УДК 631.547:581.19:633.521

БИОСИНТЕЗ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД И КОНЦЕПЦИИ

В.В. Титок[1], В.Н. Леонтьев[2], И.В. Федоренко[3], С.В. Кубрак[1], С.И. Юренкова[1], З.Е. Грушецкая[1]

[1]Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь
[2]Белорусский государственный технологический университет, Минск, Республика Беларусь
[3]Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь

Понимание биосинтеза полисахаридных компонентов клеточной стенки, а именно целлюлозы привлекает большое внимание исследователей в свете фундаментальной важности этих молекул не только для функционирования растения, но и для человека. Целлюлоза является самым распространенным биополимером на Земле. Многие производства зависят от целлюлозы, поскольку являются неотъемлемой частью продукции волокна для текстиля и бумажной продукции, диетической клетчатки и древесины для строительных материалов. Цель данной работы – анализ современных моделей биосинтеза целлюлозы в клеточных стенках растений, оценка экспрессии генов целлюлозосинтазы и активности сахарозосинтазы у льна-долгунца в ходе онтогенеза.

Целлюлоза – полисахарид, макромолекулы которого построены из остатков D-глюкозы (рис. 1A). В зависимости от источника, из которого получена целлюлоза, ее кристаллическое состояние, степень кристалличности и молекулярный вес варьируют. Кристаллическое состояние целлюлозы определяется расположением глюкановых цепей по отношению друг другу в элементарной ячейке. В природе большое количество целлюлозы продуцируется в виде кристаллической целлюлозы – целлюлозы I. Глюкановые цепи в целлюлозе I параллельны друг другу и упакованы бок о бок для образования микрофибрилл, которые у большинства растений достигают 3 nm толщины. В целлюлозе I обнаружены два кристаллических субаморфа (Iα и Iβ), отличающиеся друг от друга по кристаллической упаковке, молекулярной конформации и водородным связям.

Макромолекулы целлюлозы в волокнах образуют агрегаты, являющиеся элементами надмолекулярной структуры. В продольном направлении молекулярные цепи целлюлозы проходят через большое число аморфных и кристаллических (длиной 65-220 нм) областей (рис. 1B). Элементарные фибриллы являются ассоциатами макромолекул диаметром до 3,5 - 4,0 нм, состоящие приблизительно из 36 цепей 1,4-β-глюкана. Они образуют более крупные объединения с поперечным сечением до 10-20 нм – микрофибриллы (рис. 1C).

Микрофибриллы находятся в матриксе из гемицеллюлоз (ксилоглюкан, ксилан, глюкоманан, арабиноксилан) и пектиновых полисахаридов (арабинан, гомогалактарунан, галактан, рамногалактарунан) и являются фундаментом клеточных стенок, обеспечивая механическую прочность и контроль в ходе расширения клетки в ходе развития растения.

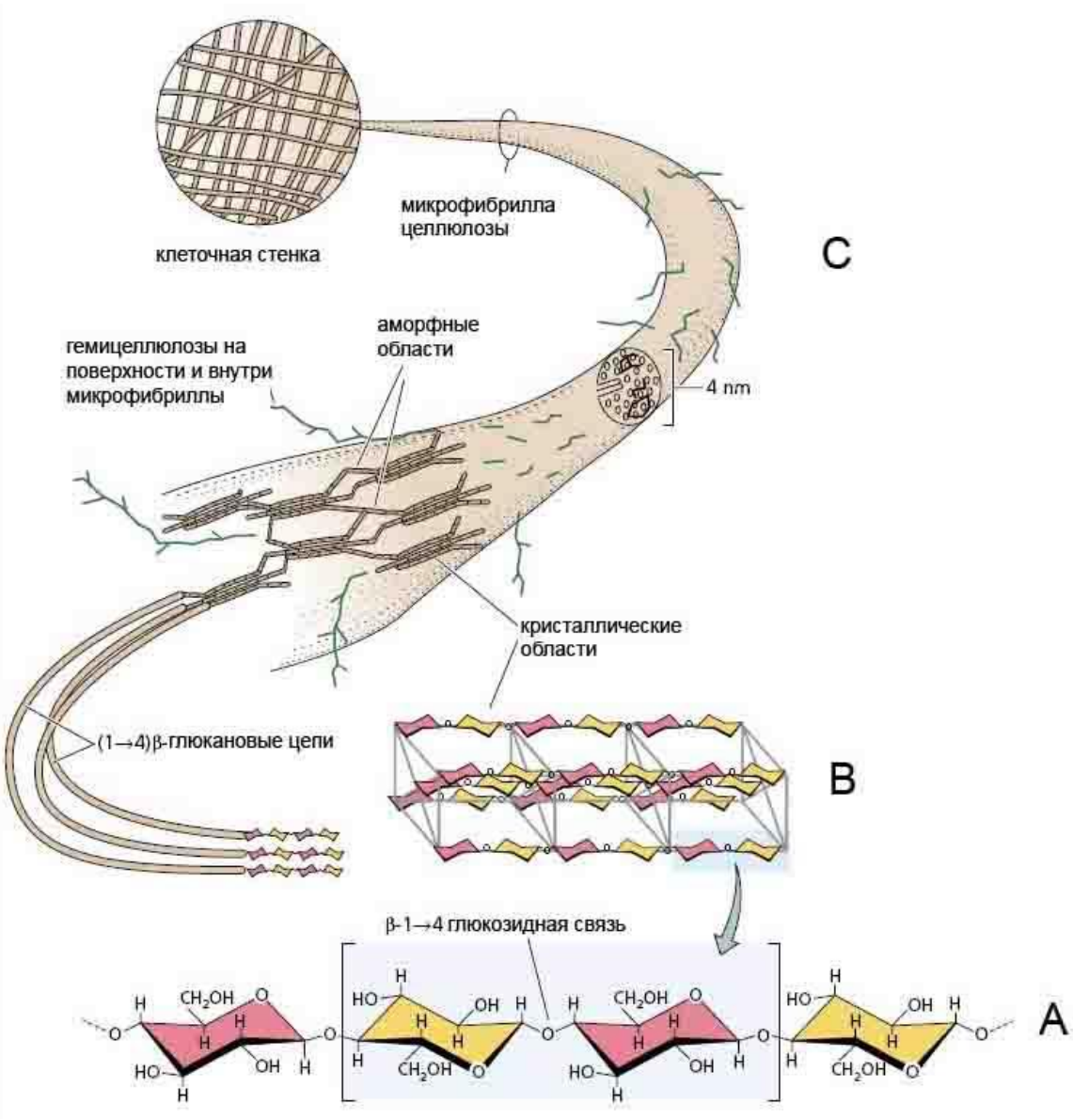

Рисунок 1. Структурная модель микрофибриллы целлюлозы [1]: A – молекулярная цепь целлюлозы, состоящая из остатков D-глюкозы; B – кристаллическая область цепи целлюлозы; C – микрофибрилла целлюлозы, состоящая из β-(1,4)-глюкановых цепей.

Клеточные стенки в зависимости от стадии роста могут быть первичными и вторичными (рис. 2). Первичная клеточная стенка с толщиной до 100 нм существует во время роста клетки растяжением. Она эластична, что позволяет клеткам увеличиваться в размерах. После остановки роста клетки первичная клеточная стенка, как правило, заменяется вторичной менее эластичной, по толщине намного превосходящей первичную. Целлюлозные волокна в первичной клеточной стенке располагаются хаотично относительно друг друга. Микрофибриллы целлюлозы во вторичной стенке ориентированы более параллельно, по сравнению с первичной и имеют определенный угол по отношению к оси клетки. Вторичная стенка волокна обычно состоит из трех слоев: S_1, S_2, и S_3. Каждый слой имеет различный микрофибрильный угол: в S_1 и S_3 – почти поперечный к оси клетки, а в слое S_2, который занимает почти 80% всей стенки, – 5-30°.

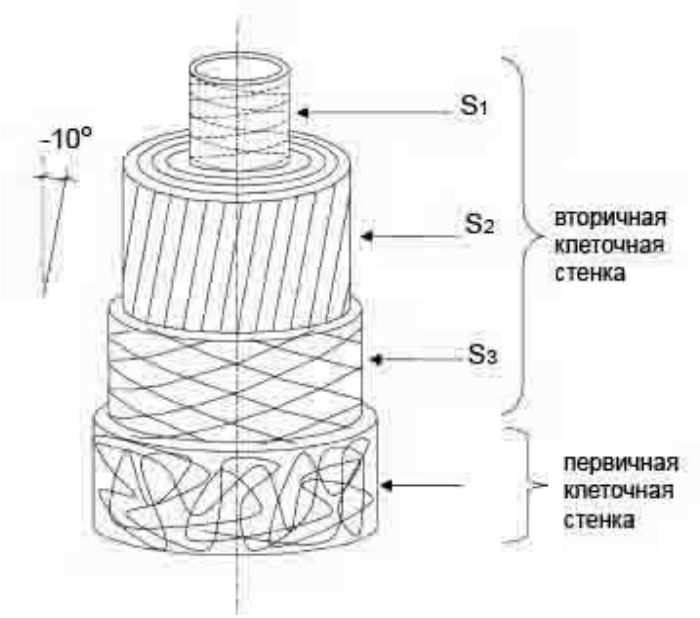

Рисунок 2. Структура первичной и вторичной клеточных стенок льна [2].

Образование целлюлозы происходит в плазматической мембране. Структуры, ответственные за синтез целлюлозы, были идентифицированы с помощью электронного микроскопа [3]. У растений – это розеточный терминальный комплекс (рис. 3А). Розетка имеет диаметр приблизительно 24 nm и представляет собой шестикратную, симметричную упаковку каталитических субъединиц. На основании ультраструктурных исследований появилась возможность создания модели сборки розетки. Существует две основные схемы сборки этого комплекса: 1) розетки собираются в аппарате Golgi и затем транспортируются в виде Golgi-везикул в плазматическую мембрану [4]; 2) ферментный комплекс, участвующий в синтезе β-1,4-глюкановых цепей и имеющий массу >500 kDa, формируется непосредственно на плазматической мембране из предшественников, которые производятся в Golgi-везикулах [5]. Внутри каждого комплекса помимо каталитических субъединиц присутствуют другие компоненты, участвующие в процессах снабжения субстратом, инициации и терминации удлинения цепи или в регуляции активности этого образования. Основываясь на современном представлении синтеза целлюлозы, UDP-глюкоза используется для связывания активной зоны ферментного комплекса на цитолазматической поверхности плазматической мембраны с полисахаридом, который продавливается через мембрану, предположительно через структуру пор, вовнутрь клеточной стенки [6].

Ферментный комплекс розетки растений состоит из субъединиц целлюлозосинтазы (рис. 3А). Впервые целлюлозосинтаза на молекулярном уровне была идентифицирована у целлюлозопродуцирующих бактерий *Agrobacter xylinum* [8].

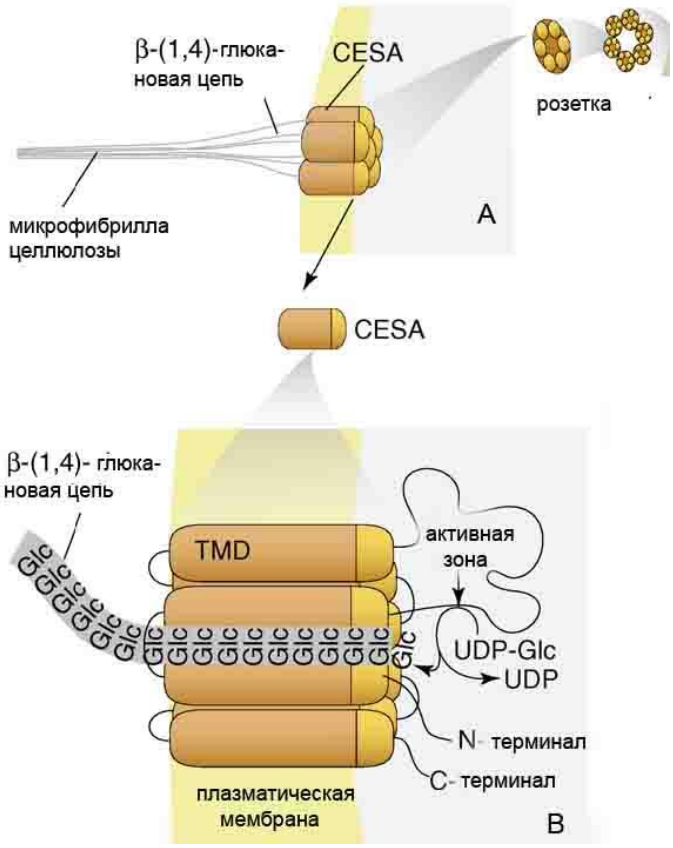

Рисунок 3. Схематическое изображение розеточного терминального комплекса [7]: A – гексаметрическая розетка, включающая шесть розеточных субъединиц, каждая из которых состоит из шести CesA белков; B – CesA белок, состоящий из трансмембранных доменов (TMD) с N- и C-терминалами и активной зоны, находящейся в цитоплазме.

Последовательности ДНК, кодирующие целлюлозосинтезы у растений, были обнаружены после сиквенирования из случайных аналогов cDNA банка хлопкового волокна [9]. Растительные целлюлозосинтазы – мембранно-связанные белки с 8 трансмембранными завитками: два на N-конце и шесть на C-конце (рисунок 3B), ограничивающие центральный цитоплазматический домен, а также области, которые отсутствуют у бактериальных копий, и содержат две большие инсерции внутри центрального домена: одна – «консервативная зона» (CR-P), другая – «гипервариабельная зона» (HVR) [9]. Целлюлозосинтаза хлопка содержит цинк-связанный домен в N-терминале [10].

Гены, кодирующие целлюлозосинтазы (CesA), идентифицированы у более, чем 170 разновидностей растений. При изучении генома *Arabidopsis*, обнаружено, что это растение имеет 10 генов целлюлозосинтаз и 30 генов подобных целлюлозосинтазе (Csl) [11]. Анализ генной экспрессии CesA в тканях листьев на различных стадиях онтогенеза растений и в различных условиях выращивания в большинстве случаев не выявил значительных различий. Однако было обнаружено, что в процессе роста клетки экспрессируются различные гены: одни активизируются при синтезе целлюлозы в первичной, а другие – во вторичной клеточной стенке [12]. Взаимосвязь между этими генами наблюдалась при изучении целлюлозо-дефицитных мутантов. У *Arabidopsis* гены CesA1, CesA3 и CesA6 экспрессируются во время синтеза целлюлозы в первичной клеточной стенке [13], а CesA4, CesA7 и CesA8 – во вторичной клеточной стенке [14]. Аналогичные результаты получены и на других растениях [15]. На основании этих данных предположили, что у растений для образования функциональной розетки необходимы три различных генных продукта CesA [16], так как мутация в любом из них приводила к потере структуры микрофибриллы целлюлозы. Методом инфракрасной микроспектроскопии были выявлены различия в составе клеточной стенки интактных и мутантных растений, которые состояли в уменьшение у мутантов количества кристаллической целлюлозы и комплементарном увеличении содержания структурных белков [13].

К настоящему времени созданы гипотетические модели, показывающие расположение различных субъединиц CesA белков в розетке, но все еще недостаточно экспериментальных данных, подтверждающие эти концепции. Одна из них основана на том, что для сборки розетки целлюлозосинтазы необходимо два этапа: образование линейных комплексов, состоящих из шести частиц, которые включают три различные гомодимера (каждый димер состоит из одной целлюлозосинтазы), происходит внутри цитоплазматической основы розеточной структуры; линейные комплексы выстраиваются в розетке с шестикратной симметрией. По другой концепции сборка линейных комплексов в розетку осуществляется в эндоплазматической сети и аппарате Golgi, затем собранная розетка транспортируется к плазматической мембране для активации и синтеза микрофибриллы [13].

По современным представлениям биосинтез целлюлозы – последовательный процесс полимеризации, кристаллизации и экструзии [6]. Существует 4 модели этого процесса (рис. 4). Первая модель основывается на том, что каталитический участок целлюлозосинтазы и UDP-глюкоза находятся в цитоплазме, а образовавшиеся

глюкановые цепи транспортируются во внеклеточное пространство через структуру подобную поре, которая может быть частью каталитической субъединицы или комплексом из многих субъединиц, а для экструзии необходимо функционирование каталитической субъединицы и связанных белков (рис. 4A). Во второй модели каталитический участок целлюлозосинтазы ориентирован к внеклеточному пространству, где и осуществляется полимеризация (рис. 4B). Транспортные белки могут включаться в перенос UDP-глюкозы и использоваться при полимеризации глюкановой цепи. В третьей модели для биосинтеза целлюлозы необходим липидный интермедиатор, который образуется на цитоплазматической поверхности клетки с помощью гликозилтрансферазы (рис. 4C). Полимеризация глюкановой цепи происходит в цитоплазме, а для ее экструзии требуются связанные белки. В четвертой модели для биосинтеза целлюлозы необходимы, по крайней мере, две гликозилтрансферазы, каталитические участки которых локализованы на цитоплазматической и внецитоплазматической поверхностях клетки (рис. 4D).

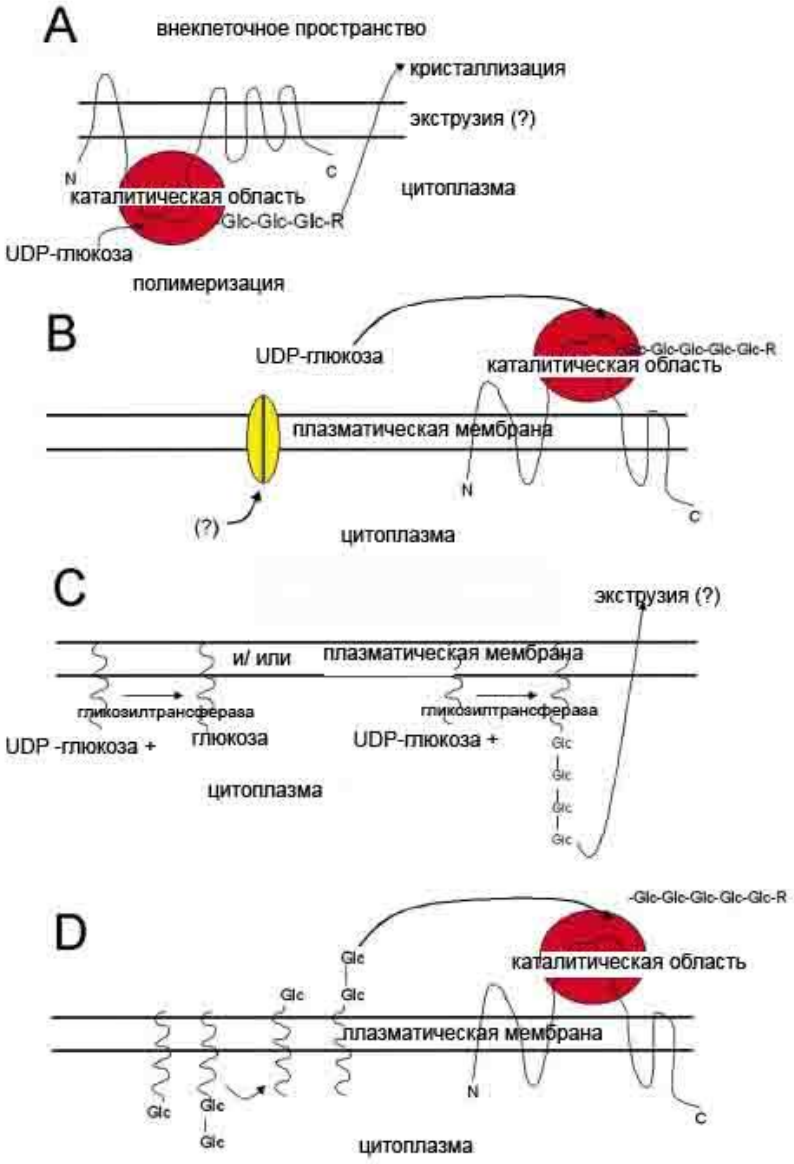

Рисунок 4. Гипотетические модели биосинтеза целлюлозы [6]: A – первая модель – каталитическая область CesA белка находится в цитоплазме, β-(1,4)-глюкановая цепь

проходит через плазматическую мембрану во внеклеточное пространство; B – вторая модель – каталитическая область расположена на поверхности клетки, UDP-глюкозу поставляют какие-то белки;.C – третья модель – липидный интермедиатор участвует в образовании гликозидной связи в молекулярной цепи целлюлозы; D – четвертая модель – комбинация моделей 2 и 3.

По этой модели, глюкоза передается от UDP-глюкозы к мембранному липиду на цитоплазматической поверхности для образования липидо-глюкозы или липидо-олигосахаридного комплекса, который может быть прикреплен к мембране. Гликозилтрансфераза, расположенная в мембране с каталитическим участком, находящимся снаружи, используется для присоединения интермедиатора и завершения реакции полимеризации, которая происходит во внецитоплазматическом пространстве. Полученные к настоящему времени данные указывают, что модель 1 является наиболее оптимальной для объяснения биосинтеза целлюлозы. Модели 3 и 4 также могут быть реальными, однако роль липидов в этом процессе еще не достаточно аргументирована.

Известно, что для биосинтеза целлюлозы необходимы сахара, поэтому изучение ферментов, участвующих в метаболизме сахарозы, является актуальным, так как точная их локализация и пространственно-временная регуляция во время роста и развития растений еще недостаточно изучены. Зависимость биосинтеза целлюлозы от сахарозы подтверждена многочисленными данными [17] и показано, что повторное использование UDP может усилить активность этого процесса [18].

Основную роль при распаде сахарозы в тканях растений играет фермент сахарозосинтаза (SuSy, К.Ф. 2.4.1.13). Преимущество разложения сахарозы с помощью SuSy по сравнению с инвертазой состоит в том, что энергия гликозидной связи сохраняется в UDP-глюкозе, которая является субстратом для синтеза целлюлозы бактериями [20], во время инициации заложения хлопкового волокна и образования его вторичной стенки [21]. SuSy в клетке находится в виде растворимой (S-SuSy) и мембранно-связанной (P-SuSy) формах. Высокая активность S-SuSy обнаружена в цитоплазме различных растительных тканей, где ее продукты используются в общем метаболизме клетки и для синтеза запасных полимеров типа крахмала [20]. P-SuSy, обнаруженная во вторичной клеточной стенке, что согласуется с ориентированным синтезом микрофибрилл целлюлозы, 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 биосинтеза целлюлозы в

плазматической мембране [21]. Количество P-SuSy *in vivo* является переменным, что обусловлено стадией развития растений [18, 21].

Основным ферментом биосинтеза целлюлозы является целлюлозосинтаза (Ces, К.Ф. 2.4.1.12). Изучение активности этого фермента сопряжено с большими трудностями, одна из которые заключается в выделения функционально активной целлюлозосинтазы. Поэтому нами было проведено изучения экспрессии генов, кодирующих субъединицы целлюлозосинтазы в клеточных стенках льна. Анализ нуклеотидных последовательностей EST (*Expressed Sequence Tag*) шести субъединиц CesA, зарегистрированных в GenBank (EF409998-EF410000, EF214742-EF214744) позволил сконструировать праймеры, специфичные к фрагменту кДНК определенной субъединицы CesA. Амплификация кДНК растений льна со специфическими праймерами к генам CesA-1 и CesA-6 дала возможность идентифицировать фрагменты ожидаемого молекулярного размера (201 и 300 п.н. соответственно) (рис. 5).

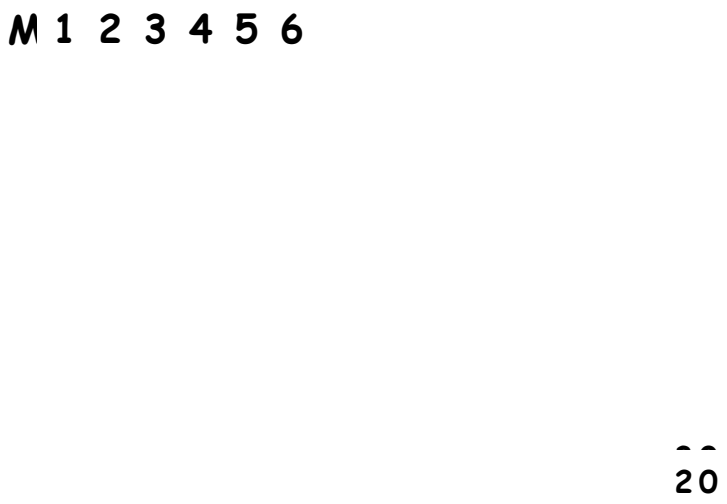

Рисунок 5. ПЦР фрагменты, полученные при амплификации ДНК и кДНК льна со специфическими CesA-6 (1-4) и CesA-1 (5,6) праймерами. 1, 2, 5 – ДНК; 3, 4, 6 – кДНК. М – маркер молекулярного веса (1 kb DNA ladder (BRL)). Стрелки показывают кДНК маркеры к CesA генам.

При амплификации сконструированных праймеров с ДНК льна были получены более тяжелые продукты, размером около 300 п.н. для CesA-1 и 400 п.н. для CesA6, что может свидетельствовать о наличии интрона в амплифицируемой области (рис. 6). Разработанные молекулярные маркеры, идентифицирующие эти гены, позволили

достоверно идентифицировать данные локусы на кДНК льна и сравнить уровень их экспрессии с помощью количественной Real-time PCR.

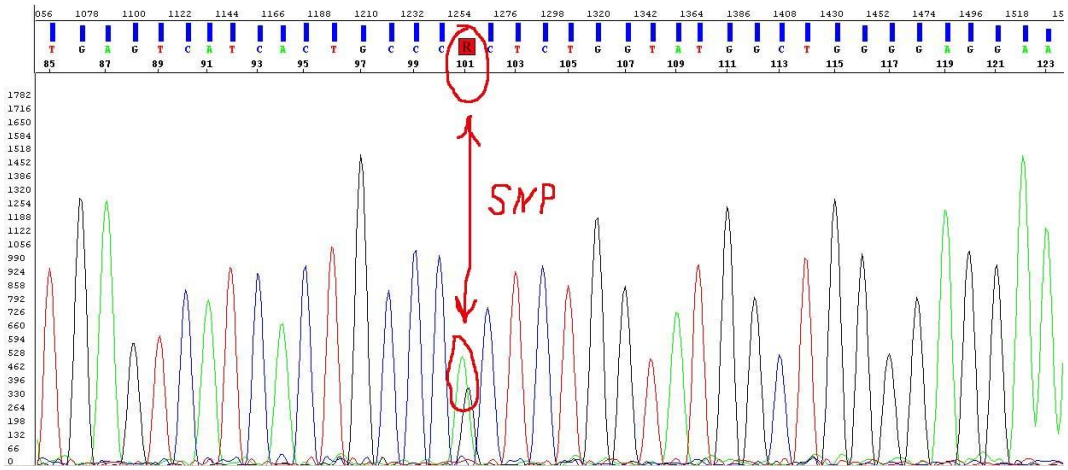

Рисунок 6. Фрагмент CesA-6 EST последовательность (стрелка указывает SNP сайт).

В связи с тем, что SuSy играет основную роль в образовании каналов UDP-глюкозы к целлюлозосинтазе во время образования клеточных стенок, нами было проведено изучение активности этого фермента. Высокая активность SuSy, обнаруженная у льна-долгунца на стадии быстрого роста, может указывать на активизацию процессов синтеза целлюлозы в ходе элонгации первичных и образования вторичных клеточных стенок в листьях и стеблях растений, а также, что особенно важно, при формировании волокна [22]. Снижение активности SuSy на стадии «цветения» по сравнению с предыдущей стадией может свидетельствовать об уменьшении пула субстратов, образуемых в результате разложения сахарозы с помощью SuSy, которые используются только на процессы поддержания клеточных органелл, так как волокна в стеблях полностью сформированы. Низкая активность фермента на стадии «елочка», по-видимому, обусловлена тем, что в этот период роста лубяные волокна еще не образуются. Эти результаты подтверждаются данными, полученными при термогравиметрическом анализе количественного содержания различных полисахаридов, в том числе целлюлозы, в стеблях льна [23]. Полученные данные позволили обнаружить прямую зависимость величины активности сахарозосинтазы от стадии развития растений льна-долгунца, что свидетельствует об участии этого фермента в качестве молекулярного переключателя в метаболических процессах поддержания, роста и дифференциации, включающие синтез целлюлозы.

На основании вышеизложенного можно заключить, что 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. Поэтому изучение отдельных этапов синтеза целлюлозы позволит расширить представления о биосинтетических процессах при формировании клеточной стенки и даст возможность разработать стратегию для улучшения структуры и качества волокна льна-долгунца.

Литература

1. Cosgrove, Daniel J. Cell Walls: Structure, Biogenesis, and Expansion. / In Plant Physiology, 2nd ed. Lincoln Taiz and Eduardo Zeiger, eds. –2006. – P. 313–338.

2. Baley, C. Analysis of the flax fibres tensile behaviour and analysis of the tensile stiffness increase / C. Baley // Composites: Part A. – 2002. – Vol. 33. – P. 939–948.

3. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis* / S.Kimura [et al.] // Plant Cell. – 1999. – Vol. 11. – P. 2075–2085.

4. Haigler, C.H., Brown, Jr.R.M. Transport of rosettes from the Golgi apparatus to the plasma membrane in isolated mesophyll cells of *Zinnia elegans* during differentiation to tracheary elements in suspension culture / C.H. Haigler // Protoplasma. – 1986. – Vol. 134. – P. 111–120.

5. Itoh, T., Brown, Jr.R.M. Development of cellulose synthesizing complexes in *Boergesenia* and *Valonia* / T. Itoh // Protoplasma. – 1988. – Vol. 144. – P. 160–169.

6. Brown, R.M.Jr., Saxena, I.M. Cellulose biosynthesis: A model for understanding the assembly of biopolymers / R.M.Jr. Brown [et al.] // Plant Physiol. Biochem. – 2000. – Vol. 38. – P. 57–67.

7. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process / O. Lerouxel [et al.] // Plant Biology. – 2006. – Vol. 9. – P. 621–630

8. Ross, P., Mayer, R., Benziman, M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria / P. Ross [et al.] // Microbiol. Rev. – 1991. – Vol. 55. – P. 35–58.

9. Higher plants contain homologs of the bacterial *CelA* genes encoding the catalytic subunit of the cellulose synthase / J. Pear [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1996. – Vol. 93. – P. 12637–12642.

10. Saxena, I.M., Brown, R.M.Jr. Cellulose biosynthesis: current views and evolving concepts / I.M. Saxena // Ann. Bot. – 2005. – Vol. 96. – P. 9–21.

11. Global expression analysis of CESA and CSL genes in Arabidopsis / T. Hamann [et al.] // Cellulose. – 2004. – Vol. 11. – P. 279–286.

12. Delmer, D.P. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study / D.P. Delmer // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1999. – Vol. 50. – P. 245–276.

13. PROCUSTE1 encodes a cellulose synthase required for normal cell elongation specifically in roots and dark-grown hypocotyls of Arabidopsis / M. Fagard [et al.] // Plant Cell. – 2000. – Vol. 12. – P. 2409–2424.

14. Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis / N.G. Taylor [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 1450–1455.

15. Three distinct rice cellulose synthase catalytic sub-unit genes required for cellulose synthesis in the secondary wall / K. Tanaka [et al.] // Plant Physiol. – 2003. – Vol. 133. – P. 73–83.

16. Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes / M.S. Doblin [et al.] // Plant Cell Physiol. – 2002. – Vol. 43. – P. 1407–1420.

17. Kudlicka, K., Brown, Jr.R.M. Cellulose and callose biosynthesis in higher plants. I. Solubilization and separation of (1→3)- and (1→4)-b-glucan synthase activities from mung bean / K. Kudlicka // Plant Physiol. – 1997. – Vol. 115. – P. 643–656.

18. Enhancement of cellulose production by expression of sucrose synthase in *Acetobacter xylinum* / T. Nakai [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 1999. – Vol. 96. – P. 14–18.

19. Carbon partitioning to cellulose synthesis / C.H. Haigler // Plant Mol. Biol. – 2001. – Vol. 47. – P. 29–51.

20. Rees, T. Sucrose metabolism / In: D.H. Lewis (Ed.) Storage Carbohydrates in Vascular Plants: Distribution, Physiology and Metabolism, Cambridge University Press, Cambridge, UK. – 1984. – P. 53–73.

21. Sucrose synthase localization during initiation of seed development and trichome differentiation in cotton ovules / K.D. Nolte // Plant Physiol. – 1995. – Vol. 109. – P. 1285–1293.

22. Метаболическая модель распределения углеводов в клетке и роль сахарозосинтазы, сахарозофосфатсинтазы и инвертазы в синтезе целлюлозы / В.В. Титок [и др.] // Труды БГТУ. Сер. IV. Химия и технология органических веществ. – 2007. – Вып. XV. – С. 158–161.

23. Thermogravimetric analysis of the flax bast fibre bundle / V.V. Titok [et al.] // J. Natural Fibers. – 2006. – Vol. 3, N 1: – P. 35–41.

Summary

Cellulose Biosynthesis: Modern View and Conceptions

V.V. Titok[1], V.N. Leontiev[2], I.V. Fedorenko[3], S.V. Kubrak[1], Z.E. Grushetskaya[1] S.I. Yurenkova[1]

[1]*Institute of Genetics and Cytology NAS of Belarus, Minsk, Belarus*
[2]*Belarusian State Technological University, Minsk, Belarus*
[3]*Belarusian State University, Minsk, Belarus*

Modern conceptions of cellulose biosynthesis were analysed in plant cell walls. Specific primers for genes (CesF1 and CesA-6), encoding cellulose synthase subunits, were designed. The developed markers were used for identifying the given loci on flax cDNA and the comparative analysis of their expression level. The revealed relationship between the saccharose synthase

activity value and a developmental stage of fiber Flax plants points to involvement of this enzyme in metabolic processes of maintenance, growth and differentiation including cellulose biosynthesis.