каждого отдельно взятого белка.

#### **1.4.3. Метаболомный анализ.**

Так как функции многих генов остаются неизвестны и многие преобразования в клетке катализируются неопределенными ферментами, то требуется дополнительная работа по уточнению их функции. Наиболее простой подход для решения задачи функциональной аннотации гена разработан на основе метаболомного анализа. Такой метод заключается в анализе изменений концентраций метаболитов в культуральной среде и биомассе «нокаутных» штаммов, то есть штаммах с делецией определенного гена (Saghatelian, Cravatt, 2005; Smith et al., 2006). Для такого штамма ожидаемым изменением в метаболоме является накопление субстратов реакций, катализируемых соответствующим удаленному гену ферментом. Детектирование накоплений метаболитов в клетках при делеции гена может позволить точно функционально аннотировать ген (Allen et al., 2003; Saito et al., 2006; Heinemann, Sauer, 2010). С помощью метаболомного анализа в 2009 году продемонстрировано наличие каждого из метаболитов предполагаемого пути биосинтеза глиоксилата у *Methylobacterium extorquens* (Peugraud et al., 2009).

В состав метаболома каждого микроорганизма входят от 100 до нескольких тысяч компонентов, имеющих различные физико-химические свойства и представленных в широком диапазоне концентраций. В 2010 году группе под руководством профессора Л. Вилмитзера удалось идентифицировать 247 метаболитов в клетках бактерии *E.coli* и количественно измерить из них - 170 метаболитов (Jozefczuk et al., 2010).

В настоящее время в метаболомике сформировалось новое направление исследований под названием «флаксомика», связанное с измерением потоков метаболитов и их изменений при внешних воздействиях (Winter, Krömer, 2013; Cascante, Marin, 2008; Aon; Cortassa, 2015). Флаксомика - это область исследований, направленная на измерение динамики потоков и концентраций метаболитов во времени. Для проведения анализа потоков метаболитов были разработаны методы мгновенного добавления  $C^{13}$ -меченных углеводов в питательную среду микроорганизмов и последующего детектирования  $C^{13}$ - производных в метаболоме клеток.

#### **1.4.4. Транскриптомный анализ. Экспрессионные профили бактерий.**

Традиционные подходы в молекулярной генетике, основанные на методах полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Saiki et al., 1986), Northern-блоттинге (Alwine et al., 1977) и последовательного анализа геномной экспрессии (Velculescu et al., 1995), направлены на изучение экспрессии одиночных генов или небольшого числа генов. Технология генных микрочипов (ДНК-микрочипов) совершила революцию в совершенствовании методов изучения генетического аппарата, так как сделала возможным мониторинг экспрессии всего клеточного генома при строго контролируемых условиях. Подобные исследования дают возможность выявить стратегии, используемые клеткой в ответ на изменения внешних условий, определить группы генов функционально связанные друг с другом, реконструировать механизмы регуляции транскрипции и определить связанные с ними метаболические пути, аннотировать гены, функция которых оставалась неизвестной (Свешникова, Иванов, 2007).

ДНК-микрочип представляет собой множество небольших одноцепочных молекул ДНК-зондов, которые ковалентно пришиты к твёрдому основанию (Garaizar et al., 2006). Каждый такой зонд имеет строго определённую последовательность нуклеотидов и место на микрочипе. Одинаковые зонды располагаются вместе, образуя сайт микрочипа. Между сайтом и последовательностью ДНК-зонда есть взаимно-однозначное соответствие. По типу последовательностей зондов микрочипы делятся на два основных класса: олигонуклеотидные чипы и чипы на основе последовательностей кодирующей ДНК (кДНК) (Свешникова, Иванов, 2007).

Для экспрессионного анализа из клеток выделяют суммарную РНК, которая подвергается обратной транскрипции, в результате которой получается меченная кДНК. Количество синтезируемых молекул кДНК пропорционально уровню экспрессии соответствующего гена в исследуемом объекте в заданных условиях (Duggan et al., 1999). Иногда требуется ещё один этап транскрипции с кДНК (для чипов, работающих с РНК).

Тогда получается меченная кРНК. Измерение генной экспрессии посредством кДНК называется профилем экспрессии, или экспрессионным анализом.

Существует несколько способов внести в целевую молекулу различные метки: включение радиоактивно (Свешникова, Иванов, 2007) или флуоресцентно меченых нуклеотидов в процессе синтеза кДНК или кРНК, использование биотин-модифицированных нуклеотидов, которые потом окрашиваются флуоресцентно-меченым стрептавидином, использование во время синтеза модифицированных нуклеотидов, на которые затем можно добавить флуоресцентную метку (Richter et al., 2002; Свешникова, Иванов, 2007).

Меченая кДНК или кРНК наносится на микрочип, гибридизуется с комплементарным ДНК-зондом на микрочипе, а кДНК/кРНК не имеющую соответствующего ДНК-зонда на микрочипе смывают. В случае флуоресцентных меток процедура сканирования микрочипа включает возбуждение красителей под действием лазерного излучения вблизи их максимумов поглощения и последующее измерение интенсивности флуоресценции в каждой точке чипа. В случае с биотинилированными образцами в олигонуклеотидных микрочипах фирмы Affymetrix гибридизации могут подвергаться сами молекулы клеточной мРНК, меченные биотином: степень гибридизации определяется при помощи стрептавидин-фикоэритриновых конъюгатов, которые дают флуоресцентный (зеленый) и фикоэритриновый (красный) гибридизационные сигналы (Hughes et al., 2001). Флуоресценция возбуждается светом лазера и регистрируется, как правило, на сканирующем конфокальном микроскопе (Bumgarner, 2013). На современных микрочипах можно полностью расположить целый геном, каждый известный ген которого будет являться зондом.

Несмотря на все свои достоинства, у ДНК-микрочипов существуют и ограничения в применении, а также сложности в интерпретации экспериментальных данных (Свешникова, Иванов, 2007).

### **1.5. Практическое значение изучения путей метаболизма ацетата в *Rba. capsulatus*.**

Пурпурные несерные бактерии способны образовывать водород как побочный продукт роста культуры на органических отходах. Молекулярный водород – экологически чистый энергоноситель, получение которого с использованием фотосинтезирующих микроорганизмов в качестве биокатализаторов является перспективной задачей. Для практического внедрения данного процесса требуется существенное повышение общей эффективности преобразования микроорганизмами энергии света и органических субстратов в биотопливо (водород). Единственный путь для достижения этой цели – получение более

глубоких знаний о процессах, происходящих внутри фотосинтетической клетки, и их перенаправление на образование водорода.

Наиболее перспективным источником органических соединений для данного процесса являются продукты брожения углеводов, которые в большом количестве содержат ацетат и бутират (метаболизируется через ацетил-КоА). Поэтому понимание путей метаболизма ацетата у пурпурной несерной бактерии *Rba. capsulatus* актуально и имеет практическую значимость, так как, в том числе, позволяет предсказать ряд генетических модификаций генома данной бактерии для возможного увеличения скоростей выделения водорода или накопления ПГБ (биоразлагаемого пластика).

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Объект исследования. Ростовые среды.

Для исследований использовали *Rba. capsulatus* штамм В10, полученный из коллекции кафедры микробиологии МГУ. Поскольку пурпурные бактерии используют и инфракрасную составляющую спектра до 850-900 нм, в лабораторных условиях их выращивают с использованием ламп накаливания, т.к. они дают непрерывный спектр в видимой и ближней инфракрасной областях спектра. Культуру выращивали в фотогетеротрофных анаэробных условиях на минимальной среде Ормерода (Ormerod et al. 1961) с ацетатом (20 мМ) или лактатом (40 мМ) в качестве единственного источника углерода.

**Таблица 1.** Состав среды Ормерода (%).

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,1250	CaCl <sub>2</sub>	0,0075
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,0900	ЭДТА	0,0020
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,0200	микроэлементы	1 мл л <sup>-1</sup>
FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,0010	лактат	0,4000
Состав микроэлементов (мг 100 мл <sup>-1</sup> ):			
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	280,0	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	24,0
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	75,0	CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	5,5
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	290,0		

Кроме того, в среду вносили витамины: тиамин (1,50 мг л<sup>-1</sup>). Основную среду стерилизовали при 1,0 атм (60 мин), а витамины стерилизовали отдельно при 0,5 атм (30 мин). Перед посевом в среду вносили стерильные растворы витаминов и доводили pH стерильным 10% раствором КОН до величины 6,8. Чистоту культуры в ходе всех экспериментов проверяли посевом на твердую агаризованную пептонно-дрожжевую среду (таблица 3).

**Таблица 2.** Состав агаризованной пептонно-дрожжевой среды (%).

CaCl <sub>2</sub>	0,022
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	0,052
Пептон	0,3
дрожжевой экстракт	0,3
Агар	1,75

Посев на чистоту культуры осуществлялся микробиологической петлей методом истощающего штриха.

**2.2. Периодическое культивирование.** Культуру выращивали в плотно закрывающихся стеклянных матрицах (250 мл с толщиной светопропускающего слоя 2,5 см) или в герметичных стеклянных пробирках объемом 19 мл с толщиной пропускающего свет слоя 1 см в анаэробных фотогетеротрофных условиях при интенсивности света 40 или 20 Вт/м<sup>2</sup> (в зависимости от задач эксперимента) при температуре 30<sup>0</sup>С.

**2.3. Периодическое культивирование с рН-статированием** проводили в управляемом фотобиореакторе на основе коаксиальных цилиндров (Tsygankov et al. 1994). Поддержание рН=7,0 осуществляли автоматическим добавлением 0,5 М Н<sub>3</sub>РО<sub>4</sub>. Для исключения влияния предыстории культуры на результаты экспериментов, мы использовали культуру *Rba. capsulatus* В10, которая не выращивалась с ацетатом в качестве единственного источника углерода. Чтобы избежать присутствия других источников углерода, инокулят выращивали до стационарной фазы роста, которая наступала после исчерпания лактата и характеризовалась резкой остановкой изменения оптической плотности (измерялась автоматически). Для поддержания анаэробных условий через среду в фотобиореакторе перед внесением инокулята пропускали аргон (100 мл/мин, 20 мин). Фотобиореактор заполняли средой до 1 л (включая инокулят, 10%), оставляя минимальную газовую фазу (около 0,1 л). После посева для поддержания анаэробных условий без существенного нарушения газового баланса среды (чтобы не удалялся СО<sub>2</sub>) над засеянной культурой пропускали аргон со скоростью 20 мл/мин. Выбор такого способа культивирования обусловлен тем, что в предварительных экспериментах с периодическими культурами в замкнутых сосудах, когда СО<sub>2</sub> не удалялся, культуры проявляли ИЦЛ активность в разных фазах роста.

О скорости роста культур судили по изменению их оптической плотности, которую измеряли в процессе роста встроенным в систему датчиком оптической плотности (измерительный свет 630 нм).

**2.4. Определение фаз роста культуры (спектрофотометрическое)** проводили по измерению оптической плотности клеточной суспензии при λ=650 нм на спектрофотометре SHIMADZU UV-VIS MINI 1240, дополнительно к автоматическому измерению оптической плотности фотобиореактором.

**2.5. Измерение интенсивности падающего света** проводили пиранометром, который был отделен от источника излучения светофильтром СЗС24, отсекающим излучение с длиной волны больше 900 нм (Цыганков, Гоготов, 1990).

**2.6. Получение бесклеточных экстрактов (БЭ).** Клетки разрушали ультразвуком (УЗГ13-0,1-0,063, 30-35 Вт; 6 подходов по 30 секунд с интервалом 30 секунд, на льду – при соблюдении этих условий нагрев образца не превышал 40<sup>0</sup>С), что приводило к разрушению более 90% клеток (по данным о количестве высвободившегося в супернатант белка). Крупные фрагменты осаждали на микроцентрифуге Eppendorf AG 22331 (12000 g, 2 мин). Полученный супернатант использовали для анализа.

## **2.7. Биохимические анализы.**

**2.7.1. Определение концентрации бактериохлорофилла *a*** проводили спектрофотометрически по поглощению ацетон-метанольных экстрактов при 772 нм ( $\epsilon = 75 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ), как описано (Clayton, 1966).

**2.7.2. Определение концентрации оргкислот в культуральной жидкости.** Для измерения концентрации лактата и ацетата в среде клетки отделяли центрифугированием (Eppendorf AG 22331, 12000 g, 2 мин), супернатант замораживали и хранили до измерения.

Концентрацию ацетата в супернатанте определяли после его подкисления до  $\text{pH} \leq 3$  с помощью 30%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  без дополнительной предобработки методом газо-жидкостной хроматографии (Laurinavichenea et al. 2008).

Содержание лактата определяли спектрофотометрическим методом по реакции восстановления НАД лактатдегидрогеназой в гидразин-глициновом буфере (Асатиани, 1969). Состав реакционной смеси: 0,9 гидразин-глицинового буфера ( $\text{pH} 9,6$ ); 1,0 мл исследуемого раствора; 0,1 мл 50 мМ раствора НАД. Оптическую плотность калибровочных и экспериментальных образцов измеряли при  $\lambda=340$  нм.

**2.7.3. Определение содержания гликогена в клетках** проводили после их разрушения ультразвуком (УЗГ13-0,1-0,063, 30-35 Вт; 6 подходов по 30 секунд с интервалом 30 секунд, на льду) глюкозооксидазным методом (Герхардт, 1984).

**2.7.4. Определение ферментативной активности ИЦЛ в БЭ.** Для определения ИЦЛ активности биомассу отмывали 50 мМ трис-НСl-буфером ( $\text{pH}=7,5$ ): клетки отделяли центрифугированием (Eppendorf AG 22331, 12000 g, 2 мин), осадок ресуспензировали в равном объеме трис-НСl буфера ( $\text{pH} 7,5$ ), повторно центрифугировали при тех же условиях. При необходимости длительного хранения проб их замораживали при температуре  $-70^0\text{C}$ . Для анализа осадок ресуспендировали в 1 мл 100 мМ трис-НСl-буфера ( $\text{pH} 7,5$ ), добавляли дитиотреитол (1 мг/мл) и ингибитор протеаз Invitrogen Roch (каталожный номер 11 836 153 001) в концентрации, рекомендованной производителем.

Клетки разрушали ультразвуком. Крупные фрагменты осаждали на микроцентрифуге Eppendorf AG 22331 (12000 g, 2 мин). Полученный супернатант использовали для анализа.

ИЦП активность определяли спектрофотометрически в аэробных условиях по методу Диксона и Корнберга (Dixon, Kornberg, 1959). Состав и концентрация компонентов реакционной смеси объемом 1 мл: 100 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,5); 5 мМ MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 3,5 мМ фенилгидразин (рН 7,5); 2 мМ изоцитрат и 50 мкл бесклеточного экстракта (5-7 мг/мл белка). Измерения проводили в 1 см кварцевой кювете. Реакцию начинали добавлением изоцитрата. Формирование гликосилат-фенилгидразона детектировали при 324 нм ( $\epsilon = 11,5 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ ). Ферментативную реакцию проводили при 30°C. За единицу активности фермента принимали нмоль субстрата, превращенного за одну минуту, в пересчете на один мг белка экстракта, внесенного в реакционную смесь.

**2.7.5. Определение концентрации белка в БЭ** проводилось спектрофотометрически при  $\lambda=750$  нм на спектрофотометре SHIMADZU UV-VIS MINI 1240 по методу Лоури (Lowry et al., 1951) в стеклянной 1 см кювете. Метод основан на возникновении окраски в реакции фенольного реагента (Фолина-Чикольте) с остатками тирозина.

Реактивы: 2% раствор Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> в 0,1 м растворе NaOH (реактив 1); 0,5% раствор CuSO<sub>4</sub>\*5 H<sub>2</sub>O в 1% Na- и K-тарtrate (реактив 2); щелочной раствор меди (50 мл реактива 1 и 1 мл реактива 2); реактив Фолина; раствор бычий сывороточный альбумин (БСА) 500 мкг/мл.

## **2.8. Методы обработки баз данных.**

**2.8.1. 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. Это позволило обнаружить цепочки ранее не установленных путей.

**2.8.2. Определение генетического потенциала для функционирования выявленных и ранее известных путей восполнения пула ЩУК в *Rba. capsulatus*.**

С целью определения генетического потенциала различных метаболических путей у *Rba. capsulatus* B10 в базе данных KEGG в разделе Pathway были найдены интересные 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 (Morgulis et al., 2008) 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. Критериями обнаружения интересующего гена были: идентичность более 70% при длине более 100 нуклеотидов при сравнении нуклеотидных последовательностей; идентичность более 40% при длине более 100 аминокислот для белковой последовательности; Bit Score (мера статистической значимости выравнивания) более 50; e-value (the expectation value)  $0-10^{-6}$  – ген есть (при удовлетворении остальным критериям), а  $>10^{-6}$  – гена нет. В случае, если данная последовательность действий не приводила к нахождению возможного гена, в тексте указывали, что гена нет.

Кроме того, когда необходимый ген отсутствовал, 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.

### **2.8.3. Определение активности генов, вовлеченных в ацетатный метаболизм в культуре *Rba. capsulatus*, 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. Авторы экспериментов (Erkal, N., Gurgan, M., Ozgur, E., and Yucel, M.) выращивали культуры *Rba. capsulatus* SB1003 на среде с 40 мМ ацетата и разными источниками азота (2 мМ глутамата или 5 мМ  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) в фотобиореакторе объемом 150 мл при 30°C и интенсивности освещения 200 Вт/м<sup>2</sup>. Отбор образцов проводили через 16 ч после посева инокулята. Все последующие операции проводились согласно методическому руководству «Affymetrix» для образцов из прокариотических организмов. ДНК-микрочипы для проведения эксперимента были изготовлены «Affymetrix», США. Микрочипы созданы

на основе данных о нуклеотидных последовательностях *Rba. capsulatus* SB 1003 в GenBank № CP001312 для хромосомы и № CP001313 для плазмиды pRCB133 (Strnad et al., 2010).

В общей сложности Erkal et al. получены данные по транскрипции 4052 последовательностей открытых рамок считывания и 200 межгенных последовательностей с более чем 300 п.н. Авторы анализировали данные при помощи программного обеспечения GeneSpring GX 11 («Agilent Technologies», США). Эта программа вычисляет *p*-значения детекции для каждого транскрипта. Значение ниже определенного порога *p*-значения (в данном случае 0,05) указывает, что транскрипт обнаружен. Если значение попадает в диапазон *p*-значений 0,05–0,06, то присутствие транскрипта считается неоднозначным. Все транскрипты, для которых *p*-значение детекции >0,06, считаются отсутствующими в образце.

### **2.9. 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 или значения со стандартным отклонением.

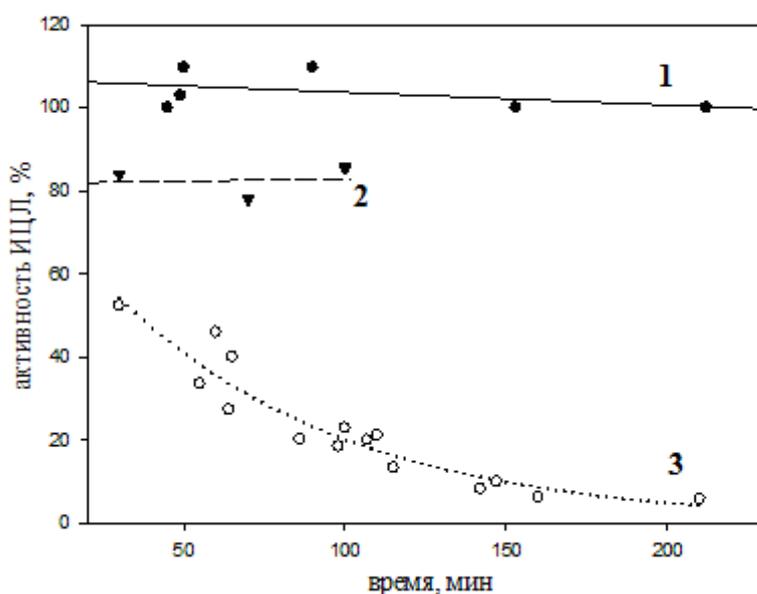
### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Метод определения ИЦЛ активности в *Rba capsulatus*.

В литературе описаны разные подходы, применяемые при определении ИЦЛ активности в культуре *Rba. capsulatus*: в живых клетках, проницаемых для субстрата и продукта реакции за счет добавления в реакционную смесь толуола (Nielsen et al. 1979), в БЭ (Kornberg, Lascelles, 1960; Willison, 1988; Meister et al., 2005; Albers, Gottschalk, 1976) и выделенного очищенного фермента (Blasco, 1991). При этом одни авторы наблюдали кинетику реакции образования окрашенного комплекса продукта реакции – глиоксилата – с фенилгидразином. Другие определяли количество образовавшегося окрашенного комплекса за определенное время (более 20 минут) инкубации пробы со всеми компонентами реакционной смеси в сравнении с контролем для каждой пробы (белок ИЦЛ или экстракт клеток с фенилгидразином, но без субстрата реакции - изоцитрата). Во втором случае измерения проводили при длине волны 460 нм, в отличие от стандартной методики (при 324 нм), ссылаясь на то, что при 324 нм фенилгидразин поглощает свет даже в отсутствие субстрата. В наших экспериментах наблюдался данный эффект, но ошибки в измерениях удается избежать при записи кинетики изменения оптической плотности. Надо отметить, что авторы, которые не обнаруживали ИЦЛ активности в «ацетатных» культурах, работали с БЭ *Rba. capsulatus* (Meister et al., 2005; Albers, Gottschalk, 1976; Kondratieva, 1979).

В 1979 году исследователями было отмечено (Nielsen et al. 1979b), что целые клетки *Rba. capsulatus* штамм St. Louis имели стабильную высокую специфическую ИЦЛ активность по сравнению с БЭ. При этом авторы отмечали, что в разрушенных клетках *Rba capsulatus* дитиотреитол (ДТ) несколько стабилизирует ИЦЛ активность.

Мы наблюдали снижение ИЦЛ активности в БЭ при инкубации образца при комнатной температуре, через 3,5 часа ее значение было близко к пределу чувствительности метода (рисунок 12, кривая 3). Мы предположили, что снижение активности в БЭ может быть обусловлено разрушением нативного белка протеазами, высвобождающимися при разрушении клеток. Действительно, добавление смеси ингибиторов протеаз в БЭ стабилизировало ИЦЛ активность (рисунок 12, кривая 1). Как видно на рисунке 12, при добавлении в бесклеточный экстракт бычьего сывороточного альбумина (БСА), снижение ИЦЛ активности было менее выражено (рисунок 12, кривая 2). Это дополнительно свидетельствует в пользу того, что ИЦЛ активность в БЭ снижается вследствие протеолитической активности, а БСА, являясь дополнительным субстратом для протеаз, маскирует их действие.



**Рисунок 12.** Изменение ИЦЛ активности в БЭ ацетатных культур *Rba. capsulatus* при 20<sup>0</sup>С 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.

Несмотря на то, что присутствие ДТ в БЭ не приводило к стабилизации ИЦЛ активности БЭ (рисунок 12, кривая 3), его добавление в суспензию клеток перед разрушением оказалось важным. В образцах, содержащих только ингибитор протеаз, при разрушении клеток начальная ИЦЛ активность была ниже по сравнению с суспензией, в которую добавлен и ингибитор протеаз и дитиотреитол (Таблица 3). Известно, что ДТ защищает белки, содержащие дисульфидные связи, от их окисления. Возможно, аналогичное сохранение ИЦЛ активности в процессе разрушения можно достичь и при поддержании анаэробных условий, что требует дополнительных исследований.

**Таблица 3.** Действие добавления ДТ на ИЦЛ активность при разрушении клеток *Rba. capsulatus* В10 ультразвуком.

Дитиотреитол (5 мМ)	Ингибитор протеаз	ИЦЛ активность сразу после разрушения (через 15 мин после разрушения), %	ИЦЛ активность через 50 мин. после разрушения, %
+	+	100	106
-	+	59	60
+	-	52	37

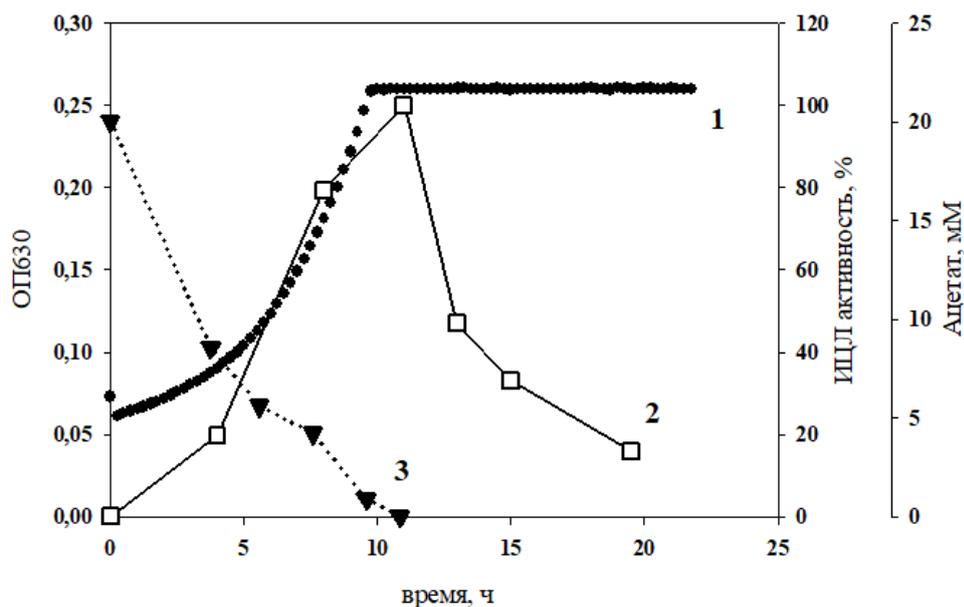
Таким образом, нами обнаружено, что при разрушении клеток в аэробных условиях ИЦЛ теряет активность вследствие окисления и протеолиза. С учетом полученных данных усовершенствован метод определения ИЦЛ активности в БЭ *Rba. capsulatus*. Для сохранения ИЦЛ активности при разрушении клеток и в процессе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

### **3.2. Влияние условий культивирования на ИЦЛ активность фотогетеротрофных культур *Rba. capsulatus*.**

При изучении функционирования глиоксилатного шунта у других штаммов *Rba. capsulatus* (штаммы St. Luis и EF1) авторы проверяли зависимость активности ИЦЛ в периодических ацетатных культурах от активности фотосинтеза (Nielsen et al. 1979; Blasco, 1991). Для этого применяли ингибиторы, подавляющие фотосинтез, или перемещение культур в темноту. Было показано, что при подавлении фотосинтеза рост культур останавливается, и в них не происходит увеличения ИЦЛ активности или происходит ее снижение даже в присутствии ацетата. Однако можно предположить, что наблюдавшееся снижение активности является следствием подавления роста, как при выходе культуры в стационарную фазу роста, причиной которой может быть не только отсутствие света, но и другие факторы, например pH или исчерпание субстрата. В связи с этим представляло интерес изучить влияние различных фаз роста культуры, физиологического состояния инокулята, pH ростовой среды, интенсивности света на ИЦЛ активность культур *Rba. capsulatus* В10 при переходе на среду с ацетатом в качестве единственного источника углерода. Кроме того, важно было изучить влияние смены ростового субстрата с ацетата на лактат на ИЦЛ активность в культурах *Rba. capsulatus* В10.

#### **3.2.1. ИЦЛ активность в разных фазах роста культур *Rba. capsulatus*.**

Изменение ИЦЛ активности изучали в периодической культуре *Rba. capsulatus*, росшей фототрофно с ацетатом в качестве единственного источника углерода. При этом использовали инокулят, выросший на среде с лактатом. Для того, чтобы избежать влияние других факторов, культуру выращивали в фотобиореакторе в контролируемых условиях при поддержании постоянного значения pH (7,0), как описано в разделе «Материалы и методы». Показано, что инокулят, выросший на лактате, не обладал ИЦЛ активностью (рисунок 13). ИЦЛ активность появлялась через 4 часа после начала роста на среде с ацетатом и достигала максимума в начале стационарной фазы и далее снижалась вплоть до величин, которые были ниже уровня чувствительности метода (рисунок 13; Петушкова, Цыганков, 2011). Существенное снижение ИЦЛ активности в стационарной фазе роста (рисунок 13) позволяет предположить, что имеющиеся в клетках протеазы, обуславливающие быструю утрату ИЦЛ активности в БЭ, могут быть задействованы в разложении ряда ферментов в стационарной фазе роста или при переходе на субстрат, не требующий присутствия глиоксилатного шунта.



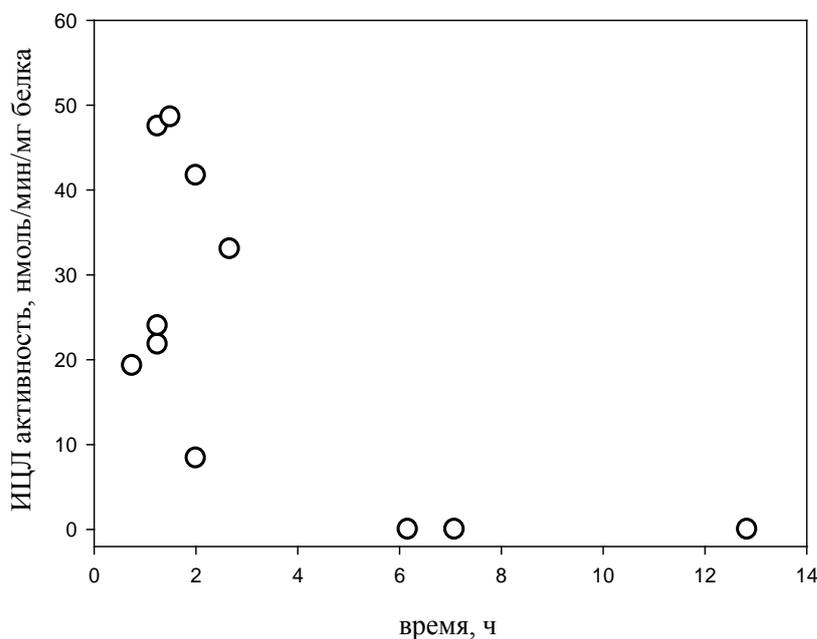
**Рисунок 13.** Зависимость ИЦЛ активности *Rba. capsulatus* от фазы роста культур при пересеве с лактата на ацетат: 1 – оптическая плотность (ОП<sub>630</sub>); 2 – ИЦЛ активность (% от макси-мальной), 3- концентрация ацетата в среде.

Несмотря на то, что закономерность изменения ИЦЛ активности наблюдалась во всех экспериментах, абсолютные величины ИЦЛ активности варьировали. Оказалось, что ИЦЛ активность зависела от возраста инокулята. Максимальная активность фермента выявлялась в культуре, инокулированной клетками, взятыми через 1–2 ч после начала стационарной фазы роста, вызванной истощением лактата (рисунок 14). С увеличением возраста инокулята, максимальное значение ИЦЛ активности (измеренное в начале стационарной фазы роста опытной культуры) снижалось. Если инокулят находился в стационарной фазе роста более 5 часов, то ИЦЛ активность в опытной культуре в начале стационарной фазы роста не обнаруживалась.

Можно полагать, что в стационарной фазе роста в культурах *Rba. capsulatus* снижалось количество ферментов и регуляторных белков в клетках, поэтому при переходе к активному росту на среде с ацетатом для проявления ИЦЛ активности требуется длительное время. Это явление широко распространено в периодических культурах микроорганизмов (Работнова, 1979).

Возможность роста *Rba. capsulatus* В10 без проявления клетками ИЦЛ активности при использовании в качестве инокулята лактатных культур, более 5 часов находившихся в стационарной фазе роста (рисунок 14), можно было бы объяснить использованием

накопленных ранее запасных веществ или наличием альтернативного пути восполнения пула ЩУК.

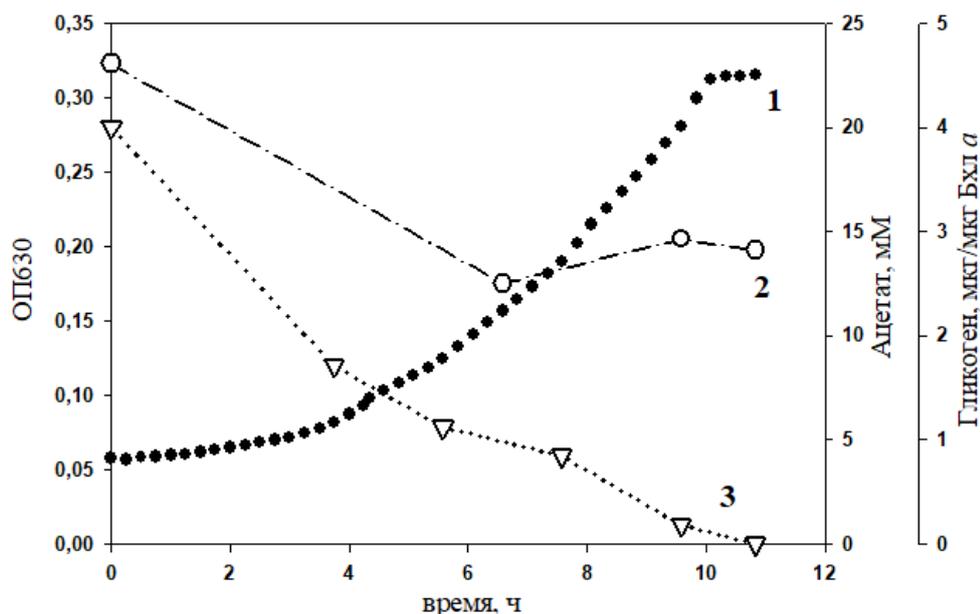


**Рисунок 14.** Зависимость максимальной ИЦЛ активности опытной культуры *Rba. capsulatus*, растущей в присутствии ацетата, от возраста стационарных клеток инокулята, выросшего на среде с лактатом.

При использовании пурпурными бактериями лактата и ряда других органических соединений, легко превращающихся в ФЕП, в клетках накапливается значительное количество гликогена (Willison et al., 1984; Eidels, Preiss, 1970). Образовавшаяся из гликогена глюкоза в *Rba. capsulatus* метаболизируется в пути Энтнера-Дудорова (Eidels, Preiss, 1970). Из глюкозы может образоваться ПВК, которая под действием пируваткарбоксилазы может приводить к образованию ЩУК, необходимой для функционирования ЦТК. На 1 моль глюкозы, полученной при разложении гликогена, для функционирования цикла Кребса возможно потребление 2 молей ацетата.

Для изучения вклада запасенного гликогена в восполнение пула ЩУК у *Rba. capsulatus* использовали культуру, выращенную в присутствии ацетата (инокулят рос на среде с лактатом). В опыте измеряли содержание гликогена в клетках и ацетата в среде (рисунок 15). Приведенные на рисунке 15 данные иллюстрируют типичный из проведенных экспериментов. Начальная концентрация гликогена в клетках в разных экспериментах (5 повторностей) колебалась от 2.4 до 4.8 при среднем значении 3.8 мкг/мкг Бхл *a*. В конце экспоненциальной фазы роста концентрация гликогена в клетках варьировала от 1.2 до 2.5 при среднем значении 1.9 мкг/мкг Бхл *a*. Во всех экспериментах при переходе культур от фазы экспоненциального роста к замедленному росту наблюдали некоторое (около 10%) увеличение содержания гликогена в клетках с последующим резким снижением при

переходе в стационарную фазу (рисунок 15). Среднее падение содержания гликогена в клетках от начала роста культур к концу роста (10 ч) составляло  $1.82 \pm 0.534$  мкг/мкг Бхл *a*. Эта разница в пересчете на количество клеток в единице объема составила, примерно, 2.8 мкг гликогена в 1 мл среды, а при пересчете на количество глюкозы (мономер гликогена) уменьшение в культуре составило 15 мкмоль/л.



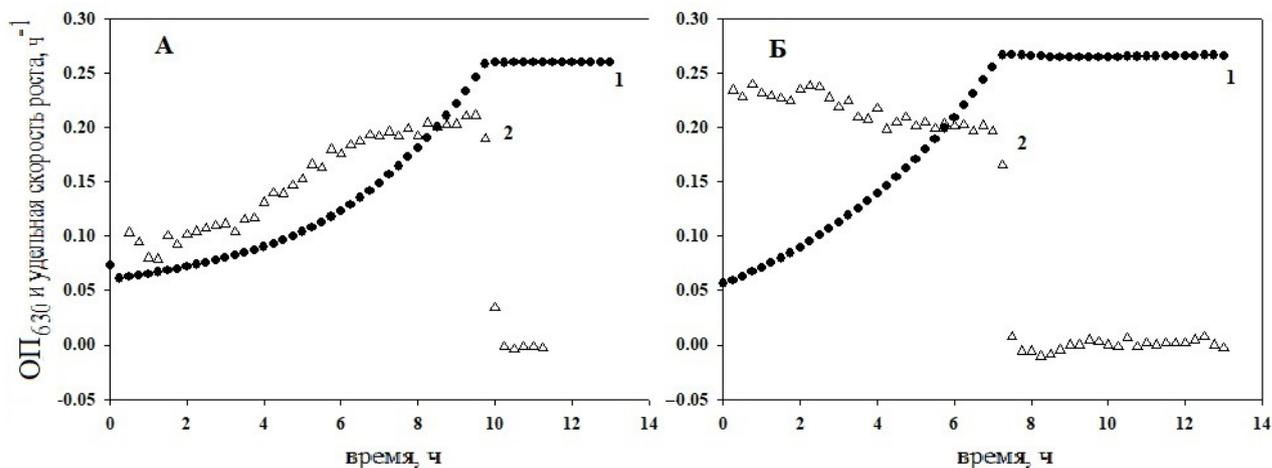
**Рисунок 15.** Содержание гликогена в клетках и ацетата в среде при пересеве культур *Rba. capsulatus* с лактата на ацетат: 1 – оптическая плотность (ОП<sub>630</sub>); 2 – содержание гликогена в клетках (мкг/мкг Бхл *a*); 3 – концентрация ацетата в среде (мМ).

За это же время в среде концентрация ацетата снижалась с 20 до 1.2 мМ (рисунок 15). Из этих результатов следует, что потребление запасного клеточного вещества (гликогена), имеющее место при переходе от использования клетками лактата на ацетат не может объяснить рост культур в присутствии ацетата без ИЦЛ активности на протяжении 8-12 часов. Таким образом, в клетках *Rba. capsulatus* имеются иные анаэробные пути, что подтверждается данными других авторов (Meister et al., 2005).

Несмотря на то, что культура *Rba. capsulatus* способна использовать ацетат в качестве единственного источника углерода в отсутствие гликоксилатного шунта, этот путь восполнения пула ЦУК играет важную роль в росте бактерии на среде с ацетатом. Это утверждение следует из того факта, что при пересеве культуры с «лактата на ацетат» скорость ее роста возрастала по мере увеличения ИЦЛ активности (рисунок 16А). Начальная скорость роста культур (в первый час роста после лаг-фазы) в 9 независимых экспериментах составляла  $0.084 \pm 0.053$  ч<sup>-1</sup>. Время нарастания скорости роста в разных экспериментах

варьировало от 3 до 5 часов (на рисунке 16А – 3,5 часа). Максимальная скорость роста культур составляла  $0.179 \pm 0.0145 \text{ ч}^{-1}$ .

Вместе с тем, при пересеве клеток «с ацетата на ацетат» скорость роста была максимальной сразу (рисунок 16Б).



**Рисунок 16.** Кривые роста культур *Rba. capsulatus* при пересеве с лактата на ацетат (А) и с ацетата на ацетат (Б) (типичные эксперименты): 1 – оптическая плотность (ОП<sub>630</sub>); 2 – удельная скорость роста (ч<sup>-1</sup>).

Учитывая, значимость различий в скоростях роста микроорганизмов в конкуренции бактерий в естественных консорциумах, существенное увеличение скорости роста при адаптации культуры *Rba. capsulatus* В10 к росту только на ацетате за счет «активации» глиоксилатного шунта, свидетельствует о его существенной роли для данной бактерии.

### 3.2.2. Влияние pH ростовой среды на ИЦЛ активность в культурах *Rba. capsulatus*.

Влияние pH культивирования на ИЦЛ активность культур можно проводить в контролируемых условиях, поддерживая заданное значение pH. Однако, это очень трудоемкий и длительный процесс. Это влияние можно изучать и в периодических неконтролируемых культурах. При увеличении времени роста культуры на среде с ацетатом за счет десятикратного уменьшения количества вносимого в среду инокулята (1%) мы наблюдали увеличение ИЦЛ активности в процессе роста культуры. Оно происходило до определенного момента, затем ИЦЛ активность оставалась на постоянном уровне вплоть до наступления фазы замедления роста и стационарной фазы, после чего снижалась (данные не приведены). Если учесть, что при постоянной ИЦЛ активности pH среды в неконтролируемых культурах *Rba. capsulatus* В10 постоянно изменяется за счет потребления ацетата, то, отбирая культуры в разных точках экспоненциальной фазы, достаточно измерить

pH и ИЦЛ активность культур и сопоставить эти значения. Проведенные таким образом эксперименты (Таблица 4) показали, что при изменении pH от 6,9 до 8,6 ИЦЛ активность изменялась примерно от 150 до 225, причем без видимой связи с изменением pH.

**Таблица 4.** Влияние pH среды на ИЦЛ-активность в процессе фототрофного роста культуры *Rba. capsulatus* В10 на среде с ацетатом\*.

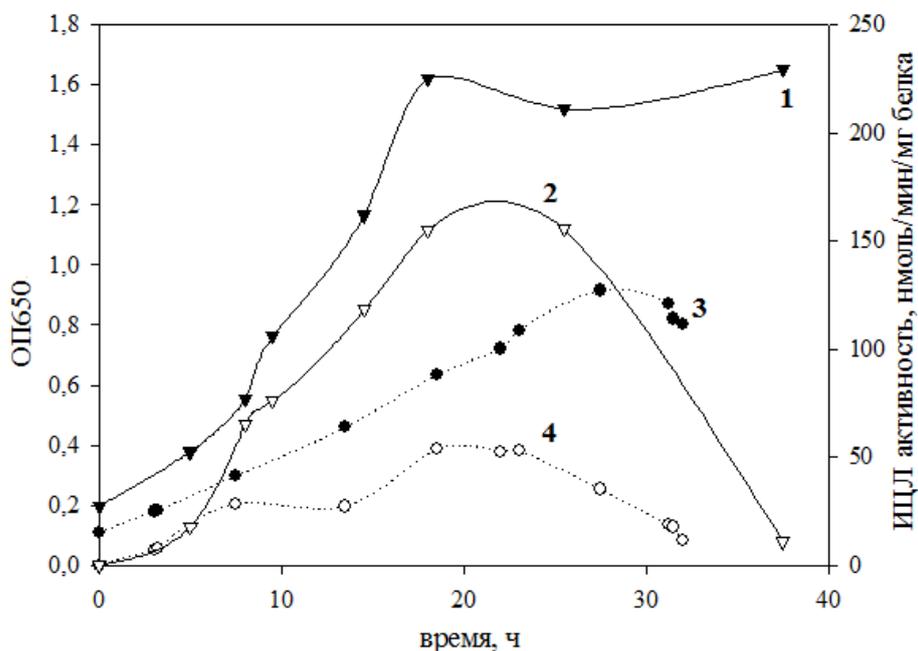
pH, ед	ИЦЛ, нмоль/мин/мг белка
6,9	173,2±68,6
7,0	128,5±26,5
7,2	224,1±25,7
7,4	149,2±3,8
7,6	195,0±26,0
7,8	145,3±14,5
8,6	174,5±17,1

Примечание. \* – культивирование проводилось в пробирках с толщиной слоя культуры 1 см при интенсивности падающего света 40 Вт/м<sup>2</sup> на минеральной среде с 20 мМ ацетата и тиамингидрохлоридом в качестве источника витаминов.

Несмотря на то, что эти изменения превышают измеренный доверительный интервал, они не связаны с изменением pH, а, по-видимому, обусловлены изменением какого-то другого фактора, который мы не могли контролировать в этих условиях. Таким образом, синтез ИЦЛ клетками не зависит от pH среды.

### 3.2.3. Влияние интенсивности света на ИЦЛ активность в культурах *Rba. capsulatus*.

Изучение влияния интенсивности освещения клеток на ИЦЛ активность в «ацетатных» культурах *Rba. capsulatus* В10 проводили, сравнивая ИЦЛ активность культур, выращенных при разной освещенности (объем инокулята составлял 10% для обеих культур). Одну культуру выращивали в 16 мл пробирках с толщиной слоя культуры 1 см и интенсивностью освещения 40 Вт/м<sup>2</sup> на среде Ормеруда с 20 мМ ацетата. В ней максимальная активность ИЦЛ составила 155,2±20,3 нмоль/мин/мг белка (рисунок 17). Другую выращивали в условиях сниженной освещенности клеток (толщина слоя культуры 2,5 см и интенсивность падающего света 20 Вт/м<sup>2</sup>) на той же среде. В данной культуре наблюдалось снижение скорости роста и максимального значения ИЦЛ активности, которое составило 53±10,7 нмоль/мин/мг общего белка (рисунок 17).



**Рисунок 17:** ИЦЛ активность в периодических культурах *Rba. capsulatus* B10 при разной освещенности клеток. 1 – оптическая плотность и 2 – ИЦЛ активность культуры при интенсивности освещения 40 Вт/м<sup>2</sup>; 3 – оптическая плотность и 4 – ИЦЛ активность культуры при пониженной интенсивности освещения.

Уменьшение ИЦЛ активности клеток при снижении их освещенности может быть связано как с пониженной скоростью роста культуры, так и с пониженной интенсивностью света. Поэтому требуются дополнительные исследования для разделения этих факторов. Например, можно было бы провести измерение активности ИЦЛ в культурах со сниженной скоростью роста за счет уменьшения температуры при культивировании.

### 3.2.4. ИЦЛ активность в культурах *Rba. capsulatus* при смене ростового субстрата с ацетата на лактат.

Полезными, с точки зрения лучшего понимания факторов, влияющих на ферменты глиоксилатного цикла, а также его роли в метаболизме *Rba. capsulatus*, являются данные о действии на ИЦЛ активность субстратов, метаболизируемых в различных участках метаболизма бактерии. Известно, что активность этого фермента в культурах пурпурных несерных бактерий отсутствует при росте на сукцинате и малате – непосредственных предшественниках ЩУК в ЦТК (Nielsen et al. 1979; Kornberg, Lascelles, 1960). Более того, показано, что при добавлении в «ацетатные» фототрофные культуры пурпурных несерных бактерий одного из этих субстратов (в случае *Rps. palustris* – сукцината, а *Rba. capsulatus* – D,L-малата) ИЦЛ-активность клеток резко снижается (Kornberg, Lascelles, 1960; Blasco, 1991, соответственно). Эти данные подтверждают, что основной ролью глиоксилатного шунта у этих бактерий в данных условиях роста является восполнение пула ЩУК. Однако на момент наших исследований в доступных литературных источниках не было информации о

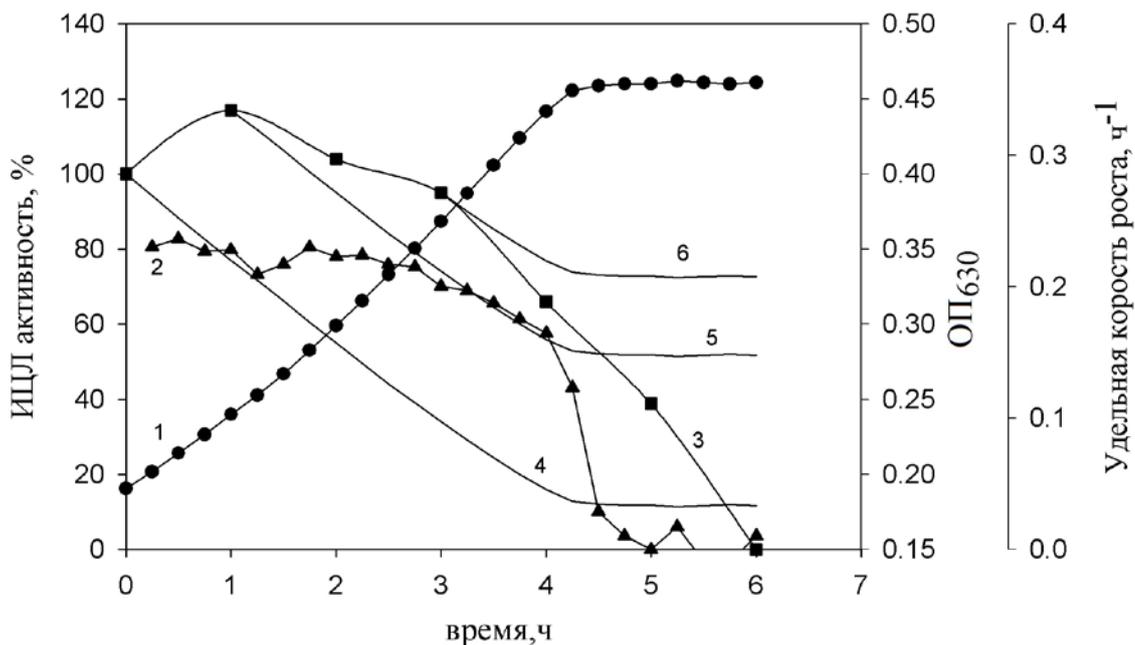
влиянии на активность глиоксилатного пути субстратов, метаболизируемых через ПВК (D,L-лактат, D-малат, углеводы), которые могут дать косвенную информацию о взаимодействии ЦТК, глиоксилатного шунта и путей синтеза/распада углеводов.

У *Rba. capsulatus* в метаболизм ПВК вовлечены следующие ферменты: пируватдегидрогеназа, пируваткарбоксилаза, пируваткиназа и ФЕП-карбоксикиназа (Willison, 1988). Интересно, что авторы наблюдали активность этих ферментов в экстрактах клеток *Rba. capsulatus* В10 и на среде с ацетатом. Но уровень пируваткарбоксилазы был меньший, а пируваткиназы – более высокий, чем в клетках, выращенных на лактате. Активность пируватдегидрогеназы не обнаруживалась в клетках, выращенных на среде с ацетатом. Кроме того, мутантный по пируваткарбоксилазе (основной фермент необходимый для образования из ПВК С4-субстратов для ЦТК) штамм *Rba. capsulatus* В10 сохранял жизнеспособность только на среде с ацетатом и рос только после длительного лаг-периода (Willison, 1988).

Как отмечалось выше, у данной бактерии ИЦЛ активность не обнаружена ни в одной из фаз роста после многократных пассажей на среду с лактатом.

Для того чтобы исследовать, как влияет добавленный в среду лактат на ИЦЛ активность клеток, к ацетатной культуре *Rba. capsulatus* В10 сразу после ее перехода в стационарную фазу роста, когда ИЦЛ активность максимальна и исчерпан ацетат, добавляли среду с 30 мМ лактата (1/3 от объема) (рисунок 18). В первый час после добавления лактата ИЦЛ активность клеток не только не уменьшилась, но и несколько возросла (рисунок 18, кривая 3). Кривые 4, 5 и 6 на рисунке 18 показывают расчетное изменение ИЦЛ активности клеток, если предположить, что в момент, с которого начинается кривая, синтез ИЦЛ прекратился, активной деградации фермента не было, и имело место разбавление имеющегося фермента в ходе прироста новых клеток, не синтезирующих ИЦЛ. Поскольку даже через 3 ч культивирования ИЦЛ активность клеток оставалась на начальном уровне вместо прогнозируемого снижения примерно до 40% от исходного уровня, можно утверждать, что в данных условиях имеет место дополнительный синтез ИЦЛ.

Снижение ИЦЛ активности в клетках ниже уровня, предсказанного кривой 4, происходило лишь после 3 часа культивирования, когда культура переходила в фазу замедления роста, что демонстрирует кривая скорости роста (рисунок 18, кривая 2). При достижении культурой стационарной фазы, вызванной исчерпанием лактата, ИЦЛ активность быстро снижалась и к 6 часу эксперимента полностью исчезала (рисунок 18, кривая 3).



**Рисунок 18.** ИЦЛ активность *Rba. capsulatus* при добавлении к культурам, выросшим в присутствии ацетата, 10 мМ лактата: 1 – оптическая плотность ( $ОП_{630}$ ); 2 – удельная скорость роста ( $ч^{-1}$ ); 3 – ИЦЛ активность (% от максимальной); 4, 5 и 6 – расчетное изменение ИЦЛ активности, исходя из предположения, что в момент, когда начинается кривая (100%), синтез ИЦЛ прекратился.

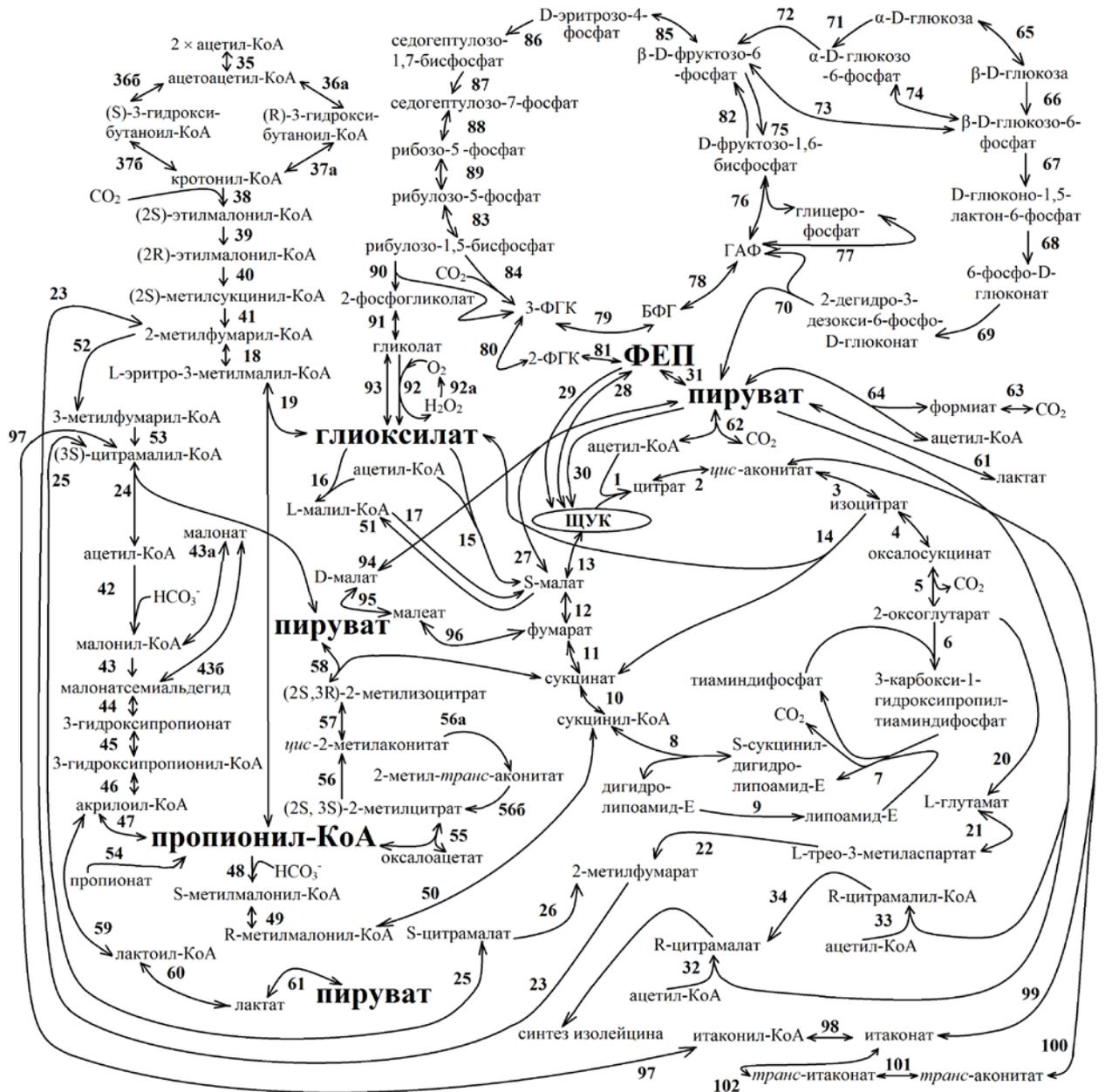
Таким образом, активный синтез ИЦЛ как ключевого фермента глиоксилатного шунта в присутствии лактата может указывать на возможность совместного функционирования при росте на ацетате пути синтеза ПВК (их несколько, и они будут рассмотрены в разделе 3.5.). Он также может объясняться образованием ацетил-КоА в этих культурах из ПВК (за счет пируватдегидрогеназы или пируват:оксидоредуктазы), который далее вступает в реакции глиоксилатного цикла. В последнем случае глиоксилатный цикл служил бы способом пластической перестройки углеродных соединений в С4-кислоты, необходимые для процессов биосинтеза. Данные предположения нуждаются в экспериментальной проверке.

### 3.3. Выяснение альтернативных глиоксилатному шунту путей восполнения пула ЩУК в *Rba. capsulatus*.

Нами был осуществлен поиск информации об альтернативных последовательностях реакций восполнения пула интермедиатов ЦТК (см. раздел 2.5.2.), которые могли бы функционировать у *Rba. capsulatus* В10 при росте на среде с ацетатом в отсутствии ИЦЛ активности. Анализ и систематизация отобранных реакций позволили создать единую метаболическую схему (рисунок 19), включающую известные и ранее неизвестные пути восполнения пула ЩУК. К последним относятся путь с участием Рубиско в качестве оксигеназы, путь образования ПВК из ацетил-КоА и формиата (образуется из  $\text{CO}_2$ ), путь образования *цис*-аконитата из ПВК и ацетил-КоА, альтернативный путь образования фумарата с участием специфичного к (R)-изоформе субстрата малик-фермента. При составлении метаболической схемы (рисунок 19) было отмечено, что некоторые из рассматриваемых путей имеют общие реакции и переменные участки. Кроме того, в случае некоторых путей автотрофной фиксации  $\text{CO}_2$  для анаплеротической функции в условиях гетеротрофного роста на ацетате достаточно лишь части их реакций для синтеза С4-звеньев ЦТК (рисунок 19).

При рассмотрении полученной метаболической схемы выявлены ключевые метаболиты путей восполнения пула ЩУК (глиоксилат, пропионил-КоА, ПВК/ФЕП), превращение которых в звенья ЦТК может происходить не только в реакциях, которые принято считать частью конкретного анаплеротического 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 (Петушкова, Цыганков, 2017).

В соответствии с предлагаемой нами классификацией эти пути можно подразделить на четыре основных группы по образуемому в них метаболиту, через который происходит образование ЩУК или звеньев ЦТК. 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  $\text{CO}_2$  с участием пируват:оксидо-редуктазы; из экзогенного ацетата и  $\text{CO}_2$  с



**Рисунок 19.** Известные метаболические пути, способные к восполнению пула ЦУК 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); метиласпартатный 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 ЦУК – 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). Анаплеротические 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.

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 анаплеротических 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 19 (см. раздел 2.5.2.). Затем на основе существующей аннотации генома *Rba. capsulatus* SB1003 (рифампицин-резистентный штамм *Rba. capsulatus* B10 (Yen, Marrs, 1976)) и последующего уточнения наличия интересующих генов из отобранного списка с помощью алгоритмов BLASTn и tBLASTn (см. 2.5.2.) 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. главу 2.8.3.). 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* (таблица 5, рисунок 19 реакции 1-13), наличие этого анаплеротического пути определяется функционированием двух дополнительных ферментов (рисунок 19 реакции 14 и 15) – изоцитратлиазы (EC: 4.1.3.1) и малатсинтазы (EC: 2.3.3.9). *Rba. capsulatus* обладает геном изоцитратлиазы (*aceA*, RCAP\_rcc03338) и двумя генами малатсинтазы (*aceB*, RCAP\_rcc03337; *glcB*, RCAP\_rcc00839). 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. Напротив, в культурах, выросших на среде с добавлением глутамата вместо  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , транскрипты изоцитратлиазы присутствовали не во всех пробах (таблица 5). Это может быть связано с тем, что глутамат служит дополнительным источником углерода, и, как следствие, потребность в функционировании анаплеротических путей снижается. Транскрипты малатсинтазы *glcB* присутствовали во всех образцах ацетатных культур, малатсинтазы *aceB* – во всех образцах культур, кроме одного из культуры, выросшей на среде с добавлением глутамата. Обсуждение возможной роли каждой из этих малатсинтаз, а также рассмотрение еще одного непрямого пути преобразования глиоксилата в малат, приведено в отдельном разделе, посвященном путям превращения глиоксилата в малат.

Таким образом, в исследуемых ацетатных культурах глиоксилатный цикл более востребован при росте только на среде с ацетатом в качестве единственного источника углерода.

**Таблица 5.** Наличие генов, кодирующих ферменты цикла Кребса (реакции 1–13) и глиоксилатного цикла (реакции 14, 15), а также их транскрипция у *Rba. capsulatus* при росте с использованием ацетата и разных источников азота.

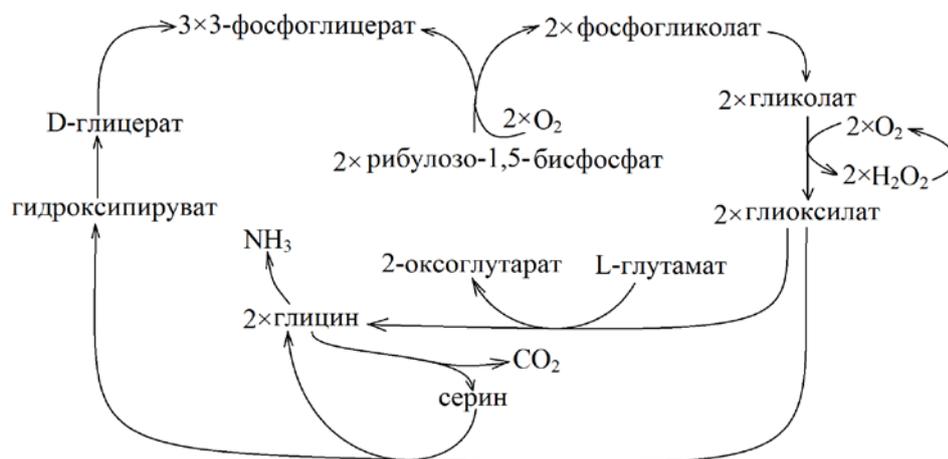
Номер реакции по рисунку	Обозн. Гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
1	<i>gltA</i>	K01647; цитрат- (Si)-синтаза (EC: 2.3.3.1)	RCAP_rcc02364	P*	P	P	P	P	P
2, 3	<i>acnA</i>	K01681; аконитатгидратаза (EC: 4.2.1.3)	RCAP_rcc02150	P	P	P	P	P	P
4, 5	<i>Icd</i>	K00031; изоцитратдегидрогеназа (NADP(+)) (EC: 1.1.1.42)	RCAP_rcc01887	P	P	P	P	P	P
6, 7	<i>sucA</i>	K00164; оксоглутаратдегидрогеназа E1-субъединица (EC: 1.2.4.2)	RCAP_rcc00724	P	P	P	P	P	P
8	<i>sucB</i>	K00658; дигидролипоилизин-сукцинилтрансфераза, переносящая сукцинил, E2-субъединица (EC: 2.3.1.61)	RCAP_rcc00725	P	P	P	P	P	P
9	<i>lpdA1</i>	K00382; дигидролипоилдегидрогеназа-1 (EC: 1.8.1.4)	RCAP_rcc00726	P	P	P	P	P	P
9	<i>lpdA2</i>	K00382; дигидролипоилдегидрогеназа-2 (EC: 1.8.1.4)	RCAP_rcc01556	P	P	P	P	P	P
10	<i>sucD</i>	K01902; сукцинил-КоА-синтетаза (АДФ-образующая), α-субъединица (EC: 6.2.1.5)	RCAP_rcc00721	P	P	P	P	P	P
	<i>sucC</i>	K01903; сукцинил-КоА-синтетаза (АДФ-образующая), β-субъединица (EC: 6.2.1.5)	RCAP_rcc00720	P	P	P	P	P	P
11	<i>sdhA</i>	K00239; сукцинатдегидрогеназа, флавиновая субъединица (EC: 1.3.99.1)	RCAP_rcc00733	P	P	P	P	P	P
	<i>sdhB</i>	K00240; сукцинатдегидрогеназа, железосерная субъединица (EC: 1.3.99.1)	RCAP_rcc00736	P	P	P	P	P	P
12	<i>fumC</i>	K01679; фумаратгидратаза (EC: 4.2.1.2)	RCAP_rcc02826	P	P	P	P	P	P
13	<i>Mdh</i>	K00024; малатдегидрогеназа (EC: 1.1.1.37)	RCAP_rcc00718	P	P	P	P	P	P

Номер реакции по рисунку	Обозн. Гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
14	<i>aceA</i>	K01637; изоцитратлиаза, (EC: 4.1.3.1)	RCAP_rcc03338	М	Р	Р	А	Р	Р
15	<i>glcB</i>	K01638; малатсинтаза, (EC: 2.3.3.9)	RCAP_rcc00839	Р	Р	Р	Р	Р	Р
15	<i>aceB</i>	K01638; малатсинтаза, (EC: 2.3.3.9)	RCAP_rcc03337	Р	Р	Р	А	Р	Р

\* Примечание. Обозначения здесь и далее: транскрипт присутствует в образце – Р, отсутствует – А, присутствие транскрипта считается неоднозначным – М

**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 19, реакции 90-92/92-92a/93). Как упоминалось в разделе 1.3.2., 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 20), в котором из двух молекул гликолата происходит образование одной молекулы ФГК и выделение одной молекулы  $\text{CO}_2$ . Процесс светозависимого поглощения  $\text{O}_2$  и выделения  $\text{CO}_2$  (фотодыхание) у высших растений протекает в клетке одновременно с функционированием цикла Кальвина-Бенсона (Эдвардс, Уокер, 1986). Фотодыхание обнаружено и у фототрофных бактерий (McFadden, Shively, 1991). Долгое время этот процесс считался бесполезным эволюционным пережитком (Чиков, 1996), более того, до сих пор ведутся работы, направленные на создание синтетических путей фотодыхания, которые бы шли в обход реакции классического гликолатного пути и позволили бы повысить, по мнению авторов, эффективность преобразования энергии и  $\text{CO}_2$  в биомассу (Shih et al., 2014).



**Рисунок 20.** Схема фотодыхания (составлена на основе информации из базы данных KEGG Pathway).

Глиоксилат, образовавшийся из гликолата в реакциях гликолатного пути, с дополнительным этапом преобразования в малат, может быть задействован для пополнения пула ЩУК. Более того, образование глиоксилата возможно и в отсутствие активного цикла

Кальвина-Бенсона. В этом случае источником рибулозобисфосфата для образования гликолата могли бы быть запасные углеводы.

Реакцию 91 (рисунок 19) превращения фосфогликолата в гликолат осуществляет фермент фосфогликолатфосфатаза (фосфогликолатгидролаза, ЕС: 3.1.3.18). В геноме *Rba. capsulatus* присутствуют три гена, которые в соответствии с GenBank аннотированы как фосфогликолатфосфатаза-1 (*gph1*, RCAP\_rcc00333), фосфогликолатфосфатаза-2 (*gph2*, RCAP\_rcc01502) и фосфогликолатфосфатаза-3 (*gph3*, RCAP\_rcc01826) с номером ЕС: 3.1.3.18. Также есть ген без названия (RCAP\_rcc02632), продукт которого аннотирован как вариант 1 субсемейства IA НАД-суперсемейства гидролаз, который в соответствии с функциональной аннотацией KEGG Orthology отнесен к фосфогликолатфосфатазам.

Образование глиоксилата из гликолата (реакции 92/92-92а или 93 рисунок 19, таблица б) могут катализировать несколько различных ферментов: необратимая гликолатдегидрогеназа (реакция 92, гликолатоксидоредуктаза, ЕС: 1.1.99.14); необратимая (S)-2-гидроксикислота-оксидаза (ЕС: 1.1.3.15, реакция 92) в сочетании с каталазой (ЕС: 1.11.1.6, реакция 92а) или каталазой-пероксидазой (ЕС: 1.11.1.21, реакция 92а). Или с помощью ферментов, осуществляющих обратимые реакции (реакция 93): НАД-зависимой глиоксилатредуктазы (ЕС: 1.1.1.26/ЕС: 1.1.1.29, так как может также катализировать превращение D-глицерата в гидроксипируват); НАДФ-зависимой глиоксилатредуктазы (ЕС:1.1.1.79).

В настоящее время сведений о характеристиках и активности необратимых ферментов с ЕС: 1.1.99.14 и ЕС: 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 (таблица б): железосерной 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 ЕС: 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 (ЕС: 1.11.1.6) в геноме исследуемой бактерии отсутствует, но есть ген каталазы-пероксидазы (ЕС: 1.11.1.21, *katG*, RCAP\_rcc01738).

В геноме бактерии присутствует ген НАД-зависимой глиоксилатредуктазы (ЕС: 1.1.1.26, *gyaR1*, RCAP\_rcc00524, таблица б). Также имеется ген, без названия (RCAP\_rcc00798), продуктом которого в соответствии с GenBank является белок семейства D-изомер-спицифичных 2-гидроксикислот-дегидрогеназ, а в соответствии с функциональной

классификацией KEGG отнесенный к глиоксилат/гидроксипируватредуктазам А (ЕС: 1.1.1.79; 1.1.1.81).

Присутствие транскриптов Рубиско, фосфогликолатфосфатазы-2, глиоксилатредуктазы-1 и белка семейства D-изомер-специфичных 2-гидроксикислот-дегидрогеназ, в соответствии с функциональной классификацией KEGG отнесенного к глиоксилат/гидроксипируватредуктазам А в исследуемых фототрофных ацетатных культурах *Rba. capsulatus* (таблица 6) свидетельствует в пользу того, что рассматриваемый путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигназы активен на транскрипционном уровне. Транскрипты перечисленных генов присутствуют в образцах вне зависимости от вида источника азота в среде.

В пользу предположения, что рассмотренные реакции могли бы выступать как альтернативный путь образования малата, можно отнести известные из литературы данные, что у некоторых организмов присутствуют две малатсинтазы (осуществляют конденсацию глиоксилата и ацетил-КоА до малата), одна из которых 1000-кратно активизируется в присутствии гликолата (Molina et al., 1994). Подробнее существующие пути преобразования глиоксилата в малат и присутствие транскриптов их генов у *Rba. capsulatus* будут рассмотрены в соответствующем разделе. Однако, константа насыщения для реакции Рубиско с кислородом высока, например, у пурпурной несерной бактерии *Rsp. rubrum* она составляет  $170 \pm 20$  мкМ (Witzel et al., 2010), у высших растений – 300-700 мкМ (Andrews, Whitney, 2005). При этом концентрация  $O_2$  в жидкости при  $30^\circ C$  при насыщении ее воздухом составляет 236 мкМ, поэтому в микроаэробных условиях (примерно 5-10 мкМ  $O_2$ ) скорость поглощения  $O_2$  Рубиско будет меньше 1% от максимальной скорости. Тем не менее, данный процесс может быть актуален в кратковременный период адаптации бактерий в природе к росту на ацетате, когда в ростовой среде неожиданно появляется кислород. А у цианобактерий, осуществляющих кислородный фотосинтез, этот путь мог бы использоваться как основной для пополнения пула ЦУК в ЦТК.

Физиологический смысл наличия транскриптов рассматриваемого пути в фототрофных условиях у *Rba. capsulatus* может быть связан с тем, что пурпурные бактерии в природе могут внезапно попадать из анаэробных в аэробные условия. В этом случае они за счет оксигеназной активности Рубиско могут значительно увеличить скорость дыхания, кратковременно снижая внутриклеточное содержание кислорода и предохраняя фотосинтетический аппарат от разрушения на свету в присутствии кислорода. Кроме того, такой путь, действительно, способствует быстрому поглощению ацетата, благодаря чему бактерии могут расти с его использованием в качестве единственного источника углерода.

**Таблица 6.** Наличие генов, кодирующих ферменты пути образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы (реакции 90-92/92-92а/93), а также их транскрипция у *Rba. capsulatus* при фототрофном росте с использованием ацетата и разных источников азота.

Номер реакции по рисунку	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
84, 90	<i>cbbL</i>	K01601; рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа большая субъединица (ЕС: 4.1.1.39)	RCAP_rcc00579	P	P	P	P	P	P
	<i>cbbS</i>	K01602; рибулезобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа малая субъединица (ЕС: 4.1.1.39)	RCAP_rcc00578	P	P	P	P	P	P
84, 90	<i>cbbM</i>	K01601; рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа большая субъединица (ЕС: 4.1.1.39)	RCAP_rcc01829	P	P	P	P	P	P
91	<i>gph1</i>	K01091; фосфогликолатфосфатаза-1 (-)	RCAP_rcc00333	A	P	M	A	M	P
91	<i>gph2</i>	K01091; фосфогликолатфосфатаза-2 (-)	RCAP_rcc01502	P	P	P	P	P	P
91	<i>gph3</i>	K01091; фосфогликолатфосфатаза-3 (-)	RCAP_rcc01826	A	A	A	A	P	A
91	-	K01091; вариант 1 субсемейства IA НАД-суперсемейства гидролаз (-)	RCAP_rcc02632	P	P	P	P	M	P
92	<i>glcF</i>	K11473; железо-серной субъединицы гликолатдегидрогеназы	RCAP_rcc02869	M	A	P	A	P	P
	<i>glcE</i>	K11472; субъединица GlcE гликолатдегидрогеназы	RCAP_rcc02870	P	A	M	P	A	P
	<i>glcD</i>	K00104; субъединица GlcD гликолатдегидрогеназы	RCAP_rcc02871	A	A	M	A	A	A
92a	<i>katG</i>	K03782; каталаза/пероксидаза	RCAP_rcc01738	P	P	P	P	P	P
93	<i>gyaR1</i>	K00015; глиоксилатредуктаза-1	RCAP_rcc00524	P	P	P	P	P	P
93	-	K12972; D-изомер-специфичных 2-гидроксикислот-дегидрогеназ	RCAP_rcc00798	P	P	P	P	P	P

Примечание. Обозначения – см. примечание к табл. 1.

**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 19, 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 (ЕС: 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\_rcc00730 (ЕС: 4.2.1.148)), так же как и ген цитратлиазы (ген *citE2*, RCAP\_rcc03164,  $\beta$ -субъединица-2 (ЕС: 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* (таблица 7).

Преобразование пропионил-КоА в сукцинил-КоА или ПВК возможно тремя известными путями, описанными в отдельном разделе. Также в отдельно рассмотрены пути преобразования глиоксилата в малат.

**Метиласпартатный цикл.** Последовательность реакций данного метаболического пути приведена на рисунке 19 (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. В результате анализа генома было установлено, что у *Rba. capsulatus* отсутствуют гены глутаматмутазы (ЕС: 5.4.99.1; рисунок, реакция 21) и метиласпартат-аммоний-лиазы (ЕС: 4.3.1.2; рисунок, реакция 22). Кроме того, реакция переноса коэнзима-А с сукцинил-КоА на 2-метилфумарат (мезаконат) с образованием 2-метилфумарил-КоА (рисунок 19, реакция 23), осуществляемая сукцинил-КоА:мезаконат КоА-трансферазой (ЕС: 2.8.3.-) (Khomyakova 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*.

Известно, что перенос КоА осуществляет группа ферментов под названием КоА-трансферазы, которая объединяет ферменты с ЕС: 2.8.3.1–2.8.3.23 и подразделяется на три семейства. В состав семейства I входят КоА-трансферазы, субстратами которых являются 3-оксокислоты (ЕС: 2.8.3.5, ЕС: 2.8.3.6), короткоцепочечные жирные кислоты (ЕС: 2.8.3.8, ЕС: 2.8.3.9) и глутаконат (ЕС: 2.8.3.12) (Heider, 2001). Немногочисленное семейство II КоА-трансфераз состоит из гомодимерных  $\alpha$ -субъединиц цитратлиазы и цитрамалатлиазы (ЕС: 2.8.3.10, ЕС: 2.8.3.11). На самом деле эти ферменты катализируют перенос ацил-переносающего белка, который содержит ковалентно связанный КоА, но также *in vitro* принимает свободные КоА-тиоэфир. Большинство известных КоА-трансфераз семейства III

обладают узкой специфичностью к субстрату и его стереоизомеру (ЕС: 2.8.3.16, ЕС 2.8.3.15, ЕС: 2.8.3.17) (Heider, 2001). Поскольку среди известных ферментов семейства II и III нет тех, которые могли бы использовать в качестве субстрата 2-метилфумарат, то мы их далее не рассматриваем. Учитывая, что большинство ферментов семейства I имеют широкую субстратную специфичность и могут использовать в качестве субстрата органические кислоты с различной длиной углеродной цепи, а также поскольку среди ферментов именно этого семейства есть белки, использующие в качестве донора КоА-группы сукцинил-КоА, то они могут рассматриваться в качестве потенциального источника сукцинил-КоА:мезаконат КоА-трансферазы.

В геноме *Rba. capsulatus* SB1003 присутствуют гены двух КоА-трансфераз с предсказанными в соответствии с данными GenBank функциями: ЕС: 2.8.3.16 и 2.8.3.5. Первая относится к семейству III и далее не рассматривается. Вторая относится к семейству I: сукцинил-КоА:3-кетокислота КоА-трансфераза (ЕС: 2.8.3.5, ген *scoA* субъединицы А, RCAP\_gcc03101; ген *scoB* субъединицы В, RCAP\_gcc03102). Этот фермент осуществляет перенос КоА с сукцинил-КоА на 3-кетокислоту, поэтому теоретически она может рассматриваться как кандидат на выполнение переноса КоА с сукцинил КоА на 2-метилфумарат. Однако для уточнения этого предположения требуются дальнейшие исследования. Следует отметить, что не все последовательности функционально описанных ферментов КоА-трансфераз известны. Поэтому в ходе дальнейших исследований возможны уточнения списка имеющихся КоА-трансфераз у *Rba. capsulatus*.

Тем не менее, поскольку в геноме не обнаружены гены глутаматмутазы и метиласпартат-аммоний-лиазы, данный путь не имеет потенциала для функционирования у *Rba. capsulatus*.

**Таблица 7.** Наличие генов ферментов этилмалонилового пути (реакции 35, (36а, 37а)/(36б, 37б), 38–41, 18, 19), ферментов превращения глиоксилата в малат не по гликсилатному шунту (16–17) и их транскриптов у *Rba. capsulatus* при росте с использованием ацетата и разных источников азота.

Номер реакции по рисунку	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
35	<i>fadA</i>	K00626; β-субъединица комплекса окисления жирных кислот (EC: 2.3.1.16)	RCAP_rcc00518	P	P	P	M	P	P
35	<i>atoB1</i>	K00626; ацетил-КоА ацетилтрансфераза-1 (EC: 2.3.1.9)	RCAP_rcc02992	P	P	P	P	P	P
35	<i>atoB2</i>	K00626; ацетил-КоА ацетилтрансфераза-2 (EC: 2.3.1.9)	RCAP_rcc03178	P	P	P	P	P	P
35	<i>atoB3</i>	K00626; ацетил-КоА ацетилтрансфераза-3 (EC: 2.3.1.9)	RCAP_rcc03449	P	P	P	P	P	P
36а	<i>phbB</i>	K00023; ацетоацетил-КоА редуктаза (EC: 1.1.1.36)	RCAP_rcc03179	M	A	M	A	M	M
37а	–*	K17865; белок МаоС-домена	RCAP_rcc02081	P	P	P	A	P	P
36б/37б	<i>fadB</i>	K01782; α-субъединица комплекса окисления жирных кислот (EC: 1.1.1.35; 4.2.1.17; 5.1.2.3)	RCAP_rcc00520	P	P	P	P	P	P
36б/37б	<i>fadJ</i>	Номера этой функции нет; α-субъединица комплекса окисления жирных кислот (EC: 1.1.1.35; 4.2.1.17; 5.3.3.8)	RCAP_rcc02589	A	M	A	A	P	P
36б	<i>hadH</i>	Номера этой функции нет; 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназа /3-гидрокси-2-метилбутирил-КоА-дегидрогеназа (EC: 1.1.1.178; 1.1.1.35)	RCAP_rcc02991	P	P	P	P	P	P
36б	<i>hbdA</i>	K00074; 3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназа (EC: 1.1.1.157)	RCAP_rcc00141	P	P	P	P	P	P
37б	<i>paaF</i>	K01715; еноил-КоА-гидратаза (EC: 4.2.1.17)	RCAP_rcc03533	P	P	P	P	P	P
38	<i>ccrA</i>	K14446; кротонил-КоА-редуктаза (–)	RCAP_rcc03243	P	P	P	P	P	P

Номер реакции по рисунку	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
39	–	K05606; метилмалонил-КоА-эпимераза (EC: 5.1.99.1)	RCAP_rcc00538	P	P	P	P	P	P
40	<i>mutB</i>	K14447; большая субъединица метилмалонил-КоА-мутаза (EC: 5.4.99.2)	RCAP_rcc03241	P	M	A	P	P	P
41	–	K14448; ацил-КоА-дегидрогеназа специфичная к среднецепочечным жирным кислотам (EC: 1.3.99.3/1.3.8.7)	RCAP_rcc03306	P	P	P	P	P	P
18	<i>maoC</i>	K14449; белок MaoC-домена	RCAP_rcc00730	P	P	P	P	P	P
19,16,24	<i>citE2</i> **	K08691; β-субъединица-2 цитратлиазы, (EC: 4.1.3.34; 4.1.3.6)	RCAP_rcc03164	P	P	P	P	P	P
17	<i>citE1</i> **	K14451; β-субъединица-1 цитратлиазы, (EC: 4.1.3.34; 4.1.3.6)	RCAP_rcc00727	P	P	P	P	P	P

Примечание. Обозначения – см. примечание к табл. 1. \* – Здесь и далее: обозначение гена отсутствует; \*\* – β-субъединицы цитратлиазы 1 и 2 являются паралогами одного из компонентов цитратлиазы EC: 4.1.3.22 *Clostridium tetanomorphum*, экспериментально продемонстрирована возможность β-субъединицы цитратлиазы 1 самостоятельно функционировать в качестве (3S)-малил-КоА-тиоэстеразы (EC: 3.1.2.30), а β-субъединицы цитратлиазы 2 – в качестве малил-КоА-лиазы/(S)-цитрамалил-КоА-лиазы EC: 4.1.3.24: 4.1.3.25 у *Rba. sphaeroides* (Erb et al., 2010).

**Цитрамалатный цикл.** Последовательность реакций этого цикла отображена на рисунке 19, реакции 24–26, 23, 18, 19, причем сукцинил-КоА, полученный из пропионил-КоА (описано ниже), вступает в реакции 10–12, 27 или 10–13, 28, 31, поставляя ПВК для возобновления цикла. Данный цикл не представлен в базе данных KEGG Pathway в обособленном виде, последовательность показана на уровне химических реакций. Поэтому поиск ферментов, способных катализировать образование необходимых для цикла субстратов, осуществлялся на основе литературных данных и по реакциям для химических соединений в KEGG Compounds.

Первая реакция данного пути – образование цитрамалата из ПВК и ацетил-КоА (рисунок 19, 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 19, реакции 24 и 25). Вторым 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 19, реакции 33 и 34). Авторы, описавшие цитрамалатный цикл (Ivanovsky et al., 1997), не уточнили: какой энантиомер цитрамалата вовлечен в реакции цикла. 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). Кроме того, установлено, что известные ферменты, способные осуществлять дальнейшее превращение цитрамалата до 2-метилфумарата (рисунок 19, реакция 26) используют в качестве субстрата (S)-энантиомер (Kronen, Berg I.A. 2015; Suzuki et al., 1977). 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 (таблица 7, реакция 24). Однако анализ генома *Rba. capsulatus* показал, что для дальнейшего превращения (S)-цитрамалил-КоА в (S)-цитрамалат (рисунок 19, 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 19, 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. из литературных данных 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. Превращение 2-метилфумарата в 2-метилфумарил-КоА, как было описано для метиласпартатного цикла, теоретически возможно за счет сукцинил КоА:3-кетокислота КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.5, ген *scoA* субъединицы А, RCAP\_gcc03101; ген *scoB* субъединицы В, RCAP\_gcc03102), транскрипты которой присутствуют во всех образцах «ацетатных» культур.

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 выяснения этих деталей необходимы дополнительные исследования.

**Этилмалонил-КоА путь.** Вариант этого пути, характерного для пурпурной несерной бактерии *Rba. sphaeroides* (Alber et al., 2006), изображен на рисунке 19 (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* (таблица 7). 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 (таблица 7, реакции 36а).

Субстрат для синтеза кротонил-КоА поставляется ацетоацетил-КоА-редуктазой. Однако образование кротонил-КоА может осуществляться и за счет других ферментов, отличающихся субстратной специфичностью к (S)-энантиомерам: через образование из ацетоацетил-КоА (S)-3-гидроксибутирил-КоА (рисунок 19, реакция 36б) с помощью (S)-3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназы (EC: 1.1.1.157) или (S)-3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы (EC: 1.1.1.35) с последующим образованием кротонил-КоА (рисунок 19, реакция 37б) за счет (3S)-3-гидроксиацил-КоА-гидратазы EC: 4.2.1.17. В геноме *Rba. capsulatus* каждый из ферментов, способных осуществлять функцию 3-гидроксиацил-КоА-дегидрогеназы и (3S)-3-гидроксиацил-КоА-гидратазы, представлен в трех копиях. В одном случае они входят в состав двух мультифункциональных ферментов комплекса окисления жирных кислот (RCAP\_gcc00520, RCAP\_gcc02589), каждый из которых способен выполнять сразу две функции (EC: 1.1.1.35 и EC: 4.2.1.17). В другом случае эти два фермента аннотированы как монофункциональные ферменты (EC: 1.1.1.35, RCAP\_gcc02991; и EC: 4.2.1.17, RCAP\_gcc03533). Кроме того, в геноме также присутствует еще ген *hbdA*, кодирующий (S)-3-гидроксибутирил-КоА-дегидрогеназу (EC: 1.1.1.157, RCAP\_gcc00141). Во всех образцах ацетатных культур *Rba. capsulatus*, вне зависимости от источника азота, присутствовали транскрипты всех этих генов, за исключением одного, кодирующего мультифункциональный фермент,  $\alpha$ -субъединицу комплекса окисления жирных кислот (ген *fadJ*, RCAP\_gcc02589, таблица 7). Транскрипты последнего присутствовали в культурах, выросших на среде с ацетатом, но отсутствовали на среде с ацетатом и глутаматом.

Таким образом, в «ацетатных» культурах имеются транскрипты генов, кодирующих ферменты, способные осуществить необходимые для образования кротонил-КоА реакции, однако необходимо экспериментальное определение того, какие из них могут участвовать в этилмалонил-КоА пути.

**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 анаэробный путь состоит из двух циклов, имеющих общие реакции. В первом цикле (рисунок 19, реакции 42–50, 10–12, 51, 16) из ацетил-КоА в результате ряда реакций образуется (S)-малил-КоА,

который расщепляется на ацетил-КоА (возвращается в цикл) и глиоксилат, который преобразуется далее в реакциях второго цикла (рисунок 19, реакции 42–47, 19, 18, 52, 53, 24) с образованием (3S)-цитрамалил-КоА, который на последнем этапе расщепляется с образованием ПВК и ацетил-КоА. В результате полных двух циклов из 3 молекул бикарбоната образуется 1 молекула ПВК. При фотоассимиляции ацетата восполнение пула ЩУК возможно за счет образования в реакциях 42–47 пропионил-КоА, который далее преобразуется в ЩУК или ее предшественники. Наш анализ будет ограничен рассмотрением этих реакций у *Rba. capsulatus*.

В геноме изучаемой бактерии имеются гены (*accA*, RCAP\_rcc03165; *accB*, RCAP\_rcc02601; *accC*, RCAP\_rcc02602; *accD*, RCAP\_rcc00236), 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 (таблица 8). Надо отметить, что этот фермент также является компонентом пути синтеза жирных кислот. 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 19, реакции 43а–43б). Из малонил-КоА под действием малонил 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 малонил КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.3), образуя малонат. Последний под действием малонат-семиальдегиддегидрогеназы (EC: 1.2.1.15) превращается в малонат-семиальдегид. В геноме *Rba. capsulatus* отсутствует ген малонил 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 (таблица 8, реакция 43а). 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. Образование из малонат-семиальдегида 3-гидроксипропионата возможно также за счет 3-гидроксипропионатдегидрогеназы (EC: 1.1.1.59) или за счет малоновой кислоты

семиальдегидредуктазы (ЕС: 1.1.1.-), однако проверить наличие их в геноме бактерии в настоящее время не представляется возможным, т.к. аминокислотные последовательности этих белков в настоящее время не установлены.

У *Rba. capsulatus* отсутствуют гены ферментов, осуществляющие реакции 45, 46 и 47 на рисунке. 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\_gcc01563). 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\_gcc00520, RCAP\_gcc02589, RCAP\_gcc03533; таблица 7, реакция 37б) вместо 3-гидроксипропионил-КоА-дегидратазы (ЕС: 4.2.1.116). Превращение акрилоил-КоА в пропионил-КоА (реакция 47) может осуществлять многофункциональный фермент – среднецепочечная 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\_gcc03306. 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\_gcc01563) (таблица 8, реакции 43а, 45), можно полагать, что указанный цикл не участвует в восполнении пула ЩУК у *Rba. capsulatus*.

**Таблица 8.** Наличие генов, кодирующих ферменты части 3-гидроксипропионатного цикла (реакции 42, 43а, 43б, 44–47), вносящей вклад в восполнение пула ЩУК из пропионил-КоА, а также их транскрипция у *Rba. capsulatus* при росте с использованием ацетата и разных источников азота.

Номер реакции по рисунку	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
42	<i>accB</i>	K02160; ацетил-КоА-карбоксилаза, биотинсодержащий карбоксил-переносящий белок (ЕС: 6.4.1.2)	RCAP_rcc02601	P	P	P	P	P	P
	<i>accC</i>	K01961; ацетил-КоА-карбоксилаза, биотин-карбоксилаза (ЕС: 6.3.4.14; 6.4.1.2)	RCAP_rcc02602	P	P	P	P	P	P
	<i>accA</i>	K01962; α-субъединица ацетил-КоА-карбоксилазы, карбоксил-трансферазы (ЕС: 6.4.1.2)	RCAP_rcc03165	P	P	P	P	P	P
	<i>accD</i>	K01963; β-субъединица ацетил-КоА-карбоксилазы, карбоксил-трансферазы (ЕС: 6.4.1.2)	RCAP_rcc00236	P	P	P	P	P	P
43а	<i>mdcE</i>	K20511; малонатдекарбоксилаза, γ-субъединица (ЕС: 4.1.1.9)	RCAP_rcp00127	P	P	A	P	M	A
	<i>mdcB</i>	K20510; малонатдекарбоксилаза, β-субъединица (ЕС: 4.1.1.9)	RCAP_rcp00128	Нет данных					
	<i>mdcD</i>	K13931; малонатдекарбоксилаза, δ-субъединица (ЕС: 4.1.1.9)	RCAP_rcp00129	Нет данных					
	<i>mdcA</i>	K13929; малонатдекарбоксилаза, α-субъединица (ЕС: 4.1.1.9)	RCAP_rcp00130	A	M	A	A	A	A
43б	–	Номера этой функции нет; малонат-семиальдегиддегидрогеназа (ЕС: 1.2.1.15)	Последовательность неизвестна						
44	–	Номера этой функции нет; 3-гидроксипропионатдегидрогеназа (ЕС: 1.1.1.59)	Последовательность неизвестна						
44	–	K18602; малоновая кислота семиальдегидредуктаза (ЕС: 1.1.1.-)	Последовательность неизвестна						

Номер реакции по рисунку	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
45	–	K18594; 3-гидроксипропионил-КоА-синтетаза (АДФ-формирующая) (ЕС: 6.2.1.-)	Последовательность неизвестна						
45	–	K05605; 3-гидроксиизобутирил-КоА-гидролаза (ЕС: 3.1.2.4)	RCAP_rcc01563	P	P	A	P	A	P
46	<i>fadB</i>	K01782; α-субъединица комплекса окисления жирных кислот (ЕС: 1.1.1.35; 4.2.1.17; 5.1.2.3)	RCAP_rcc00520	P	P	P	P	P	P
46	<i>fadJ</i>	Номера этой функции нет; α-субъединица комплекса окисления жирных кислот (ЕС: 1.1.1.35; 4.2.1.17; 5.3.3.8)	RCAP_rcc02589	A	M	A	A	P	P
46	<i>paaf</i>	K01715; еноил-КоА-гидратаза (ЕС: 4.2.1.17)	RCAP_rcc03533	P	P	P	P	P	P
47	–	K00249; ацил-КоА-дегидрогеназа специфичная к среднецепочечным жирным кислотам (ЕС: 1.3.8.7; 1.3.99.3)	RCAP_rcc03306	P	P	P	P	P	P

Примечание. Обозначения – см. примечание к табл. 1.

**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 (EC: 2.3.3.9)**, впервые продемонстрированной в глиоксилатном пути. На данный момент охарактеризованы две малатсинтазы с EC: 2.3.3.9 (малатсинтазы А и G), которые отличаются стабильностью и природой ингибитора (Ornston, Ornston, 1969). Малатсинтаза G сильно индуцибельна гликолатом (1000-кратно) и глиоксилатом (Molina et al., 1994), тогда как малатсинтаза А индуцируется 20-кратно ацетатом или жирными кислотами (Vanderwinkel, De Vlieghere, 1968). Некоторые авторы полагают, что малатсинтаза G связана с гликолитическим путем, а малатсинтаза А, которая активируется ацетатом – с ЦТК (Ornston, Ornston, 1969; Vanderwinkel, De Vlieghere, 1968). Кроме того мы полагаем, что малатсинтаза G, сильно индуцибельная гликолатом и глиоксилатом, может работать в связке с путем образования глиоксилата через гликолат, который функционирует с участием Рубиско в качестве оксигеназы.

*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 (таблица 5).

2) Преобразование глиоксилата в малат может осуществляться с помощью последовательного действия **малил-КоА(S)-цитрамалил-КоА-лиазы (EC: 4.1.3.24; 4.1.3.25) и (3S)-малил-КоА-тиоэстеразы (EC: 3.1.2.30)**. Прервая катализирует образование L-малил-КоА, который далее под действием (3S)-малил-КоА-тиоэстеразы (EC: 3.1.2.30) превращается в (S)-малат (рисунок 19, реакции 16 и 17).

В геноме *Rba. capsulatus* присутствуют гены ферментов, способных к осуществлению данных реакций. Для реакции 16 – это  $\beta$ -субъединица-2 цитратлиазы (EC: 4.1.3.34; 4.1.3.6; RCAP\_rcc03164), а для реакции 17 –  $\beta$ -субъединица-1 цитратлиазы (EC: 4.1.3.34; 4.1.3.6; RCAP\_00727). Транскрипты генов этих ферментов детектировали во всех образцах «ацетатных» культур (таблица 7) данной бактерии.

$\beta$ -субъединицы цитратлиазы 1 и 2 являются паралогами одного из компонентов цитратлиазы EC: 4.1.3.22 *Clostridium tetanomorphum*, экспериментально продемонстрирована возможность  $\beta$ -субъединицы цитратлиазы 1 самостоятельно функционировать в качестве (3S)-малил-КоА-тиоэстеразы (EC: 3.1.2.30), а  $\beta$ -субъединицы цитратлиазы 2 – в качестве

малил-КоА-лиазы/(S)-цитрамалил-КоА-лиазы EC: 4.1.3.24: 4.1.3.25 у *Rba. sphaeroides* (Erb et al., 2010).

**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 (описано ниже).

**Метилмалонил-КоА путь.** В этом пути из пропионил-КоА в результате трех реакций образуется сукцинил-КоА (рисунок 19, реакции 48–50). Образование из пропионил-КоА S-метилмалонил-КоА могут осуществлять 2 фермента: пропионил-КоА-карбоксилаза (EC: 6.4.1.3) и метилмалонил-КоА-карбокситрансфераза (EC: 2.1.3.1), ген которой не обнаружен в геноме *Rba. capsulatus*. Ген первого фермента, а также остальных, необходимых для осуществления реакций 49–50, присутствуют в изучаемом геноме и приведены в таблице 9 (*pccA*, RCAP\_rcc00911 и *pccB*, RCAP\_rcc00906 – гены  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц пропионил-КоА-карбоксилазы (EC: 6.4.1.3), соответственно; RCAP\_rcc00538 – метилмалонил-КоА-эпимеразы (EC: 5.1.99.1); *bhbA*, RCAP\_rcc00912 – метилмалонил-КоА-мутаза (EC: 5.4.99.2)). Однако этот путь неактивен у исследуемых «ацетатных» культур *Rba. capsulatus*, так как в них отсутствовали транскрипты метилмалонил-КоА-мутазы (EC: 5.4.99.2, таблица 9, реакция 50).

**Таблица 9.** Наличие генов, кодирующих ферменты карбоксилирования ПВК и ФЕП (реакции 27, 28, 30), ферменты образования ПВК из ацетил-КоА (реакции 63, 64 или 62), метилмалонил-КоА пути (реакции 48–50) и метилцитратного цикла (реакции 55–56, 58), а также их транскрипция у *Rba. capsulatus* при росте с использованием ацетата и разных источников азота.

Номер реакции по рисунку	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
28	<i>pckA</i>	K01610; ФЕП-карбоксикиназа (АТФ, ЕС: 4.1.1.49)	RCAP_rcc02837	P	P	P	P	P	P
27	<i>maeB1</i>	K00029; малатдегидрогеназа-1 оксалоацетатдекарбоксилирующая (НАДФ <sup>+</sup> , ЕС: 1.1.1.40)	RCAP_rcc00443	P	P	P	P	P	P
27	<i>maeB2</i>	K00029; малатдегидрогеназа-2 оксалоацетатдекарбоксилирующая (НАДФ <sup>+</sup> , ЕС: 1.1.1.40)	RCAP_rcc03496	P	P	P	P	P	P
30	<i>pyc</i>	K01958; пируваткарбоксилаза (ЕС: 6.4.1.1)	RCAP_rcc01203	P	P	P	P	P	P
63	<i>fdhE</i>	K00126; δ-субъединица формиатдегидрогеназы (НАД, ЕС: 1.2.1.2)	RCAP_rcc03033	P	A	P	A	P	P
	<i>fdhA</i>	K00123; α-субъединица формиатдегидрогеназы (НАД-ЕС: 1.2.1.2)	RCAP_rcc03035	P	P	M	A	P	A
	<i>fdhB</i>	K00124; β-субъединица формиатдегидрогеназы (НАД, ЕС: 1.2.1.2)	RCAP_rcc03036	P	P	P	P	P	P
	<i>fdhC</i>	K00127; γ-субъединица формиатдегидрогеназы (НАД, ЕС: 1.2.1.2)	RCAP_rcc03037	P	P	P	A	P	A
64	<i>pflD</i>	K00656; формиат-С-ацетилтрансфераза (ЕС:2.3.1.54)	RCAP_rcc02211	P	P	P	P	P	A
64	<i>pflB</i>	K00656; формиат-С-ацетилтрансфераза (ЕС: 2.3.1.54)	RCAP_rcc02866	A	P	P	P	P	A
62	<i>nifJ</i>	K03737; пируват:флаводоксин оксидоредуктаза (ЕС: 1.2.7.-)	RCAP_rcc01728	P	A	P	A	P	A

48	<i>rccA</i>	K01965; $\alpha$ -субъединица пропионил-КоА-карбоксилазы (ЕС: 6.4.1.3)	RCAP_rcc00911	P	P	P	P	P	P
	<i>rccB</i>	K01966; $\beta$ -субъединица пропионил-КоА-карбоксилазы (ЕС: 6.4.1.3)	RCAP_rcc00906	P	P	P	P	P	P
49	–	K05606; метилмалонил-КоА-эпимераза (ЕС: 5.1.99.1)	RCAP_rcc00538	P	P	P	P	P	P
50	<i>bhbA</i>	K01847; метилмалонил-КоА-мутаза (ЕС: 5.4.99.2)	RCAP_rcc00912	P	A	A	A	P	A
54	<i>prpE</i>	K01908; пропионил-КоА-лигаза (ЕС: 6.2.1.17)	RCAP_rcc00442	P	P	P	P	P	P
54	<i>acsA1</i>	K01895; ацетат–КоА-лигаза-1 (ЕС: 6.2.1.1)	RCAP_rcc02126	A	A	P	A	P	P
54	<i>acsA2</i>	K01895; ацетат–КоА-лигаза-2 (ЕС: 6.2.1.1)	RCAP_rcc02620	P	P	P	P	P	P
54	<i>acsA3</i>	K01895; ацетат–КоА-лигаза-1 (ЕС: 6.2.1.1)	RCAP_rcc02859	M	A	A	A	P	P
55	<i>prpC</i>	K01659; 2-метилцитратсинтаза (ЕС: 2.3.3.5)	RCAP_rcc03348	P	P	P	P	P	M
56	<i>prpD</i>	K01720; 2-метилцитратдегидратаза (ЕС: 4.2.1.79)	RCAP_rcc03347	A	P	P	M	A	A
58	<i>prpB</i>	K03417; метилизоцитратлиаза (ЕС: 4.1.3.30)	RCAP_rcc03349	P	P	P	P	P	P

Примечание. Обозначения – см. примечание к табл. 1.

**Метилцитратный цикл.** Последовательность реакций этого пути отражена на рисунке 19 (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, реакция 56), в метилцитратном цикле II образование из (2S,3S)-2-метилцитрата 2-метил-цис-аконитата осуществляется в результате двух реакций (рисунок, реакции 56а 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, 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, and Escalante-Semerena, 2001). Для выявления такой возможности у аконитатгидратазы (*acnA*, RCAP\_rcc02150, таблица 5, реакция 2/3) *Rba. capsulatus* необходима экспериментальная проверка.

Наличие генов остальных ферментов метилцитратного цикла I (рисунок 19, 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 (ЕС: 4.2.1.79, таблица 9, реакция 56), 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 19, реакции 47, 59–61) образование пропионил-КоА в акрилоил-КоА (рисунок 19, 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. Гены 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. Ген фермента, осуществляющего превращение лактата в ПВК (реакция 61 данного пути – лактатдегидрогеназа (ЕС: 1.1.1.27)) присутствует в геноме бактерии (RCAP\_rcc00817, таблица 10).

Таким образом, в связи с отсутствием двух ключевых генов данного пути преобразования пропионил-КоА, рассматриваемый путь не может принимать участие в выполнении 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 фумарата 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 19, 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 (таблица 9) или синтезировались на уровне близком к пределу обнаружения (данные не приведены). Надо отметить, что т.к. в восстановительном цикле трикарбоновых кислот (ВЦТК) и дикарбоксилат-гидроксибутиратном цикле анаплеротическую функцию выполняет пируват:ферредоксин оксидоредуктаза в сочетании с карбоксилирующими ферментами, то они далее не рассматриваются в качестве уникальных путей восполнения пула ЩУК.

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 (ЕС: 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 (ЕС: 2.3.1.54; *pflB*, RCAP\_rcc02866; *pflD*, RCAP\_rcc02211). Однако в

ацетатных культурах этой бактерии, транскрипты субъединиц формиатдегидрогеназы отсутствовали (таблица 9, реакция 63) или синтезировались на уровне близком к пределу обнаружения независимо от источника азота (данные не приведены). Таким образом, синтез ПВК из ацетата *Rba. capsulatus* возможен, но в исследованных ацетатных культурах не реализуется.

**Таблица 10.** Наличие генов, кодирующих ферменты гликолиза/глюконеогенеза (реакции 71, 72, 75/82–81, 31), Энтнера–Дудорова (реакции 65-70, совместно с реакциями превращения  $\alpha$ -D-глюкозы в  $\beta$ -D-глюкозо-6-фосфат, реакции 65, 66), а также их транскрипция у *Rba. capsulatus* при росте с использованием ацетата и разных источников азота.

Номер реакции по рисунку	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
65	<i>galM</i>	K01785; альдолаза-1-эпимераза (ЕС: 5.1.3.3)	RCAP_rcc01132	P	M	P	A	P	P
67	<i>zwf</i>	K00036; глюкозо-6-фосфат-1-дегидрогеназа (ЕС: 1.1.1.49)	RCAP_rcc02408	P	P	P	P	P	M
68	<i>pgl</i>	K01057; 6-фосфоглюконолактоназа (ЕС: 3.1.1.31)	RCAP_rcc02407	A	A	A	A	A	A
69	<i>edd</i>	K01690; фосфоглюконатдегидрогеназа (ЕС: 4.2.1.12)	RCAP_rcc02411	P	P	P	P	P	P
70	<i>eda</i>	K01625; КГГ/КДФГ-альдолаза* (ЕС: 4.1.2.14; 4.1.3.16)	RCAP_rcc02412	P	P	P	P	P	P
66, 71	<i>glk</i>	K00845; глюкокиназа (ЕС: 2.7.1.2)	RCAP_rcc01768	P	P	P	P	P	P
72 – 74	<i>pgi</i>	K01810; глюкозо-6-фосфатизомераза (ЕС: 5.3.1.9)	RCAP_rcc02406	P	P	P	P	P	P
75	<i>pfkB</i>	K16370; 6-фосфофруктокиназа (ЕС: 2.7.1.11)	RCAP_rcc01137	P	A	P	A	P	M
82	<i>fbp</i>	K03841; фруктозо-бисфосфатаза (ЕС: 3.1.3.11)	RCAP_rcc01834	P	P	P	P	P	A
82, 87	<i>glpX</i>	K11532; фруктозо-1,6-бисфосфатаза (ЕС: 3.1.3.11)	RCAP_rcc03062	P	P	P	P	P	P
76, 86	<i>fda</i>	K01623; фруктозо-бисфосфатальдолаза (ЕС: 4.1.2.13)	RCAP_rcc01707	P	P	P	P	P	P
76, 86	<i>fba</i>	K01624; фруктозо-бисфосфатальдолаза (ЕС: 4.1.2.13)	RCAP_rcc01830	P	P	P	P	P	P
77	<i>tpiA</i>	K01803; триозофосфатизомераза (ЕС: 5.3.1.1)	RCAP_rcc01598	P	P	P	P	P	P
78	<i>gapI</i> **	K00134; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (фосфорилирующая) (ЕС: 1.2.1.12)	RCAP_rcc01831	A	A	A	A	A	A

78	<i>gap2**</i>	K00134; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (фосфорилирующая) (ЕС: 1.2.1.12)	-2	RCAP_rcc02071	P	P	P	P	P	P
78	<i>gap3**</i>	K00134; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (фосфорилирующая) (ЕС: 1.2.1.12)	-3	RCAP_rcc02160	P	P	P	P	P	P
78	<i>gap4**</i>	K00134; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (фосфорилирующая) (ЕС: 1.2.1.12)	-4	RCAP_rcp00086	Нет данных					
79	<i>pgk</i>	K00927; фосфоглицераткиназа (ЕС: 2.7.2.3)		RCAP_rcc01708	P	P	P	P	P	P
80	<i>gpml</i>	K15633; 2,3-бисфосфоглицерат фосфоглицертамутаза (ЕС: 5.4.2.1)	-независимая	RCAP_rcc00077	P	P	P	P	P	P
81	<i>eno</i>	K01689; фосфоенолпируватгидратаза (ЕС: 4.2.1.11)		RCAP_rcc01715	P	P	P	P	P	P
31	<i>pykA1</i>	K00873; пируваткиназа-1 (ЕС: 2.7.1.40)		RCAP_rcc00420	P	P	P	P	P	P
31	<i>pykA2</i>	K00873; пируваткиназа-2 (ЕС: 2.7.1.40)		RCAP_rcc03157	P	P	P	P	P	P
61	<i>ldh</i>	K00016; L-лактатдегидрогеназа (ЕС: 1.1.1.27)		RCAP_rcc00817	P	P	P	P	P	P
62	<i>nifJ</i>	K03737; пируват:флаводоксин оксидоредуктаза(ЕС: 1.2.7.-)		RCAP_rcc01728	P	A	P	A	P	A

Примечание. Обозначения – см. примечание к табл. 1.

\* – кетогидроксиглутарат/кетодегидрофосфоглюконат-альдолаза; \*\* – гены аннотированы как глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, данных о том, являются ли они паралогами или ортологами нет.

**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 19, реакции 65–70) и гликолитическом пути (Эмбдена–Мейергофа–Парнаса; рисунок 19, реакции 71, 72, 75/82–81, 31), который при наличии одного дополнительного фермента – фруктозобисфосфатазы (ЕС: 3.1.3.11; реакция 82), может работать в обратном направлении (путь глюконеогенеза). Одними из конечных метаболитов обоих путей являются ПВК и ФЕП. Гены всех необходимых ферментов указанных путей в геноме *Rba. capsulatus* имеются (таблица 10). Во всех образцах ацетатных культур исследуемых бактерий отсутствовали транскрипты гена, кодирующего один из ферментов пути Энтнера–Дудорова (6-фосфоглюконолактоназы (ЕС: 3.1.1.31), RCAP\_gcc02407 – реакция 68; таблица 10). Транскрипты остальных генов, кодирующих ферменты этого пути, присутствовали в образцах ацетатных культур (таблица 10).

В ацетатных культурах *Rba. capsulatus* транскрипты гена ключевого фермента пути гликолиза, 6-фосфофруктокиназы (ЕС: 2.7.1.11), RCAP\_gcc01137, рисунок 19, реакция 75, в части образцов отсутствовали. При этом во всех образцах обнаруживались транскрипты фруктозобисфосфатазы (ЕС: 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, данные о транскриптах демонстрируют, что запасные углеводы не играют роли в восполнении пула ЩУК в данных экспериментальных условиях, что подтверждается и нашими экспериментальными данными (раздел диссертации 3.4).

**Образование ФЕП/ПВК из интермедиатов цикла Кальвина–Бенсона** (рисунок 19, 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. У факультативно автотрофных видов фиксация CO<sub>2</sub> через цикл Кальвина–Бенсона в присутствии органических веществ, которые эти бактерии используют, часто резко снижается (McFadden,

Shively, 1991). Но в отдельных случаях пурпурные бактерии фиксируют в значительном количестве углекислоту в рассматриваемом цикле независимо от присутствия органических соединений. Например, при фотогетеротрофном росте *Rps. palustris* на среде с ацетатом 22% ацетатного углерода преобразуется в CO<sub>2</sub> и 67% этого CO<sub>2</sub> фиксируется в клеточный материал через рибулозобисфосфаткарбоксилазу (McKinlay, Harwood, 2010).

Гены, необходимые для функционирования цикла Кальвина–Бенсона, присутствуют в геноме *Rba. capsulatus* (таблица 11), их транскрипты присутствовали в образцах ацетатных культур этой бактерии. При этом для функционирования этого цикла дополнительное внесение углекислоты или бикарбонат-ионов в среду не требуется, т.к. уровень восстановленности углерода в биомассе *Rba. capsulatus* выше, чем углерода в ацетате. Поэтому для баланса восстановленности при росте культуры с использованием ацетата происходит выделение углекислоты (Tsygankov, Laurinavichene, 1996), которая далее может использоваться в цикле Кальвина–Бенсона.

**Таблица 11.** Наличие генов, кодирующих ферменты цикла Кальвина–Бенсона (реакции 83, 84, 79, 78, 77, 76, 82, 85–89) и их транскрипция у *Rba. capsulatus* при росте с использованием ацетата и разных источников азота.

Номер реакции по рисунку	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
83	<i>cbbP</i>	K00855; фосфорибулокиназа (EC: 2.7.1.19)	RCAP_rcc01833	P	P	A	P	P	M
84, 90	<i>cbbL</i>	K01601; рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа большая субъединица (EC: 4.1.1.39)	RCAP_rcc00579	P	P	P	P	P	P
	<i>cbbS</i>	K01602; рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа малая субъединица (EC: 4.1.1.39)	RCAP_rcc00578	P	P	P	P	P	P
84, 90	<i>cbbM</i>	K01601; рибулозобисфосфаткарбоксилаза/оксигеназа большая субъединица (EC: 4.1.1.39)	RCAP_rcc01829	P	P	P	P	P	P
79	<i>pgk</i>	K00927; фосфоглицераткиназа (EC: 2.7.2.3)	RCAP_rcc01708	P	P	P	P	P	P
78	<i>gap1</i>	K00134; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (фосфорилирующая) (EC: 1.2.1.12) -1	RCAP_rcc01831	A	A	A	A	A	A
78	<i>gap2</i>	K00134; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (фосфорилирующая) (EC: 1.2.1.12) -2	RCAP_rcc02071	P	P	P	P	P	P
78	<i>gap3</i>	K00134; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (фосфорилирующая) (EC: 1.2.1.12) -3	RCAP_rcc02160	P	P	P	P	P	P
78	<i>gap4</i>	K00134; глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (фосфорилирующая) (EC: 1.2.1.12) -4	RCAP_rcc00086	Нет данных					
76, 86	<i>fda</i>	K01623; фруктозо-бисфосфатаальдолаза (EC: 4.1.2.13)	RCAP_rcc01707	P	P	P	P	P	P
76, 86	<i>fba</i>	K01624; фруктозо-бисфосфатаальдолаза (EC: 4.1.2.13)	RCAP_rcc01830	P	P	P	P	P	P
82	<i>fbp</i>	K03841; фруктозо-бисфосфатаза (EC: 3.1.3.11)	RCAP_rcc01834	P	P	P	P	P	A
82, 87	<i>glpX</i>	K11532; фруктозо-1,6-бисфосфатаза (EC: 3.1.3.11)	RCAP_rcc03062	P	P	P	P	P	P

Номер реакции по рисунку	Обозн. гена	Номер функции в соответствии с базой данных KEGG Orthology; название и номер фермента, кодируемого геном, в соответствии с классификацией ферментов по описанию последовательности в GenBank	Идентификационный номер гена	Источник азота в среде					
				глутамат (2 мМ), повторности				NH <sub>4</sub> Cl (5 мМ), повторности	
				I	II	III	IV	I	II
85, 88	<i>tkt1</i>	K00615; транскетолаза -1 (EC: 2.2.1.1)	RCAP_rcc01832	М	Р	Р	М	А	А
85, 88	<i>tkt2</i>	K00615; транскетолаза -2 (EC: 2.2.1.1)	RCAP_rcc02146	Р	Р	Р	Р	Р	Р
85, 88	<i>tktB</i>	K00615; транскетолаза, C-терминальная субъединица* (EC: 2.2.1.1)	RCAP_rcc02654	Р	Р	Р	Р	Р	Р
85, 88	<i>tktA</i>	K00615; транскетолаза, N-терминальная субъединица* (EC: 2.2.1.1)	RCAP_rcc02655	М	М	А	А	Р	А
89	<i>rpiA</i>	K01807; рибозо-5-фосфатизомераза-А (EC: 5.3.1.6)	RCAP_rcc02396	Р	Р	Р	Р	Р	Р

Примечание. Обозначения – см. примечание к табл. 1.

\* – В базе данных Uniprot данный белок *Methanocaldococcus jannaschii* (strain ATCC 43067) назван Putative transketolase C-terminal section, но в этой же базе в других организмах он назван Transketolase, C-terminal subunit. Аннотированы эти гены в соответствии с гомологией. Это относится и к транскетолазе, N- терминальной субъединице.

**ПВК/ФЕП-карбоксилирующие ферменты (анаплеротические карбоксилазы) и путь образования из ПВК фумарата.** Для получения интермедиатов ЦТК из ПВК или других С3-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 19, реакция 29), ГТФ-зависимая ФЕП-карбоксикиназа (ЕС: 4.1.1.32; рисунок 19, реакция 28) и ФЕП-карбоксифосфоорилаза (ЕС: 4.1.1.38; рисунок 19, реакция 28). Однако в исследуемом геноме присутствуют два гена (*maeB1* (RCAP\_gcc00443) и *maeB2* (RCAP\_gcc03496)), кодирующих малик-фермент (ЕС: 1.1.1.40) (таблица 9, реакция 27). Считается, что преимущественное направление реакции этого фермента – декарбоксилирование. Однако показано, что у некоторых малик-ферментов преимущественное направление реакции (в сторону образования ПВК или малата) зависит от pH (Nuiiry, Cook, 1985). Кроме того, в *Synechocystis* sp. PCC 6803, не имеющей активного анаплеротического пути ассимиляции ацетата, малик-фермент является ключевым ферментом восполнения интермедиатов ЦТК, осуществляя карбоксилирование ПВК (Bricker et al., 2004). Оба малик-фермента *Rba. capsulatus* (*maeB1* и *maeB2*) являются НАДФ<sup>+</sup>-зависимыми. Малик-фермент *maeB* из *E. coli* также зависит от НАДФ<sup>+</sup>, показано, что его активность *in vitro* снижается в присутствии ЩУК и увеличивается в присутствии аспартата, а также возрастает в присутствии глюкозо-6-фосфата (Bologna et al., 2007). Позитивное регулирование *maeB* из *E. coli* глюкозо-6-фосфатом (источник С3-соединений таких, как ПВК, ФЕП) указывает на то, что этот фермент может играть важную роль в метаболизме бактерии, катализируя карбоксилирование ПВК с образованием малата. 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 (таблица 9, реакция 27).

Отдельного рассмотрения требует еще один малик-фермент (ЕС: 1.1.1.83), обладающий в отличие от описанных выше ферментов субстратной специфичностью к (R)-энантиомеру малата. В случае возможного осуществления данным ферментом карбоксилирования ПВК образуется (R)-малат (реакция 94), который не может напрямую включиться в ЦТК из-за специфичности его ферментов к (S)-форме субстрата. (R)-малат сначала превращается в малеат с участием малеатгидратазы (реакция 95, ЕС: 4.2.1.31), который далее под действием малеатизомеразы (реакция 96, ЕС: 5.2.1.1) преобразуется в фумарат, вступающий в реакции ЦТК. В геноме *Rba. capsulatus* ген (R)-малик-фермента (ЕС:

1.1.1.83) не обнаружен. С функцией малеатгидратазы (ЕС: 4.2.1.31) в настоящее время ассоциирован многофункциональный фермент, обнаруженный в *Methanocaldococcus jannaschii* кодируемый геном *leuC* (Drevland et al., 2007). Продемонстрировано, что он проявляет активность малеатгидратазы. В геноме *Rba. capsulatus* не обнаружено сходного гена. Малеатизомераза (ЕС: 5.2.1.1) у этой бактерии также отсутствует.

Также в геноме *Rba. capsulatus* присутствует ген АТФ-зависимой ФЕП-карбоксикиназы (ЕС: 4.1.1.49, RCAP\_gcc02837), его транскрипты присутствовали во всех образцах (таблица 9, реакция 28). При этом уровень транскрипции ФЕП-карбоксикиназы был достаточно высоким независимо от источника азота (данные не приведены). У некоторых бактерий, таких как *Ralstonia eutropha*, фермент ФЕП-карбоксикиназа катализирует обратную реакцию (т.е. С3-карбоксилирование) (Schobert, Bowien, 1984; Bramer, Steinbuchel, 2002).

*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 независимо от источника азота (таблица 9, реакция 30). Таким образом, наличие малик-ферментов, ФЕП-карбоксикиназы, а также биотин-содержащей пируваткарбоксилазы позволяет утверждать, что пул ЩУК у *Rba. capsulatus* может восполняться путем карбоксилирования С3-соединений.

Таким образом, комбинация реакций синтеза ПВК и С3-кислот с их карбоксилированием является путем восполнения ЦТК интермедиатами, что может позволять культурам *Rba. capsulatus* расти с использованием ацетата в качестве единственного источника углерода, даже когда глиоксилатный шунт не активен.

**Образование *цис*-аконитата из ПВК и ацетил-КоА.** Последовательность реакций, связанная с метаболизмом итаконата (рисунок 19, реакции 24,97-98, 99/100-102) гипотетически, могла бы участвовать в восполнении ЦТК интермедиатами на уровне *цис*-аконитата. В настоящее время этот путь рассматривается как основной для ассимиляции итаконата (реакции 98-97 и 24 (Gray, Kornberg, 1960)) и его синтеза (реакции 99 (Steiger, 2013) или 102-100 (Geiser, et. al., 2016)). В нем все реакции, кроме одной – декарбоксилирования *цис*-аконитата/*транс*-аконитата до итаконата (реакция 99/100) – в настоящее время считаются обратимыми. Как отмечалось выше, у некоторых карбоксилаз (декарбоксилаз) при определенных условиях направление реакции может смещаться в сторону карбоксилирования (Nuiry, Cook, 1985; Bricker et al., 2004). В случае возможности протекания реакции 99 в обратном направлении за счет гипотетической обратимости реакции (или при существовании фермента-антагониста) в этом пути из ацетата и ПВК могло бы

происходить образование *цис*-аконитата – метаболита ЦТК. О возможности преобразовании трансизомера итаконата в реакции 98 и далее нет данных. В настоящее время доступно мало информации о ферментах, способных к превращению итаконата, и охарактеризованы белки из небольшого числа организмов (The UniProt Consortium, 2015). Однако есть экспериментальные статьи, в которых реакции преобразования итаконата в бактериях исследованы на уровне активностей ферментов.

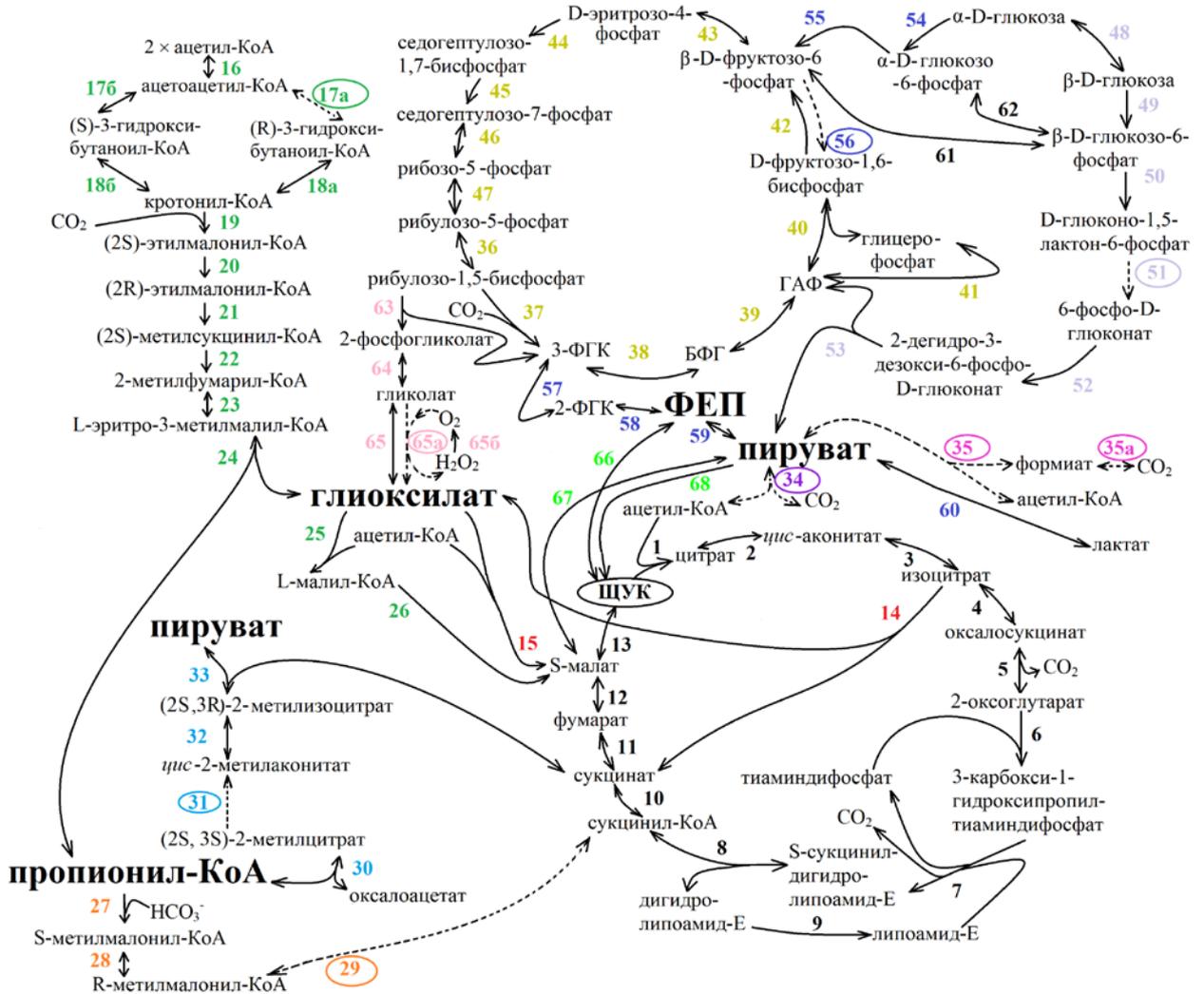
Уникальными для гипотетического пути образования *цис*-аконитата являются все перечисленные выше реакции, кроме конденсации ацетил-КоА и ПВК (реакция 24, таблица 8), которую осуществляет (S)-цитрамалил-КоА-лиаза (EC: 4.1.3.25) и реакции превращения итаконил-КоА в итаконат, которую осуществляет сукцинил-КоА-синтетаза (EC: 6.2.1.4, 6.2.1.5, ген *sucD*,  $\alpha$ -субъединица, RCAP\_rcc00721; и ген *sucC*,  $\beta$ -субъединица RCAP\_rcc00720).

Первая реакция предполагаемого пути – конденсация ацетил-КоА и ПВК, катализируется (S)-цитрамалил-КоА-лиазой (EC: 4.1.3.25; реакция 24). Превращение (3S)-цитрамалил-КоА в итаконил-КоА (реакция 97) катализирует фермент итаконил-КоА-гидратаза (EC: 4.2.1.56). Далее итаконил-КоА под действием сукцинил-КоА:итаконат КоА-трансферазы (EC: 2.8.3.-) или сукцинил-КоА-синтетазы (EC: 6.2.1.4, 6.2.1.5) превращается в итаконат (реакция 98). Далее *цис*-аконитатдекарбоксилаза (EC: 4.1.1.6, реакция 99), которая гипотетически могла бы катализировать обратную реакцию, осуществляет карбоксилирование итаконата до *цис*-аконитата.

Известно, что пурпурная несерная бактерия *Rsp. rubrum* не проявляет способности к использованию итаконата в качестве единственного источника углерода (Berg et al., 2002). Позже показано, что добавление итаконата к целым клеткам ацетаных фототрофных культур *Rba. sphaeroides* (Филатова, 2005) оказывает ингибирующее действие на скорости потребления ацетата/пропионата. Надо отметить, что это ингибирующее действие не связано с подавлением изоцитратлиазы (итаконат считается ингибитором изоцитратлиазы (Rao and McFadden, 1965; Williams et al., 1971) и используется в этом качестве при исследовании глиоксилатного шунта), так как ген этого фермента у бактерий *Rsp. rubrum* и *Rba. sphaeroides* отсутствует.

В геноме *Rba. capsulatus* отсутствуют все известные в настоящее время гены уникальных ферментов этого пути. Гены ферментов, осуществляющих реакцию 102 (аконитатизомераза (EC: 5.3.3.7)) и реакцию 101 (транс-аконитатдекарбоксилаза), также отсутствуют в геноме исследуемой бактерии.

Таким образом, в результате проведенных исследований выяснены пути восполнения пула ЩУК в ЦТК, имеющие генетический потенциал у *Rba. capsulatus*, и определено, какие из них экспрессируются этой бактерией в фотогетеротрофных условиях с использованием ацетата (рисунок 21).



**Рисунок 21.** Пути восполнения пула ЩУК в ЦТК, имеющие генетический потенциал у *Rba. capsulatus* и их экспрессия в фотогетеротрофных условиях с использованием ацетата. Пунктиром обозначены реакции, не активные на уровне транскриптов. ЦТК (1–13); глиоксилатный цикл (1–3, 14, 15 или 25–26, 11–13); часть реакций этилмалонил-КоА пути (16–24, 15 или 25–26). Путь образования глиоксилата с участием Рубиско в качестве оксигеназы (63, 64, 65 или 65а–65б). Пути, в которых пропионил-КоА превращается в ЩУК – метилмалонил-КоА путь (27–29, 10–13), часть реакций метилцитратного цикла (30–33). Пути образования ПВК из экзогенного ацетата (34 и 35, 35а); путь Энтнера–Дудорова (48–53) в сочетании с реакциями 39, 38, 57–59 и 66–68; путь Эмбдена–Мейергофа–Парнаса (54–56, 40, 39, 38, 57–59) в сочетании с реакциями 66–68; цикл Кальвина–Бенсона (36–47) в сочетании с реакциями 57–59 и 66–68. Анаплеротические карбоксилазы: 66–68.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проделанной работы были определены основные причины существовавших разногласий в отношении использования пурпурной несерной бактерией *Rba. capsulatus* глиоксилатного цикла при фотогетеротрофном росте на среде с ацетатом в качестве единственного источника углерода. Они заключаются, во-первых, в высокой лабильности ключевого фермента глиоксилатного цикла, ИЦЛ, которая отличается высокой чувствительностью к протеазам и подвержена деструктивным процессам в окислительных условиях. Во-вторых, в зависимости ИЦЛ активности от физиологического состояния культуры в процессе роста на ацетате. В-третьих, возможностью роста данной бактерии без глиоксилатного цикла за счет использования других анаэробических последовательностей, которые позволяют пополнять пул ЦУК в ЦТК при росте на ацетате.

Установлено, что инокулят *Rba. capsulatus*, выросший на среде с лактатом, не обладал ИЦЛ активностью, а при пассаже клеток на среду с ацетатом – ИЦЛ активность зависит от фаз роста культуры (рисунок 13).

Обнаружено, что ИЦЛ активность в ацетатных культурах *Rba. capsulatus* зависела от времени пребывания инокулята в стационарной фазе. Максимальная активность выявлялась в культуре, если инокулят для ее посева был отобран в начале (1-2 ч) стационарной фазы, вызванной истощением лактата (рисунок 14). 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 не обнаруживалась.

В результате проведенного поиска информации о последовательностях реакций, позволяющих пополнять пул интермедиатов ЦТК, были идентифицированы пути, которые ранее не рассматривались при изучении метаболизма ацетата. Выявленные последовательности реакций были объединены в общую метаболическую схему, представленную на рисунке 19.

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 ЦУК или звеньев ЦТК, предшествующих ЦУК.

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

Установлены пути, имеющие потенциал для функционирования в *Rba. capsulatus*. Используя данные об экспрессионных профилях фототрофных ацетатных культур бактерии, показано, какие из этих путей активны на транскрипционном уровне. Полученные результаты суммированы в таблице 12.

**Таблица 12.** 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 ЩУК и предшественники ЩУК</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	-	-
		малик-фермента	+	+
		путь образования фумарата из ПВК	-	-
		образование из ПВК и ацетил-КоА <i>цис</i> -аконитата	-	-
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.

Отдельного рассмотрения требует влияние на ИЦЛ активность в фототрофных ацетатных культурах *Rba. capsulatus* В10 смены ростового субстрата. Известно, что С4-кислоты, такие как малат и сукцинат, подавляют ИЦЛ активность при добавлении в среду к ацетатным культурам пурпурных несерных бактерий (Blasco, 1991; Kornberg, Lascelles, 1960). Нами продемонстрировано, что С3-соединение, метаболизирующееся через ПВК (лактат) не оказывает на ИЦЛ подобного действия, напротив, происходит активный синтез фермента (рисунок 18). Отсутствие снижения ИЦЛ активности в присутствии лактата может объясняться:

а) образованием из ПВК за счет пируватдегидрогеназы или пируват:оксидоредуктазы ацетил-КоА, который далее вступает в реакции глиоксилатного цикла. Однако транскрипты пируват:оксидоредуктазы отсутствовали в половине образцов культур *Rba. capsulatus*

(таблица 9, реакция 62), а отсутствие активности пируватдегидрогеназы в «ацетатных» фототрофных культурах *Rba. capsulatus* В10, проявляющих активность ферментов глиоксилатного шунта, подтверждено экспериментально (Willison, 1988).

б) совместным функционированием при росте на ацетате глиоксилатного шунта и путей синтеза ПВК и/или путей его превращения в С4-кислоты.

В ацетатных фототрофных культурах *Rba. capsulatus* на транскрипционном уровне из путей синтеза ПВК, имеющих генетический потенциал в исследуемой бактерии, активны только гены цикла Кальвина-Бенсона совместно с генами ферментов части гликолитического пути (таблицы 10 и 11).

Из путей превращения ПВК в С4-кислоты ЦТК присутствуют транскрипты пируваткарбоксилазы, двух малик-ферментов, а также пируваткиназы совместно с ФЕП-карбоксикиназой. Наличие активности пируваткарбоксилазы в экстрактах ацетатных культур *Rba. capsulatus* продемонстрировано экспериментально (Willison, 1988).

Отмечено, что при переходе с роста на субстратах, являющихся интермедиатами ЦТК, на рост на ацетате в качестве единственного источника углерода, наблюдается длительный лаг-период (Nielsen et al., 1979a). Подобного лаг-периода нет при переносе культуры *Rba. capsulatus* В10, выращенной на среде с лактатом, на ацетатную среду (рисунок 13), что может свидетельствовать о реальном вкладе всех обнаруженных анаэробических путей в восполнении пула ЩУК в ЦТК, что позволяет данной бактерии расти на ацетате без глиоксилатного шунта.

Полученные результаты указывают на наличие у *Rba. capsulatus* нескольких путей, способных осуществлять вклад в пополнение пула ЩУК (таблица 12), что позволяет объяснить рост *Rba. capsulatus* на ацетате в отсутствие активности ИЦЛ. Одновременное присутствие в культурах транскриптов генов нескольких путей можно объяснить по-разному.

Во-первых, активность генов на транскрипционном уровне может не сопровождаться синтезом белков или, синтезируясь конститутивно, они могут находиться в клетке в неактивном состоянии (подвержены аллостерической регуляции и активируются в определенных условиях).

Во-вторых, присутствие нескольких путей, способных к синтезу С4-дикарбоновых кислот, может объясняться их дополнительными функциями, способствующими оптимальному росту на С2-субстрате. В этом случае глиоксилатный цикл является основным путем восполнения пула ЩУК, цикл Кальвина-Бенсона может способствовать поддержанию окислительно-восстановительного баланса и снижать отток интермедиатов ЦТК на синтез

углеводов. Этималонил-КоА цикл является источником пропионил-КоА – основного звена при синтезе оргкислот 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.

Одновременное функционирование двух и более метаболических путей, в которых может происходить образование метаболитов, необходимых для восполнения ЦТК в условиях роста на С2 углеродных субстратах, все чаще обнаруживается у различных видов бактерий, относящихся к разнообразным систематическим группам. Например, совместное функционирование 3-гидроксипропионатного цикла (автотрофного пути фиксации CO<sub>2</sub>) и глиоксилатного шунта в зеленой несерной бактерии *Cfl. aurantiacus* при фототрофном росте на среде с ацетатом (Zarzycki, Fuchs G., 2011), по-видимому, объясняется тем, что первый необходим для образования пропионил-КоА, а второй – для образования С4-кислот пула ЦТК. Кроме того, фиксация CO<sub>2</sub> в реакциях 3-гидроксипропионатного цикла может служить для поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки.

У пурпурной несерной бактерии *Rps. palustris*, использующей глиоксилатный цикл как основной путь восполнения пула ЩУК и синтезирующей изоцитратлиазу конститутивно, одновременно функционируют глиоксилатный цикл и цикл Кальвина-Бенсона (McKinlay, Harwood, 2010). Роль последнего в этих условиях, вероятнее всего, заключается в поддержании окислительно-восстановительного баланса клетки и в синтезе углеводов, что снижает отток звеньев ЦТК на эти цели.

Недавно с помощью протеомного анализа было продемонстрировано одновременное функционирование двух путей, способных вносить вклад в синтез предшественников ЩУК в ЦТК в ацетатных фототрофных культурах пурпурной несерной бактерии *Rsp. rubrum*, в которых присутствовали все белки этималонил-КоА пути и пируватсинтаза (осуществляет обратимую реакцию образования ПВК из ацетил-КоА и CO<sub>2</sub>) (Leroy et al., 2015).

Безусловно, бактерии теоретически способны к образованию основных метаболитов для построения компонентов клеток растущей культуры в одном пути. Однако наличие дополнительных путей позволяет более тонко регулировать метаболизм бактерии в соответствии с изменяющимися условиями роста и физиологическим состоянием культуры, что, в конечном счете, может давать микроорганизмам преимущество при конкуренции в естественных консорциумах, повышая их скорость роста. Необходимо отметить, что, несмотря на разное функциональное значение путей, в которых могут образовываться С4-кислоты и которые одновременно активны в клетке, когда глиоксилатный путь не активен, анаэробная функция может являться для них основной.

Таким образом, стратегия клетки в условиях роста на ацетате с точки зрения углеродного метаболизма:

1) активировать пути восполнения пула ЦУК, чтобы компенсировать затраты ЦТК из-за оттока интермедиатов на биосинтетические нужды;

2) снизить нагрузку на ЦТК за счет активации дополнительных альтернативных путей, направленных на синтез из двухуглеродного ацетата необходимых биосинтетических звеньев.

## ВЫВОДЫ

1) Обнаружено, что ключевой фермент глиоксилатного пути, изоцитратлиаза, подвергается протеолизу при разрушении клеток *Rba. capsulatus*. Оработан 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), пути образования пирувата/ФЕП за счет интермедиатов цикла Кальвина; для превращения пирувата/ФЕП имеются гены С3-карбоксилирующих ферментов (пируваткарбоксилаза, ФЕП-карбоксикиназа, два гена 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 (два гена малатсинтаз и путь с участием малил-КоА/(S)-цитрамалил-КоА-лиазы в сочетании с (3S)-малил-КоА-тиоэстеразы).

5) Используя базу данных NCBI Gene Expression Omnibus, содержащую экспериментальные данные 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 путь и пути образования глиоксилата при участии Рубиско в качестве оксигеназы.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асатиани В.С. (1969) Ферментные методы анализа. М.: Наука. – 740 с.
2. Определитель бактерий Берджи (1997) / Под. Ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита, Дж. Стейли и С. Уильямса. Изд-во «Мир» в двух томах.
3. Гельфанд М. С. (1998) Компьютерный анализ последовательностей ДНК. Молекулярная биология. Т. 32, № 1, с. 103-120.
4. Герхардт Ф. (1984) Методы общей бактериологии. М.: Мир. Т. 2, 472 с.
5. Гоготов И.Н. (1989) Биотехнологические основы получения водорода за счет фототрофных микроорганизмов. Биотехнология. 5(1). 7.
6. Голомысова А.Н., Иванов П.С. (2011) Исследование анаэробного метаболизма бактерий *Rhodobacter capsulatus* с помощью потоковой модели / Биофизика, том 56, вып. 1, с. 85-98.
7. Горленко В.М., Компанцева Е.И., Пучкова Н.Н. (1985) Влияние температуры на распространение фототрофных бактерий в термальных источниках. Микробиология. 54. 5. 848-853.
8. Демидов Е.А., Пельтек С.Е. (2014) Протеомика / Вавиловский журнал генетики и селекции, Том 18, № 1.
9. Кондратьева Е. Н., Гоготов И. Н. (1976) Микроорганизмы — продуценты водорода. Изв. АН СССР. 1. Сер. биол. 1. 69.
10. Кондратьева Е.Н. (1989) Фототрофные бактерии как продуценты поли-β-гидроксibuтирата / Е.Н. Кондратьева, Е.Н. Красильникова // Прикладная биохимия и микробиология, 25, 6, 785-789 с.;
11. Кондратьева Е.Н. (1989а) Фототрофные микроорганизмы / Е.Н. Кондратьева, И.В. Максимова, В.Д. Самуилов - М: Изд-во МГУ, - 376 с.
12. Кондратьева Е.Н (1989б) Способность фототрофных бактерий к хемоавтотрофии. Под. ред. М.В. Иванова. Хемосинтез: к 100-летию открытия С.Н. Виноградским. Наука, М., С. 139-147.
13. Кондратьева Е.Н. (1996) Автотрофные прокариоты: Учебное пособие. Москва: Издательство МГУ. С. 312.
14. Патрушева Е.В. (2007) Синтез бактериохлорофилла а пурпурной несерной бактерией *Rhodobacter capsulatus* / Е.В. Патрушева, А.С. Федоров, В.В. Белера, И.Г. Минкевич, А.А. Цыганков // Прикладная биохимия и микробиология. - Т. 43. - №2. - С. 208-214.
15. 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.
16. Петушкова Е.П., Цыганков А.А. / Метаболизм ацетата пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* // БИОХИМИЯ, 2017, том 82, вып. 5, с. 786 – 807.
  17. Свердлов Е.Д. (2009) Взгляд на жизнь через окно генома. Москва. Т. 1. – 592 с.
  18. Свешникова А.Н., Иванов П.С. (2007) Экспрессия генов и микрочипы: проблемы количественного анализа, Рос. Хим. Ж., Т.51, №3, С. 127-135.
  19. Текучева Д.Н., Цыганков А.А. (2012) Сопряженные биологические системы получения водорода (обзор). Прикладная биохимия и микробиология, том 48(4), с. 357-375.
  20. Филатова Л.В. (2005) Механизм ассимиляции ацетата у пурпурных несерных бактерий, не имеющих глиоксилатного шунта / диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук, Москва. – 106 с.
  21. Цыганков А.А., Павлова Е.А., Гоготов И.Н. (1982) Активность некоторых ферментов, участвующих в метаболизме H<sub>2</sub> у *Rhodopseudomonas capsulata* в зависимости от условий роста культур. Микробиология. 51(2): 188-192.
  22. Цыганков А.А., Гоготов И.Н. (1990) Получение биомассы пурпурных несерных бактерий. Прикл. биох. и микробиол. 26. 819-824.
  23. Цыганков А.А., Хуснутдинова А.Н. (2015) Участие H<sub>2</sub> в метаболизме пурпурных бактерий и перспективы практического использования, Микробиология, 84, 3–26.
  24. Чиков В.И. (1996) Фотодыхание Соросовский образовательный журнал, №11, 2-8
  25. Эдвардс Дж., Уокер Д. (1986) Фотосинтез C<sub>3</sub> и C<sub>4</sub> растений: механизмы и регуляция. – М.: Мир. – 590 с.
  26. Abe H., Doi Y. (2002) Side-chain effect of second monomer units on crystalline morphology, thermal properties, and enzymatic degradability for random copolyesters of (R)-3-hydroxybutyric acid with (R)-3-hydroxyalkanoic acids. Biomacromolecules. 3, 133–138.
  27. Adman ET, Sieker LC, Jensen LH. (1973) Structure of a bacterial ferredoxin. J. Biol. Chem. 248:3987–96.
  28. Alber B.E., Spanheimer R., Ebenau-Jehle C., Fuchs G. (2006) Study of an alternate glyoxylate cycle for acetate assimilation by *Rhodobacter sphaeroides*. Mol Microbiol. 61(2):297-309.
  29. Albers H. and Gottschalk G. (1976) Acetate metabolism in *Rhodopseudomonas gelatinosa* and several other rhodospirillaceae. Arch Microbiol. 111:45-49.

30. Allen J., Davey H.M., Broadhurst D., Heald J.K., Rowland J.J., Oliver S.G., Kell D.B. (2003) High-throughput classification of yeast mutants for functional genomics using metabolic footprinting. *Nat Biotechnol.* 21(6): 692-6.
31. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389–3402.
32. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5350-4.
33. Anderson L. (1967) C Photosynthesis in *Rhodospirillum rubrum*. 3. Metabolic control of reductive pentose phosphate and tricarboxylic acid cycle enzymes / L. Anderson, R. Fuller // *Plant Physiol.* 42(4): 497-502.
34. Anderson N.L., Anderson N.G. (1998). «Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words». *Electrophoresis* 19 (11): 1853–61.
35. Andrews T.J., Whitney S.M. (2005) Manipulating ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in the chloroplasts of higher plants. In: Collings AF, Critchley C (eds) *Artificial photosynthesis from basic biology to industrial application*. Wiley-VCH, Weinheim, pp 243–261.
36. Antranikian G., Herzberg C., and Gottschalk G. (1982) Characterization of ATP citrate lyase from *Chlorobium limicola*. *J Bacteriol* 152: 1284–1287
37. Aon M.A., Cortassa S. (2015) Systems Biology of the Fluxome. *Processes.* 3 (3): 607–618.
38. Aoshima M., Ishii M. and Igarashi Y. (2004) A novel enzyme, citryl-KoA synthetase, catalysing the first step of the citrate cleavage reaction in *Hydrogenobacter thermophiles* TK-6. *Mol Microbiol* 52: 751–761.
39. Ashworth J.M., Kornberg H.L. (1963) Fine control of the glyoxylate cycle by allosteric inhibition of isocitrate lyase. *Biochim. Biophys. Acta* 73:519–22.
40. Badger M.R., Price G.D. (1994) *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.* 45:369–392
41. Badger M.R., Price G.D. (2003) CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in cyanobacteria: molecular components, their diversity and evolution. *J Exp Botany.* 54:609–622.
42. Bahatyrova S., Frese R.N., Siebert C.A., Olsen J.D., van der Werf K.O., van Grondelle R., Niederman R.A., Bullough P.A., Otto C., Hunter C.N. (2004) The native architecture of a photosynthetic membrane. *Nature.* 430: 1058–1062.
43. Bandell M., Ansanay V., Rachidi N., Dequin S., Lolkema J.S. (1997) Membrane potential-generating malate (MleP) and Citrate (CitP) transporters of lactic acid bacteria are

- homologous proteins. Substrate specificity of the 2-hydroxycarboxylate transporter family. *J. Biol. Chem.* 272: 18140-18146.
44. Barthelmes J., Ebeling C., Chang A., Schomburg I., Schomburg D. (2007) BRENDA, AMENDA and FRENDA: the enzyme information system in 2007 // *Nucleic Acids Res.* 35, № Database issue: D511-4.
  45. Bassham J.A., Benson A.A. and Calvin M. (1950) The path of carbon in photosynthesis, *J. Biol. Chem.* 185: 781-787.
  46. Bentley R., Thiessen C.P. (1957). Biosynthesis of itaconic acid in *Aspergillus terreus*. I. Tracer studies with C14-labeled substrates. *J. Biol. Chem.* 226: 673-687.
  47. Berg I.A., Kockelkorn D., Buckel W. and Fuchs G. (2007) A 3-hydroxypropionate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon dioxide assimilation pathway in archaea. *Science.* 318: 1782-1786.
  48. Blasco R. (1991) Regulation of isocitrate lyase in *Rhodobacter capsulatus* E1F1. J. Cardenas, F. Castillo // *Curr. Microbiol.* 22: 73-76.
  49. Bologna F.P., Andreo C.S., and Drincovich M.F. (2007) *Escherichia coli* malic enzymes: two isoforms with substantial differences in kinetic properties, metabolic regulation, and structure, *J. Bacteriol.*, 189: 5937–5946.
  50. Boutet E., Lieberherr D., Tognolli M., Schneider M., Bairoch A. (2007) UniProtKB/Swiss-Prot // *Methods Mol Biol.* 406: 89-112.
  51. Bonacci W., Teng P.K., Afonso B., Niederholtmeyer H., Grob P., Silver P.A., Savage D.F. (2012) Modularity of a carbon-fixing protein organelle. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:478–483.
  52. Bork P., Dandekar T., Diaz-Lazcoz Y., Eisenhaber F., Huynen M., Yuan Y. (1998) Predicting function: from genes to genomes and back. *J. Mol. Biol.* 283: 707–725;
  53. Bowes G., Ogren W.L., Hagerman R.H. (1971) Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 45: 716-722.
  54. Bramer C.O. and Steinbuchel A. (2002) The malate dehydrogenase of *Ralstonia eutropha* and functionality of the C3/C4 metabolism in a Tn5-induced mdh mutant. *FEMS Microbiol. Lett.*, 212: 159–164.
  55. Bricker T.M., Zhang S., Laborde S.M., Mayer P.R., Frankel L.K. and Moroney J.V. (2004) The malic enzyme is required for optimal photoautotrophic growth of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 under continuous light but not under a diurnal light regimen. *J. Bacteriol.*, 186: 8144–8148.

56. Brock M., Maerker C., Schutz A., Volker U., and Buckel W. (2002) Oxidation of propionate to pyruvate in *Escherichia coli*. Involvement of methylcitrate dehydratase and aconitase. *Eur J. Biochem.* 269(24): 6184–6194.
57. Brune D.C., (1995). Sulfur compounds as photosynthetic electron donors. In: Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E. (eds). *Anoxygenic photosynthetic bacteria*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 885-914.
58. Bryant D.A., Costas A.M., Maresca J.A., Chew A.G., Klatt C.G., Bateson M.M., Tallon L.J., Hostetler J., Nelson W.C., Heidelberg J.F., and Ward D.M. (2007). *Candidatus Chloracidobacterium thermophilum*: an aerobic phototrophic Acidobacterium. *Science*. 317: 523–526.
59. Buchanan B.B., Arnon D.I. (1970) Ferredoxins: chemistry and function in photosynthesis, nitrogen fixation, and fermentative metabolism. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 33:119–76.
60. Bumgarner R., (2013) Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol*. Chapter 22:Unit 22.1. doi: 10.1002/0471142727.mb2201s101.
61. Calvin M. and Benson A.A. (1948) The path of carbon in photosynthesis. *Science*. 107: 476-480.
62. Campbell B.J., Stein J.L. and Cary S.C. (2003) Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Appl Environ Microbiol.* 69: 5070–5078.
63. Cascante M., Marin S., (2008) Metabolomics and fluxomics approaches. *Essays In Biochemistry.* 45: 67–82.
64. Chen J.H., Gibson J.L., McCue L.A. and Tabita F.R. (1991) Identification, expression, and deduced primary structure of transketolase and other enzymes encoded within the form II CO<sub>2</sub> fixation operon of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Biol. Chem.* 266:20447–20452.
65. Chen R.D., Gadal P. (1990) Structure, function and regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenase in higher plants and in other organisms. *Plant Physiol. Biochem.* 28:411–27.
66. Chin A.M., Feldheim D.A., Saier M.H. Jr. (1989) Altered transcriptional patterns affecting several metabolic pathways in strains of *Salmonella typhimurium* which overexpress the fructose region. *J. Bacteriol.* 171:2424–34.
67. Clayton R.K. (1966) Spectroscopic analysis of bacteriochlorophylls *in vitro* and *in vivo*. *Photochem. Photobiol.* 5: 669-677.

68. Cogdell R. J., Isaacs N. W., Howard T. D., Mcluskey K., Fraser N. J., Prince S. M. (1999) How photosynthetic bacteria harvest solar energy. *J. Bacteriol.* 181: 3869-3879.
69. Cogdell R.J., Roszak A.W. (2014) Structural biology: The purple heart of photosynthesis. *Nature.* 508(7495): 196—197.
70. Conrad R. and Schlegel H.G, (1974) Different pathways for fructose and glucose utilization in *Rhodospseudomonas capsulata* and demonstration of 1-phosphofructokinase in phototrophic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 358: 221-225.
71. Cozzone A.J., (1998) Regulation of acetate metabolism by protein phosphorylation in Enteric bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 52:127–64.
72. Dangel A. W., Gibson J. L., Janssen A. P. and Tabita F. R. (2005) Residues that influence *in vivo* and *in vitro* CbbR function in *Rhodobacter sphaeroides* and identification of a specific region critical for co-inducer recognition. *Mol. Microbiol.* 57:1397–1414.
73. Dey S., North J.A., Sriram J., Evans B.S., Tabita F.R. (2015) In Vivo Studies in *Rhodospirillum rubrum* Indicate That Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) Catalyzes Two Obligatorily Required and Physiologically Significant Reactions for Distinct Carbon and Sulfur Metabolic Pathways. *J Biol Chem.* 290(52):30658-68.
74. Dixon G.H., Kornberg H.L. (1959) Assay methods for key enzymes of glyoxylate cycle. *Biochem. J.* 72(1):3.
75. Drevland R.M., Waheed A., Graham D.E. (2007) Enzymology and evolution of the pyruvate pathway to 2-oxobutyrate in *Methanocaldococcus jannaschii*. *J. Bacteriol.* 189:4391-4400.
76. Driscoll B., Lunceford C., Lin S., Woronowicz K., Niederman R.A. and Woodbury N.W. (2014) Energy transfer properties of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores during adaptation to low light intensity. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16:17133.
77. Du S., Bird T.H. and Bauer C.E. (1998) DNA binding characteristics of RegA\*. A constitutively active anaerobic activator of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Biol. Chem.* 273:18509–18513.
78. Dubbs P., Dubbs J.M. and Tabita F.R. (2004) Effector-mediated interaction of CbbRI and CbbRII regulators with target sequences in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 186:8026–8035.
79. Dubbs J.M. and Tabita F.R. (2004) Regulators of nonsulfur purple phototrophic bacteria and the interactive control of CO<sub>2</sub> assimilation, nitrogen fixation, hydrogen metabolism and energy generation. *FEMS Microbiol. Rev.* 28:353–376.
80. Duggan D.J., Bittner M., Chen Y., Meltzer P., Trent J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.* 21(1 Suppl):10-4.

81. Dunstan R.H., Kelley B.C., Nicholas D.J.D. (1982). Fixation of dinitrogen derived from denitrification of nitrate in a photosynthetic bacterium, *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans. J. Bacteriol. 150:100-104.
82. Ehrenreich A., Widdel F. (1994) Anaerobic oxidation of ferrous iron by purple bacteria, a new type of phototrophic metabolism. Appl Environ Microbiol. 60:4517– 4526.
83. Eidels L., and Preiss J. (1970) Carbohydrate metabolism in *Rhodopseudomonas capsulata*: enzyme titers, glucose metabolism, and polyglucose polymer synthesis. Arch. Biochem. Biophys. 140:75–89.
84. Eidels L. and Preiss J. (1970) Citrate synthase. A regulatory enzyme from *Rhodopseudomonas capsulata*. J. Biol. Chem. 245: 2937-2945.
85. Ellis L.B., Roe D., Wackett L.P. (2006) The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: the first decade. Nucleic Acids Res. 34: No Database issue. P. D517-21.
86. El-Mansi E.M.T., Nimmo H.G., Holms W.H. (1985) The role of isocitrate in control of the phosphorylation of isocitrate dehydrogenase in *Escherichia coli* ML308. FEBS Lett. 183:251–55.
87. Elsen S., Dischert W., Colbeau A. and Bauer C.E. (2000) Expression of uptake hydrogenase and molybdenum nitrogenase in *Rhodobacter capsulatus* is coregulated by the RegB-RegA two-component regulatory system. J. Bacteriol. 182:2831–2837.
88. Elsen S., Swem L.R., Swem D.L. and Bauer C.E. (2004) RegB/RegA, a highly conserved redox-responding global two-component regulatory system. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68:263–279.
89. Erb T.J., Berg I.A., Brecht V., Müller M., Fuchs G., Alber B.E. (2007) Synthesis of C5-dicarboxylic acids from C2-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. Proc Natl Acad Sci USA. 104(25):10631-6.
90. Erb T.J., Frerichs-Revermann L., Fuchs G. and Alber B.E. (2010) The apparent malate synthase activity of *Rhodobacter sphaeroides* is due to two paralogous enzymes, (3S)-Malyl-coenzyme A (CoA)/ $\beta$ -methylmalyl-CoA lyase and (3S)-Malyl-CoA thioesterase, J. Bacteriol., 192:1249–1258.
91. Evans M.C.W., Buchanan B.B., Arnon D.I. (1966a) A new ferredoxin-dependent carbon reduction cycle in a photosynthetic bacterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 55(4): 928-934.
92. Falcone D.L., Quivey R.G. and Tabita F.R. (1988) Transposon mutagenesis and physiological analysis of strains containing inactivated form I and form II ribulose

- bisphosphate carboxylase/oxygenase genes in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 170:5-11.
93. Favinger J., Stadtwald R., Gest H. (1989) *Rhodospirillum centenum*, sp. nov., a thermotolerant cyst-forming anoxygenic photosynthetic bacterium. Antonie Van Leeuwenhoek. 55(3): 291-296.
  94. Feng X., Bandyopadhyay A., Berla B., Page L., Wu B., Pakrasi H.B. and Tang Y.J. (2010) The citramalate pathway in isoleucine biosynthesis. Microbiology. 156: 596–602.
  95. Filatova L.V., Berg I.A., Krasil'nikova E.N., Tsygankov A.A., Laurinavichene T.V. and Ivanovsky R.N. (2005) A Study of the Mechanism of Acetate Assimilation in Purple Nonsulfur Bacteria Lacking the Glyoxylate Shunt: Acetate Assimilation in *Rhodobacter sphaeroides*. Microbiology. 74: 265–269.
  96. Filatova L.V., Berg I.A., Krasil'nikova E.N., Ivanovsky R.N. (2005a) A Study of the Mechanism of Acetate Assimilation in Purple Nonsulfur Bacteria Lacking the Glyoxylate Shunt: Enzymes of the Citramalate Cycle in *Rhodobacter sphaeroides*. Microbiology. 74(3): 270-278.
  97. Francke C., Siezen R.J., Teusink B. (2005) Reconstructing the metabolic network of a bacterium from its genome. Trends Microbiol. 13(11): 550-8.
  98. Garaizar J., Rementeria A., Porwollik S. (2006) DNA microarray technology: a new tool for the epidemiological typing of bacterial pathogens? FEMS Immunol Med Microbiol. 47(2): 178-189.
  99. Garland D., Nimmo H.G. (1984) A comparison of the phosphorylated and unphosphorylated forms of isocitrate dehydrogenase from *Escherichia coli* ML308. FEBS Lett. 165:259–64.
  100. Garnak M., Reeves H.C. (1979a) Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. Science 203:1111–12.
  101. Garnak M., Reeves H.C. (1979b) Purification and properties of phosphorylated isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 254:7915–20.
  102. Geerse R.H., Izzo F., Postma P.W. (1989a) The PEP: fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*: FPr combines enzyme III Fru and pseudo-HPr activities. Mol. Gen. Genet. 216:517–25.
  103. Geerse R.H., Van der Pluijm J., Postma P.W. (1989b) The repressor of the PEP: fructose phosphotransferase system is required for the transcription of the pps gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 218:348–52.

104. Geiser E., Przybilla S.K., Friedrich A., Buckel W., Wierckx N., Blank L.M. and Bölker M. (2016) *Ustilago maydis* produces itaconic acid via the unusual intermediate *trans*-aconitate. *Microb Biotechnol.* 9(1): 116-126.
105. Gibson J.L. and Tabita F.R. (1977) Isolation and preliminary characterization of two forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 132: 818-823.
106. Gibson J.L. and Tabita F.R. (1993) Nucleotide sequence and functional analysis of *CbbR*, a positive regulator of the Calvin cycle operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 175:5778–5784.
107. Gill S.R., Paula J. Fedorka-Cray, Rodney K. Tweten, Bayard P. Sleeper (1984) Purification and properties of the carbonic anhydrase of *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Microbiology* 138(2): 113-118.
108. Glaeser J., Overmann J. (1999) Selective enrichment and characterisation of *Roseospirillum parvum*, gen. nov. and sp. nov., a new purple nonsulfur bacterium with unusual light absorption properties. *Arch. Microbiol.* 171:405-416.
109. Codd G.A., Kuenen J.G. (1987) Physiology and biochemistry of autotrophic bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53:3–14.
110. Gomelsky M., Kaplan S. (1995) Genetic evidence that PpsR from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 functions as a repressor of *puc* and *bchF* expression. *J Bacteriol.* 177: 1634–1637.
111. Gould T.A., Langemheen H. Van De, Muñoz-Elías E.J., McKinney J.D. and Sacchettini J.C. (2006) Dual role of isocitrate lyase 1 in the glyoxylate and methylcitrate cycles in *Mycobacterium tuberculosis*, *Mol. Microbiol.* 61: 940–947.
112. Gray C.T., Kornberg H.L. (1960) Enzymic formation of citramalate from acetyl-coenzyme A and pyruvate in *Pseudomonas ovalis* Chester, catalysed by "pyruvate transacetase". *Biochim. Biophys. Acta* 42: 371-372.
113. Gregor J., Klug G. (1999) Regulation of bacterial photosynthesis genes by oxygen and light. *FEMS Microbiol Lett.* 179: 1-9.
114. Grishin N.V. (1995) Estimation of the number of amino acid substitutions per site when the substitution rate varies among sites. *J Mol Evol.* 41(5): 675-9.
115. Hansen T.A., Gernerden H. (1972) Sulfide utilization by nonsulfur bacteria. *Arch. Mikrobiol.* 86: 49-56.
116. Hansen T.A. and Imhoff J.F. (1985) *Rhodobacter veldkampii*, a new species of phototrophic purple nonsulfur bacteria. *Intl J Syst Bacteriol.* 35: 115–116.
117. Heider J. (2001) Minireview A new family of CoA-transferases, *FEBS Lett.*, 509: 345–349.

118. Heinemann M., Sauer U. (2010) Systems biology of microbial metabolism. *Curr Opin Microbiol.* 13(3): 337-43.
119. Herter S., Busch A. and Fuchs G. (2002) L-Malyl-coenzyme A lyase/beta-methylmalyl-coenzyme A lyase from *Chloroflexus aurantiacus*, a bifunctional enzyme involved in autotrophic CO<sub>2</sub> fixation. *J. Bacteriol.* 184: 5999–6006.
120. Hillmer P., Gest H. (1977) H<sub>2</sub> metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*: H<sub>2</sub> production by growing cultures. *J. Bacteriol.* 129:724–731.
121. Holmes P.A. (1995) Applications of PHB-A microbially produced biodegradable thermoplastics, *Phys. Technol.* 16: 32-36.
122. Horne I.M., Pemberton J.M., McEwan A.G. (1996) Photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides* is regulated by redox changes which are linked to electron transport. *Microbiology.* 142: 2831-2838.
123. Horswill A.R. and Escalante-Semerena J. (2001) In vitro conversion of propionate to pyruvate by *Salmonella enterica* enzymes: 2-Methylcitrate dehydratase (PrpD) and aconitase enzymes catalyze the conversion of 2-methylcitrate to 2-methylisocitrate. *Biochem. (N. Y.).* 40: 4703–4713.
124. Hsieh Y.J. and Kolattukudy P.E. (1994) Inhibition of erythromycin synthesis by disruption of malonyl-coenzyme A decarboxylase gene eryM in *Saccharopolyspora erythraea*. *J. Bacteriol.* 176: 714–724.
125. Huber H., Gallenberger M., Jahn U., Eylert E., Berg I.A., Kockelkorn D., Eisenreich W. and Fuchs G. (2008) A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105: 7851–7856.
126. Hughes T.R., Mao M., Jones A.R., Burchard J., Marton M.J., Shannon K.W., Lefkowitz S.M., Ziman M., Schelter J.M., Meyer M.R., Kobayashi S., Davis C., Dai H., He Y.D., Stephanians S.B., Cavet G., Walker W.L., West A., Coffey E., Shoemaker D.D., Stoughton R., Blanchard A.P., Friend S.H., Linsley P.S. (2001) Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer. *Nat Biotechnol.* 19(4):342-7.
127. Hügler M., Wirsen C.O., Fuchs G., Taylor C.D. and Sievert S.M. (2005) Evidence for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation via the reductive tricarboxylic acid cycle by members of the  $\epsilon$  subdivision of proteobacteria. *J Bacteriol* 187: 3020–3027.
128. Imhoff J.F. (2001) True marine and halophilic anoxygenic phototrophic bacteria. *Arch Microbiol.* 176: 243–254.

129. Iuchi S., Lin E.C.C. (1988) *arcA* (*dye*), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:1888–92.
130. Iuchi S., Cameron D.C., Lin E.C.C. (1989) A second global regulator gene (*arcB*) mediating repression of enzymes in aerobic pathways of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 171:868–73.
131. Ivanovsky R.N., Krasilnikova E.N., Berg I.A. (1997) A proposed citramalate cycle for acetate assimilation in the purple non-sulfur bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 153: 399-404.
132. James P. (1997) Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Q Rev Biophys.* 30: 279-331.
133. Jingnan L.U., Ryan C. Tappel and Christopher T. Nomura (2009) Mini-Review: Biosynthesis of Poly(hydroxyalkanoates). *Journal of Macromolecular Science R , Part C: Polymer Reviews*, 49:226–248.
134. Jitrapakdee S., Wallace J.C. (1999) Structure, function and regulation of pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 340:1–16.
135. Joshi H.M. and Tabita F.R. (1996) A global two component signal transduction system that integrates the control of photosynthesis, carbon dioxide assimilation, and nitrogen fixation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:14515– 14520.
136. Joshi G.S., Simona Romagnoli, Nathan C. VerBerkmoes, Robert L. Hettich, Dale Pelletier and F. Robert Tabita (2009) Differential Accumulation of Form I RubisCO in *Rhodopseudomonas palustris* CGA010 under Photoheterotrophic Growth Conditions with Reduced Carbon Sources. *Journal of Bacteriology.* 191: 4243–4250.
137. Jozefczuk S., Klie S., Catchpole G., Szymanski J., Cuadros-Inostroza A., Steinhauser D., Selbig J., Willmitzer L. (2010) Metabolomic and transcriptomic stress response of *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol.* 6(364): 1-18.
138. Kanehisa M., Goto S., Sato Y., Furumichi M. and Tanabe M. (2012) KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 40: D109–114.
139. Kanao T., Fukui T., Atomi H. and Imanaka T. (2001) ATP-citrate lyase from the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* is a heteromeric enzyme composed of two distinct gene products. *Eur J Biochem.* 268: 1670–1678.
140. Kapp L.D., Lorsch J.R. (2004) The molecular mechanics of eukaryotic translation. *Annual Review of Biochemistry.* 73: 657-704.
141. Kaplan A., Reinhold L. (1999) CO<sub>2</sub> concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50:539–570.

142. Karp P.D., Paley S., Romero P. (2002) The Pathway Tools software. *Bioinformatics*. 18: Suppl 1, (P): S225-32.
143. Kato Y. and Asano Y. (1997) 3-Methylaspartate ammonia-lyase as a marker enzyme of the mesaconate pathway for (S)-glutamate fermentation in *Enterobacteriaceae*, *Arch. Microbiol.* 168: 457–463.
144. Khomyakova M., Özlem Bükmez, Thomas L.K., Erb T.J., Berg I.A. (2011) A Methylaspartate Cycle in *Haloarchaea*. *Science*. 331: 334-337.
145. Kondratieva E.N. (1979) Interrelation between modes of carbon assimilation and energy production in phototrophic purple and green bacteria. In *International Review of Biochemistry, Microbial Biochemistry*. 21: 117-175. Edited by J. R. Quayle. Baltimore: University Park Press.
146. Kondratieva E.N., Ivanovsky R.N., Krasilnikova E.N. (1981) Light and dark metabolism in purple sulfur bacteria. In: Skulachev V.P. (ed) *Soviet Science Review*. IPC Science and Technology Press, Guilford, England, New York, pp. 325-364.
147. Kornberg H.L. and Krebs H.A. (1957) Synthesis of cell constituents from C<sub>2</sub>-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature*. 179: 988–991.
148. Kornberg H.L. and Lascelles J. (1960) The formation isocitratase by the athiorhodaceae. *J. Gen. Microbiol.* 23: 511-517.
149. Korotkova N., Lindstrom E. (2001) Connection between poly- $\beta$ -hydroxyalkanoate biosynthesis and growth on C<sub>1</sub> and C<sub>2</sub> compounds in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *J. Bacteriol.* 183: 1038-1046.
150. Korotkova N., Chistoserdova L., Kuksa V., Lidstrom M.E. (2002) Glyoxylate regeneration pathway in the methylotroph *Methylobacterium extorquens* AM1. *J Bacteriol.* 184(6): 1750-8.
151. Kranz R.G., Gabbert K.K., Locke T.A. and Madigan M. T. (1997a) Polyhydroxyalkanoate Production in *Rhodobacter capsulatus* : genes, mutants, expression, and physiology. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(8): 3003-3009.
152. Kronen M. and Berg I.A. (2015) Meseconase/Fumarase FumD in *Escherichia coli* O157:H7 and Promiscuity of *Escherichia coli* Class I Fumarases FumA and FumB, *PLoS ONE*, 10, e0145098.
153. Kulichevskaya I.S., Gusev V.S., Gorlenko M.V., Liesack W., Dedysh S.N. (2006) *Rhodoblastus sphagnicola* sp. nov., a novel acidophilic purple non-sulfur bacterium from Sphagnum peat bog. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56: 1397-1402.

154. Kummel A., Panke S., Heinemann M. (2006) Systematic assignment of thermodynamic constraints in metabolic network models. *BMC Bioinformatics*. 7(512): 312-20.
155. Kusian B. and Bowien B. (1997) Organization and regulation of *cbb* CO<sub>2</sub> assimilation genes in autotrophic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 21: 135– 155.
156. Lakshmi T.M., Helling R.B. (1978) Acetate metabolism in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 24: 149–53.
157. Lang A.S. and Beatty T.J. (2001) The gene transference agent of *Rhodobacter capsulatus* and “constitutive transduction” in prokaryotes. *Arch Microbiol.* 175: 241–249.
158. LaPorte D.C., Koshland D.E. Jr. (1982) A protein with kinase and phosphatase activities involved in regulation of tricarboxylic acid cycle. *Nature*. 300: 458–60.
159. LaPorte D.C., Koshland D.E. Jr. (1983) Phosphorylation of isocitrate dehydrogenase as a demonstration of enhanced sensitivity in covalent regulation. *Nature*. 305:286–90.
160. Laurinavichene T.V., Tekucheva D.N., Laurinavichius K.S., Ghirardi M.L., Seibert M. and Tsygankov A.A. (2008) Towards the integration of dark and photo fermentative waste treatment. 1. Hydrogen photoproduction by purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* using potential products of starch fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy*. 33: 7020–7026.
161. Lebedeva N.V., Malinina N.V. and Ivanovsky R.N. (2002) A Comparative Study of the Isocitrate Dehydrogenases of *Chlorobium limicola* forma thiosulfatophilum and *Rhodospseudomonas palustris*. *Microbiology*. 71(6): 657–661.
162. Leroy B., Meur De Q., Moulin C., Wegria G. and Wattiez R. (2015) New insight into the photoheterotrophic growth of the isocitrate lyase-lacking purple bacterium *Rhodospirillum rubrum* on acetate. *Microbiology*. 161: 1061-1072.
163. Ljungdahl L.G. (1986) The autotrophic pathway of acetate synthesis in acetogenic bacteria. *Annu.Rev.Microbiol.* 40: 415–450.
164. Lowry O.H., Rosenbrough W.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1963) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193: 265-275.
165. Ma H., Zeng A.P. (2003) Reconstruction of metabolic networks from genome data and analysis of their global structure for various organisms. *Bioinformatics*. 19(2): 270-7.
166. MacKintosh C. and Nimmo H.G. (1988) Purification and regulatory properties of isocitrate lyase from *Escherichia coli* ML308. *Biochem. J.* 250: 25-31.
167. Madigan M.T. and Gest H. (1978) Growth of a photosynthetic bacterium anaerobically in darkness supported by "oxidant-dependent" sugar fermentation. *Arch. Microbiol.* 117: 119-122.
168. Madigan M.T. and Gest H. (1979) Growth of the photosynthetic bacterium

- Rhodopseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H<sub>2</sub> as the energy source. J. Bacteriol. 137: 524-530.
169. Madigan M.T. (2003) Anoxygenic phototrophic bacteria from extreme environments. Photosynth Res. 76: 157–171.
  170. Marcus E.A., Moshfegh A.P., Sachs G., Scott D.R. (2005) The periplasmic  $\alpha$ -carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. J Bacteriol 187:729–738.
  171. Marrs B.L. (1974) Genetic recombination in *Rhodopseudomonas capsulata*. Proc Natl Acad Sci USA. 71:971–973.
  172. Mas J., Van Gemerden H. (1995) Storage products in purple and green sulfur bacteria // Anoxygenic photosynthetic bacteria / Ed. by R. E. Blankenship, M. T. Madigan, C. E. Bauer. - Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. P. 973-990.
  173. McFadden B.A. and Shively L.M. (1991) in: *Variations in autotrophic life*. (Shively, L.M. and Barton, L.L., eds) Acad. Press, London, pp. 25–49.
  174. McKinlay J.B. and Harwood C.S. (2010) Carbon dioxide fixation as a central redox cofactor recycling mechanism in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 107: 11669–11675.
  175. McKinlay J.B., Oda Y., Ruhl M., Posto A.L., Sauer U. and Harwood C.S. (2014) Non-growing *Rhodopseudomonas palustris* increases the hydrogen gas yield from acetate by shifting from the glyoxylate shunt to the tricarboxylic acid cycle. The Journal of biological chemistry, 289(4): 1960-1970.
  176. Medová H. (2013) Phototrophic microorganisms in extreme environments. Ph.D. Thesis Series, No. 1. University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic, pp.123.
  177. Meister M., Saum S., Alber B.E. and Fuchs G. (2005) L-Malyl-Coenzyme A/  $\beta$ -Methylmalyl-Coenzyme A Lyase Is Involved in Acetate Assimilation of the Isocitrate Lyase-Negative Bacterium *Rhodobacter capsulatus*. Journal of bacteriology. 1415–1425.
  178. Molina I., Pellicer M.T., Badia J., Aguilar J., Baldoma L. (1994) Molecular characterization of *Escherichia coli* malate synthase G: differentiation with the malate synthase A isoenzyme. Eur. J. Biochem. 224:541–48.
  179. Muller F.M. (1933) On the metabolism of the purple sulfur bacteria in organic media. Arch. Mikrobiol. 4:131–166.
  180. Neutzling O., Imhoff J.F., Truper H.G. (1984) *Rhodopseudomonas adriatica* sp. nov., a new species of the *Rhodospirillaceae*, dependent on reduced sulfur compounds. Arch. Microbiol. 137: 256-261.

181. Niederman R.A. (2013) Membrane development in purple photosynthetic bacteria in response to alterations in light intensity and oxygen tension. *Photosynthesis Research*. 116(2-3). 333-348.
182. Nielsen A.M., Rampsch B.J., Sojka G.A. (1979a) Regulation of isocitrate lyase in a mutant of *Rhodospseudomonas capsulate*. *Arch. Microbiol.* 120(1): 43-46.
183. Nielsen A.M., Rampsch B.J., Sojka G.A. (1979b) Photoheterotrophic utilization of acetate by the wild type and an acetate-adapted mutant of *Rhodospseudomonas capsulate*. *Arch. Microbiol.* 120: 39-42.
184. Nimmo G.A., Nimmo H.G. (1984) The regulatory properties of isocitrate dehydrogenase kinase and isocitrate dehydrogenase phosphatase from *Escherichia coli* ML308 and the roles of these activities in the control of isocitrate dehydrogenase. *Eur. J. Biochem.* 141:409–14.
185. Niwa, S., Yu L.J., Takeda K., Hirano Y., Kawakami T., Wang-Otomo Z.Y., Miki K (2014) Structure of the LH1-RC complex from *Thermochromatium tepidum* at 3.0 Å. *Nature*. 508(7495): 228–232.
186. Nuiry I.I. and Cook P.F. (1985) The pH dependence of the reductive carboxylation of pyruvate by malic enzyme, *Biochim Biophys Acta*, 829: 295–298.
187. Ormerod J.G., Ormerod S.K., Gest H. (1961) Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of hydrogen by photosynthetic bacteria: relationship with metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 64: 449-463.
188. Osterman A., Overbeek R. (2003) Missing genes in metabolic pathways: a comparative genomics approach. *Curr Opin Chem Biol.* 7(2): 238-51.
189. Ornston L.N., Ornston M.K. (1969) Regulation of glyoxylate metabolism in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 98: 1098–108.
190. Paoli G.C., Morgan N.S., Tabita F.R. and Shively J.M. (1995) Expression of the *cbbLcbbS* and *cbbM* genes and distinct organization of the *cbb* Calvin cycle structural genes of *Rhodobacter capsulatus*. *Arch. Microbiol.* 164:396– 405.
191. Paoli G.C., Vichivanives P., and Tabita F.R. (1998) Physiological control and regulation of the *Rhodobacter capsulatus* *cbb* operons. *J. Bacteriol.* 180:4258–4269.
192. Pellicer M.T., Badía J., Aguilar J., Baldomà L. (1996) *glc* locus of *Escherichia coli*: characterization of genes encoding the subunits of glycolate oxidase and the *glc* regulator protein. *J Bacteriol.* 178(7): 2051-9.
193. Peyraud R., Kiefer P., Christen P., Massou S., Portais J.C., Vorholt J.A. (2009) Demonstration of the ethylmalonyl-CoA pathway by using <sup>13</sup>C metabolomics. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(12): 4846-51.

194. Pfennig N. (1969) *Rhodopseudomonas acidophila*, sp. n., a new species of the budding purple nonsulfur bacteria. J Bacteriol. 99: 597–602.
195. Pfennig N. (1974) *Rhodopseudomonas globiformis*, sp. n., a new species of the Rhodospirillaceae. Arch Microbiol. 100: 197–206.
196. Pohlmann A., Fricke W.F., Reinecke F., Kusian B., Liesegang H., Cramm R., Eitinger T., Ewering C., Pötter M., Schwartz E., Strittmatter A., Voss I., Gottschalk G., Steinbüchel A., Friedrich B., Bowien B. (2006) Genome sequence of the bioplastic-producing “Knallgas” bacterium *Ralstonia eutropha* H16. Nat Biotechnol 24: 1257–1262.
197. Price G.D., Sultemeyer D., Klughammer B., Ludwig M., Badger M.R. (1998) The functioning of the CO<sub>2</sub> concentrating mechanism in several cyanobacterial strains - a review of general physiological characteristics, genes, proteins, and recent advances. Can J Bot 76:973–1002.
198. Puskás L.G., Inui M., Zahn K., Yukawa H. (2000) A periplasmic, alpha-type carbonic anhydrase from *Rhodopseudomonas palustris* is essential for bicarbonate uptake. Microbiology. 146( Pt 11): 2957-66.
199. Qian P., Papiz M.Z., Jackson P.J., Brindley A.A., Ng I.W., Olsen J.D., Dickman M.J., Bullough P.A., Hunter C.N. (2013) Three-dimensional structure of the *Rhodobacter sphaeroides* RC-LH1-PufX complex: dimerization and quinone channels promoted by PufX. Biochemistry 52, 7575–7585.
200. Qian Y. and Tabita F.R. (1996) A global signal transduction system regulates aerobic and anaerobic CO<sub>2</sub> fixation in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 178: 12–18.
201. Ramseier T.M., Bledig S., Michotey V., Feghali R., Saier M.H. Jr. (1995) The global regulatory protein, FruR, modulates the direction of carbon flow in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 16: 1157–69.
202. Rao G.R., McFadden B.A. (1965) Isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. IV. Specificity and inhibition. Arch. Biochem. Biophys. 12: 294-303.
203. Reddy C.S.K., Ghai R., Rashmi, V.C. Kalia (2003) Polyhydroxyalkanoates: an overview. Bioresource technology. 87: 137-146.
204. Recchia P. A., Davis C.M., Liburn T.G., Beatty J.T., Parkes-Loach P.S., Hunter C.N. and Loach P.A. (1998) Isolation of the PufX protein from *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*: Evidence for its interaction with the apolypeptide of the core light-harvesting complex. Biochemistry. 37: 11055–11063.
205. Ren Q., Kang K.H., Paulsen I.T. (2004) TransportDB: a relational database of cellular membrane transport systems. Nucleic Acids Res. 32(Database issue): D284-8.

206. Resnick S.M and Madigan M.T. (1989) Isolation and characterization of a mildly thermophilic non-sulfur purple bacterium containing bacteriochlorophyll *b*. FEMS Microbiol Lett 65: 165-170.
207. Richardson D.J., King G.F., Kelly D.J., McEwan A.G., Ferguson S.J., Jackson J.B. (1988) The role of auxillary oxidants in maintaining redox balance during photoheterotrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. Arch Microbiol. 150:131–137.
208. Richter A., Schwager C., Hentze S., Ansorge W., Hentze M.W., Muckenthaler M. (2002) Comparison of fluorescent tag DNA labeling methods used for expression analysis by DNA microarrays. Biotechniques. 33(3): 620-8, 630.
209. Risso C., Van Dien S.J., Orloff A., Lovley D.R., and Coppi M.V. (2008) Elucidation of an alternate isoleucine biosynthesis pathway in *Geobacter sulfurreducens*. J. Bacteriol. 190: 2266–2274.
210. Romagnoli S. and Tabita F.R. (2006) A novel three-protein two-component system provides a regulatory twist on an established circuit to modulate expression of the *cbbI* region of *Rhodospseudomonas palustris* CGA010. J. Bacteriol. 188: 2780–2791.
211. Roszak A. W., Howard T.D., Southall J., Gardiner A.T., Law C.J., Isaacs N.W., Cogdell R.J. (2003) Crystal structure of the RC-LH1 core complex from *Rhodospseudomonas palustris*. Science. 302(5652): 1969–1972.
212. Roszak A.W., Moulisová V., Reksodipuro A.D., Gardiner A.T., Fujii R., Hashimoto H., Isaacs N.W., Cogdell R.J. (2012) New insights into the structure of the reaction centre from *Blastochloris viridis*: evolution in the laboratory. Biochem J. 442(1): 27-37.
213. Saghatelian A., Cravatt B.F. (2005) Discovery metabolite profiling--forging functional connections between the proteome and metabolome. Life Sci. 77(14): 1759-66.
214. Saier M.H., Ramseier T.M., Reizer J. (1996) Regulation of carbon utilization. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, ed. FC Neidhardt, 1:1325–43. Washington, DC: ASM. 2nd ed.
215. Saiki R.K., Bugawan T.L., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature. 324(6093): 163-6.
216. Saito N., Robert M., Kitamura S., Baran R., Soga T., Mori H., Nishioka T., Tomita M. (2006) Metabolomics approach for enzyme discovery. J Proteome Res. 5(8): 1979-87.
217. Sarles L.S., Tabita F.R. (1983) Derepression of the synthesis of D-ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from *Rhodospirillum rubrum*. J. Bacteriol. 153: 458-464.

218. Satoh T., Hoshino Y., Kitamura H. (1976) *Rhodopseudomonas sphaeroides* forma sp. denitrificans, a denitrifying strain as a subspecies of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Archives of Microbiology. 108(3): 265-269.
219. Sattley W.M. and Madigan M.T. (2006) Isolation, Characterization, and Ecology of Cold-Active, Chemolithotrophic, Sulfur-Oxidizing Bacteria from Perennially Ice-Covered Lake Fryxell, Antarctica. Appl Environ Microbiol. 72(8): 5562–5568.
220. Seifert E. and Pfennig N.F. (1979) Chemoautotrophic growth of *Rhodopseudomonas* species with hydrogen and chemotrophic utilization of methanol and formate. Archiv Microbiol. 122: 177-182.
221. Sevinc P., Gunduz U., Eroglu I., Yucel M. (2012) Kinetic analysis of photosynthetic growth, hydrogen production and dual substrate utilization by *Rhodobacter capsulatus*. International Journal Of Hydrogen Energy. 37: 1643016436.
222. Schobert P. and Bowien B. (1984) Unusual C3 and C4 metabolism in the chemoautotroph *Alcaligenes eutrophus*. J. Bacteriol. 159: 167–172.
223. Schultz J.F. and Weaver P.F. (1982) Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. J. Bacteriol. 149: 181-190.
224. Shih P.M., Zarzycki J., Niyogi K.K. and Kerfeld C.A. (2014) Introduction of a Synthetic CO<sub>2</sub>-fixing Photorespiratory Bypass into a Cyanobacterium. The Journal of Biological Chemistry. 289(14): 9493–9500.
225. Shimizu S., Ueda S., Sato K. (1984) Physiological role of vitamin B12 in a methanol utilising bacterium, *Protaminobacter rubber*. Microbial growth on C1 compounds / Ed. by R. L. Crawford, R. S. Hanson. - Washington, DC: American Society for Microbiology. 1984. - P. 113-117.
226. Shively J.M., Davidson E. and Marrs B.L. (1984) Depression of the synthesis of the intermediate and large forms of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxy- genase in *Rhodopseudomonas capsulata*. Arch. Microbiol. 138: 233-236.
227. Shively J. M., Van Keulen G. and Meijer W.G. (1998) Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. Annu. Rev. Microbiol. 52: 191–230.
228. Singh J., Tabita F.R. (2010) Roles of RubisCO and the RubisCO-like protein in 5-methylthioadenosine metabolism in the Nonsulfur purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. J Bacteriol. 192(5): 1324-31.
229. Sganga M. W. and Bauer C. E. (1992) Regulatory factors controlling photosynthetic reaction center and light-harvesting gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. Cell. 68: 945–954.

230. Smejkalová H., Erb T.J., Fuchs G. (2010) Methanol assimilation in *Methylobacterium extorquens* AM1: demonstration of all enzymes and their regulation. PLoS One. 2010 Oct 1; 5(10).
231. Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G. (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. Anal Chem. 78(3): 779-87.
232. Smith K.S., Jakubzick C., Whittam T.S. and Ferry J.G. (1999) Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. PNAS. 96(26): 15184-15189.
233. Smith K.S., Ferry J.G. (2000) Prokaryotic carbonic anhydrases. FEMS Microbiol Rev 24:335–366.
234. Smith S.A. and Tabita F.R. (2002) Up-regulated expression of the *cbbI* and *cbbII* operons during photoheterotrophic growth of a ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase deletion mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 184:6721–6724.
235. Statwald-Demchick R., Turner R.F., Gest H. (1990) *Rhodopseudomonas cryptolactis*, sp. nov., a new thermotolerant species of budding phototrophic purple bacteria. FEMS Microbiol Lett, 71: 117–121.
236. Steinbuchel A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M.H., Mayer, F., Pieper-Fürst, U., Pries, A., Valentin, H.E., Wieczorek, R. (1995) Considerations of the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. Can. J. Microbiol. 41: 94–105.
237. Strauss G. Fuchs G. (1993) Enzymes of a novel autotrophic CO<sub>2</sub> fixation pathway in the phototrophic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*, the 3-hydroxypropionate cycle. Eur. J. Biochem. 215(3): 633-643.
238. Steiger M.G., Blumhoff M.L., Mattanovich D. and Sauer M. (2013) Biochemistry of microbial itaconic acid production. Front Microbiol. 4: 23.
239. Strnad H., Lapidus A., Paces J., Ulbrich P., Vlcek C., Paces V., Haselkorn R. (2010) Complete Genome Sequence of the Photosynthetic Purple Nonsulfur Bacterium *Rhodobacter capsulatus* SB 1003 J Bacteriol. 192(13): 3545-3546.
240. Stueland C.S., Eck K.R., Stieglbauer K.T., LaPorte D.C. (1987) Isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase exhibits an intrinsic adenosine triphosphatase activity. J. Biol. Chem. 262: 16095–99.
241. Sudesh K., Abe H., Doi Y. (2000) Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog. Polym. Sci. 25: 1503–1555.

242. Sudesh K. (2004) Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): an emerging biomaterial for tissue engineering and therapeutic applications. *Med. J. Malaysia*. 59 Suppl B: 55–56.
243. Suzuki S., Osumi T. and Katsuki H. (1977) Properties and metabolic role of mesaconate hydratase of an aerobic bacterium. *J. Biochem.* 81: 1917–1925.
244. Tabita F.R. (1988). Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 52: 155-189.
245. Tabita F.R., Hanson T.E., Li H., Satagopan S., Singh J. and Chan S. (2007) Function, Structure, and Evolution of the RubisCO-Like Proteins and Their RubisCO Homologs. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71(4): 576–599.
246. Takai K., Campbell B.J., Cary S.C., Suzuki M., Oida H., Nunoura T., Hirayama H., Nakagawa S., Suzuki Y., Inagaki F., Horikoshi K. (2005) Enzymatic and genetic characterization of carbon and energy metabolism by deepsea hydrothermal chemolithoautotrophic isolates of epsilonproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* 71: 7310–7320.
247. Tang K.H., Tang Y.J., Blankenship R.E. (2011) Carbon metabolic pathways in phototrophic bacteria and their broader evolutionary implications. *Frontiers in Microbiology*, 2: article 165, doi: 10.3389/fmicb.2011.00165.
248. The UniProt Consortium (2015) UniProt: a hub for protein information, *Nucleic Acids Res.*, 43: D204–212.
249. Tholozan J.L., Samain E., Grivet J.P., Albagnac G. (1990) Propionate metabolism in a methanogenic enrichment culture. Direct reductive carboxylation and acetogenesis pathway. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73: 291-298.
250. Tian W. and Skolnick J. (2003) How Well is Enzyme Function Conserved as a Function of Pairwise Sequence Identity? *J. Mol. Biol.* 333: 863–882.
251. Tichi M.A. and Tabita F.R. (2002) Metabolic signals that lead to control of CBB gene expression in *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bacteriol.* 184:1905–1915.
252. Tsygankov A.A., Laurinavichene T.V., and Gogotov I.N. (1994) Laboratory scale photobioreactor. *Biotechnol. Tech.* 8: 575-578.
253. Tsygankov A.A. and Laurinavichene T.V. (1996) Influence of the degree and mode of light limitation on growth characteristics of the *Rhodobacter capsulatus* continuous cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 51: 605–612.
254. Tsygankov A.A., Fedorov A.S., Laurinavichene T.V., Gogotov I.N., Rao K.K. and Hall D.O. (1998) Actual and potential rates of hydrogen photoproduction by continuous culture of the purple non-sulphur bacterium *Rhodobacter capsulatus*, *Appl. Microbiol Biotechnol.*,

- 49: 102–107.
255. Uchino K., Saito T., B., G., Jendrossek D. (2007) Isolated poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from acetyl coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to acetyl-CoA. *J. Bacteriol.* 189: 8250–8256.
  256. Ueda S., Sato K., Shimizu S. (1981) Glyoxylate formation from mesaconyl-CoA and its related reactions in a methanol-utilising bacterium, *Protaminobacter rubber*. *Agr. Biol. Chem.* 45(4): 823-830.
  257. Ulbrich P., Strand H., Hejkalova V., Paces J., Paces V. (2002) Genetic Determination of Polyalkanoate Metabolism in *Rba. capsulatus* SB1003. *Folia biologica (Praha)* 48: 157-159.
  258. Utter M.F. and Kolenbrander H.M. (1972) in *The Enzymes*, (Boyer, P.D., ed.), Academic Press, N. Y., VI, pp. 117–170.
  259. Vanderwinkel E. and De Vlieghere M. (1968) Physiologie et g´en´etique de l’isocitritase et des malate synthases chez *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 5:81–90.
  260. Velculescu V.E., Zhang L., Vogelstein B., Kinzler K.W. (1995) Serial analysis of gene expression. *Science.* 270(5235): 484-7.
  261. Vichivanives P., Bird T.H., Bauer C.E. and Tabita F.R. (2000) Multiple regulators and their interactions in vivo and in vitro with the cbb regulons of *Rhodobacter capsulatus*. *J. Mol. Biol.* 300: 1079–1099.
  262. Wahlund T.M. and Tabita F.R. (1997) The reductive tricarboxylic acid cycle of carbon dioxide assimilation: initial studies and purification of ATP-citrate lyase from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum*. *J Bacteriol.* 179: 4859–4867.
  263. Walsh K., Koshland D.E. Jr. (1984) Determination of flux through the branch point of two metabolic cycles: the tricarboxylic acid cycle and the glyoxylate shunt. *J. Biol. Chem.* 259: 9646–54.
  264. Walsh K., Koshland D.E. Jr. (1985) Branch point control by the phosphorylation state of isocitrate dehydrogenase: a quantitative examination of fluxes during a regulatory transition. *J. Biol. Chem.* 260: 8430–37.
  265. Wang D., Zhang Y., Welch E., Li J. and Roberts G.P. (2010) Elimination of Rubisco alters the regulation of nitrogenase activity and increases hydrogen production in *Rhodospirillum rubrum*. *Int.J.Hydrogen Energy.* 35: 7377–7385.
  266. Wang D., Zhang Y., Pohlmann E.L., Li J. and Roberts G.P. (2011) The Poor Growth of *Rhodospirillum rubrum* Mutants Lacking RubisCO Is Due to the Accumulation of Ribulose-1,5-Bisphosphate. *Journal of Bacteriology.* p. 3293–3303.

267. Weaver P.F., Wall J.D. and Gest H. (1975) Characterization of *Rhodopseudomonas capsulata*. Arch. Microbiol. 105: 207–216.
268. Weaver K.E. and Tabita F.R. (1983) Isolation and partial characterization of *Rhodopseudomonas sphaeroides* mutants defective in the regulation of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase. J. Bacteriol. 156: 507-515.
269. Whisstock J.C. and Lesk A.M. (2003) Prediction of protein function from protein sequence and structure. Q. Rev. Biophys. 36: 307–340.
270. Wilkins M.R., Sanchez J.C., Gooley A.A., Appel R.D., Humphery-Smith I., Hochstrasser D.F., Williams K.L. (1996) Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. Biotechnol Genet Eng Rev. 13: 19-50.
271. Williams J.O., Roche T.E., McFadden B.A. (1971) Mechanism of action of isocitrate lyase from *Pseudomonas indigofera*. Biochemistry 10: 384–90.
272. Williams S.F., Martin D.P. (2002) Applications of PHAs in medicine and pharmacy. In Biopolymers, Doi Y., Steinbüchel A., Eds. Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2002; pp 91–127.
273. Willison J.C., Madern D. and Vignais P.M. (1984) Increased photoproduction of hydrogen by non-autotrophic mutants of *Rhodopseudomonas capsulata*. Biochem. J. 219: 593-600.
274. Willison J.C. (1988) Pyruvate and acetate metabolism in the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. J. Gen. Microbiol. 134(9): 2429-2439.
275. Willison J.C. (1993) Biochemical genetics revisited: the use of mutants to study carbon and nitrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 104: 1–38.
276. Winter G., Krömer J.O. (2013) Fluxomics – connecting 'omics analysis and phenotypes. Environmental Microbiology. 15(7): 1901–1916.
277. Witzel F., Goetze J., Ebenhoeh O. (2010) Slow deactivation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase elucidated by mathematical models. FEBS J. 277: 931-950.
278. Wodke J.A., Puchalka J., Lluch-Senar M., Marcos J., Yus E., Godinho M., Gutiérrez-Gallego R., dos Santos V.A., Serrano L., Klipp E., Maier T. (2013) Dissecting the energy metabolism in *Mycoplasma pneumoniae* through genome-scale metabolic modeling. Mol Syst Biol. 9(653): 1-19.
279. Woronowicz K., Olubanjo O.B., Sung H.C., Lamptey J., Niederman R.A. (2012) Differential assembly of polypeptides of the light harvesting 2 complex encoded by distinct operons during acclimation of *Rhodobacter sphaeroides* to low light intensity. Photosynth Res. 111(1-2): 125–138.

280. Yen H.C. and Marrs B. (1976) Map of genes for carotenoid bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J. Bacteriol.* 126: 619–629.
281. Yen H.C., Hu N.T., Marrs B.L. (1979) Characterization of the gene transfer agent made by an overproducer mutant of *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Mol Biol.* 131:157–168.
282. Yilmaz L.S., Kontur W.S., Sanders A.P., Sohmen U., Donohue T.J., Noguera D.R. (2010) Electron Partitioning During Light- and Nutrient-Powered Hydrogen Production by *Rhodobacter sphaeroides*. *BioEnergy Research.* 3(1): 55–66.
283. Zhang Y., Rodionov D.A., Gelfand M.S. and Gladyshev V.N. (2009). Comparative genomic analyses of nickel, cobalt and vitamin B12 utilization. *BMC Genomics.* 10: 78.
284. Zannoni D. (1995) Aerobic and anaerobic electron transport chains in anoxygenic phototrophic bacteria. Editors: Blankenship R.E., Madigan M.T., Bauer C.E. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Advances in Photosynthesis and Respiration.* Dordrecht: Springer, 949-971.
285. Zarzycki J., Brecht V., Müller M. and Fuchs G. (2009) Identifying the missing steps of the autotrophic 3-hydroxypropionate CO<sub>2</sub> fixation cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106(50): 21317–21322.
286. Zarzycki J. and Fuchs G. (2011) Coassimilation of Organic Substrates via the Autotrophic 3-Hydroxypropionate Bi-Cycle in *Chloroflexus aurantiacus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(17): 6181-6188.
287. Zhu Y.S., Hearst J.E. (1986) Regulation of expression of genes for light-harvesting antenna proteins LH-I and LH-II; reaction center polypeptides RC-L, RC-M, and RC-H; and enzymes of bacteriochlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* by light and oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 83: 7613-17.
288. Zinn M., Witholt B., Egli T. (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 53: 5–21.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую благодарность научному руководителю, д.б.н., заведующему лабораторией «Биотехнологии и физиологии фототрофных организмов» (БФФО), директору ИФПБ РАН, Анатолию Анатольевичу Цыганкову, за постановку интересной научной задачи, решению которой посвящена данная работа, за полученные практические знания и навыки грамотной научно-исследовательской работы, за помощь в планировании экспериментов и интерпретации полученных результатов и, конечно же, за строгую экспертизу моих научных утверждений.

От всего сердца благодарю к.б.н., в.н.с. лаборатории БФФО, Татьяну Викторовну Лауринавичене. Критический анализ, который она обеспечивала через свое непревзойденное внимание к деталям, позволил совершенствовать точность рассуждений при представлении мной данных и формулировании выводов. Ее терпение, великодушие и мудрость всегда помогали найти выход из самой трудной ситуации.

Выражаю бесконечную признательность всему коллективу лаборатории БФФО за удивительную атмосферу, сочетающую в себе дружбу, взаимопомощь и научную беседу, которая всегда сопровождается веселыми и продуктивными дискуссиями.

Отдельно хочется поблагодарить рецензентов журнала Биохимия за внимательное отношение и тщательный анализ нашей рукописи, результаты которой составляют значительную часть диссертационной работы. Благодаря одному из них мы нашли и исправили несколько важных недочетов.

Выражаю искреннюю благодарность любимому учителю биологии МБОУ лицей №4 г. Краснодара, Кононовой Ольге Александровне, за организацию интересного и содержательного учебного процесса. А также своим первым преподавателям по специальности, сотрудникам кафедры биохимии и физиологии человека и животных ФГБОУ ВО «КубГУ» г. Краснодара, Марку Тихоновичу Проскурякову и Виктору Викторовичу Хаблюку, которые сделали возможными мои первые шаги в настоящую науку.

Особая благодарность Тукаевой Елене Марсовне за неоценимую помощь и чуткое отношение ко всем членам моей семьи, за бесконечный оптимизм и жизнерадостность, уверенность в успехе, которые мотивировали продолжать научную деятельность в один из нелегких периодов моей жизни.

Выражаю сердечную благодарность супругу, Петушкову Олегу Витальевичу, за бесконечное терпение, понимание и любовь, без каждодневной поддержки которого работа бы не состоялась.

## СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в рецензируемых 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 Пушинская 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 Пушинская 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.