

В. В. Титок, зав. лабораторией ИГиЦ НАН Беларуси; В. Н. Леонтьев, доцент; С. И. Юренкова, вед. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси; С. И. Кубрак, мл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси; В. Г. Лугин, зав. НИЛ ФХМИ; Л. В. Хотылева, гл. науч. сотрудник ИГиЦ НАН Беларуси

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ УГЛЕВОДОВ В КЛЕТКЕ И РОЛЬ САХАРОЗОСИНТАЗЫ, САХАРОЗОФОСФАТСИНТАЗЫ И ИНВЕРТАЗЫ В СИНТЕЗЕ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ

The purpose of the research consisted in studying activity of enzymes which directly participate in a metabolism of saccharose and synthesis of cellulose at the cultivars of long-fibred flax differing on a growing season and productivity. As a stuff for researches cultivars of long-fibred flax (*Linum usitatissimum* L. ssp. *usitatissimum* conv. *elongatum*) a various ecology-geographical and genetical parentage served. Comparative analysis of the activity of major enzymes involved in sucrose metabolism and cellulose biosynthesis was carried out. The revealed intervarietal differences in the activity of the enzymes analyzed can be evidence of a differential activity of cellulose synthesis reactions depending on the genotype of fiber flax accessions under study. It is shown, that the orientation of reactions of a metabolism of saccharose depends on a stage of development of plants and varietal features of long-fibred flax.

Введение. В настоящее время процессы биосинтеза целлюлозы и связанное с ними образование вторичной клеточной стенки изучают на модельных объектах, которыми являются организмы, обладающие определенными особенностями целлюлозного синтеза. К таким объектам относятся целлюлозосодержащие бактерии, цианобактерии, слизневые грибы, некоторые десмидиевые водоросли, из растений – многие технические культуры, в частности хлопчатник и лен.

Лен культурный (*Linum usitatissimum* L.) является удобной модельной системой для фундаментального изучения процессов роста, дифференциации клеток и формирования клеточных стенок. Для этой культуры характерно наличие хорошо развитой флоэмной ткани, состоящей из различных типов клеток, в том числе высокоспециализированных волоконных клеток. Волокна льна – классический пример клеток, метаболизм которых ориентирован на масштабный синтез целлюлозы. В период интенсивного роста стебель льна-долгунца увеличивается в длину на несколько сантиметров в сутки за счет высокой скорости удлинения индивидуальных клеток. Такой интенсивный метаболизм, связанный с высокой скоростью ростовых процессов, и наличие маркерных признаков отдельных стадий развития растений делают лубяные волокна льна наиболее интересным объектом для изучения механизмов роста растительной клетки и их регуляции. Проблемы развития лубяных волокон важны и с практической точки зрения, так как удлинение клетки-волокна и формирование ее клеточных стенок (первичной и вторичной) напрямую связаны с качеством технического волокна, а от количества и строения волоконистых пучков зависят величина и качество урожая льна.

В настоящее время не возникает никаких сомнений относительно важной роли клеточ-

ных стенок в растительном организме любого уровня и систематического положения. Клеточные стенки состоят из комплекса полимеров, которые секретируются клеткой, а затем собираются в сложную структуру за счет ковалентных и нековалентных связей. В этот комплекс кроме полисахаридов входят структурные белки, ферменты, полимеры фенольных соединений и некоторые другие вещества. Полисахариды клеточной стенки разделяют на целлюлозу и компоненты матрикса. Целлюлоза – важнейший представитель полисахаридов, макромолекулы которых построены из элементарных звеньев моносахаридов, соединенных между собой гликозидной связью. Макромолекула целлюлозы состоит из остатков D-глюкозы – моносахарида, углеводный скелет молекулы которого содержит шесть атомов углерода. Макромолекулы целлюлозы в целлюлозных волокнах существуют не изолированно друг от друга, а образуют агрегаты, являющиеся элементами надмолекулярной структуры.

Несмотря на то что целлюлоза – главный полимерный компонент растительной клеточной стенки и наиболее распространенный полисахарид на Земле, понимание механизма биосинтеза целлюлозы является одним из малоизученных направлений в биологии растений. Простота химической структуры целлюлозы противоречит сложностям, которые связаны с ее биосинтезом и сборкой. В настоящее время все еще недостаточно известно о механизмах и регуляции биохимических стадий синтеза полисахаридов клеточной стенки, а также о взаимодействии компонентов, обеспечивающих клетку функционально активной оболочкой. В связи с многочисленностью выполняемых функций для модификации (элонгации и утолщения) клеточных стенок необходима синхронизирующая система сигналов, ферментов и строительных блоков [1].

Основная часть. Цель настоящего исследования состояла в изучении активности фер-

ментов (сахарозофосфатсинтазы, сахарозосинтазы и кислой инвертазы), непосредственно участвующих в метаболизме сахарозы и синтезе целлюлозы у сортов льна-долгунца, различающихся по вегетационному периоду и продуктивности.

Материалом для исследований служили сорта льна-долгунца (*Linum usitatissimum* L. ssp. *usitatissimum* convar. *elongatum*) различного эколого-географического и генетического происхождения.

Для определения активности сахарозосинтазы (К.Ф. 2.4.1.13) была использована методика, разработанная нами на основе методов Р. К. Брусковой и др. [2] (для проростков гороха) и О. А. Павлиновой и др. [3] (для листьев сахарной свеклы). Определение активности сахарозофосфатсинтазы (К.Ф. 2.4.1.14) проводили, используя комбинацию методов V. M. Babb et al. [4] (для хлопчатника и гипокотилей бобов) и S. C. Huber et al. [5] (для листьев сои). Активность кислой инвертазы (К.Ф. 3.2.1.26) определяли с помощью метода, предложенного М. В. Туркиной и др. [6] (для листьев овощных культур) и G.-Q. Tang [7] (для моркови). Количество синтезированной сахарозы определяли по методу J. H. Roe [8] в нашей модификации. Активность исследуемых ферментов выражали в микрограммах фруктозы за 1 мин в расчете на миллиграмм белка. Для биохимических анализов были использованы листья растений льна, выращенных в полевых и лабораторных условиях в светоустановке при температуре $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$, освещенности 6 тыс. лк и длительности фотопериода 16 ч. Измерение оптической плотности окрашенных растворов проводили на спектрофотометре при 520 нм. Количество фруктозы, входящей в состав синтезированной сахарозы, определяли по калибровочной кривой.

На основе современного представления о биосинтезе целлюлозы UDP-глюкоза используется для связывания активной зоны на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны с полисахаридом, который продавливается через мембрану (предположительно через структуру пор) внутрь стенки. Необходимо отметить, что структуры, ответственные за синтез целлюлозы, у многих организмов были идентифицированы с помощью электронного микроскопа (см. рисунок).

Биосинтез сахарозы катализируется последовательным действием сахарозофосфатсинтазы (SPS) и сахарозо-6-фосфатфосфатазы. Равновесие обратимой реакции с SPS *in vivo* смещается благодаря быстрому удалению сахарозо-6-фосфата с помощью специфической и высокоактивной фосфатазы, и таким образом активность SPS вносит существенный вклад в контролирование потока углерода для синтеза сахарозы.

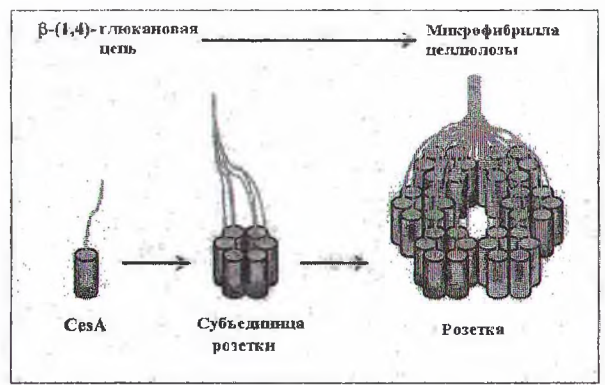


Рисунок. Структура розетки, комплексного образования для синтеза элементарной целлюлозной микрофибриллы [9]

Биосинтез сахарозы катализируется последовательным действием сахарозофосфатсинтазы (SPS) и сахарозо-6-фосфатфосфатазы. Равновесие обратимой реакции с SPS *in vivo* смещается благодаря быстрому удалению сахарозо-6-фосфата с помощью специфической и высокоактивной фосфатазы, и таким образом активность SPS вносит существенный вклад в контролирование потока углерода для синтеза сахарозы. На регуляцию генной экспрессии SPS наслаивается несколько механизмов, которые могут регулировать ее каталитическую активность. Один такой механизм представляет собой аллостерический контроль активации при помощи глюкозо-6-фосфата и ингибирования неорганическим фосфатом, т. е. биосинтез сахарозы происходит только при высокой концентрации метаболитов [4].

Распад сахарозы может катализироваться по крайней мере двумя различными классами ферментов. Инвертазы катализируют необратимый гидролиз сахарозы до глюкозы и фруктозы. Напротив, обратимое расщепление сахарозы катализируется сахарозосинтазой (SuSy). При расщеплении сахарозы с помощью SuSy энергия гликозидной связи сохраняется в UDP-глюкозе, которая является субстратом для синтеза целлюлозы или может использоваться в гликолизе через совместное действие уридиндифосфатазы и фосфоглюкомутазы.

Расщепляющую активность сахарозосинтазы обычно связывают с синтезом клеточной стенки. К настоящему времени показано наличие сопряженной реакции между SuSy и целлюлозосинтазами и построена модель, в которой растворимая SuSy обеспечивает UDP-глюкозой реакцию биосинтеза полисахарида, в то время как инвертазы поставляют гексозы для дыхательного метаболизма [10]. Обнаружено, что значительная часть сахарозосинтазы связана с фракцией макрочас-

Активность сахарозосинтазы (Susy), сахарозофосфатсинтазы (SPS) и кислой инвертазы (Inv) в листьях сортов льна-долгунца в условиях светоустановки (I) и стадии быстрого роста (II) в полевых условиях, мкмоль фруктозы/мин · мг белка

Сорт	Susy		SPS		Inv
	I	II	I	II	II
Вита	6,7	3,0	8,8	7,4	6,5
Fibra	19,8	8,4	9,8	8,2	5,3
К-65	17,4	3,3	5,0	13,3	15,8
Архангельский кряж	4,2	7,0	9,1	24,2	8,5
Bison	8,2	5,3	3,9	14,1	13,5
Батист	4,2	9,6	6,5	7,8	6,9
Дашковский	5,7	5,8	5,0	4,5	2,7
Л-41	3,5	4,1	11,5	8,0	5,1
Успех	4,3	8,9	4,7	14,5	5,0
Л-1120	16,1	5,3	2,9	3,5	1,3

тиц растущего волокна [11]. Эта особая, специфическая SuSy была названа плазматической, мембранно-связанной формой (P-SuSy), а растворимая SuSy – S-SuSy. Такая сложность в регуляции генной экспрессии и локализации фермента предполагает его ключевую роль в метаболизме растения. Сахарозосинтаза не является интегральным мембранным белком, однако ее связь с микросомальной клеточной фракцией достаточно прочна. Иммунофлюоресцентные исследования показали, что SuSy может существовать в клеточной стенке волокна в области вторичной стенки, что согласуется с ориентированным синтезом микрофибрилл целлюлозы [9, 10]. Считается, что P-SuSy обеспечивает канальную проводимость UDP-глюкозы к целлюлозе на плазматической мембране – биохимический анализ выявил высокую концентрацию фермента на поверхности волокна около кортикальных микротрубочек в непосредственной близости к участку синтеза целлюлозы на плазматической мембране.

Инвертазы в дополнение к SuSy могут катализировать гидролиз сахарозы. Эти ферменты также отличаются по локализации: растворимая кислая инвертаза – вакуолярная, нерастворимая кислая инвертаза – связана с клеточной стенкой и нейтральные/щелочные инвертазы – цитозольные. Вакуолярная кислая инвертаза расщепляет сахарозу, когда имеется высокий спрос на продукты ее гидролиза (при расширении клетки). Нейтрально-щелочные инвертазы функционируют, когда активность кислой инвертазы снижается. Инвертаза клеточной стенки в фотосинтезирующих тканях, вероятно, играет роль в ассимиляции благодаря высокому градиенту концентрации сахарозы.

В таблице представлены результаты изучения активности сахарозосинтазы, сахарозофосфатсинтазы и кислой инвертазы у сортов льна-долгунца. Полученные данные показали, что наибольшая активность сахарозосинтазы в листьях растений, выращенных в лабораторных условиях, обнаружена у сортов Fibra, К-65 и Л1120 (таблица, Susy, I). У остальных анализируемых сортов она колебалась в пределах от 3,51 (у сорта Л-41) до 8,15 мкм/мин · мг белка (у сорта Bison). Известно, что наиболее высокая активность сахарозосинтазы характерна для листьев молодых, растущих растений. Поэтому полученные нами результаты можно объяснить различиями в скорости биосинтетических реакций, направленных на процессы роста и развития тканей листа, у поздних и раннеспелых сортов льна-долгунца.

Активность Susy в листьях, собранных с полевых растений на стадии «быстрый рост», у сортов Батист, Успех, Fibra и Архангельский кряж была выше, чем у остальных исследуемых сортов (таблица, Susy, II). Однако различия по величинам активности этого фермента между сортами, выращенными в полевых условиях, не столь значительны по сравнению с результатами, полученными на листьях растений, растущих в светоустановке. Это может быть связано с тем, что листья полевых растений на стадии «быстрый рост» полностью сформированы и функционирование сахарозосинтазы направлено в сторону расщепления сахарозы с образованием метаболитов, которые используются в реакциях дыхательного метаболизма, а также в процессах «поддержания» клеточных компартментов.

По активности сахарозофосфатсинтазы также были отмечены межсортовые различия и различия в зависимости от условий выращивания растений льна-долгунца (таблица, SPS, I и II). У большинства анализируемых сортов (К-65, Архангельский кряж, Bison, Батист, Успех, Л-1120) отмечена более высокая активность SPS в листьях полевых растений по сравнению с сортами, выращенными в лабораторных условиях. Было показано, что активность фермента зависит от фотосинтеза и стадии развития растения [4]. Полученные нами данные подтверждают эти результаты и показывают, что активность сахарозофосфатсинтазы достигает высоких значений в листьях-донорах полевых растений, находящихся на стадии «быстрый рост». Обнаруженные различия по активности SPS между этими сортами могут быть обусловлены различиями в интенсивности фотосинтетических реакций в листьях растений на стадии «быстрый рост», для которой характерна активизация синтетиче-

ских и биоэнергетических реакций, обеспечивающих рост и развитие растительного организма (таблица, SPS, II). Другими словами, экспрессия генов SPS приводит к суперпродукции фермента в фотосинтезирующих тканях листа и, как следствие, к ускорению синтеза сахарозы. Низкая активность фермента, выявленная в листьях полевых растений сорта Л-41, может свидетельствовать о снижении эффективности функционирования листового аппарата на этой стадии развития. В листьях лабораторных растений активность сахарозофосфатсинтазы несколько снижена (таблица, SPS, I) по сравнению сортами, выращенными в полевых условиях. Это может быть связано с тем, что листья лабораторных растений представляют собой органы, потребляющие ассимиляты, в отличие от листьев-доноров полевых растений.

По активности кислой инвертазы выявлены только межсортные различия (таблица, Inv, II). Наибольшая активность фермента обнаружена у сортов К-65 и Bison. Так как растворимая кислая инвертаза локализуется в вакуолях и является регулятором концентрации сахарозы в цитозоле, то высокие величины активности фермента могут свидетельствовать о продуктивном протекании фотосинтеза. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что направленность реакций метаболизма сахарозы зависит от стадии развития растений и сортовых особенностей льна-долгунца.

Заключение. Исходя из вышесказанного, можно заключить, что изучение отдельных звеньев метаболизма сахарозы позволит расширить наши представления о биосинтетических процессах, проходящих в ходе формирования клеточной стенки волокна растений. Полное понимание распределения углеводов в клетке, несомненно, требует более глубокого исследования взаимодействий между размером пула субстратов, посттрансляционной регуляцией активности ферментов, участвующих в метаболизме сахарозы, и регуляцией их генной экспрессии, что, в конечном итоге, даст возможность разработать стратегию по изменению скорости синтеза целлюлозы для улучшения структуры, качества волокна и урожайности льна-долгунца.

Литература

1. Wittich, P. E. Localization of sucrose synthase activity in developing in maize kernels by *in situ* enzyme histochemistry / P. E. Wittich, D. Vreugdenhil // J. Exp. Bot. – 1998. – Vol. 49, N 324. – P. 1163–171.
2. Активность сахарозосинтазы и кислой инвертазы в органах проростков гороха / Р. К. Брускова [и др.] // Физиол. раст. – 2004. – Т. 51, № 5. – С. 702–706.
3. Павлинова, О. А. Сахарозфосфатсинтаза, сахарозосинтаза и инвертаза в листьях сахарной свеклы / О. А. Павлинова, Е. Н. Балахонцев, М. В. Туркина // Физиол. раст. – 2002. – Т. 49, № 1. – С. 78–84.
4. Babb, V. M. Sucrose phosphate activity rises in correlation with high-rate cellulose synthesis in three heterotrophic systems / V. M. Babb, C. H. Haiger // Plant Physiol. – 2001. – Vol. 127, N 3. – P. 1234–1232.
5. Huber, S. C. Biochemical basis for partitioning of photosynthetically fixed carbon between starch and sucrose in soybean (*Glycine max* Merr.) leaves / S. C. Huber, D. W. Israel // Plant Physiol. – 1982. – Vol. 69, N 3. – P. 691–696.
6. Туркина, М. В. Методы определения моносахаридов и олигосахаридов / М. В. Туркина, С. В. Соколова // Биохимические методы в физиологии растений / под ред. О. А. Павлиновой [и др.]. – М.: Наука, 1971. – С. 7–33.
7. Tang, G.-Q. Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning / G.-Q. Tang, A. Sturm // Plant Molecular Biology. – 1999. – Vol. 41, N 4. – P. 465–479.
8. Roe, J. H. A calorimetric method for the determination of fructose in blood and urine / J. H. Roe // J. Biol. Chem. – 1934. – Vol. 107, N 1. – P. 15–22.
9. Cellulose Biosynthesis in Plants: from Genes to Rosettes / M. S. Doblin [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2002. – Vol. 43, N 12. – P. 1407–1420.
10. Rollit, J. Synthesis of wall glucan from sucrose by enzyme preparations from *Pisum sativum* / J. Rollit, G. A. Maclachlan // Phytochemistry. – 1974. – Vol. 13, P. 367–374.
11. Winter, H. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes / H. Winter, C. S. Huber // Crit. Rev. Plant Sci. – 2000. – Vol. 19, N 1. – P. 31–67.