

ОГЛЯДИ

УДК 581.19

ФИТОХЕЛАТИНЫ: СТРУКТУРА, БИОСИНТЕЗ, ФУНКЦИИ

© 2007 г. Д. В. СЫЩИКОВ

*Криворожский ботанический сад
Национальной академии наук Украины
(Кривой Рог, Днепропетровская обл., Украина)*

Обобщены литературные данные о структуре, функциях и путях биосинтеза различных классов фитохелатинов в клетках растений. Показано участие данных цистеин-обогащенных полипептидов в процессах детоксикации тяжелых металлов и поддержания гомеостаза растений в стрессовых условиях, вызванных их избыточным поступлением в клетки. Накопленные факты позволяют считать, что основными функциями фитохелатинов являются хелатирование ионов тяжелых металлов с их последующей компартиментализацией и, в некоторых случаях, с более поздним их высвобождением для синтеза металлосодержащих апопротеинов, а также участие в защите метало чувствительных ферментов.

Ключевые слова: *фитохелатины, глутатион, синтез, аминокислота, тяжелые металлы, транспорт, компартиментализация*

Поскольку растения зафиксированы корневой системой в субстрате, то являются особенно уязвимыми к изменению концентрации тяжелых металлов в окружающей среде. Поэтому в процессе эволюционного развития они выработали разнообразные механизмы, предотвращающие (либо уменьшающие) поступление токсикантов в растительные клетки. Данные адаптивные реакции включают иммобилизацию, исключение, хелатирование и компартиментализацию ионов металлов и запуск более общих стрессовых адаптивных реакций, таких как образование этилена и стрессовых белков [2, 6, 26, 32]. Наиболее важным и информативным механизмом защиты растений от повышенных концентраций тяжелых металлов является хелатирование. На сегодня у растений идентифицированы многочисленные металлосвязывающие лиганды. Так, например, исследованиями W.Rauser [44] показана важность органических кислот (цитрата и малата) в ме-

ханизмах устойчивости к алюминию, связанных с его внеклеточным хелатированием. В экспериментах U.Kramer [25] также рассматривается роль органических кислот и некоторых аминокислот, в частности гистидина, в связывании ионов металлов как внутри клеток, так и в ксилемном экссудате. Однако наибольшей емкостью поглощения разнообразных тяжелых металлов обладают цистеин-обогащенные полипептиды, изучению которых в последние десятилетия уделяется большое внимание многими зарубежными исследователями [24, 29, 43, 64]. Эти соединения получили разные названия: фитохелатины, кадустины, γ -глутамилцистеинил изопептиды или γ -ЕС изопептиды. Они имеют ряд общих свойств:

а) глутамин занимает аминокислотное терминальное положение;

б) следующим аминокислотным остатком является цистеин с пептидной связью по γ -карбоксилу глутамина;

в) γ -Глу-Цис пары повторяются от 2 до 11 раз.

Адрес для корреспонденции: Сыщиков Дмитрий Валерьевич, Криворожский ботанический сад НАН Украины, ул. Маршака, 50, Кривой Рог, 50089, Украина; e-mail: botgard@ukrtel.dp.ua

ФИТОХЕЛАТИНЫ

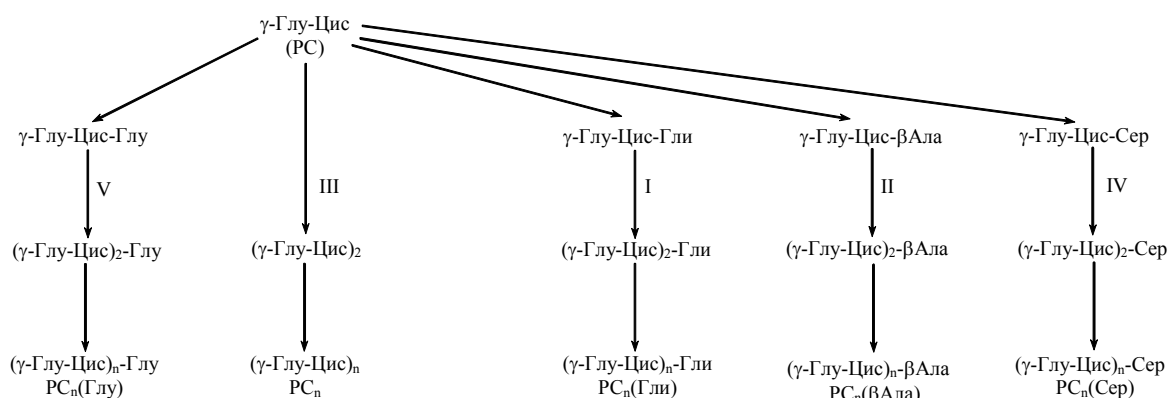


Рис. 1. Семейства γ -Глу-Цис пептидов, участвующие в иммобилизации металлов у растений и дрожжей [34, 43].

W.Rausser выделяет пять семейств γ -Глу-Цис пептидов [43]. Первоначально была установлена структура “истинных” фитохелатинов $(\gamma\text{-Глу-Цис})_n\text{-Гли}$, $\text{PC}_n\text{-(Гли)}$, где $n =$ от 2 до 4 (рис. 1, I), представители остальных четырех семейств, в дополнение к систематическим названиям, получили общее название изофитохелатины. Второе семейство γ -Глу-Цис пептидов, образующихся из гомологичного глутатиону трипептида $\gamma\text{-Глу-Цис-}\beta\text{-Ала}$, обнаружено у некоторых бобовых [39, 40]. Сд-связывающие комплексы из этих растений содержали пептиды состава $(\gamma\text{-Глу-Цис})_n\text{-}\beta\text{-Ала}$, $\text{PC}_n\text{-(}\beta\text{-Ала)}$ ($n = 2\text{-}7$), названные гомофитохелатинами (рис. 1, II). К третьему семейству относятся пептиды, состоящие только из идентично повторяющихся пар $\gamma\text{-Глу-Цис}$, PC_n (рис. 1, III). Они впервые были обнаружены в качестве минорного компонента Cd-связывающих комплексов у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* и позднее – как главный компонент таких комплексов у кукурузы [34]. Cd-индуцируемые $\gamma\text{-Глу-Цис}$ пептиды с карбокси-терминальным серином были обнаружены у отдельных видов злаковых [21]. Они имеют первичную структуру $(\gamma\text{-Глу-Цис})_n\text{-Сер}$, $\text{PC}_n\text{-(Сер)}$, т.е. сходное с гидроксиметил-глутатионом строение и получили название гидроксиметил-фитохелатины (рис. 1, IV). В середине 90-х годов исследованиями P.Meuwly [34] у кукурузы было идентифицировано пятое семейство фитохелатинов со структурой $(\gamma\text{-Глу-Цис})_n\text{-Глу}$, $\text{PC}_n\text{-(Глу)}$ (рис. 1, V).

Химическая структура фитохелатинов подтверждает их высокое сродство к глутатиону. Фитохелатины и изо- фитохелатины не яв-

ляются первичными генными продуктами, синтезируемыми на рибосомах, поскольку во-первых, γ -глутамильная связь не образуется во время трансляции и во-вторых, для изофитохелатинов семейства II, не показано наличие $\text{tRNA}^{\beta\text{-Ала}}$ [40, 66]. Высоконуклеофильные сульфгидрильные цистеиновые группы фитохелатинов обеспечивают им способность реагировать с широким спектром агентов, от свободных радикалов, активных кислородных радикалов, цитотоксических электрофильных органических ксенобиотиков до тяжелых металлов. Их N-терминальная и следующие γ -пептидильные связи, с другой стороны, вероятно необходимы для защиты данных тиолированных пептидов от неспецифической протеазной активности [53].

Проведенные E.Grill [14] кинетические исследования с использованием культуры клеток *Rauvolfia serpentina*, подвергнутой действию $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, показали, что после добавления соли металла происходит быстрое уменьшение концентрации внутриклеточного глутатиона. Таким образом, синтез фитохелатинов осуществляется без какой-либо заметной лаг-фазы, в то время как индукция ферментов путем трансляции и транскрипции осуществляется с задержкой от 1 до 3 ч. Экспериментами S.di Torri на суспензионных культурах клеток моркови показано, что первичные продукты синтеза фитохелатинов (PC_2) идентифицируются менее чем за 30 мин после добавления в среду ионов Cd^{2+} [9, 10]. Приведенные факты доказывают, что ферменты, ответственные за синтез фитохелатинов, присутствуют в клетке до начала стрессового воздействия. Использование глутатиона в процессах биосинтеза фитохелатинов

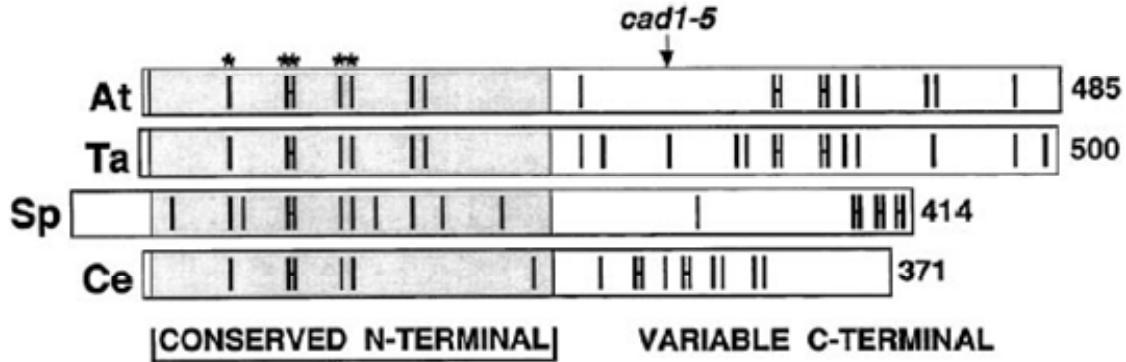


Рис. 2. Схематическое сравнение полипептидов фитохелатинсинтазы различных организмов: At – *Arabidopsis thaliana* (CAD1/AtPCS1); Ta – *Triticum aestivum* (TaPCS1); Sp – дрожжи (SPPCS); Ce – *Caenorhabditis elegans* (CePCS1). Справа указано полное число аминокислот. Приблизительные позиции всех цистеиновых остатков указаны вертикальными полосами; смежные цистеиновые остатки соединены горизонтальными полосами; остатки, сохраненные в трех последовательностях, отмечены звездочкой. Стрелка указывает позицию бессодержательной мутации арабидопсиса cad1-5 [4].

также нашло свое подтверждение и в исследованиях Н.В. Scheller и G. Szalai [54, 58].

Е. Grill [12] показано, что образование фитохелатинов происходит путем удлинения пептидной цепи глутатиона, которое катализируется специфическим ферментом: γ -глутамилцистеин дипептидилтрансферазой (фитохелатинсинтазой), КФ 2.3.2.15. Это утверждение базируется на следующих фактах:

- а) структурным подобием между глутатионом и фитохелатинами;
- б) увеличением концентрации фитохелатинов с сопутствующим уменьшением содержания глутатиона;
- в) снижением интенсивности или отсутствием синтеза фитохелатинов у мутантов, дефицитных по глутатионсинтетазе или γ -глутамилцистеинилсинтетазе;
- г) ингибированием синтеза фитохелатинов бутионинсульфоксимином (ингибитором γ -глутамилцистеинилсинтетазы).

Гены, кодирующие данный фермент, были одновременно выделены тремя независимыми группами исследователей, использующими различную технику выделения [3, 15, 60].

Исследователи, работающие под руководством S. Clemens и О.К. Vatamaniuk, использовали экспрессию растительных генов (арабидопсиса и пшеницы соответственно) у *Saccharomyces cerevisiae* для идентификации генов, ответственных за резистентность к Cd. В результате чего были идентифицированы гены *AtPCS1* и *TaPCS1*, экспрессия которых приводила к увеличению резистентности к Cd [3, 60].

Наряду с этим, экспериментами Y. Li показано, что сверхэкспрессия гена фитохелатинсинтазы арабидопсиса в конструкции с регуляторной последовательностью *A2::AtPSC1* обеспечивает у трансгенных растений высокую устойчивость к As, но одновременно приводит к сверхчувствительности к Cd [28]. Третья группа исследователей идентифицировала *AtPCS1* с помощью позиционного клонирования гена арабидопсиса *CAD1* [15].

Дальнейший генетический анализ с конструированием кДНК арабидопсиса *CAD1* (*AtPCS1*) показал, что она содержит 9 экзонов и кодирует предшествующий 55 кДа полипептид, состоящий из 485 аминокислот [1]. Сравнение аминокислотной последовательности у арабидопсиса и дрожжей показало, что их N-терминальные участки сходны (45% идентичности), тогда как C-терминальная последовательность показала невысокое очевидное сохранение аминокислотной последовательности (рис. 2). Наиболее очевидной общей особенностью C-терминального участка является наличие многочисленных цистеиновых остатков, часто парных. В C-терминальном участке протеинов арабидопсиса и дрожжей насчитывается 10 и 7 таких остатков соответственно, из которых 4 и 6 соответственно парные [4, 5]. Однако на сегодня не установлено явного сохранения позиции этих цистеиновых остатков относительно друг друга.

Наряду с этим, в экспериментах, проведенных J.Ramos et al. [42], доказано наличие альтернативного сплайсинга пре-мРНК фитохелатинсинтазы, выделенной из растений *Lotus japonicus* после воздействия ионов тяжелых ме-

ФИТОХЕЛАТИНЫ

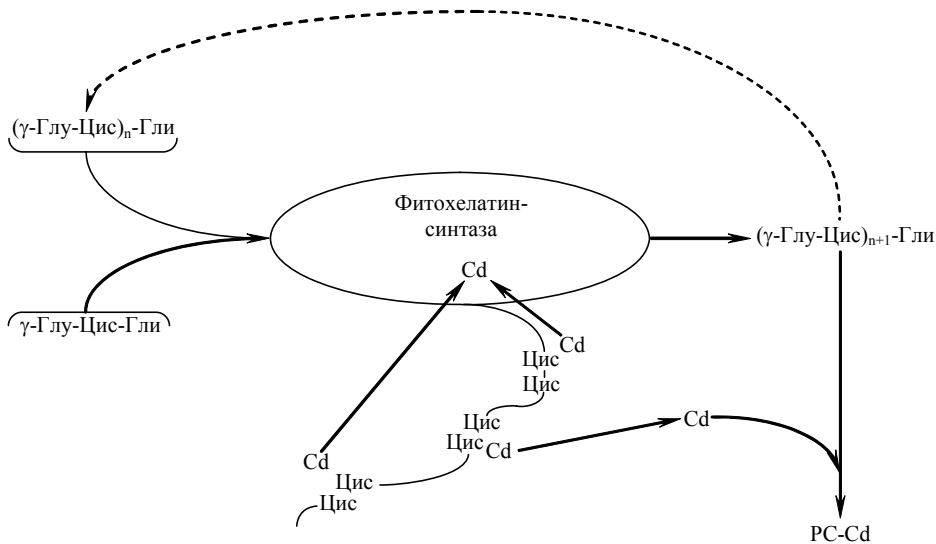
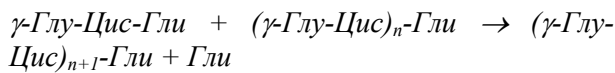


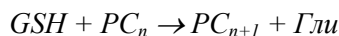
Рис. 3. Модель функционирования фитохелатинсинтазы [4].

таллов (в частности Cd), в результате чего увеличивается толерантность к таким стрессорам.

Фитохелатинсинтазой катализируется процесс переноса γ -глутамил-цистеиновой дипептидной группы глутатиона на акцептор – другую молекулу глутатиона, или на растущую цепь молекулы фитохелатина:



или



Исследованиями М.Н. Zenk и др. показано, что протекание этой реакции индуцируется повышенными внутриклеточными концентрациями Cd, Ni, Cu, Zn, Ag, Sn, Sb, Te, W, Au, Hg, Pb, Bi, As, In, Tl, Ge и Ga. Индукции образования фитохелатинов не отмечено при добавлении неорганических солей Na, Mg, Al, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Co и Cs [33, 41, 55, 66].

Протекание фитохелатинсинтазной реакции осуществляется только после активации фермента тяжелыми металлами (рис. 3). В молекуле фитохелатинсинтазы различают С-терминальный домен, действующий как локальный сенсор ионов тяжелых металлов (таких как Cd^{2+} , Cu^{2+} и/или Hg^{2+}). Цистеиновые остатки (Цис-56, Цис-90, Цис-91, Цис-109 и Цис-113) связывают ионы металлов, обеспечивая их более тесный контакт, и затем происходит их перенос в активационный сайт N-терминального каталитического домена. Этот активированный домен и катализирует перенос γ -Глу-Цис группировки на молекулу-акцептор

(восстановленный глутатион либо молекулу PC с более низким числом повторов γ -Глу-Цис единиц) с образованием PC_{n+1} [5, 46, 50]. Данная модель хорошо согласуется с результатами биохимических исследований с использованием антигенно-меченной AtPCS, которая связывает ионы Cd с высокой аффинностью ($K_d = 0,54 \pm 0,2 \mu\text{M}$) и емкостью (стехиометрический уровень = $7,09 \pm 0,94$) [4].

Изучение стационарной кинетики катализируемого фитохелатинсинтазой образования фитохелатинов из глутатиона на среде, содержащей тяжелые металлы, позволило группе исследователей под руководством Р.А. Реа разработать схему функционирования фермента, в которой тиолат тяжелого металла и глутатион взаимодействуют с образованием промежуточного цистеинил ферментного ацилированного интермедиата. Для протекания реакции должна быть разорвана как минимум одна пептидная связь и для каждой синтезированной молекулы PC_2 образована как минимум одна новая связь. Кроме того, первоначальная атака на карбонильный углерод расщепляемой пептидной связи должна быть нуклеофильной. В процессе катализа фитохелатинсинтаза подвергается ацилированию на двух сайтах и ацилирование по крайней мере в одном из этих сайтов необходимо для синтеза фитохелатинов [47, 61].

На первом этапе реакции происходит нуклеофильная атака на разрываемую связь первого субстрата (донора) с образованием Цис-производного тиолатного аниона и γ -Глу-Цис тиоэфира с сопутствующим освобождением Гли (рис. 4, I). Нуклеофильность Цис-56, скорее

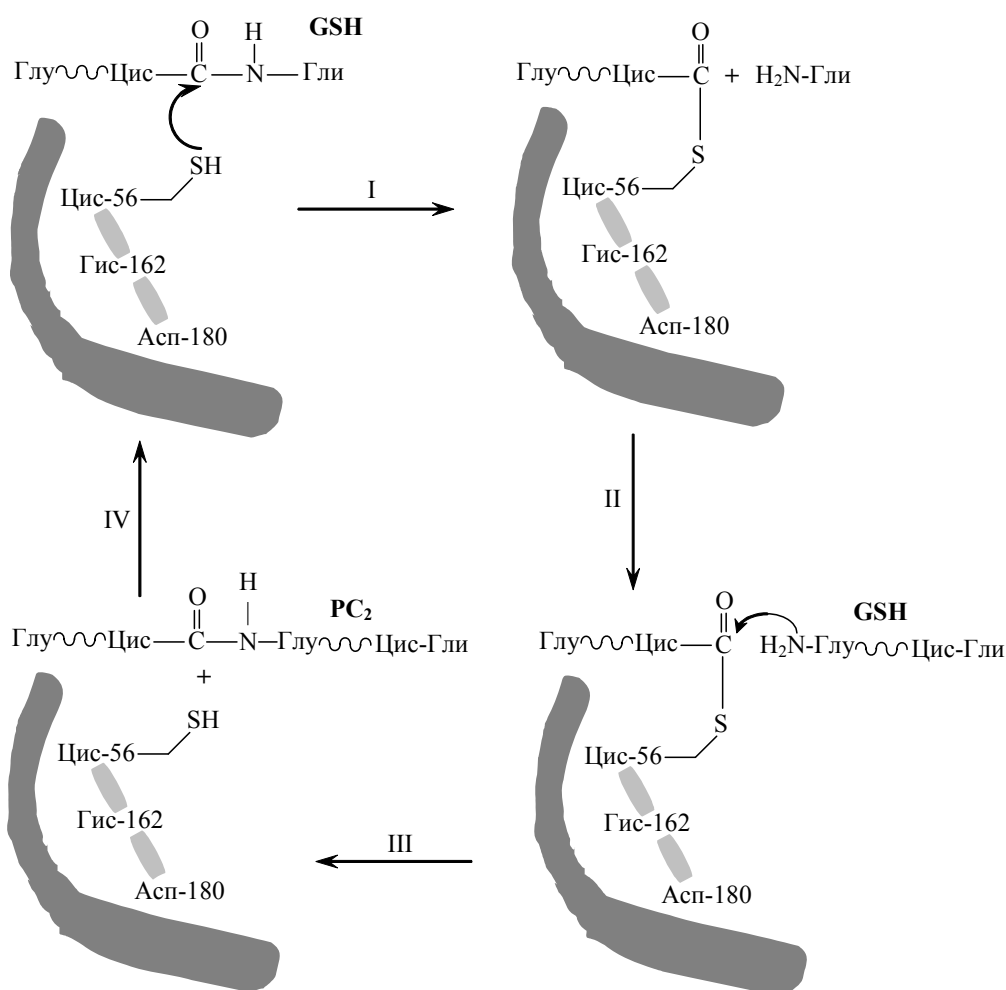


Рис. 4. Каталитический механизм фитохелатинсинтазы [47, 61]

всего, обуславливается его близостью к Гис-162 и Асп-180. Сульфгидрильный протон от Цис-56 перемещается в имидазольное кольцо Гис-162, электрофильность которого увеличивается за счет непосредственной близости к β-карбоксилу Асп-180. На втором этапе высвобожденный Гли отделяется от фермента и перемещается ко второму субстрату – акцептору (рис. 4, II). В самом простом случае (синтез PC₂ из двух молекул глутатиона) акцептором является вторая молекула глутатиона. N-терминальная часть акцепторного глутатиона далее нуклеофильно атакует промежуточный фермент-субстратный тиозфирный комплекс, приводя к образованию PC₂ и регенерации свободной тиоловой группы Цис-56 (рис. 4, III). Диссоциация PC₂ от фермента и его замена новой молекулой донорного глутатиона завершает каталитический цикл (рис. 4, IV). Такой же механизм объясняет образование более длинной цепи фитохелатинов если вместо молекулы глутатиона на втором этапе реакции связывается PC_n с образованием PC_{n+1} [47, 62].

Фитохелатинсинтаза имеет мол. м. 95 кДа и возможно состоит из четырех субъединиц (мол. м. активного димера 50 кДа). Ее изоэлектрическая точка находится около pH 4,8, температурный оптимум 35°C, оптимум pH – 7,9 и K_m по глутатиону 6,7 мМ [8, 22, 43]. Фермент ингибируется по типу обратной связи высокими концентрациями фитохелатинов или их комплексами с металлами. Так, S. Loeffler [30] показано, что добавление фитохелатинов в присутствии Cd прекращает продолжающуюся реакцию элонгации цепи. Интенсивность ее ингибирования зависит от длины цепи молекулы пептида. Фитохелатины с длиной цепи свыше семи γ-Глу-Цис единиц имеют большую относительную комплексообразующую способность, чем пептиды с меньшей длиной и следовательно способны в большей степени к терминеции процесса элонгации. Наряду с этим, поступление в клетку нескольких тяжелых металлов также может приводить к снижению (либо полному ингибированию) активности фитохелатинсинтазы. Так, экспериментами

ФИТОХЕЛАТИНЫ

R. Nakazawa установлено, что одновременное введение в среду выращивания клеток табака Cd^{2+} и As^{3+} приводило к снижению концентрации $(\gamma\text{-Глу-Цис})_{3-4}\text{-Гли}$ на единицу содержания Cd [36]. Данные, полученные L. Yin с использованием ингибитора синтеза фитохелатинов, демонстрируют, что ингибирование данного процесса ведет к гиперчувствительности к ионам тяжелых металлов, в частности к Cd [65]. Однако на сегодня невозможно с полной уверенностью говорить об однозначности этого утверждения, поскольку исследованиями S. Lee показано, что сверхэкспрессия фитохелатинсинтазы трансгенных растений арабидопсиса парадоксально приводит к сверхчувствительности к Cd и Zn [27]. В целом же следует отметить, что по утверждению S. Heiss эффекты тяжелых металлов (в частности Cd) на уровень экспрессии фитохелатинов могут варьировать не только в зависимости от вида растений, но и в зависимости от их органов [16].

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о том, что на сегодня биосинтез изо-фитохелатинов изучен недостаточно. В частности, S. Klarheck [22] показано, что неочищенный фермент из листьев гороха способен синтезировать фитохелатины первого и второго семейств, как в условиях Cd-стресса, так и в нормальных условиях. Наряду с этим, он оказался способен катализировать *in vitro* синтез фитохелатинов четвертого семейства, характерных для семейства злаков, тогда как *in vivo* у представителей семейства бобовые ни субстрата, ни продуктов этого синтеза не обнаружено [20, 21]. Полученные данные свидетельствуют о том, что выделенная из гороха фитохелатинсинтаза обладает широкой субстратной специфичностью.

Избыточное поступление тяжелых металлов в клетку приводит к запуску механизмов их нейтрализации, которые в частности, включают и внутриклеточную комплексообразование с более поздним их высвобождением для синтеза металлосодержащих апопротеинов или для конечного транспортирования в сайты хранения в пределах клетки [11]. Подтверждение участия фитохелатинов в этих процессах получено при выращивании культур растительных клеток с последующим их переносом на питательную среду, содержащую повышенные концентрации Cu и Zn. Содержание фитохелатинов в среде напрямую зависело от концентрации тяжелого металла: было максимальным на начальных этапах роста и снижалось по мере истощения металлов в питательной среде [13].

Cu-содержащие фитохелатины способны реактивировать апо-форму Cu-содержащей диаминоксидазы также хорошо, как и сульфат меди. В то время как сульфат цинка в большей степени реактивирует апокарбонную ангидразу, чем Zn-содержащие фитохелатины. Способность n_2 олигомеров последних к реактивации апофермента больше, чем n_7 олигомеров, что объясняется возрастающей силой, с которой большие олигомеры связывают металлы [59].

Наряду с этим, фитохелатины принимают участие в защите металло-чувствительных ферментов. Так, Cd, связанный фитохелатинами, оказывает от 10 до 1000 раз меньший ингибирующий эффект на ферменты РБФК/О, нитратредуктазу, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу и уреазу, чем нитрат Cd в аналогичных концентрациях [23]. Активность нитратредуктазы, ингибируемой ацетатом Cd, полностью восстанавливается, когда молярное соотношение $PC_3\text{-}(\text{Гли})/Cd$ достигает 1/4. Однако глутатион примерно в 1000 раз менее эффективен, чем фитохелатины в уменьшении ингибирования при действии Cd [43].

Основной функцией $\gamma\text{-Глу-Цис}$ пептидов является хелатирование металлов. К настоящему времени хорошо изучены Cd-связывающие комплексы, поскольку Cd является наиболее эффективным индуктором синтеза фитохелатинов. Гель-фильтрационный анализ экстрактов корней и культур клеток растений, подвергнутых действию различных концентраций Cd показывает, что обычно 90% растворимого Cd входит в состав пептидных комплексов, тогда как Cd в свободном виде практически отсутствует. Это свидетельствует о том, что в клетках он в основном связывается фитохелатинами [19, 31, 45].

Cu-связывающие комплексы изучены в меньшей степени в силу той легкости, с которой окисляется Cu (I) [23, 49]. На сегодня не выделены нативные Zn-связывающие комплексы и нам не удалось найти данных относительно пептидных комплексов с остальными металлами, включающих в себя $\gamma\text{-Глу-Цис}$ пептиды.

При связывании ионов Cd молекулами фитохелатинов образуются два комплекса. Вначале они были выделены из дрожжей, затем идентифицированы у растений. Эти комплексы получили название Cd-связывающий комплекс I (Cd-СК₁) и Cd-связывающий комплекс II (Cd-СК₂), причем молекулярная масса первого меньше, чем второго. Истинная молекулярная масса этих комплексов не выяснена, поскольку

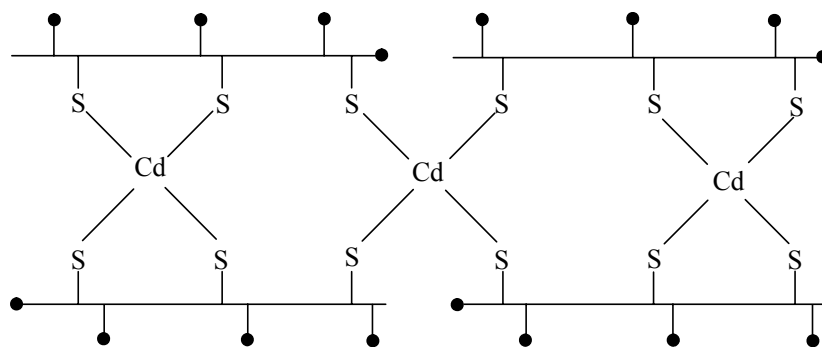


Рис. 5. Структурная модель Cd-фитохелатинового комплекса $Cd_3(PC_3)_4$: • – карбоксильные группы [57].

на ее величину оказывает значительное влияние ионная сила буфера. Например, Cd-СК₂, выделенный из *Rauvolfia serpentina*, имеет мол. м. 8 кДа при низкой ионной силе, которая постепенно снижается до 3,6 кДа при ионной силе большей 0,3М [14]. Наряду с этим, исследованиями М. Като установлено, что у растений риса, выращенных на среде содержащей Cd, его комплексы во флоэмном экссудате имели массу < 10 кДа [18].

Р. Кнеер [23] в экспериментах с *R. serpentina* показал, что после гель-фильтрации клеточного экстракта более 97% ¹⁰⁹Cd было ассоциировано с Cd-СК (фракции 54-78). Только около 1% ¹⁰⁹Cd был ассоциирован с высокомолекулярными растительными белками, не входящими в состав Cd-СК. Дальнейший анализ радиоактивно-меченных Cd-белковых комплексов показал наличие двух отдельных пиков (фракции 63 и 71) - с низкой и высокой молекулярной массой, которые были идентифицированы как Cd-СК₁ и Cd-СК₂ соответственно.

В увеличении устойчивости Cd-СК и усилении связывания металлов важную роль играет наличие сульфидной кислотной метки S²⁻ [23, 43, 66]. У растений томата и горчицы сарептской, выращенных на питательной среде, содержащей 100 мкМ Cd, в Cd-СК₂ преобладал кислото-лабильный сульфид (молярное соотношение S²⁻/Cd: 0,15-1,0), тогда как в Cd-СК₁ его содержание было значительно меньшим [48, 56].

Из дрожжей выделены Cd-СК₂ с молярным соотношением S²⁻/Cd большим, чем 0,4 и диаметром частиц 20 Å. Рентгеновский дифракционный анализ показал присутствие кристаллитов CdS, в которых около 80 CdS единиц

покрыты 30 молекулами глутатиона, PC₂-(Гли) и PC₂ [7].

В отличие от таких комплексов дрожжей, у растений томата кристаллиты имеют меньший диаметр и стабилизируются пептидной оболочкой со структурой PC_n-(Гли), где n = 3, 4 и 6 [48]. Это строение кристаллитов является примером биоминерализации, когда биополимеры обеспечивают упорядоченность структуры одному компоненту.

Определение молекулярной массы, состава пептида и концентрации металла позволили установить структурную и пространственную формулу Cd-СК из *R. serpentina* с молярным соотношением S²⁻/Cd равным 0,01. В нем атом Cd находится в непосредственном окружении четырех атомов S [57]. В целом комплекс состоит из Cd (Sцис)₄ центров с длиной связи Cd-S 2,52±0,02 Å (рис. 5). Молярное соотношение сульфгидрильные пептиды/Cd в растворимых комплексах равняется 3,78. В том случае, когда происходит интенсивное насыщение комплексов CdSO₄, это соотношение уменьшается до 1,01 и атом Cd координируется одним атомом S и тремя-четырьмя атомами O и N [45].

Полипептидная оболочка Cd-СК, выделенных из растительных источников, состоит из полипептидов различных семейств. Так, у сои Cd-СК₂ образовывали n₁₋₄ олигомеры (γ-Глу-Цис)_n-β-Ала. Cd-СК₂ кукурузы формировались из пептидов следующих трех семейств: (γ-Глу-Цис)_n-Гли, (γ-Глу-Цис)_n и (γ-Глу-Цис)_n-Глу [45].

Ферментативный синтез пептидов, входящих в состав Cd-СК, происходит как в цитозоле, так и в хлоропластах. Фермент γ-

ФИТОХЕЛАТИНЫ

глутамил-цистеин дипептидилтранспептидаза, обеспечивающий элонгацию цепи γ -Глу-Цис пептидов, хорошо растворим, так же как и Cd-СК₁ и Cd-СК₂, выделенные из разнообразных источников [12]. Экспериментами R.Vogeli-Lange [63] показано, что в вакуолях протопластов клеток мезофилла табака, подвергнутых действию Cd, содержится максимальное количество как Cd, так и РС_n-(Гли). Им высказано предположение, что синтез РС_n-(Гли) осуществляется в цитозоле с последующим переносом Cd и пептидов, возможно в виде комплекса, через тонопласт внутрь вакуоли, где происходит компартиментализация основного количества внутриклеточного Cd с участием пептидов и органических кислот.

Место клеточной локализации Cd-СК₂ было установлено в исследованиях, проводимых на *Schizosaccharomyces pombe*. Мутанты, дефективные в образовании Cd-СК₂, были более чувствительны к 100 мкМ Cd, чем штаммы дикого типа [35]. У мутанта *S. pombe*, дефицитного по Cd-СК₂, но все же способного к образованию фитохелатинов, был выделен дополняющий ген *hmt 1* с последовательностью, идентичной семейству АТФ-связывающего транспортного белка кассетного типа [37]. Штаммы дрожжей, получившие плазмидные *hmt 1*-экспрессирующие мульткопии, проявляют возрастающую резистентность к Cd по сравнению со штаммами дикого типа и способны к большей внутриклеточной аккумуляции

Cd при образовании Cd-СК₂.

Нативные НМТ1 полипептиды являются частью вакуолярной мембраны [38]. Эти белки транспортируют апофитохелатины, а также Cd-СК₁ и Cd-СК₂ в АТФ-зависимом переносе внутрь везикулы вакуоли. Сульфид обедненный Cd-СК₁ транспортируется более эффективно, чем сульфид, обогащенный Cd-СК₂, однако НМТ1 полипептиды не способны транспортировать ионы Cd²⁺.

Модель, объясняющая механизмы транспорта Cd-СК предложена D.F. Ortiz, D.E. Salt и W.E. Rauser (рис. 6). Синтезированные в цитозоле фитохелатины объединяются с Cd с образованием Cd-СК₁, который передвигается через мембрану вакуоли АТФ-связываемым транспортером кассетного типа. Большинство Cd, транспортируемого внутрь вакуоли через Cd²⁺/H⁺ антипорт, вместе с сульфидом включается в Cd-СК₁ с образованием Cd-СК₂. Сульфид, обогащенный Cd-СК₂, более стабилен в кислой среде вакуоли и имеет большую Cd-связывающую емкость чем Cd-СК₁. В представленной модели Cd-СК₁ функционирует как цитозольный переносчик, а вакуолярный Cd-СК₂ – главная форма хранения внутриклеточного Cd. Источником сульфида для Cd-СК₂ считается пуриновый метаболизм [17]. Такая модель транспорта Cd-СК подтверждена данными, полученными в экспериментах на овсе. Во-первых, везикулы тонопласта корней овса

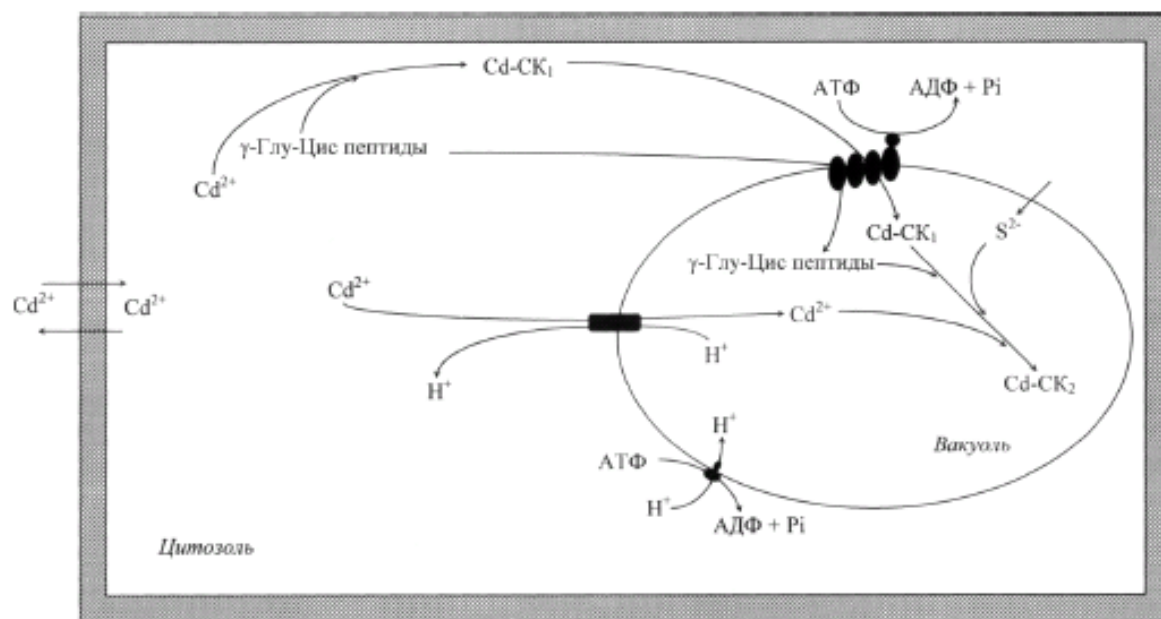


Рис. 6. Модель внутриклеточной локализации Cd-связывающих комплексов и ассоциированного транспортного механизма [38, 51, 52].

имеют Cd^{2+}/H^{+} антипорт, во-вторых, обнаружен MgATФ-зависимый транспорт фитохелатинов и Cd-фитохелатиновых комплексов [51, 52].

Образованные в цитозоле γ -Глу-Цис пептиды также могут транспортироваться внутрь вакуоли в виде апопептидов по альтернативному пути (рис. 6). Далее они в вакуоли объединяются с Cd и сульфидом и формируют Cd-СК₂ [38, 51].

Представленные выше фундаментальные данные о молекулярных и клеточных механизмах поступления и компартментализации тяжелых металлов расширяют наши представления о физиолого-биохимических процессах, которые лежат в основе устойчивости организмов к неблагоприятным факторам. Однако требует объяснения связь уровня металлотолерантности растений с экспрессией геномом фитохелатинсинтазы. Наряду с этим, еще остаются невыясненными видоспецифические механизмы функционирования РС-комплексов по связыванию других тяжелых металлов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cazalé A.-C., Clemens S. Arabidopsis thaliana expresses a second functional phytochelatin synthase // FEBS Lett. – 2001. – V. 507. – P. 215-219.*
2. *Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis // Planta. – 2001. – V. 212, № 4. – P. 475-486.*
3. *Clemens S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.I. Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeasts // EMBO J. – 1999. – V. 18. – P. 3325-3333.*
4. *Cobbett C.S. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification // Plant Physiol. – 2000. – V. 123, № 3. – P. 825-832.*
5. *Cobbett C., Goldsbrough P. Phytochelatin and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis // Annu. Rev. Plant Biol. – 2002. – V. 53. – P. 159-182.*
6. *Cospa C., Martinoia E., Keller C. Hyperaccumulation of cadmium and zinc in *Thlaspi caerulescens* and *Arabidopsis halleri* at the leaf cellular level // Plant Physiol. – 2004. – V. 134, № 2. – P. 716-725.*
7. *Dameron C.T., Reese R.N., Mehra R.K. et al. Biosynthesis of cadmium sulfide quantum semiconductor crystallites // Nature. – 1989. – V. 338. – P. 596-597.*
8. *De Knecht J.A., van Baren N., Ten Bookum W.M. et al. Synthesis and degradation of phytochelatin in cadmium-sensitive and cadmium-tolerant *Silene vulgaris* // Plant Sci. – 1995. – V. 106. – P. 9-18.*
9. *di Toppi L.S., Gabbriellini R. Response to cadmium in higher plants // Environ. Exp. Botany. – 1999. – V. 41. – P. 105-130.*
10. *di Toppi L.S., Lambardi M., Pazzagli L. et al. Response to cadmium in carrot in vitro plants and cell cultures // Plant Sci. – 1998. – V. 137, № 2. – P. 119-129.*
11. *Feng B., Ma M. Progress in researches of phytochelatin and phytochelatin synthase in regard to the heavy metals stability // Chin J. Appl. and Environ. Biol. – 2003. – V. 9, № 6. – P. 657-661.*
12. *Grill E., Löffler S., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Phytochelatin, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific γ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1989. – V. 86. – P. 6838-6842.*
13. *Grill E., Thumann J., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Induction of heavy-metal binding phytochelatin by inoculation of cell cultures in standard media // Plant Cell Rep. – 1988. – V. 7. – P. 375-378.*
14. *Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Phytochelatin, a class of heavy-metal binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1987. – V. 84. – P. 439-443.*
15. *Ha S.-B., Smith A.P., Howden R, et al. Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast, Schizosaccharomyces pombe // Plant Cell. – 1999. – V. 11. – P. 1153-1164.*
16. *Heiss S., Wachter A., Bogs J. et al. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure // J. Exp. Bot. – 2003. – V. 54. – P. 1833-1839.*
17. *Juang R.-H., McCue K.F., Ow D.W. Two purine biosynthetic enzymes that are required for cadmium tolerance in Schizosaccharomyces pombe utilize cysteine sulfinic acid in vitro // Arch. Biochem. Biophys. – 1993. – V. 304. – P. 392-401.*
18. *Kato M., Fujiwara T., Yoneyama T., Hayashi H. Investigation of cadmium-binding substances in rice phloem sap // Plant and Cell Physiol. – 2004. – V. 45. – P. 223.*
19. *Keltjens W.G., van Beusichem M.L. Phytochelatin as biomarkers for heavy metal stress in maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.): combined effects of copper and cadmium // Plant and Soil. – 1998. – V. 203, № 1 – P. 119-126.*

ФИТОХЕЛАТИНЫ

20. Klapheck S., Chrost B., Strake J., Zimmermann H. γ -Glutamylcysteinylserine: a new homologue of glutathione in plants of the family Poaceae // Bot. Acta. – 1992. – V. 105. – P. 174-179.
21. Klapheck S., Fliegner W., Zimmer I. Hydroximethyl-phytochelatin [(γ -Glu-Cys)_n-Ser] are metal-induced peptides of the Poaceae // Plant Physiol. – 1994. – V. 104. – P. 1325-1332.
22. Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L. Synthesis of phytochelatin and homo-phytochelatin in *Pisum sativum* L. // Ibid. – 1995. – V. 107. – P. 515-521.
23. Kneer R., Zenk M.H. Phytochelatin protect plant enzymes from heavy metal poisoning // Phytochemistry. – 1992. – V. 31, № 8. – P. 2663-2667.
24. Kondo N., Imai K., Isobe M. et al. Cadystin A and B, major subunit peptides comprising cadmium binding peptides induced in fission yeast – separation, revision of structures and synthesis // Tetrahedron Lett. – 1984. – V. 25. – P. 3869-3872.
25. Kramer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M. et al. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel // Nature (Gr. Brit.). – 1996. – V. 379, № 6566. – P. 635-638.
26. Lang M.-L., Zhang Y.-X., Chai T.-Y. Successes in research of heavy metals hyperaccumulation mechanisms in plants // Acta Bot. Boreali-Occident. Sin. – 2003. – V. 23, № 11. – P. 2021-2030.
27. Lee S., Moon J.S., Ko T.-S. et al. Overexpression of arabidopsis phytochelatin synthase paradoxically leads to hypersensitivity to cadmium stress // Plant Physiol. – 2003. – V. 131, № 2. – P. 656-663.
28. Li Y., Dhankher O.P., Carreira L. et al. Overexpression of phytochelatin synthase in Arabidopsis leads to enhanced arsenic tolerance and cadmium hypersensitivity // Plant and Cell Physiol. – 2004. – V. 45, № 12. – P. 1787-1797.
29. Lin D., Chen D.-M., Yan X.-D., Zhu C. Research advance on the physiologically molecular mechanisms for plant heavy metal tolerance // J. Zhejiang Univ. Agr. and Life Sci. – 2004. – V. 30, № 4. – P. 375-382.
30. Loeffler S., Hochberger A., Grill E. et al. Termination of the phytochelatin synthase reaction through sequestration of heavy metals by the reaction products // FEBS Lett. – 1989. – V. 258. – P. 42-46.
31. Maier E.A., Matthews R.D., McDowell J.A. et al. Environmental cadmium levels increase phytochelatin and glutathione in lettuce grown in a chelator-buffered nutrient solution // J. Environ. Qual. – 2003. – V. 32, № 4. – P. 1356-1364.
32. Malowski E., Kurtyka R. Mechanizmy hyperakumulacji cynku i kadmu w roslinach // Post. Biol. Komorki. – 2003. – V. 30, № 3. – P. 483-496.
33. Mehra R.K., Mulchandani P. Glutathione-mediated transfer of Cu (I) into phytochelatin // Biochem. J. – 1995. – V. 307. – P. 697-705.
34. Meuwly P., Thibault P., Schwan A.L., Rauser W.E. Three families of thiol peptides are induced by cadmium in maize // Plant J. – 1995. – V. 7. – P. 391-400.
35. Mutoh N., Hayashi Y. Isolation of mutants of *Schizosaccharomyces pombe* unable to synthesize cadystin, small Cd-binding peptides // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1988. – V. 151. – P. 32-39.
36. Nakazawa R., Ikawa M., Yasuda K., Takenaga H. Synergistic inhibition of the growth of suspension cultured tobacco cells by simultaneous treatment with cadmium and arsenic in relation to phytochelatin synthesis // Soil. Sci. and Plant Nutr. – 2000. – V. 46, № 1 – P. 271-275.
37. Ortiz D.F., Kreppel L., Speiser D.M. et al. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter // EMBO J. – 1992. – V. 11. – P. 3491-3499.
38. Ortiz D.F., Ruscitti T., McCue K.F., Ow D.W. Transport of metal-binding peptides by HMT-1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein // J. Biol. Chem. – 1995. – V. 270. – P. 4271-4278.
39. Oven M., Page J.E., Zenk M.H., Kutchan T.M. Molecular characterization of the homophytochelatin synthase of soybean *Glycine max* // Ibid. – 2002. – V. 277. – P. 4747-4754.
40. Oven M., Raith K., Neubert R.H.H. et al. Homophytochelatin are synthesized in response to cadmium in azuki beans // Plant Physiol. – 2001. – V. 126. – P. 1275-1280.
41. Raab A., Feldmann J., Meharg A.A. The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica* // Ibid. – 2004. – V. 134, № 3. – P. 1113-1122.
42. Ramos J., Clemente M.R., Naya L, et al. Phytochelatin synthases of the model legume *Lotus japonicus*: a small multigene family with differential response to cadmium and alternatively spliced variants // Ibid. – 2007. – in press.
43. Rauser W.E. Phytochelatin and related peptides: structure, biosynthesis and function // Ibid. – 1995. – V. 109. – P. 1141-1149.

44. *Rauser W.E.* Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins // *Cell. Biochem. Biophys.* – 1999. – V. 31. – P. 19-48.
45. *Rauser W.E., Meuwly P.* Retention of cadmium in roots of maize seedlings: role of complexation by phytochelatin and related thiol peptides // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 109. – P. 195-202.
46. *Rea P.A.* Phytochelatin synthase, papain's cousin, in stereo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – V. 103. – P. 507-508.
47. *Rea P.A., Vatamaniuk O.K., Rigden D.J.* Weeds, Worms, and More. Papain's Long-Lost Cousin, Phytochelatin Synthase // *Plant Physiol.* – 2004. – V. 136, № 1. – P. 2463-2474.
48. *Reese R.N., White C.A., Wingle D.R.* Cadmium-sulfide crystallites in Cd-(γ EC)_nG peptide complexes from tomato // *Ibid.* – 1992. – V. 98. – P. 225-229.
49. *Robinson N.J., Tommey A.M., Kuske C., Jackson P.J.* Plant metallothioneins // *Biochem. J.* – 1993. – V. 295. – P. 1-10.
50. *Ruotolo R., Peracchi A., Bolchi A. et al.* Domain organization of phytochelatin synthase // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 14686-14693.
51. *Salt D.E., Rauser W.E.* MgATP-dependent transport of phytochelatin across the tonoplast of oat roots // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 107. – P. 1293-1301.
52. *Salt D.E., Wagner G.J.* Cadmium transport across tonoplast of vesicles from oat roots // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – P. 12297-12302.
53. *Satofuka H., Fukui T., Takagi M. et al.* Metal-binding properties of phytochelatin-related peptides // *J. Inorg. Biochem.* – 2001. – V. 86. – P. 595-602.
54. *Scheller H.V., Huang B., Hatch E., Goldsbrough P.B.* Phytochelatin synthesis and glutathione levels in response to heavy metals in tomato cells // *Plant Physiol.* – 1987. – V. 85. – P. 1031-1035.
55. *Sharma N.C., Gardea-Torresdey J.L., Parsons J., Sahi S.V.* Chemical speciation and cellular deposition of lead in *Sesbania drummondii* // *Environ. Toxicol. and Chem.* – 2004. – V. 23, № 9. – P. 2068-2073.
56. *Speiser D.M., Abrahamson S.L., Banuelos G., Ow D.W.* *Brassica juncea* produces a phytochelatin-cadmium sulfide complex // *Plant Physiol.* – 1992. – V. 99. – P. 817-821.
57. *Strasdeit H., Duhme A.-K., Kneer R. et al.* Evidence for discrete Cd(SCys)₄ units in cadmium phytochelatin complexes from EXAFS spectroscopy // *J. Chem. Soc. Ser. Chem. Commun.* – 1991. – P. 1129-1130.
58. *Szalai G., Janda T., Golan-Goldhirsh A., Paldi E.* Effect of Cd treatment on phytochelatin synthesis in maize // *Acta Biologica Szeged.* – 2002. – V. 46, № 3-4. – P. 121-122.
59. *Thumann J., Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H.* Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes // *FEBS Lett.* – 1991. – V. 284. – P. 66-69.
60. *Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y-P., Rea P.A.* AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96. – P. 7110-7115.
61. *Vatamaniuk O.K., Mari S., Lang A. et al.* Phytochelatin synthase, a dipeptidyltransferase that undergoes multisite acylation with γ -glutamylcysteine during catalysis. Stoichiometric and site-directed mutagenic analysis of *Arabidopsis thaliana* PCS1-catalyzed phytochelatin synthesis // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – P. 22449-22460.
62. *Vivares D., Arnoux P., Pignol D.* A papain-like enzyme at work: native and acyl-enzyme intermediate structures in phytochelatin synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2005. – V. 102. – P. 18848-18853.
63. *Vogeli-Lange R., Wagner G.J.* Subcellular localization of cadmium-binding peptides in tobacco leaves. Implication of a transport function for cadmium-binding peptides // *Plant Physiol.* – 1990. – V. 92. – P. 1086-1093.
64. *Wu F., Zhang G.* Phytochelatin and their functions in tolerance of higher plants to the heavy metals // *Chin. J. Appl. Ecol.* – 2003. – V. 14, № 4. – P. 632-636.
65. *Yin L., Zhou Y., Fan X., Lu R.* Induction of phytochelatin in *Lemna aquinoctialis* in response to cadmium exposure // *Bull. Environ. Contam. and Toxicol.* – 2002. – V. 68, № 4. – P. 561-568.
66. *Zenk M.H.* Heavy metal detoxification in higher plants // *Gene.* – 1996. – V. 179. – P. 21-30.

Поступила в редакцию
07.03.2007 г.

ФИТОХЕЛАТИНЫ

PHYOTCHELATINS: STRUCTURE, BIOSYNTHESIS, FUNCTIONS

D. V. Syshchikov

*Kriviy Rig Botanic Garden of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kriviy Rig, Dnepropetrovsk reg., Ukraine)*

Is generalized literary information about a structure, functions and ways of biosynthesis of different classes of phytochelatins in the plant cells. Is shown the participation of this cysteine enriched polypeptides in the processes of heavy metals detoxification and maintenances of plants homoeostasis in the stress conditions caused by their surplus receipt in cells. The accumulated facts allow to consider that are the basic functions of phytochelatins are the chelation of heavy metal ions with their subsequent compartmentalization and, on occasion, with more late their freeing for the synthesis of metal-containing apoproteins, and also participation in defence of metal-sensitive enzymes.

Key words: *phytochelatins, glutathione, synthesis, amino acid, heavy metals, transport, compartmentalization*

ФИТОХЕЛАТИНИ: СТРУКТУРА, БІОСИНТЕЗ, ФУНКЦІЇ

Д. В. Сишиков

*Криворізький ботанічний сад Національної академії наук України
(Кривий Ріг, Дніпропетровська обл., Україна)*

Узагальнені літературні дані про структуру, функції та шляхи біосинтезу різних класів фітохелатинів в клітинах рослин. Показана участь цих цистеїн-збагачених поліпептидів в процесах детоксикації важких металів та підтримання гомеостазу рослин в стресових умовах, що викликані їх надлишковим надходженням в клітини. Накопичені факти дозволяють вважати, що основними функціями фітохелатинів є хелатування іонів важких металів з їх подальшою компартменталізацією та, у деяких випадках, з більш пізнім вивільненням для синтезу металовмісних апопротеїнів, а також участь у захисті метало чутливих ферментів.

Ключові слова: *фітохелатини, глутатіон, синтез, амінокислота, важкі метали, транспорт, компартменталізація*