อภินันทนาการ

เอกสารประกอบการสอนวิชา

109741 Plant Biochemistry

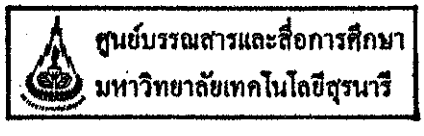
ประจำปีการศึกษา 2548

โดย อ.ดร. รจนา โอภาสศิริ

สาขาวิชาชีวเคมี

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



คำนำ

เอกสารประกอบการสอนรายวิชา 109741 Plant Biochemistry ฉบับนี้จัดทำขึ้นเพื่อใช้ประกอบการสอนในรายวิชานี้ในภาคการศึกษาที่ 3 ปีการศึกษา 2548 ซึ่งเปิดสอนสำหรับนักศึกษาบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโทและเอก ในสาขาเทคโนโลยีการเกษตรและชีวเคมี ในการจัดทำรูปเล่มนี้เป็นการรวบรวมเนื้อหาที่เกี่ยวข้องกับ Plant biochemistry ในรูปแบบสไลด์ที่ใช้ในการประกอบการสอน ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่าเนื้อหาที่ปรากฏในเอกสารประกอบการสอนนี้จะเป็นประโยชน์แก่นักศึกษาทั้งระดับปริญญาตรี โทและเอก และบุคคลทั่วไป

อ. ดร. รจนา โอภาสศิริ

สารบัญ

I. Introduction

II. Photosynthesis and Photorespiration

III. Plant respiration

IV. Plant carbohydrate metabolisms

V. Plant lipids metabolisms

VI. Nitrogen metabolisms

VII. Response to plant pathogen

Plant Biochemistry

Outline

I. Introduction

II. Photosynthesis and Photorespiration

III. Plant respiration

IV. Plant carbohydrate metabolisms

V. Plant lipids metabolisms

VI. Nitrogen metabolisms

VII. Response to plant pathogen

I. Introduction

- Involvement of biochemistry in plant life cycle
- Bioenergetics consideration
- Aspect of enzyme
- Compartmentation and organelles

Involvement of biochemistry in plant life cycle

ความสำคัญของพืช

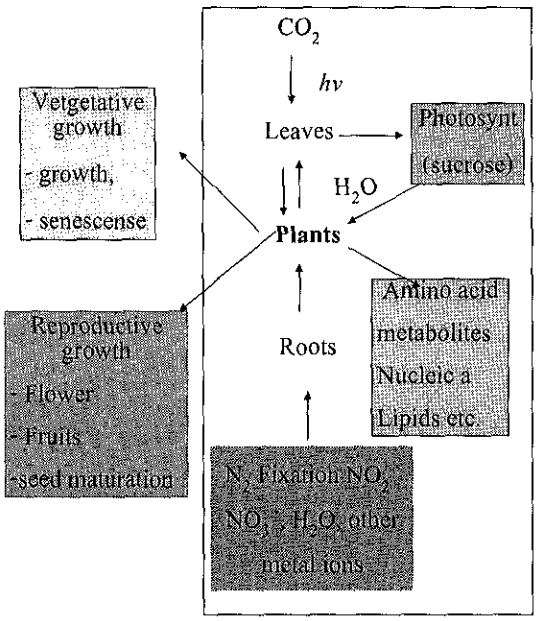
Food, Phamarceuticals, เพิ่ม O_2 / ลด CO_2 ป้องกันการชะล้างพังทลายของดิน, เพิ่มแร่ธาตุอาหารแก่ดิน, อุตสาหกรรมไม้, กระดาษ เป็นต้น

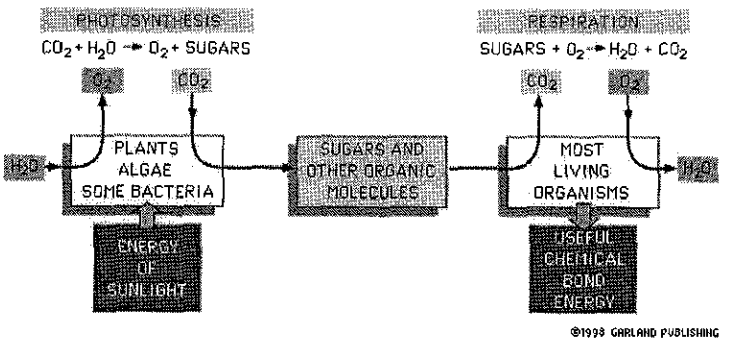
Chemical compounds **ที่มีอยู่ในพืช**

- สารพื้นฐานในการดำรงชีวิต (basic compound) :
  - carbohydrate (monosacc, oligosacc, glucomannan, inulin, starch, sucrose)
  - Lipid (unsaturated and saturated fatty acid, wax)
  - Amino acid and protein (storage protein, enzyme)
  - Nucleic acid
  - Hormone,
- Secondary metabolites : พบในพืชบางชนิด เช่น pigments แสดงสีของดอกไม้, กลิ่น (terpenes), N-compounds (Alkaloid, non-protein amino acids, CN-)

พืชมีการดำรงชีวิตอยู่อย่างไร ?

- สังเคราะห์แสง
- หายใจ
- ดูดซึมธาตุอาหาร - inorganic cpd, mineral (CO_2, H_2O, N_2/P/K/Fe...) เพื่อไปสังเคราะห์ organic cpd เพื่อนำไปเผาผลาญให้ได้พลังงาน, growth, maintenance





การแพร่ของสาร (water, mineral, inorganic cpd) เข้าสู่เซลล์

- **การแพร่ของน้ำ**

Diffusion : Conc gradient,

Osmosis : conc gradient, -- short distance

Pressure-bulk flow -- long distance

- **การแพร่ของสารผ่าน membrane**

- ขึ้นกับ [สาร] และ permeability of membrane

Passive transport ขึ้นกับ conc gradient [high] ⇒ [low]

Active transport ใช้พลังงาน [low] ⇒ [high]

Facilitated transport [high]-⇒ [low] มี carrier, ไม่ใช้พลังงาน

ชีวพลังงาน (Bioenergetics)

- การศึกษาการเปลี่ยนแปลงพลังงานที่เกิดขึ้นภายในเซลล์และระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อม
- การเกิดปฏิกิริยาชีวเคมีเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนรูปพลังงาน (energy transduction process)

Gibbs Free Energy

$G = H - TS$

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

$\Delta G < 0$ means Exergonic, favorable process

$\Delta G > 0$ means Endergonic, reverse process favored

<u>การเปลี่ยนแปลงพลังงานอิสระในปฏิกิริยาชีวเคมี</u>

$$\Delta G^{0'} = -RT \ln K_{eq}$$

(R = ค่าคงที่ของแกส, T = อุณหภูมิ, K; Keq = ค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยา)

- ค่า $G^{0'}$ ใช้บอกทิศทางของปฏิกิริยา

- $-$ ⇨ $K_{eq} > 1$, ปฏิกิริยาเกิดขึ้นเองได้ (Exergonic)
- 0 ⇨ $K_{eq} = 1$, ปฏิกิริยาอยู่ในสมดุล
- $+$ ⇨ $K_{eq} < 1$, ปฏิกิริยา เกิดขึ้นเองไม่ได้ (Endergonic)

- สำหรับค่า $G^{0'}$ ของปฏิกิริยา ที่เกิดควบคู่กัน (couple reaction) คือผลรวมของ $G^{0'}$ ของแต่ละปฏิกิริยา

Coupled Reactions

For
A <=> B (ΔG° = +10 kJ/mol) and
C <=> D (ΔG° = -30kJ/mol),
A + C <=> B + D (ΔG° = +10 - 30 = -20 kJ/mol)

การเกิดปฏิกิริยาควบคู่ในลักษณะนี้ช่วยให้บางปฏิกิริยาที่ไม่สามารถเกิดได้เอง (ΔG° เป็น +) แต่หลังจากได้รับพลังงานเสรีจากคู่ปฏิกิริยาซึ่งมี G° เป็น - แล้วจะสามารถเกิดขึ้นได้

Energy Generating Systems

1. Hydrolysis of energy compounds

(High E) $ATP + H_2O \longrightarrow AMP + 2Pi$ $\hat{}G^0 > -60$ kJ/mol

$ATP + H_2O \longrightarrow ADP + Pi$ $\hat{}G^0 = -30$ kJ/mol

$ADP + H_2O \longrightarrow AMP + Pi$ $\hat{}G^0 = -32.2$ kJ/mol

(low E) $AMP + H_2O \longrightarrow$ adenosine $\hat{}G^0 = -14.2$ kJ/mol

GTP, UTP, CTP, Acetyl CoA,

Phosphoenol pyruvate, Glycerate 1,3 diphosphate

2. Oxidation-reduction reactions

Oxidant = Oxidizing agent ตัวรับ e-

Reductant = Reducing agent ตัวให้ e-

$AH_2 + O_2 \dashrightarrow A + H_2O_2$

reductant oxidant

$A + e^- \longrightarrow A^-$ A ถูก reduced Reduction รับ e- เช่น Fe^{3+} ------- Fe^{2+}

$A^- \longrightarrow A + e^-$ A- ถูก oxidize Oxidation เสีย e- เช่น Fe^{2+} ------ Fe^{3+}

- Redox potential measures potential to accept or donate electron (E^0)

O_2 $E^0 = +0.82$ V

NADH $E^0 = -0.32$ V

e- จาก NADH จะส่งไปให้ O_2 ; O_2 ถูก reduced; NADH ถูก oxidized

FMN/FMNH $E^0 = -0.22$ V

NAD/NADH $E^0 = -0.32$ V

e- จาก NADH จะส่งไปให้ FMN/FMNH

$\hat{}G^0 = -nF \hat{} E^0$ = ค่าพลังงานอิสระของ e- flow

n = number of e- flow , F = Faraday constant,

E^0 = ค่าความแตกต่างของค่า redoxpotential

$\hat{}E^0$ ต้องมีค่าเป็น + จึงจะเป็น spontaneous reaction

Light driven oxidation-reduction reaction

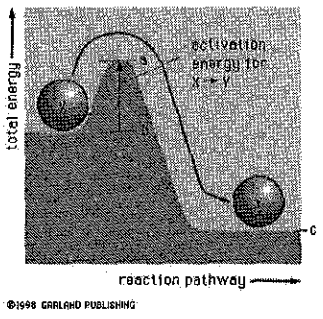
proton electrochemical gradients across membrane

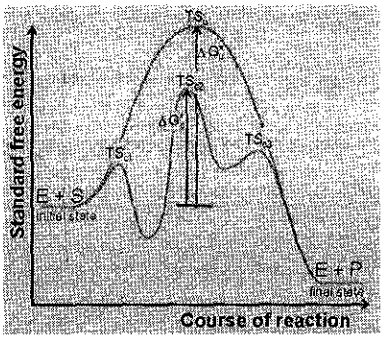
Aspects of enzymes

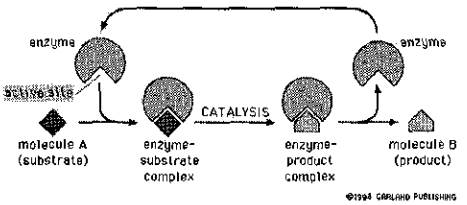
• เอนไซม์ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ เนื่องจากเอนไซม์ไปเปลี่ยนวิถีทางการเกิดปฏิกิริยาใหม่ เพื่อลดระดับพลังงานของ transition state

โดยการยึดจับ substrate และตัวทำปฏิกิริยาอื่น ๆ ให้อยู่ในทิศทางที่เหมาะสมทำให้เกิดการลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยา (active energy) ลง ทำให้การเปลี่ยน substrate ไปเป็น product เกิดได้เร็วขึ้น

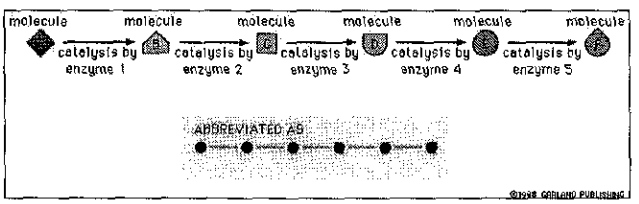
• เอนไซม์ จะไม่เปลี่ยนผลต่างของพลังงานอิสระของปฏิกิริยา





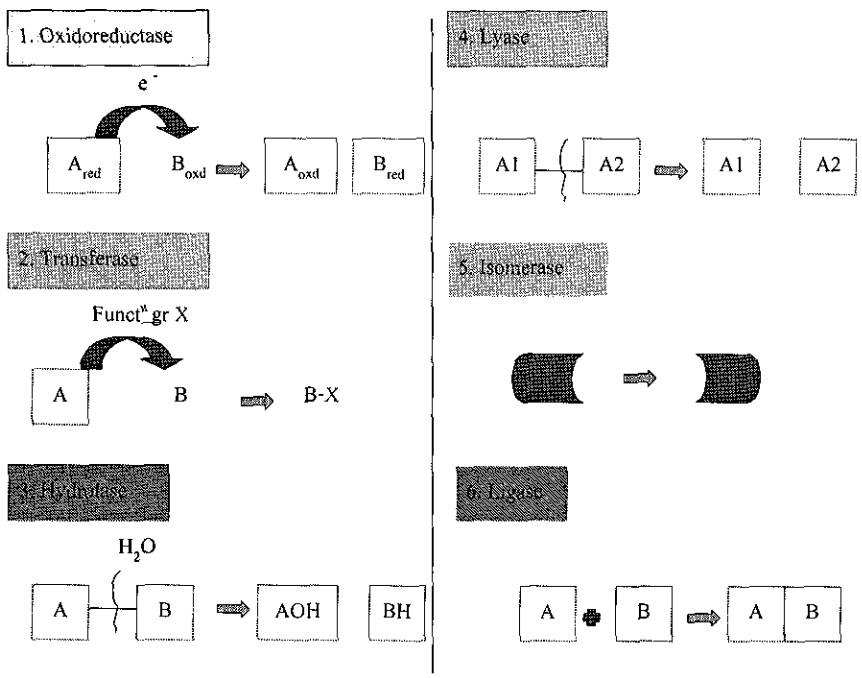


ปฏิกิริยาเคมีในร่างกายจะมีการดำเนินไปพร้อมกัน หรือต่อเนื่อง จึงจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิด เอนไซม์หนึ่งต้องอาศัยผลิตภัณฑ์ของเอนไซม์อีกตัวหนึ่งมาเป็น substrate และส่งผ่านผลิตภัณฑ์ที่ได้ ไปเป็น substrate ของเอนไซม์ถัดไป (เช่น ปฏิกิริยาการหายใจระดับเซลล์)



แบ่งเอนไซม์เป็น 6 พวกใหญ่ๆ (class) ตามชนิดของปฏิกิริยา

Number	Classification	Biochemical Properties
1.	Oxidoreductases	Act on many chemical groupings to add or remove hydrogen atoms.
2.	Transferases	Transfer functional groups between donor and acceptor molecules. Kinases are specialized transferases that regulate metabolism by transferring phosphate from ATP to other molecules.
3.	Hydrolases	Add water across a bond, hydrolyzing it.
4.	Lyases	Add water, ammonia or carbon dioxide across double bonds, or remove these elements to produce double bonds.
5.	Isomerases	Carry out many kinds of isomerization: L to D isomerizations, mutase reactions (shifts of chemical groups) and others.
6.	Ligases	Catalyze reactions in which two chemical groups are joined (or **ligated**) with the use of energy from ATP.



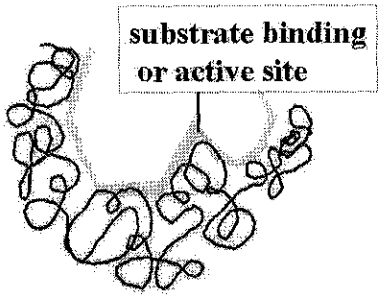
บริเวณที่สำคัญบนเอนไซม์

บริเวณที่สำคัญบนเอนไซม์ประกอบด้วย Active site และ Binding site ซึ่งมีลักษณะทั่วไปดังนี้

1. มีโครงรูป 3 มิติ ประกอบด้วย amino acid ซึ่งมักจะอยู่ลำดับต่างกันบนสาย polypeptide เช่น 35, 52, 62, 63, 101
2. เป็นบริเวณเล็กๆ บน enzyme

1. บริเวณจับ (รับ) (binding site) เป็นบริเวณหนึ่งของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ยึดจับกับ Substrate
   - Binding site จะมีกรดอะมิโนที่สามารถจับกับ substrate ด้วยแรง Hydrophobic interaction, แรงดึงดูดระหว่างประจุ,
   - มักจะประกอบด้วย amino acid หลายตัวทำหน้าที่นี้ร่วมกัน เช่น Lysozyme มี amino acid 6 ตัว ตรึง 6 หน่วย saccharides
   - ขณะที่เกิดการยึดจับ บางเอนไซม์ก็อาจเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้เหมาะสมกับรูปร่างของ substrate
2. บริเวณเร่ง (catalytic site) เป็นบริเวณที่ substrate จะเกิดปฏิกิริยาเคมีกับเอนไซม์ให้เกิดผลิตภัณฑ์
   - อาจจะเป็นตำแหน่งเดียวกันหรือใกล้กับ binding site
   - มักจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนที่มีข้ว กรด เบส amino acid เหล่านี้ จะทำหน้าที่แตกพันธะ / สร้างพันธะใหม่ ของ *substrate* เพื่อเปลี่ยน *substrate* ไปเป็น *product* เรียกกรดอะมิโนที่ทำหน้าที่นี้ว่า catalytic amino acid

- สำหรับ amino acid อื่นๆ ที่อยู่บริเวณ active site และ binding site แต่ไม่ได้ทำหน้าที่เป็นหมู่จับหรือหมู่เร่ง ก็มีความสำคัญมากต่อความจำเพาะของเอนไซม์ โดยหมู่ R จะต้องมีขนาดรูปร่างและคุณสมบัติเหมาะสมไม่ขัดขวางการเข้าจับกับ substrate
- บริเวณอื่นๆ ของเอนไซม์ก็มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยมีส่วนร่วมในการกำหนดตำแหน่งที่อยู่ของหมู่เร่งต่างๆ ในบริเวณ active site



โครงสร้างสามมิติของเอนไซม์

★ สรุป : เอนไซม์จึงทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาได้โดย :

1. ยึดจับ substrate และตัวทำปฏิกิริยาอื่นๆ ให้อยู่ในทิศทางที่เหมาะสมใน active site ของเอนไซม์
2. เปลี่ยนวิถีทางการเกิดปฏิกิริยาใหม่เพื่อลดระดับพลังงานของ transition state ทำให้เกิดการลดพลังงานกระตุ้นของปฏิกิริยา (active energy) ลง ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น
3. ใช้กรดอะมิโนบริเวณ active site มี catalytic group ทำหน้าที่ แตกพันธะ / สร้างพันธะใหม่ ให้กับ substrate เพื่อเปลี่ยน substrate ให้เป็น product

ผลของปัจจัยต่าง ๆ ต่อการทำงานของเอนไซม์

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ได้แก่

1). ปริมาณเอนไซม์ 2). ปริมาณ substrate

3). pH 4). อุณหภูมิ

5) สารตัวแปลง (Modifier) etc.

1). ปริมาณของเอนไซม์

จากการศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาที่เร่งโดยเอนไซม์ และ จลนศาสตร์ของเอนไซม์ พบว่า เมื่อให้ปริมาณ substrate คงที่ อัตราเร็วในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับปริมาณของเอนไซม์ (ดูหัวข้อที่ 5)

2). ปริมาณของ substrate

เมื่อควบคุมปริมาณเอนไซม์ให้คงที่ และพบว่าอัตราเร็วของปฏิกิริยาขึ้นกับ ปริมาณ substrate (ดูหัวข้อที่ 5)

3) pH

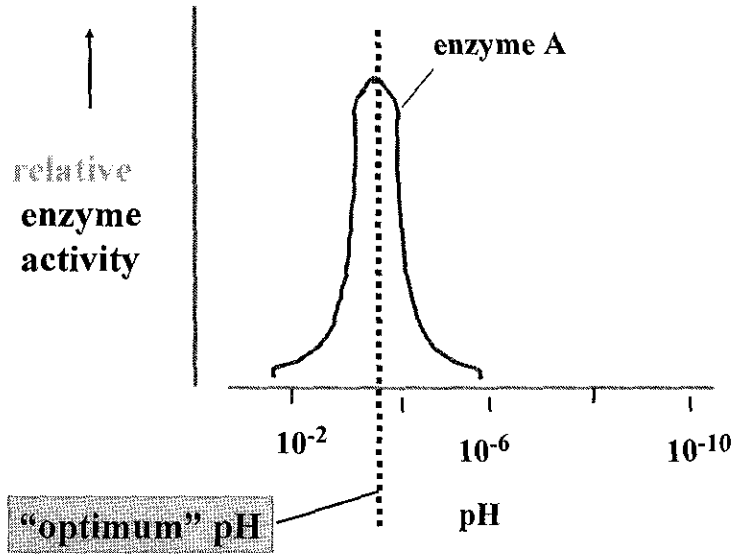
1) ผลของ pH ต่อการเร่งปฏิกิริยา : การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์จะขึ้นอยู่กับ pH ของสารละลาย ปฏิกิริยาของเอนไซม์จะเกิดขึ้นได้ดี ที่ pH ของสารละลายที่เหมาะสมค่าหนึ่ง (pH optimum) เนื่องจาก pH มีผลต่อประจุไฟฟ้าในโมเลกุลของทั้งเอนไซม์ และ substrate

- เอนไซม์ส่วนมากจะเร่งปฏิกิริยา ได้ดีในช่วง pH 5-9 ถ้า pH ต่ำกว่า หรือสูงกว่านี้ อาจทำให้เอนไซม์เอนไซม์เสียสภาพ เนื่องจาก 3D structure ถูกทำลาย แต่ก็มีเอนไซม์บางชนิดที่ทำงานได้ดีที่ pH เป็นกรด มาก เช่น pepsin หรือเป็นด่างมาก เช่น alkaline phosphatase

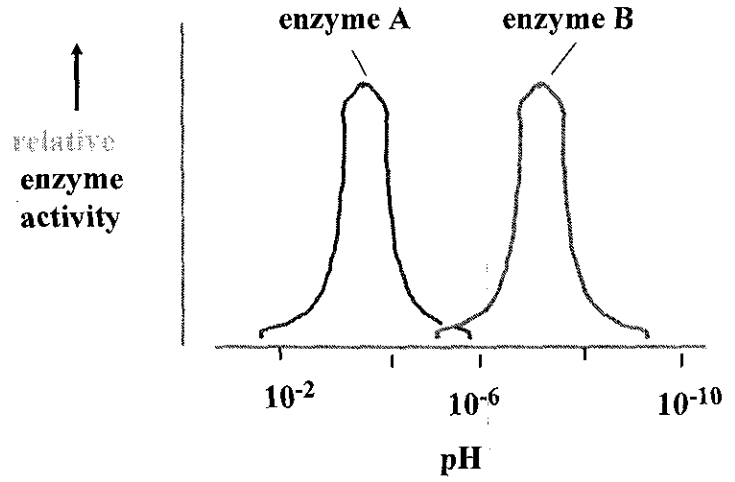
2) อิทธิพลของ pH ต่อความเสถียรของเอนไซม์ : โดยนำเอนไซม์ไป preincubate ที่ pH ต่างๆ เป็นเวลาอย่างน้อยนานเท่ากับ เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์ activity ของเอนไซม์ แล้วจึงนำเอนไซม์ ที่ pH ต่างๆ มาหา activity ที่ optimum pH

- เอนไซม์บางชนิดอาจมีความเสถียรมากเมื่อเก็บที่ pH ที่แตกต่างจาก pH optimum ที่เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์

เมื่อเขียนเส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์กับ pH แล้วมักได้กราฟรูประฆังคว่ำ



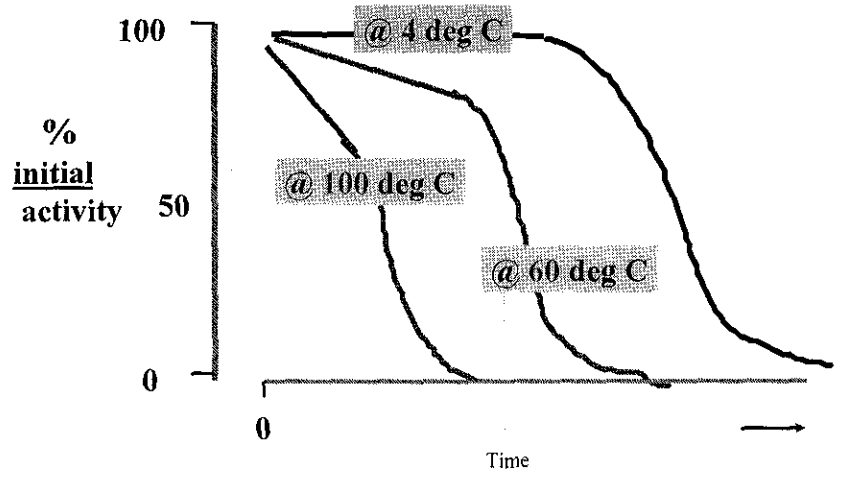
เอนไซม์แต่ละชนิดอาจมี pH optimum แตกต่างกัน



4) ผลของ Temperature ต่อเอนไซม์

- การเพิ่ม Temp จะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่มขึ้น แต่มีขีดจำกัด เพราะเอนไซม์เป็นโปรตีนที่มี 3D structure ที่ซับซ้อน และการที่เอนไซม์เร่งปฏิกิริยา ได้ เอนไซม์จะต้องมี 3D structure ที่เหมาะสมที่ให้หมู่ R ของ amino acid โดยเฉพาะตรง active site มีการจัดเรียงอย่างพอเหมาะที่จะเข้าจับกับ S และเกิดปฏิกิริยาได้
- 3D structure จะคงรูปได้จะต้องอาศัยแรงอย่างอ่อนของพันธะ noncovalent ต่างๆ จำนวนมาก ซึ่งพันธะเหล่านี้จะง่ายแก่การถูกทำลาย ดังนั้นเมื่อเพิ่ม temp ให้สูงขึ้น ในตอนแรกจะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาเพิ่ม เพราะทำให้ความเข้มข้นของ E-S complex เพิ่มขึ้น แต่ถ้า อุณหภูมิเพิ่มขึ้นอีก จนทำให้เอนไซม์เสียสภาพไป จะทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาลดลง

ผลของอุณหภูมิต่ออัตราการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์



5) สารตัวแปลง (Modifier)

- Modifier หมายถึงสารเคมีใดๆ ที่สามารถควบคุมอัตราเร็วของปฏิกิริยาเอนไซม์ให้เพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ สารตัวแปลงมักเป็นสารที่มีขนาดเล็ก ที่พบในร่างกาย ส่วนใหญ่เป็นสาร intermediate หรือสารผลิตผลที่เกิดขึ้นในขบวนการ metabolism, โลหะ และวิตามิน
- Modifier สามารถจับกับ active site หรือตรงบริเวณอื่นที่ไม่ใช่ active site ของเอนไซม์

Modifier มี 2 แบบ คือ

1) Positive modifier หรือตัวกระตุ้น (Activator) มีผลทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์เร็วขึ้น เอนไซม์หลายชนิดไม่สามารถทำงานได้ หรือทำงานในอัตราเร็วที่ช้ามากหากไม่มีตัวกระตุ้น ตัวกระตุ้นส่วนใหญ่เป็น metal ion และวิตามิน ซึ่งสามารถสร้างพันธะทางเคมีกับเอนไซม์ ตัวกระตุ้นบางชนิดเป็นสาร intermediate หรือสารผลิตผลที่เกิดขึ้นในขบวนการ metabolism โดยไปจับกับบางบริเวณบนเอนไซม์

2) Negative modifier หรือ ตัวยับยั้ง (Inhibitor) มีผลทำให้อัตราเร็วของปฏิกิริยาของเอนไซม์ลดลง ตัวยับยั้งสามารถจับกับเอนไซม์ตรงบริเวณ active site หรือตรงบริเวณอื่นที่ไม่ใช่ active site ของเอนไซม์

การควบคุมการทำงานของเอนไซม์

- วิถี metabolism ไม่ได้เกิดขึ้นที่ Rate สูงสุดตลอดเวลา จะมีบางช่วงของ cell cycle ที่บาง metabolic patheway ถูกยับยั้งทำให้ปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆ เกิดขึ้นไม่ได้ ซึ่งเกิดจากการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาควบคุม (Rate limiting step) ของวิถีนั้น

มีหลายวิธี

1). การควบคุมแบบ Allosteric (Allosteric Regulation) :

2). การควบคุมโดยการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (Covalent modification) ต่อเอนไซม์

3). การควบคุมโดยการเกิด Proteolytic activation

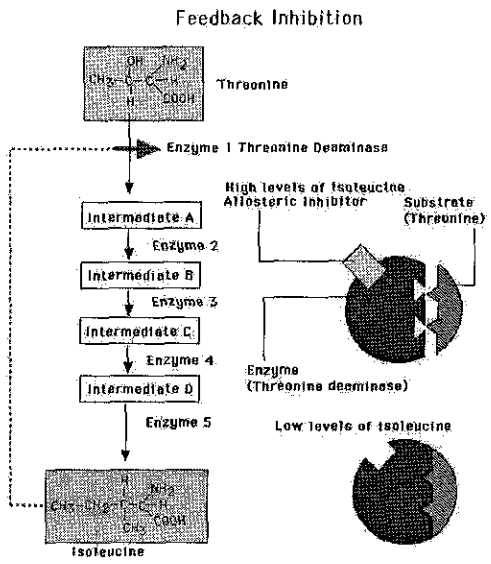
4). การควบคุมการสังเคราะห์และสลายเอนไซม์

1) การควบคุมแบบ Allosteric (Allosteric Regulation)

- Allosteric Regulation เป็นการควบคุมโดยการที่มีโมเลกุลบางชนิด เช่น ligand (เรียก allosteric effector) เข้าจับกับเอนไซม์ตรงบริเวณอื่นที่อยู่แยกต่างหากจากบริเวณ active site แล้วมีผลทำให้ความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์เพิ่มขึ้นหรือลดลง
- Ligand : organic molecule ที่มีขนาดเล็ก เช่น ATP , โปรตีนที่มีขนาดเล็ก, substrate หรือ product
- การจับของ allosteric effector กับ allosteric site จะเหนี่ยวนำให้เอนไซม์เปลี่ยนโครงรูปไป ทำให้ความสามารถในการจับ substrate หรือ ligand อื่นๆ เปลี่ยนแปลงไป

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- จากรูป Y (ตัวอย่างนี้คือ Threonine) เป็นสารตั้งต้น ส่วน A, B,C ,และ D เป็นตัวกลาง และ X (ในตัวอย่างนี้เป็น Isoleucine) เป็นผลผลิตสุดท้ายของวิถี; E1, E2, E3, E4 และ E5 เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาตามลำดับ
- X อาจจะถูกนำไปใช้เป็น substrate ของเอนไซม์ในวิถีอื่นๆ สมมติว่าวิถีที่มีการเอา X ไปใช้เกิดได้ช้าลง ทำให้เกิดการสะสมของ X ดังนั้นเซลล์ต้องมีวิธีการที่ไม่ให้สาร Y ถูกเปลี่ยนไปเป็น X โดย X จะไปยับยั้งการทำงานของ E1



2. การควบคุมโดยการเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี (Covalent modification) **ต่อเอนไซม์โมเลกุล**

- เป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีต่อเอนไซม์โดยปฏิกิริยาที่มีเอนไซม์อื่นเร่ง ทำให้เอนไซม์นี้สามารถถูก
  - activate (ทำให้สามารถเร่งปฏิกิริยาได้)
  - deactivate (ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ หรือทำงานได้น้อยลง)
- เช่น – การเกิด phosphorylation/ dephosphorylation ซึ่งเป็นการเติมหมู่ Phosphate หรือการตัดหมู่ phosphate ออกจากเอนไซม์

3. การควบคุมโดยการเกิด Proteolytic activation

- เป็นการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่อยู่ในรูปแบบที่ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาได้ (proenzyme) ให้กลายเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาได้ เกิดจากการทำงานของ proteolytic enzyme
- ตัวอย่างเอนไซม์ที่ถูกควบคุมด้วยกระบวนการนี้ เช่น trypsinogen – สร้างที่ตับอ่อน—ส่งไปยังลำไส้เล็ก—ย่อยเป็น trypsin

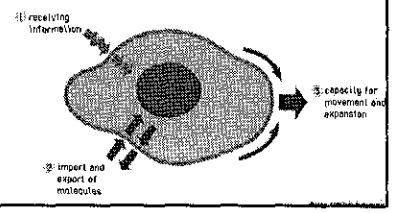
4). การควบคุมการสังเคราะห์และสลายเอนไซม์

<u>การควบคุมการสังเคราะห์เอนไซม์</u>

- มักเกิดกับเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาบางปฏิกิริยาขณะเกิดการพัฒนาการ ในบางเนื้อเยื่อหรือเซลล์บางชนิด หรือภายใต้สภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง
- เกิด ได้ 2 แบบ
  - ควบคุมการ transcription (การสังเคราะห์ mRNA)** พบมาก
  - ควบคุมการ translation (การสังเคราะห์โปรตีนจาก mRNA)

<u>การควบคุมการสลายเอนไซม์</u>

- เอนไซม์ที่ถูกควบคุมโดยวิธีนี้จะเป็นเอนไซม์ที่ไม่สามารถมีอยู่ในเซลล์ตลอดเวลา เพราะจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ เซลล์จะมีเอนไซม์ กลุ่ม proteolytic degradation ย่อยสลายเอนไซม์เหล่านี้



Compartmentation

1. Compartmentation ➡ organelles

   ใน eukaryotes, ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ metabolism คือ การจัดวางกระบวนการต่างๆ ใน metabolism ไว้ใน subcellular compartments ที่มีความจำเพาะ

- Eg. enzyme ที่ catalyze ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ fatty acid จะอยู่ที่ cytosol แต่ปฏิกิริยาการสลาย fatty acid อยู่ที่ mitochondria.
- Compartmentation จึงทำให้เกิดการควบคุม metabolism ที่มีผลตรงข้ามกัน
- ทำให้ metabolites มาอยู่รวมกัน และง่ายต่อการควบคุมการทำงานของ enzymes ในปฏิกิริยา.

2. Compartmentation ⇒ enzymes complex

⇒ เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยมีการจัดเรียง Enzymes ที่เร่งปฏิกิริยาใน pathway มารวมกันเป็น multienzyme complexes

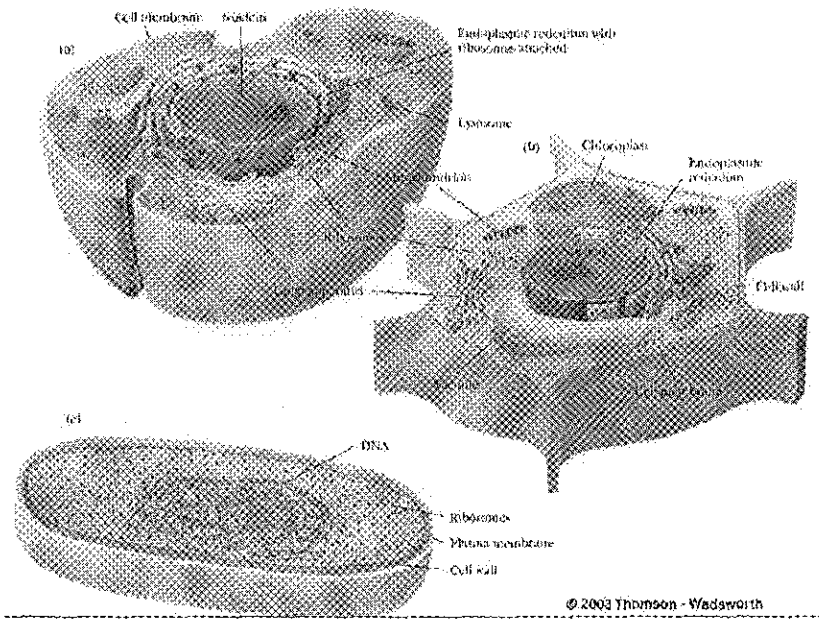
⇒ ทำให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ต่อเนื่อง

enzymes จะรวมตัวอยู่กับ membranes ⇒ good for interaction.

, ป้องกันการแพร่กระจาย ของ metabolite

3. Compartmentation ⇒ specialization of tissues

- ทำให้มีเนื้อเยื่อที่มีบทบาทหน้าที่จำเพาะ
- เกิด site-specific regulation of metabolic processes.
- เนื้อเยื่อจึงมีชนิดของเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน



2. Compartmentation ➡ enzymes complex

➡ เกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยมีการจัดเรียง Enzymes ที่เร่งปฏิกิริยาใน pathway มารวมกันเป็น multienzyme complexes

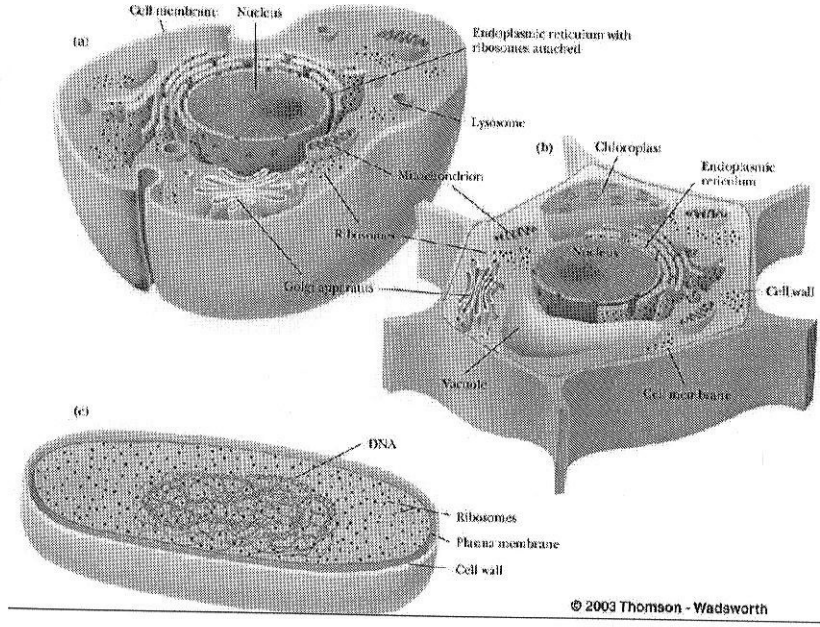
➡ ทำให้เอนไซม์เร่งปฏิกิริยาได้ต่อเนื่อง

enzymes จะรวมตัวอยู่กับ membranes ➡ good for interaction.

, ป้องกันการแพร่กระจาย ของ metabolite

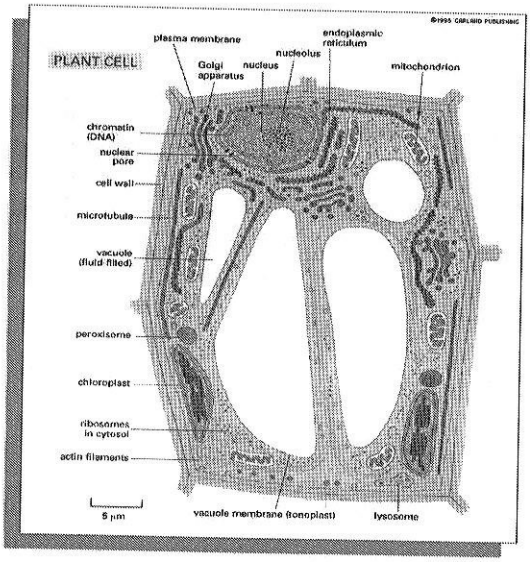
3. Compartmentation ➡ specialization of tissues

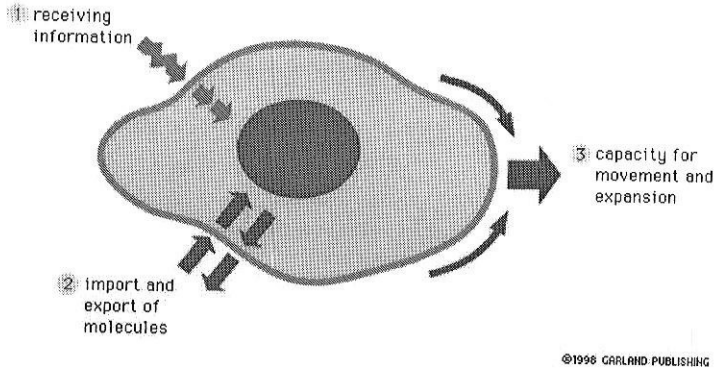
- ทำให้มีเนื้อเยื่อที่มีบทบาทหน้าที่จำเพาะ
- เกิด site-specific regulation of metabolic processes.
- เนื้อเยื่อจึงมีชนิดของเอนไซม์ที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน



© 2003 Thomson - Wadsworth

Plant cell


©1998 GARLAND PUBLISHING
PLANT CELL
plasma membrane
endoplasmic reticulum
nucleolus
Golgi apparatus
nucleus
mitochondrion
chromatin (DNA)
nuclear pore
cell wall
microtubule
vacuole (fluid-filled)
peroxisome
chloroplast
ribosomes in cytosol
actin filaments
5 μm
vacuole membrane (tonoplast)
lysosome

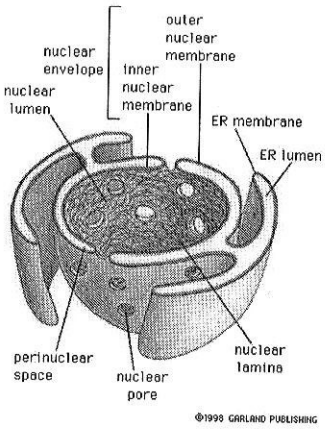

1 receiving information
3 capacity for movement and expansion
2 import and export of molecules
©1998 GARLAND PUBLISHING

1.Nucleus

★ Central of genetic control in the cell.

- Contain DNA, RNA, some proteins
- DNA replication, transcription
- Components

- Nuclear membrane (เป็นเยื่อหุ้ม 2 ชั้น)
- Nuclear pores ควบคุมการเข้าออกของสารระหว่าง nucleus และ ส่วนอื่นๆ ของเซลล์
  - pore เชื่อม nucleus กับ cytosol / ER
- Nucleolus เป็นบริเวณที่มี DNA, RNA, protein บางชนิด (อะไรบ้าง?)
  - เป็นที่ที่มีการสร้าง Ribosome (~rRNA) ซึ่งจะลำเลียงออกนอก nucleus เพื่อสังเคราะห์โปรตีน



2. ระบบเมมเบรนของเซลล์
(Cytomembrane Network)

เป็นระบบ ที่มีการลำเลียงสารผ่าน organelle ต่างๆ ในระบบไปยังที่ต่างๆ ในเซลล์หรือ secrete ออกนอกเซลล์

Protein ที่ถูกสร้างขึ้นมาใหม่ใน eukaryote

- บางชนิดก็ถูกส่งไปยัง cytoplasm เพื่อใช้งานทันที หรือส่งไปยัง organelle
- ส่งไปเซลล์อื่น ผ่านระบบ membrane network

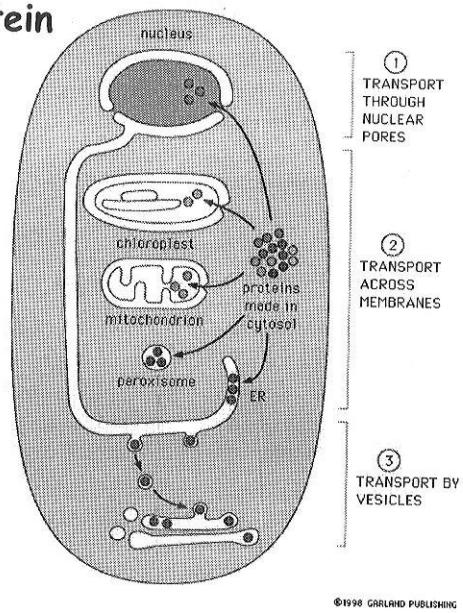
Membrane network ประกอบด้วย

2.1 Endoplasmic reticulum

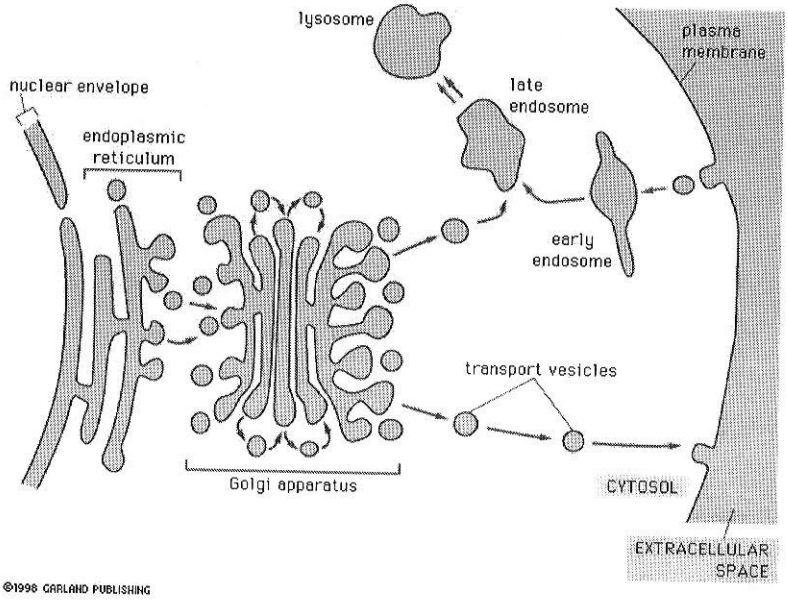
2.2 Golgi apparatus

2.3 Vesicles

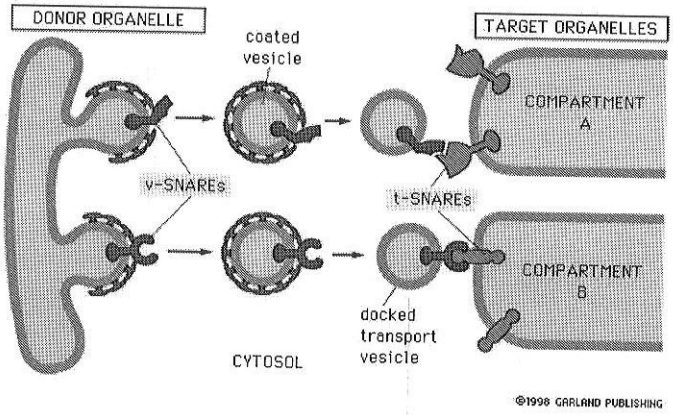
Transport of Protein



Membrane network



Vesicles: Transport of bio molecule to target organelles



3. Peroxisomes and Glyoxisomes

Peroxisomes เป็นถุงบรรจุเอนไซม์ที่มีหน้าที่ย่อยสลายกรดไขมัน และกรดอะมิโน (Beta-oxidation)

- ผลผลิตของปฏิกิริยา จะมี Hydrogen peroxide ซึ่งมีอันตรายต่อเซลล์
- H_2O_2 ⇒ สลายไปเป็น O_2 และน้ำ โดยเอนไซม์ catalase ใน peroxisomes
  ⇒ นำไปสลาย ETOH (ในเซลล์ตับและไต)

Glyoxisomes (พบในพืช) มีเอนไซม์ทำหน้าที่ เปลี่ยนไขมันและน้ำมันที่สะสมไว้เป็นน้ำตาล

4. Mitochondria

หน้าที่ : cellular respiration สร้างพลังงานในรูป ATP

Structure :

Outermembrane

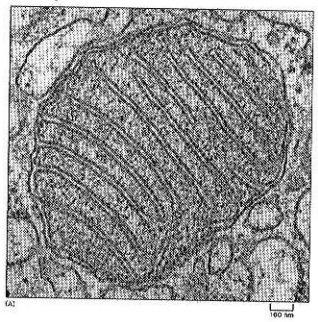
Intermembrane space

Inner membrane มีเอนไซม์ใน electron transfer oxidative phosphorylation เพื่อสังเคราะห์ ATP

การหักทบของ membrane ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว ATP

Mitochondrial matrix : citric acid cycle

มี DNA และ ribosomeของตัวเอง



5. Plastid

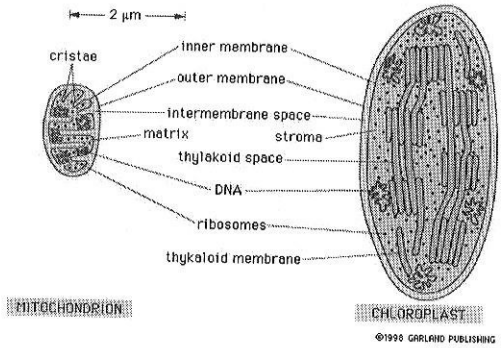
- 3 types: chloroplast, chromoplast, amyloplast
- Chloroplast : Photosynthesis, Carbon metabolism

  Thylakoid membrane (light reaction)

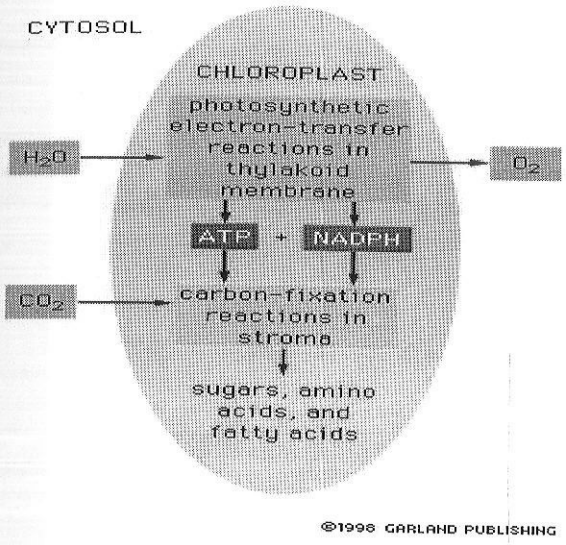
  Lumen

  Stroma (Dark reaction)

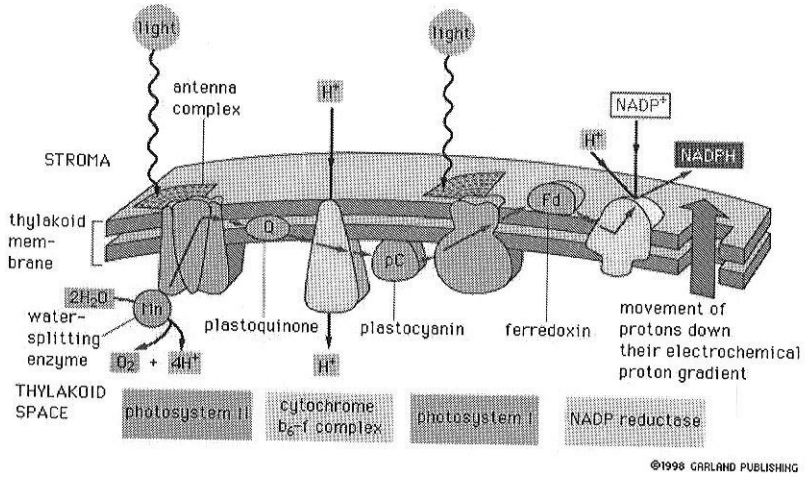
มี DNA และ ribosomeของตัวเอง



Photosynthesis reaction in Chloroplast



Light reaction : Electron tranfer reaction



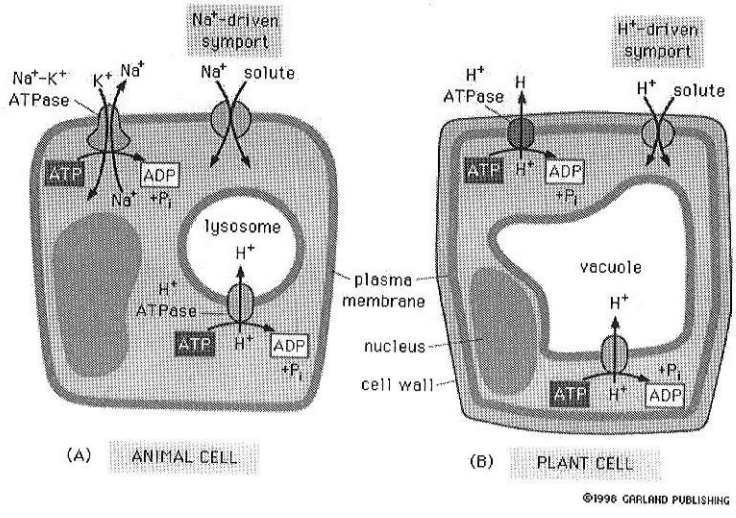
6. Vacuole have multiple functions (in plants)

ล้อมรอบด้วย Tonoplast

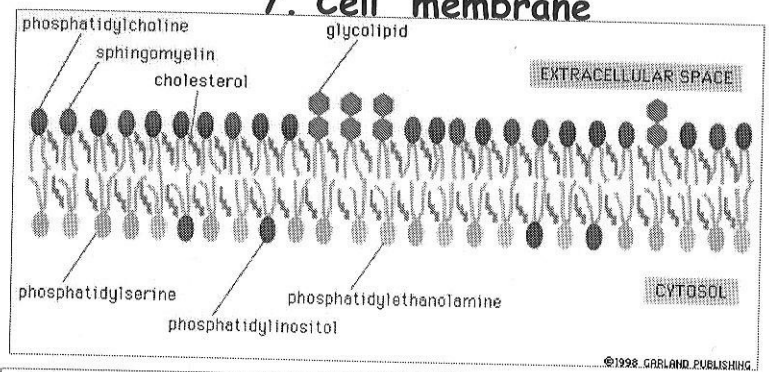
หน้าที่ :

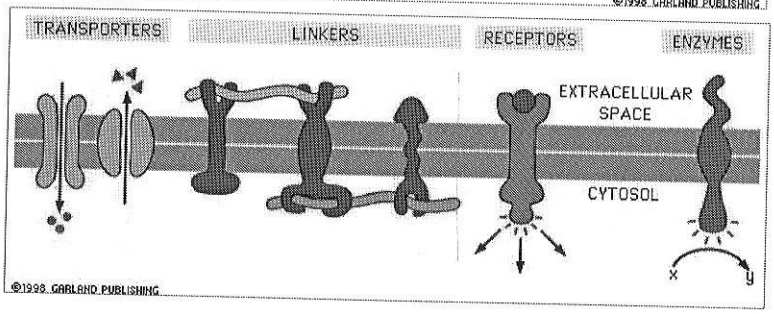
- Maintain cell turgor
  - accumulation of osmotically active substance
- Storage function (nitrate, phosphate, malate, carbohydrate, protein)
- Recycling (hydrolytic enzyme for protein, nucleic acid, polysaccharides)
  * senescence
- Waste deposits

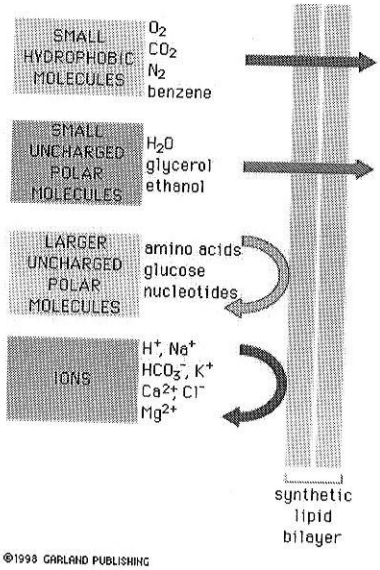
Vacuole and lysosome



7. Cell membrane







II. Photosynthesis and Photorespiration

Out line

1. Light reaction and photophosphorelation

   1.1 Pigments, Light absorbtion and energy conversion, Return of chlorophyll from the 1^{st} singlet stage to ground stage, Antenna

   1.2 Photosystems and electron transport pathway

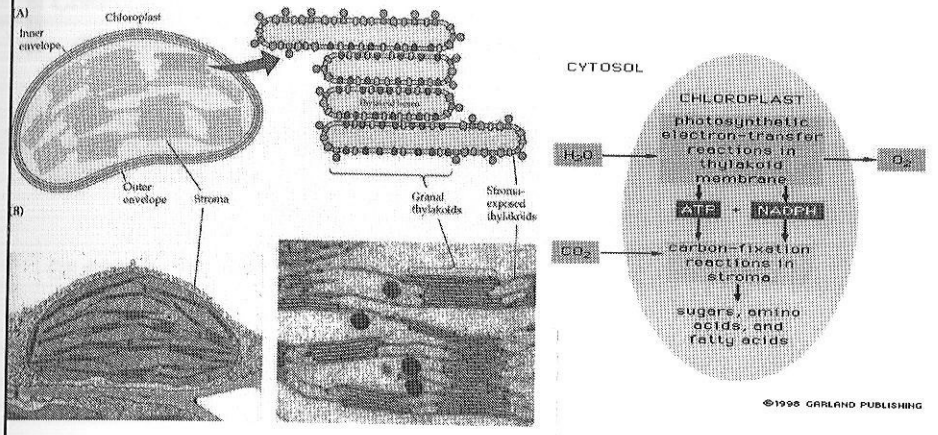
2. Carbon reactions

   - Calvin cycle

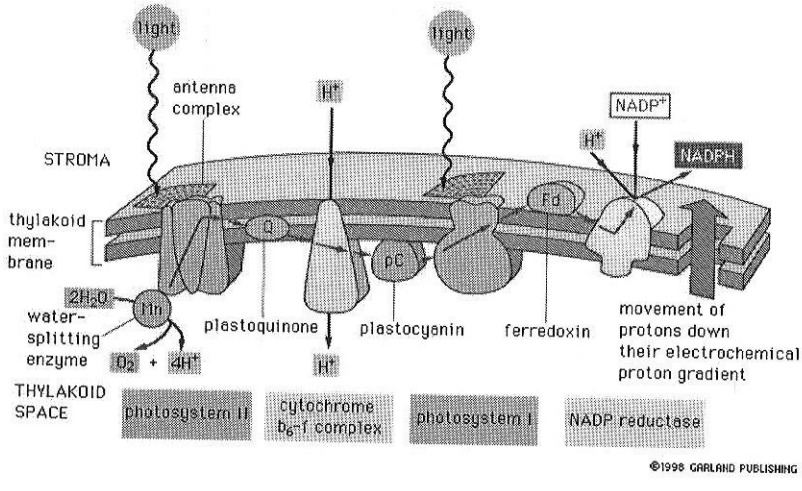
   - CO_2 Fixation in C4 & CAM plants

3. Environmental effects on photosynthesis

Overview of Photosynthesis



1. Light reaction and photophosphorelation



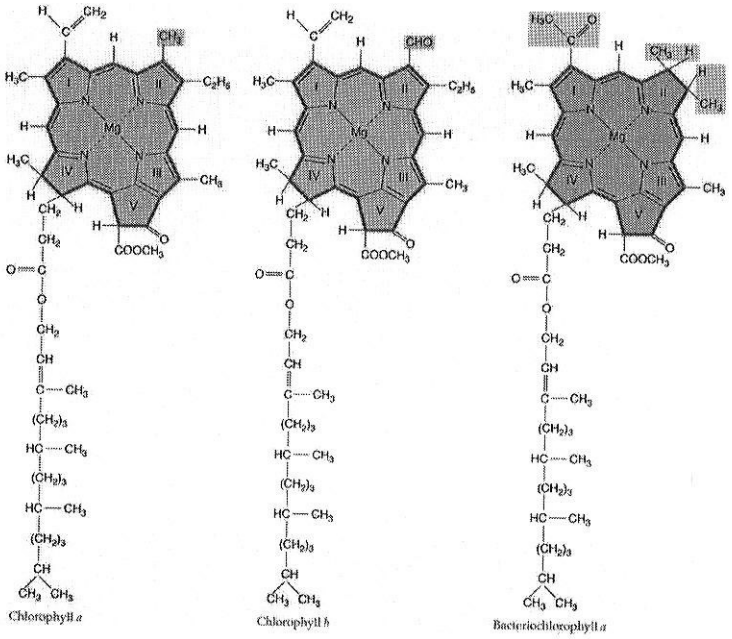
1.1 Pigments and antennae:

Chlorophyll

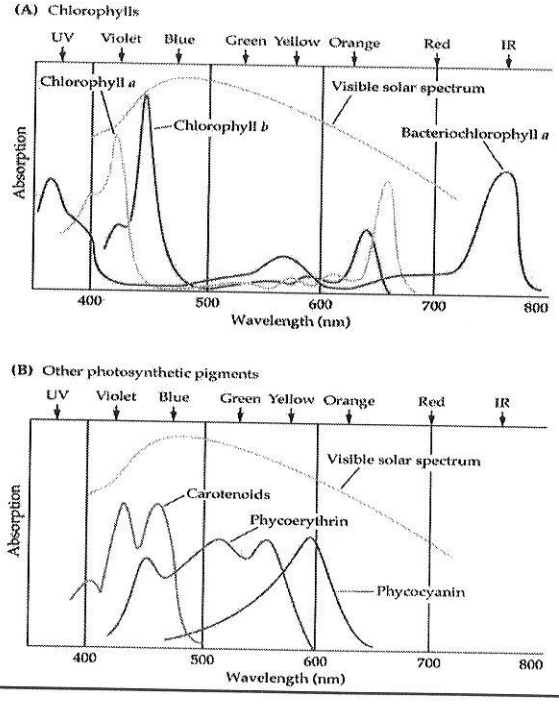
- มีโครงสร้างเป็น tetrapyrole ring (มี Mg อยู่กลางโครงสร้าง) ที่มี phytol tail (hydrocarbon side chain) ต่ออยู่
- การสังเคราะห์ : precursor คือ 8-aminolevuleic acid (ALA) ซึ่งสังเคราะห์มาจาก glutamate

Glutamate ➡ ➡ ALA ➡➡➡➡ Protoporphyrin IX ➡ Mg-protoporphyrin - ➡ ➡ ➡ ➡ chlorophyll a ➡ chlorophyll b

<u>Chl b สังเคราะห์มาจาก chl a</u>: เอนไซม์ oxygenase เปลี่ยน methyl gr ของ chl a มาเป็น formyl gr ได้เป็น chl b ซึ่งทำให้การดูดกลืนแสงของ chl a และ chl b แตกต่างกันมาก

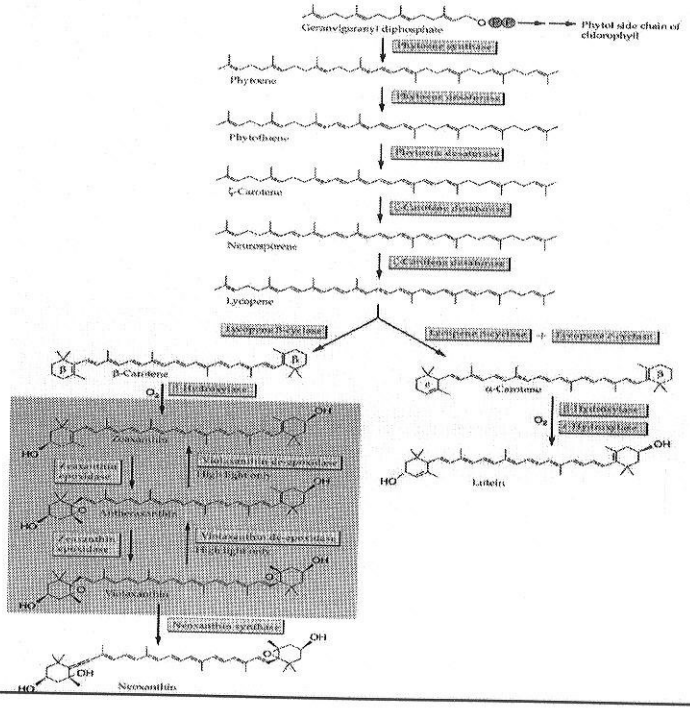


- chl a ไม่สามารถดูดกลืนแสงได้ ทุกช่วงแสง
- chlo b ช่วยดูดกลืนแสงช่วงที่มีความยาวคลื่นสูงกว่า chl a และส่งพลังงานต่อไปยัง chl a จึงเป็นการเพิ่ม efficiency ในการดูดกลืนแสงวิธีหนึ่ง
- ในพืช สัดส่วนของ chl a : chl b = 3:1 และสัดส่วนของ chlorophyll 2 ชนิดนี้ บน thylakoid membrane จะแตกต่างกันในแต่ละบริเวณ
- chlorophyll จะต่ออยู่กับ chlorophyll- binding protein



Carotenoids

- ช่วยในการดูดกลืนแสง ความยาวคลื่น 450-500 nm
- สังเคราะห์มาจาก 8 isoprene units
- โครงสร้างประกอบด้วย conjugated-double bond ของ hydrocarbon
- มีหลายชนิด ได้แก่ carotene, lutein, zeaxathin, zeoxanthin
- หน้าที่ของ carotenoids
  - 1. Accessory light-harvesting pigments ใน การดูดกลืนแสง แล้วส่งต่อพลังงานไปยัง chlorophyll
  - 2. ป้องกัน ส่วนประกอบต่าง ๆ ใน photosynthesis system จากการถูกทำลาย จากการเกิด photooxidation ใน chlorophyll



Light absorbtion and energy conversion

- quantum ของแสง หรือ photon เป็น อนุภาคที่บรรจุพลังงาน (energy-carrying particles)
- E= hv = h c / lamda (h = 6.626 x 10^{-34} J*s , c = velocity of light, lamda = wave length)
- แสง 1 Einstein = พลังงานที่มาจากแสง 1 mole

  = hv * N

  = 50 kcal

(N= Avocrado number, hv =photon)

- พืชใช้ช่วงแสง visible (Blue---- red)
- Quantum efficiency : 1 molecule photosynthetic product จะต้องใช้แสงจำนวนเท่าไหร่ ? ➡ 1 โมเลกุล O_2 ที่เกิดจาก oxidation ของน้ำต้องใช้แสง 8 quanta
- Intensity ของแสง แปรผันตาม energy หรือ จำนวน photon ต่อ พื้นที่ของใบต่อเวลา

pigments ดูดซับ แสง (photon) พลังงานใน photon

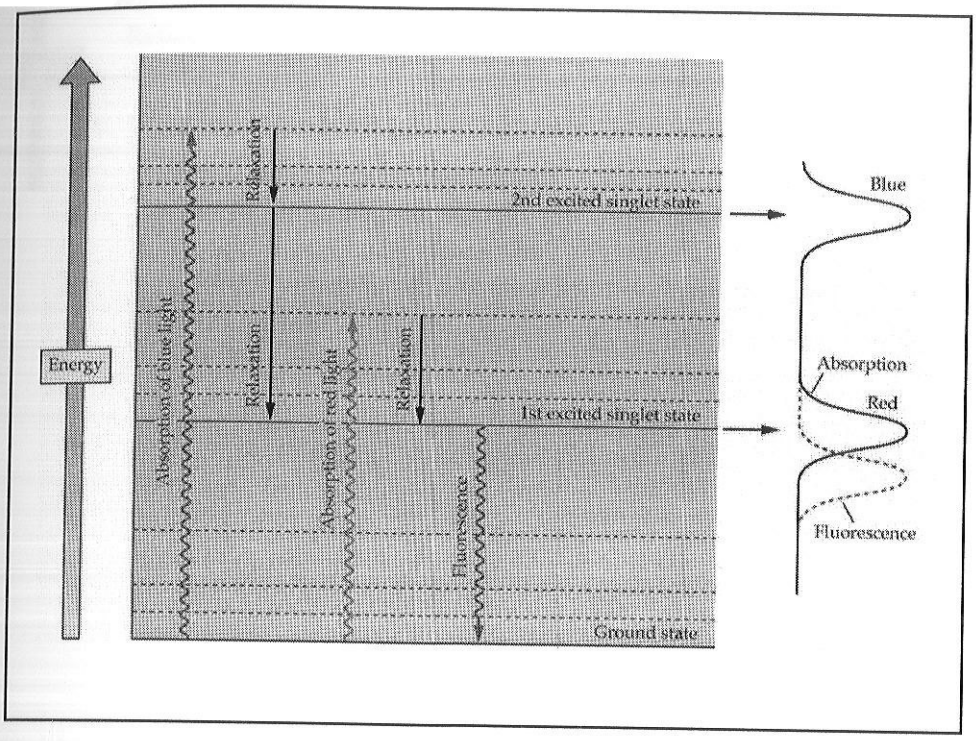
⬇

พลังงานที่ได้จาก photon ไปทำให้ electron ของ pigments ที่อยู่ระดับ lower-energy orbital เปลี่ยนตำแหน่งไปอยู่ระดับ energy orbital ที่สูงขึ้น ได้แก่ 1st singlet stage

⬇

ทำให้ระดับพลังงานของ pigments เปลี่ยนจาก ground stage ไปเป็น excited stage

- การเปลี่ยนตำแหน่ง orbital ของ electron นี้ทำให้เกิด resonance form ของ conjugated double bonds ใน **tetrapyrole ring** ของ chlorophyll และใน **hydrocarbon ของ** carotenoid



<u>บทบาทของ carotenoid ต่อ photoprotection</u>

- ภายใต้ภาวะที่มีความเข้มแสงสูง E แสงที่มากเกินไปจะไปกระตุ้นให้ Chlorophyll เข้าสู่ภาวะ triplet stage (^{3}Chl) พลังงานของ ^{3}Chl จะทำให้ O_2 กลายสภาพเป็น singlet oxygen ($^1O_2$)
- carotenoid สามารถรับ excited energy ของ ^{3}Chl เพื่อป้องกันไม่ให้เกิด singlet oxygen
- มีงานวิจัยที่ศึกษาพบว่า เมื่อมีการ block carotenoid biosynthesis โดยการเติม inhibitor หรือ mutation แล้วให้แสงความเข้มสูงๆ แก่พืช พบว่าระดับของ singlet oxygen เพิ่มสูงมากจนอยู่ในระดับที่เป็นอันตราย

Return of chlorophyll from 1st singlet stage to ground stage

- หลังจากที่ chlorophyll ดูดกลืนพลังงานแสง จนทำให้ e- ไปอยู่ในระดับ 1st singlet stage แล้ว e- จะปลดปล่อยพลังงานและกลับสู่ ground stage อีกครั้งได้ ด้วยวิธีการ ดังนี้
  - ถ่ายทอด excited electron ไปยังสารโมเลกุลต่างๆ ใน photosynthesis system ที่ทำหน้าที่เป็น electron acceptor เกิดเป็น chemical product เรียกกระบวนการนี้ว่า photochemistry
  - ligth-- fluorescense
  - heat

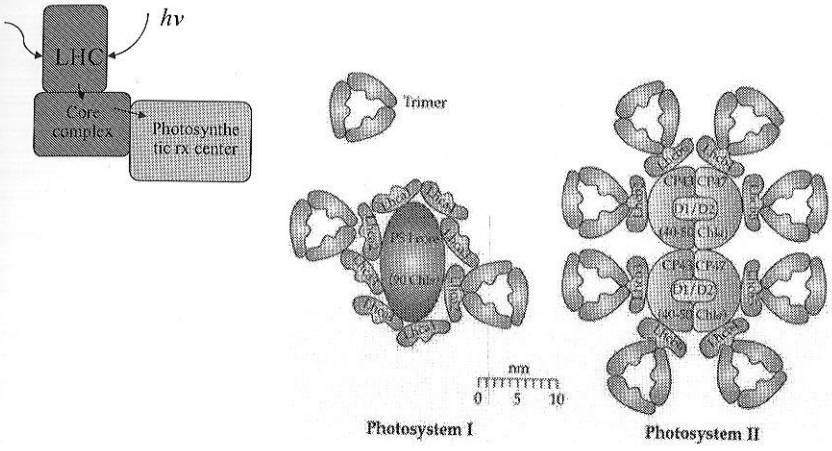
  หากมีเหตุการณ์ที่ทำให้ E แสงเข้าสู่ photochemical rx ไม่ได้ ก็จะเหลือแค่ 2 ทางคือ heat, fluorescense เพราะฉะนั้นการเกิด photochemistry จึงผกผันกับ heat & fluorescense

Antenna capture light and transfer of energy to reaction center

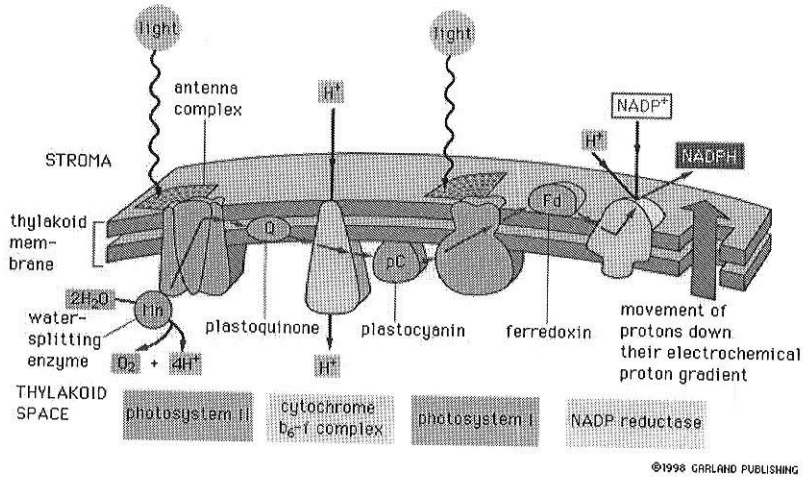
- Antennae ประกอบไปด้วยโมเลกุลโปรตีนที่มี chlorophyll เกาะอยู่ (protein-bound chlorophyll molecules) ซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมาก
- ทำหน้าที่ดูดซับ photon และถ่ายทอดพลังงานไปให้ reaction center และ accessory pigments (carotenoids)
- 1 O_2 ที่เกิดขึ้น / 2400 chlorophyll molecules และ / 8 photon
- การถ่ายทอดพลังงาน (photons) จาก chlrophyll ไปยัง chlorophyll ที่อยู่ติดกัน จะเกิดขึ้นเมื่อ chlorophyll มาจัดเรียงต่อกันในทิศทางที่เหมาะสม แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกการถ่ายทอด photons
- Chl a พบที่ reaction center และ antenna, Chl b พบเฉพาะ ที่ antenna
- Antennae ยังประกอบไปด้วย carotenoilds ในสัดส่วน carotenoid/ total chl ~ 0.5

Antenna มี 2 ส่วน

- Light Harvesting complex (LHC) : รวบรวมแสง/ exitons
- Core complex : ส่ง exitons ไปให้ Photosynthetic reaction center (PS I, PS II)



1.2 Photosystems and electron transport pathway



ส่วนประกอบต่าง ๆ ใน photosynthetic systems

- Photosynthetic system II (PS II) ประกอบด้วย Antennae (LHC II, Core complex) และ P680 Reaction center
- Photosynthetic system I (PS I) ประกอบด้วย Antennae (LHC I, Core complex) และ P700 Reaction center

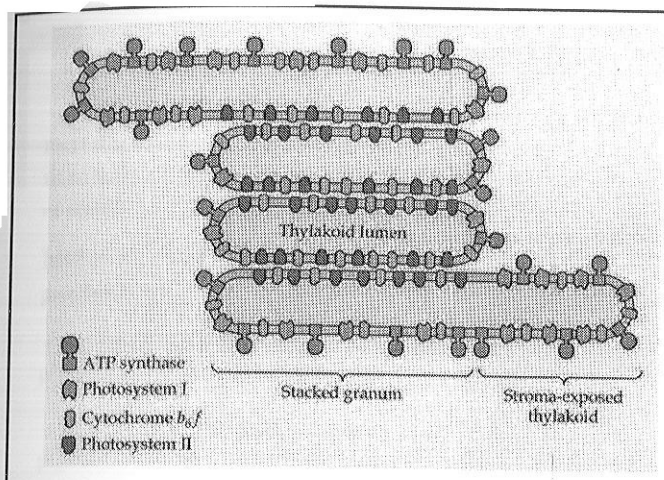
  LHC ของ PS I กับ PS II จะต่างกัน

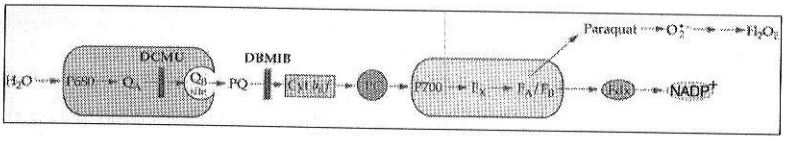
  ➡ **LHC II เคลื่อนที่ไปหา LHC I ได้ เมื่อมีแสงตกกระทบมากขึ้น แต่ LHC I เคลื่อนที่ไม่ได้**

  อัตราส่วนของ PS I และ PS II ไม่คงที่ แปรผันตาม condition แสงว่ามากหรือน้อย
- Plastoquinone
- Cytochrome b_6f complex
- Plastocyanin
- ATP synthase

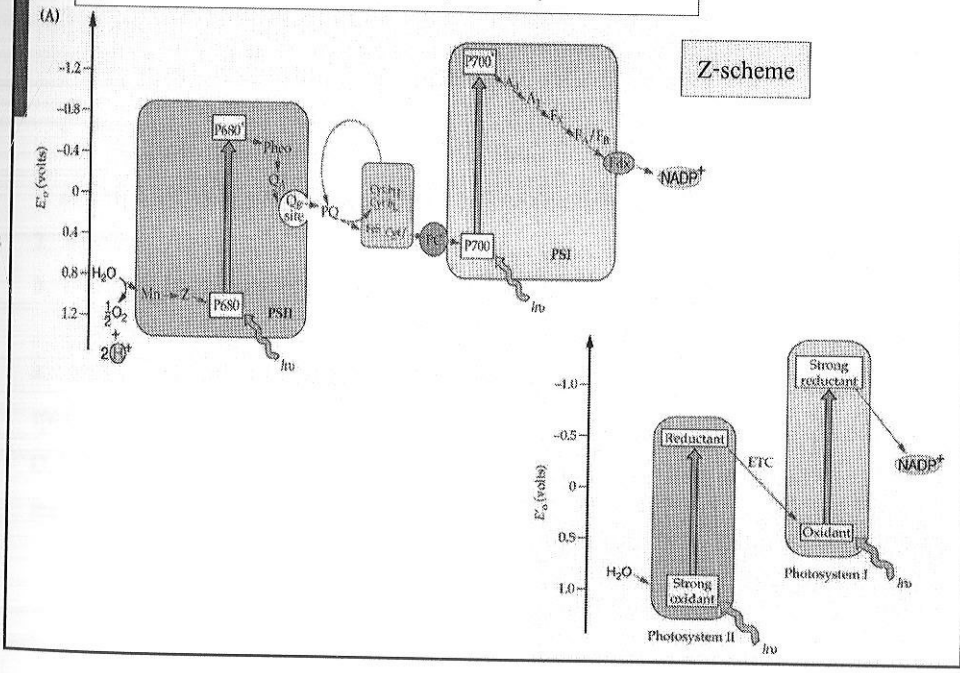
การจัดเรียงตัวของ องค์ประกอบต่างๆ ใน photosynthetic systems บน thylakoid membrane

- Photosynthetic system II (PS II) : in appressed (stack and granal) membranes
- Plastoquinone : อยู่บน PS II แต่สามารถเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง PS II กับ cytochrome b6f complex
- Cytochrome b6f complex : กระจายอย่างสม่ำเสมอ บน membrane
- Plastocyanin : อยู่ใน thylakoid lumen
- Photosynthetic system I (PS I) : unstacked and stroma exposed membrane
- ATP synthase : stroma exposed membrane





Electron transport in photosynthetic systems



In the light, PS II functions as a water- plastoquinone oxido reductase, transfer e- from water to plastoquinone (PQ)

PS II เป็น intregral membrane complex ซึ่งประกอบด้วย LHC II, core complex และ P680 rx center.

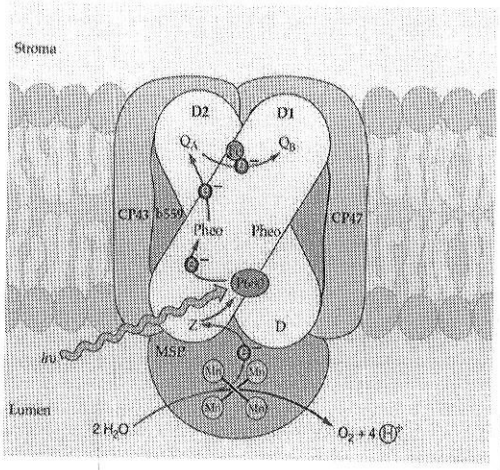
โปรตีนที่ประกอบกันเป็น PS II มี > 20 ชนิด proteins ได้แก่

- D1, D2 : จับกับ e- transfer prosthetic group เช่น P_{680}, pheophytin, quinone (Q_A,Q_B)

- CP43, CP47 : จับกับ chl a antenna pigments

- 33, 32, 17 kDa : water oxidation

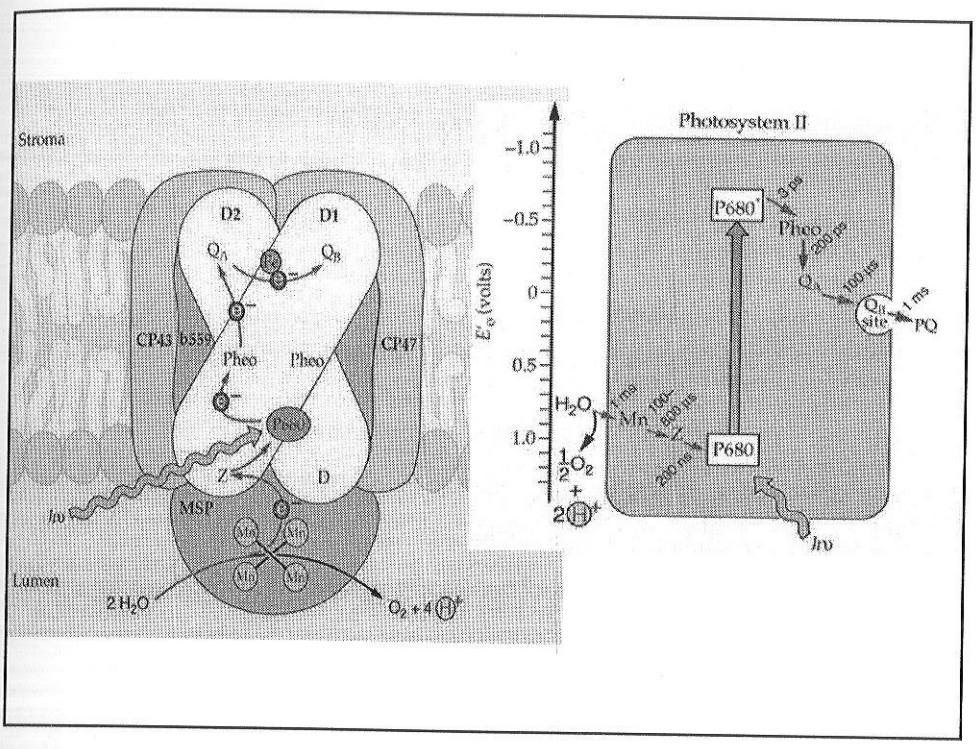
- unknown protein : cyt b559



- P_{680} center จับอยู่กับ quinones 2 ชนิด คือ Q_A , Q_B.
- Q_A ทำหน้าที่เป็น the 1st e- accpetor, Q_B เป็น 2nd e- acceptor.
- การส่ง e- จาก P_{680} ไปให้ Q_A และ Q_B มี 4 ขั้นตอน:

1. e- ตัวที่ 1 จะปล่อยออกจาก P680 ไปให้ Pheophytin -และส่งต่อไปให้ Q_A เกิดเป็น Q_A^-
2. จากนั้น e - จะถูกส่งไปให้ Q_B เกิด semiquinone Q_B^- แล้ว Q_A^- จะเปลี่ยนกลับมาเป็น Q_A
3. e- ตัวที่ 2 ที่ปล่อยออกจาก P680 -ไปให้ Pheophytin และส่งต่อให้ Q_A จากข้อ 2 เกิดเป็น 2^{nd} Q_A^-
4. 2^{nd} Q_A^- ส่ง - ให้ Q_B^- เกิดเป็น Q_B^{2-}, และได้ Q_A กลับคืนมา

สุดท้าย the fully reduced Q_B^{2-}, ก็จะรับ protons (H) 2 ตัวจาก stoma เกิดเป็น plastoquinol, Q_BH_2 หรือ PQH_2 จากนั้น จะเคลื่อนที่ออกจาก PSII ไปตาม lipid bilayer ของ thylakoid membrane เพื่อส่ง e- ไปให้ Cytochrome b_6f



Cytochrome b_6f cpx : transfer e- from reduced plastoquinone to oxidized plastocyanin

ประกอบด้วย e- carrier 3 ชนิด :

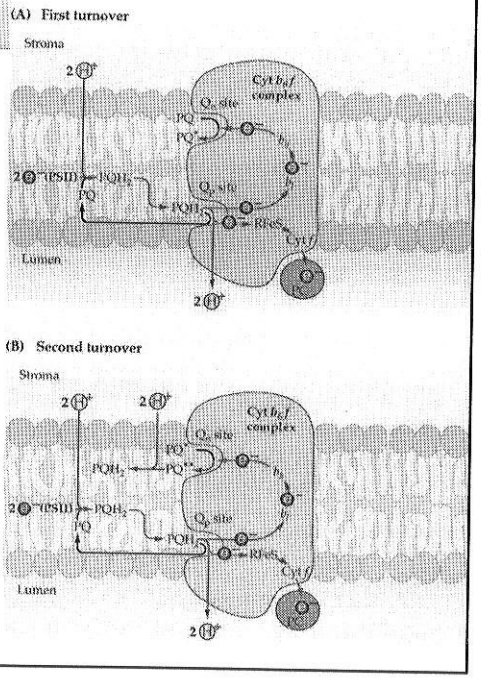
- a high-potential c-type cytochrome (cytf)

- a high-potential 2 Fe-2S protein (the Rieske Fe-S protein)

- b-type cytochrome (Cyt b_6) .

Cyt b_6f cpx ทำหน้าที่เคลื่อนย้าย 2 e- จาก plastoquinol (PQH_2) ไปให้ plastocyanin (PC)

- ขณะที่มีการเคลื่อนย้าย 2 e- ก็จะมีการปล่อย 2 H+ เข้าสู่ lumen ของ thylakoid membrane



Proton translocation via cytochrome b6f is though to involve Q-cycle

Cyt b6f cpx มี quinol binding site (Qp) ตั้งอยู่ ฝั่ง lumen และ quinone binding site (Qn) อยู่ฝั่ง stroma ของ thylakoid membrane

ที่ Qp site (luminal side) : quinol (PQ^{2-}) จะส่ง e- 1 ตัว ไปให้ Rieske Fe-S center (ทำให้ quinol กลายเป็น semiquinone, PQ^{-}) จากนั้น Reiske Fe-S จะส่ง e- ไปให้ cyt f และ ส่งต่อให้ plastocyanin (PC) ขณะเดียวกันก็จะมีการเคลื่อนย้าย 2 H+ เข้าสู่ lumen

ส่วน e- อีก 1 ตัว ของ semiquinone (PQ^{-}) จะส่งไปให้ quinone (PQ) ที่ Qn site (stamal side) เกิดเป็น semiquinone (PQ^{-})

วงจรทั้ง 2 นี้ จะเกิดขึ้นอีก 1 รอบ โดยการเกิดการส่ง 2 e- จาก plastoquinol ตัวที่ 2 (PQH_2) โดย e- ตัวที่ 1 ถูกส่งไปให้ PC ส่วน e- ตัวที่ 2 ส่งไปให้ semiquinone (PQ^{-}) เกิดเป็น quinol (PQ^{2-}) จากนั้น (PQ^{2-}) จะรับ 2 H^+ จาก stroma แล้วหลุดออกจาก Qn site และปล่อย $2H^+$ เข้าสู่ lumen กลับมาเป็น PQ เพื่อกลับไปที่ Qn site อีกครั้ง

สิ่งที่ได้จาก Q cycle

- plastoquinol (PQ^{2-}) ถูก oxidized เป็น quinone (PQ) ที่ Qp site และส่ง e- 1 ตัวให้ PC อีก 1 ตัว ให้ PQ ที่ Qn site จากนั้น PQ ก็จะย้อนกลับไปรับ 2 e- จาก Q_B^{2-} ใหม่ และทำเหมือนเดิม อีก รอบ สิ่งที่ได้คือ

2 e- ถูก ส่ง ไปให้ PC

4 H + เคลื่อนจาก stroma สู่ lumen เกิด proton gradient (ร่วมกับ 4 H+ จาก water oxiadation ที่ PS II)

สิ่งที่ต้องใช้ 4e- จาก chlorophyll ที่ P680 โดยส่งมาในรูปของ quinol (PQH_2) 2 โมเลกุล

Cyt b6f เป็นจุดจำกัดอัตราเร็วของการถ่ายทอด e- ที่สำคัญที่สุด

Plastocyanin (PC) เป็น soluble protein ละลายอยู่ ใน lumen ของ thylakoid membrane ประกอบด้วย Copper atom ที่มี oxidation stage จาก Cu^{2+} -- Cu^{+} จึงสามารถรับ e- จาก cyt b6 f ได้ทีละตัว เพื่อส่งไปให้ PS I

PS I functions as a light-dependent plastocyanin-ferredoxin oxidoreductase

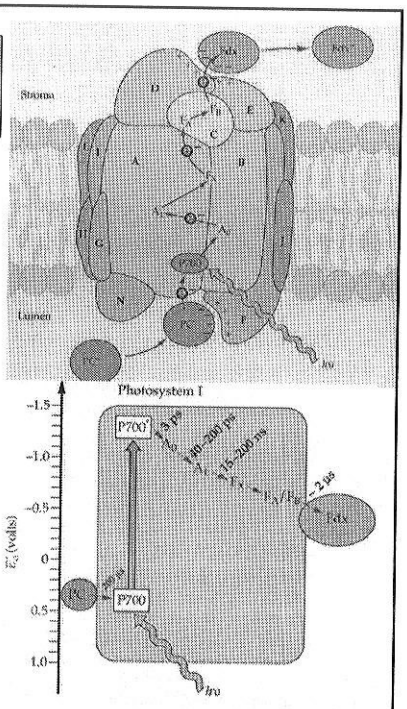
PS I ประกอบไปด้วยโปรตีน ~ 15 subunits

Psa A and Psa B : จับกับ major e- transfer carriers

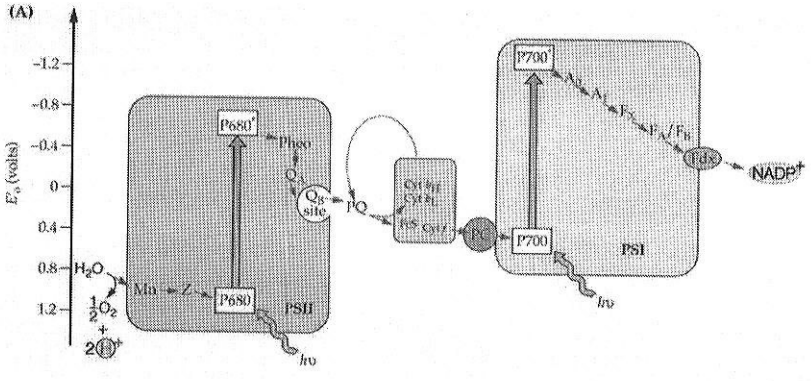
e- จาก PC จะส่งไปให้ P700 ที่นี่ e- ถูกกระตุ้นโดยแสง e- จะถูกส่งไปให้ A_0, A_1, F_x, F_A, F_B สุดท้าย จะส่ง ไปที่ Ferredoxin (Fdx)

ที่ Fdx จะมี Ferredoxin reductase (FNR) ต่ออยู่

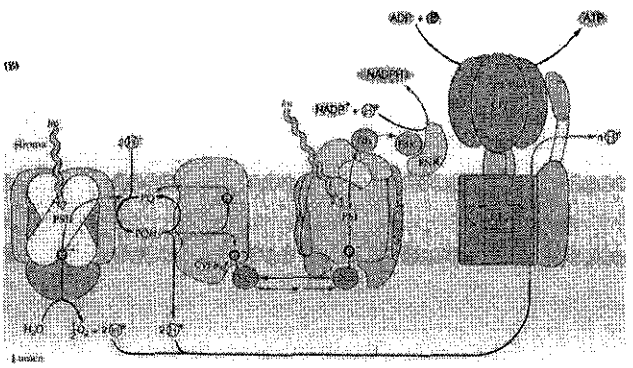
FRN มี FAD เป็น prosthetic gr ซึ่งสามารถรับ 2 e- เกิดเป็น $FADH_2$ จากนั้น 2 e- จะถูกส่ง ไปให้ NADP+ ได้ product เป็น NADPH เพื่อนำไปใช้ใน dark reaction ต่อไป

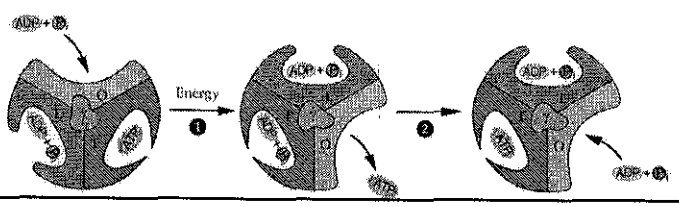


สรุป Electron transport in photosynthetic systems



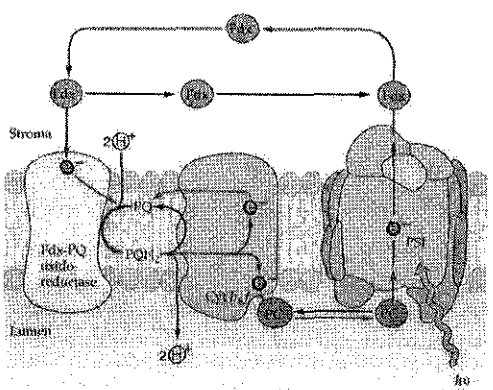
การสังเคราะห์ ATP ขณะที่เกิดการถ่ายทอดอิเล็คตรอน





Cyclic electron transport chain

- Fdx ที่ได้รับ e- จาก PS I จะกลายเป็น Fdx-,
- Fdx- จะเคลื่อนมาส่ง e- ให้ PQ ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย Fdx-PQ oxido-reductase
- Fdx- จึงกลับมาเป็น Fdx และย้อนกลับไปที่ PS I อีก
- ผลิต ATP ได้ แต่ สร้าง NADPH ไม่ได้



Oxidation of water produces O_2 and release e- required by PSII

การเกิด oxidation ของน้ำ - เกิดจากกระบวนการซับซ้อนหลายขั้นตอน

- เกิดขึ้นที่ luminal side ของ PS II

• oxidation ของน้ำ จะมีการเคลื่อนย้าย 4 e- จากน้ำ 2 โมเลกุล

$$2\ H_2O \Rightarrow O_2 + 4H^+ + 4\ e^-$$

สมการนี้จะเกิดขึ้นภายในขั้นตอนเดียวเพื่อป้องกันไม่ให้เกิด Reactive oxygen species (ROX, O*) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ กลไกการป้องกันนี้เกิดผ่านตัวกลางสำคัญคือ Mn (= S ในรูป)

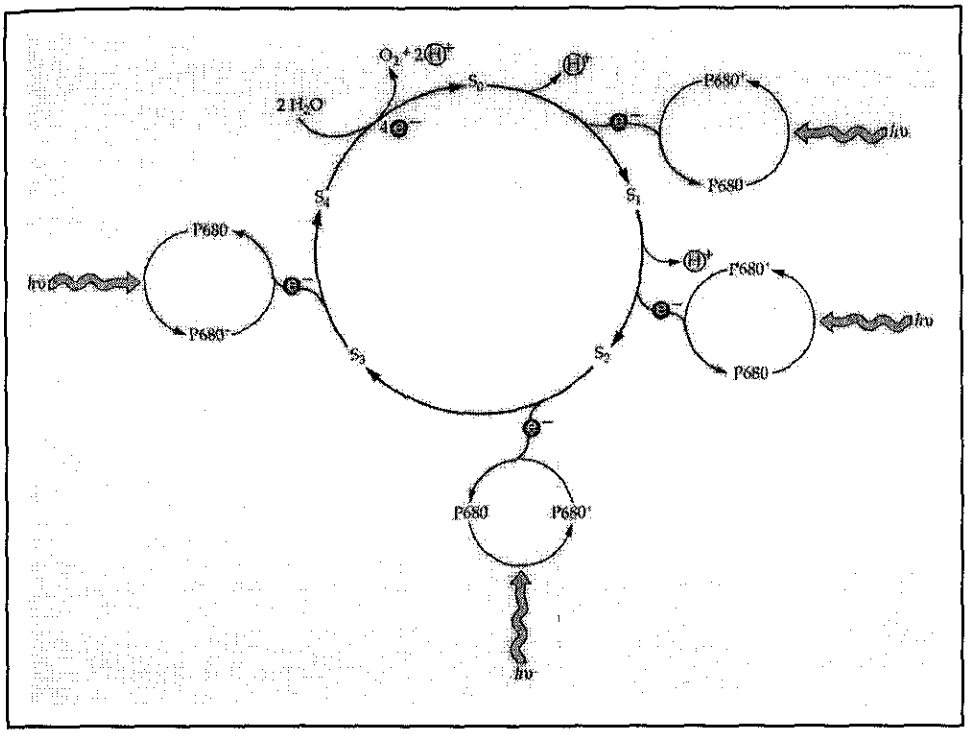
Oxidation ของน้ำ

- P680 ส่ง e- ไปในการถ่ายทอด e- กลายเป็น $P680^+$
- $P680^+$ จะดึง e- จาก Z (tyrosine on reaction center protein) มาทดแทน จะกลายเป็น P680 อีกครั้ง, Z กลายเป็น Z^+
- Mn จะทำหน้าที่ ส่ง e- ให้ Z+ ➡ Mn กลายเป็น Mn+

!!! ทั้ง 3 ขั้นตอน จะเกิดซ้ำกัน 4 รอบ เพราะ P680 ต้องถ่ายทอด e- ไปในระบบถ่ายทอดอิเล็คตรอนทั้งหมด 4 e- เพื่อที่จะสังเคราะห์ NADPH 1 โมเลกุล

- เมื่อ Mn เสีย e- ครบ 4 ตัว (จาก Mn 4 ตัว, Mn cluster) $4Mn^+$ จะไป oxidize น้ำ 2 โมเลกุล เกิดเป็น O_2^+ และ e- 4 ตัว จากน้ำจะส่งไปให้ $4Mn^+$ เพื่อกลับมาเป็น 4Mn อีกครั้ง (S_0)
- $2\ H_2O \Rightarrow O_2 + 4H^+ + 4\ e^-$

$$SZP_{680} \Rightarrow h\nu \Rightarrow SZP_{680}^{+} \Rightarrow SZ^+ P_{680} \Rightarrow S^+Z\ P_{680} \quad (S = Mn)$$



2. Carbon reaction in plant : calvin cycle in stroma

เป็นวิถีที่มีการตรึง CO_2 มาใช้ในการสร้างน้ำตาลที่มี C 3 อะตอม (GAP) และนำ NADPH, ATP ที่ได้จาก light reaction มาใช้ในปฏิกิริยาต่างๆ ใน cycle

- เรียก pathway นี้ว่า Calvin cycle หรือ C3 carbon fixation pathway
- เรียกพืชกลุ่มที่มีการตรึง CO_2 มาใช้ใน Calvin cycle นี้ว่า C3 plants
- Calvin cycle ประกอบด้วยปฏิกิริยา 13 ขั้นตอน โดยแบ่งเป็น 3 phase:

carboxylation, reduction และ regeneration

1) carboxylation phase : มี 1 ปฏิกิริยา โดย เกิด carboxylation ของ RuBP ได้ 3-PGA เป็น product

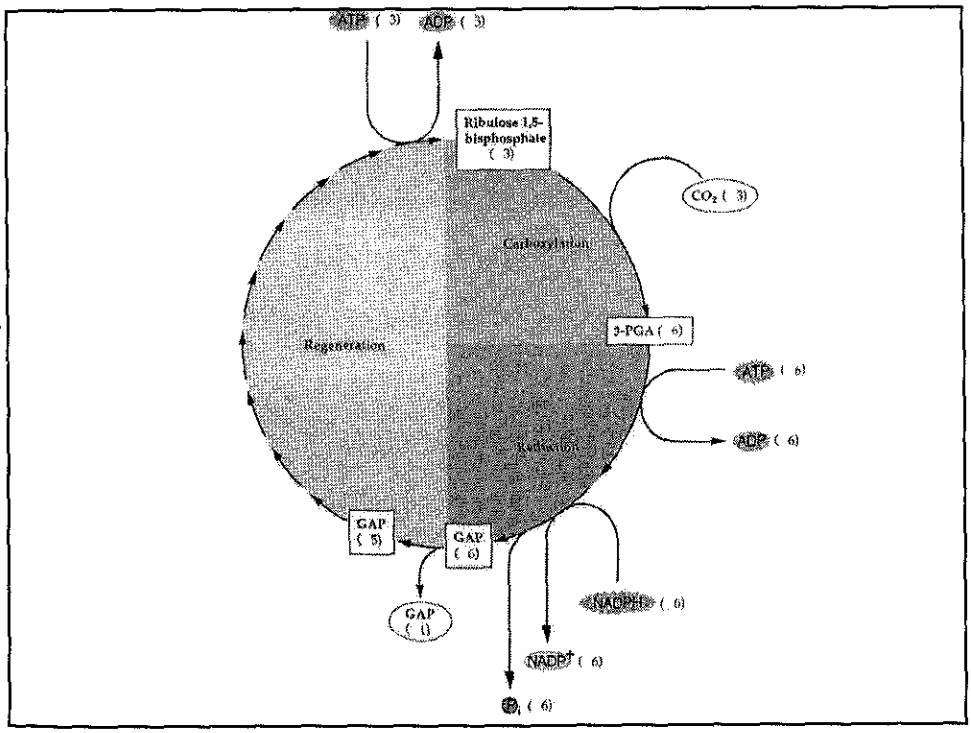
3-PGA เกิดขึ้นโดย 3 CO_2 เกิดปฏิกิริยา carboxylation กับ C5-sugar (ribulose 1,5-bisphosphate, RuBP) 3 โมเลกุล เกิดเป็น C6 intermediate 3 โมเลกุลซึ่งจะถูกตัดออกมาเป็น 3-PGA 6 โมเลกุลทันที ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดยเอนไซม์ Ribulose 1,5-BP carboxylase/ oxygenase (RuBisco)

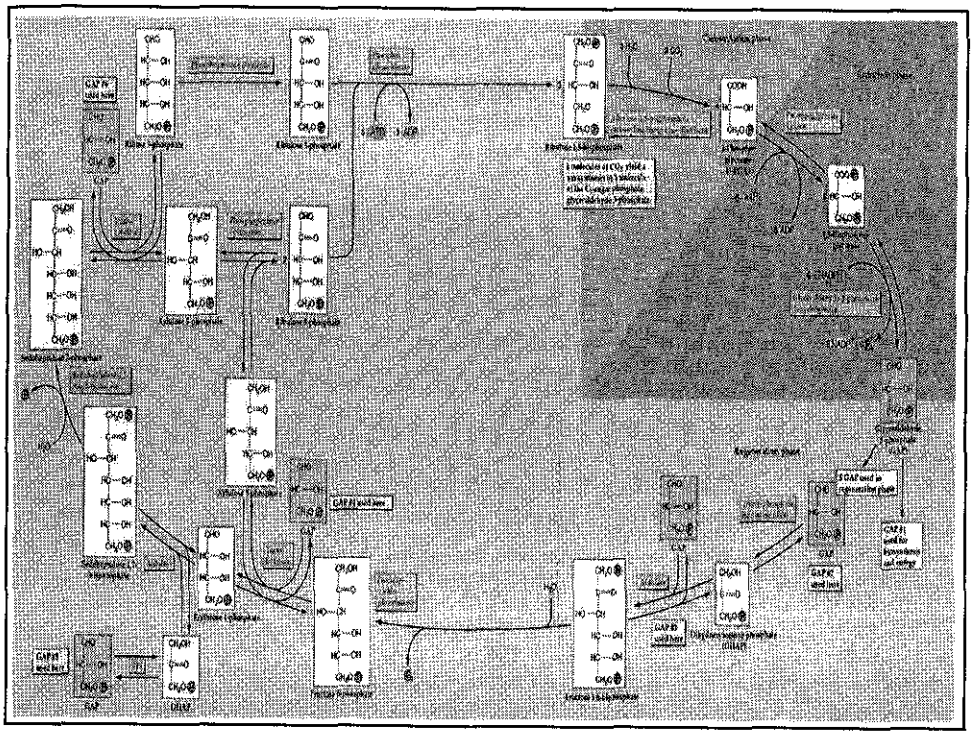
Rubisco เป็นเอนไซม์ที่จับได้ทั้ง CO_2 และ O_2 ดังนั้นจึงเกิดการแข่งขันกันระหว่างก๊าซ 2 ชนิดนี้ในการจับกับเอนไซม์ หาก Rubisco จับกับ O_2 ได้มากก็จะทำให้ Calvin cycle เกิดลดลง

2) reduction phase : ประกอบด้วย 2 ปฏิกิริยา ทำให้ 3-PGA 6 โมเลกุล เปลี่ยนไปเป็น glyceraldehyde-3-P (GAP) 6 โมเลกุล ขั้นตอนนี้มีการนำ ATP และ NADPH จาก light reaction มาใช้

3) Regeneration phase : ประกอบปฏิกิริยา 10 ขั้น เพื่อสังเคราะห์ RuBP หมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ GAP 5 โมเลกุล จาก phase 2 และ 3 ATP ถูกนำมาใช้ regenerate RuBP 3 โมเลกุล GAP อีก 1 โมเลกุลจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ carbohydrate และ สารประกอบอื่นๆ

chloroplast	cytosol
Triose P ➡	Carbohydrate
	Lipids,
	N-compound





CO_2 fixation in C4 & CAM plants

C4 plants : ข้าวโพด , อ้อย, หญ้า , dicots บางชนิด

ที่ใบ มีเซลล์ที่มี chloroplast อยู่ 2 กลุ่ม : mesophyll & bundle sheath cells

- Environmental factors ที่ทำให้ C4 มีการตรึง CO_2 แบบนี้ ได้แก่

- High temperature ➡ CO_2/O_2ลดลง ➡ photorespiration: photosynthesis เพิ่มขึ้น

➡ ทำให้ H_2O vapor in air space เพิ่มขึ้น ➡ เสียน้ำจากใบมาก ➡ พืช จึง ลด stromatal conductance ➡ทำให้อัตราการแลกเปลี่ยนก๊าซลดลง , ทำให้ปริมาณ CO_2 ที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์แสงลดลง

- พืช C4 ได้พัฒนากลไกขึ้นมาเพื่อเพิ่ม photosynthetic efficiency และลดการเสียน้ำในภาวะที่มีอุณหภูมิสูง

How? โดยเพิ่ม CO_2- trapping efficiency เพื่อทำให้พืชสามารถลด stromatal conductance ซึ่งจะทำให้พืชรักษาปริมาณน้ำไว้ได้

- การตรึง CO_2 ของ พืช C4 จะใช้กลไกในการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์ 2 ชนิด คือ mesophyll และ bundle sheath cells

ที่ mesophyll cells จะเกิดการตรึง CO_2 แล้วนำมาเปลี่ยนให้อยู่ในรูป HCO^{3-} จากนั้น HCO^{3-} จะทำปฏิกิริยากับ PEP (C3)ได้เป็น oxaloacetate (C4) ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดย PEP carboxylase

⇩

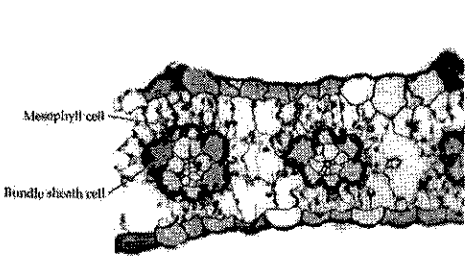
จากนั้น oxaloacetate จะถูกส่งไปยัง bundle sheath cells

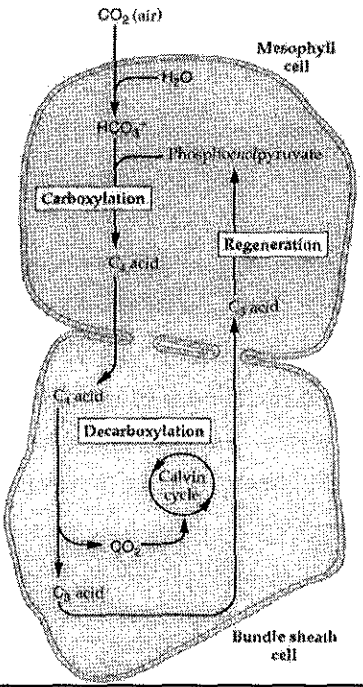
ที่ bundle sheat cells oxaloacetate จะสลายเป็น CO_2 และ C3 acid

CO_2 จะถูกตรึงโดย Rubisco ใน Calvin cycle

ส่วน C3 acid จะถูกส่งกลับไปที่ mesophyll cells เพื่อนำไปสังเคราะห์ PEP เพื่อถลับไปใช้ใหม่

- ดังนั้น - Calvin cycle จะมีเฉพาะที่ bundle sheath chloroplasts
  - PS II และ PS I activities เกิดมากที่ mesohpyll cells, ที่ bundle sheath cells น้อยมาก
  - PEP carboxilase จะจับ HCO^{3-} ได้ดี แต่ไม่ชอบ O_2 ก็จะไม่เกิดการแย่งกันในการจับกับ enz ระหว่าง CO_2 กับ O_2.

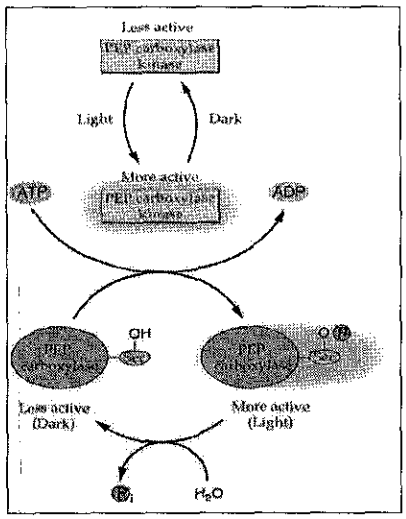




การทำงานของเอนไซม์ใน C4 pathway ถูกควบคุมให้เกิดขึ้นในภาวะที่มีแสง เช่น PEP carboxylase, PPDK โดย แสงจะควบคุมให้เกิดการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 ผ่าน protein phosphorylation

การควบคุมนี้มีความสำคัญต่อการทำงานร่วมกันระหว่าง mesophyll และ bundle shreath cells เพื่อที่จะทำให้แน่ใจว่าขณะที่เกิด light reaction ที่ mesophyll cells จะมี C4 acid (oxaloacetate) ส่งให้ bundle sheath cells เพื่อปล่อย CO_2 ไปใช้ใน Calvin cycle ซึ่งจะทำให้ photosynthesis ไม่หยุดชะงักลง

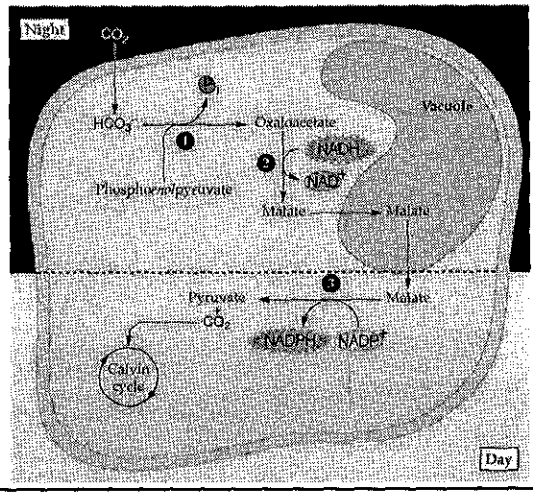
อย่างไรก็ตามเอนไซม์อื่นๆ จะมีการควบคุมที่แตกต่างกันออกไป



CAM metabolism involves the temporal separation of CO_2 capture

- พบในพืชทนแล้ง, กล้วยไม้, กระบองเพชร--มี cuticle หนา
- โดยทั่วไป CAM plants จะมีปัญหาเกี่ยวกับการรักษาระดับน้ำในเซลล์ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง พืชจึงปรับตัวโดยใช้ CO_2 fixation mechanism ที่ลดการเสียน้ำ และเพิ่มความเข้มข้นของ CO_2
- กลไก : ใช้กลไกการตรึง CO_2 แล้วเปลี่ยนมาเป็น HCO^{3-} เพื่อทำปฏิกิริยากับ PEP carboxylase คล้ายพืช C4 แต่เกิดขึ้นในเซลล์เดียวกัน แต่ที่เวลาต่างกัน
- CO_2 จะถูกตรึงโดย PEP carboylase (ในรูปของ HCO^{3-}) ตอนกลางคืน เพื่อนำไปทำปฏิกิริยากับ PEP เกิดเป็น oxaloacetate แล้วถูกเปลี่ยนเป็น malate สะสมใน vacuole ตลอดเวลาในช่วงกลางคืน จนกระทั่งมีแสง malate จะถูกขนส่งออกมาจาก vacuoles และเกิดปฏิกิริยา decarboxylated เพื่อผลิต CO_2 และ pyruvate จากนั้น CO_2 จะถูกตรึงโดย Rubisco
- PEP carboxylase ทำงานในตอนกลางคืนเท่านั้น โดยถูกควบคุมโดย endogenous circadium rhythms โดย exogenous light & dark signal ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

- ในช่วงเวลากลางวัน PEP carboxylase จะอยู่ในรูป day form ซึ่งถูกยับยั้งการทำงานโดย malate แต่ในตอนกลางคืน เอนไซม์ในรูป night form จะไม่ถูกยับยั้งโดย malate ทำให้มันสามารถสร้างและสะสม malate ได้ กลไกการควบคุม form ทั้ง 2 ของเอนไซม์นี้เกี่ยวข้องกับ protein phosphorylation และ dephosphorylation



Photorespiration

- การที่ Rubisco มี oxygenase activity ทำให้ product จาก dark reaction ลดลง
- ใน Chloroplast : 2 โมเลกุล Rubis 1,5 P จะถูกเปลี่ยนเป็น 3-PGA 2 โมเลกุล และ 2-phosphoglycorate 2 โมเลกุล
- ที่ peroxisome : 2-phosphoglycorate 2 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนเป็น glyoxylate 2 โมเลกุล
- ใน mitochondria glyoxylate 2 โมเลกุล ถูกนำไปเปลี่ยนเป็น glycine 2โมเลกุลโดย transamination โดยใช้ glutamate จาก chloroplast จากนั้น glycine 2โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนไปเป็น Serine 1 โมเลกุล นอกจาก Serine แล้ว ยังได้ NH_3 และ CO_2 เพื่อนำไปใช้สร้าง glutamate ใน chloroplast ด้วย
- จากนั้น serine จะย้อนกลับมาที่ peroxisome และถูกเปลี่ยนเป็น hydroxypyruvate ซึ่งจะถูก reduce โดย NADH เปลี่ยนเป็น glycerate
- Glycerate จะถูกส่งไปที่ chloroplast เพื่อเปลี่ยนเป็น 3-PGA เข้าสู่ calvin cycle ได้อีก

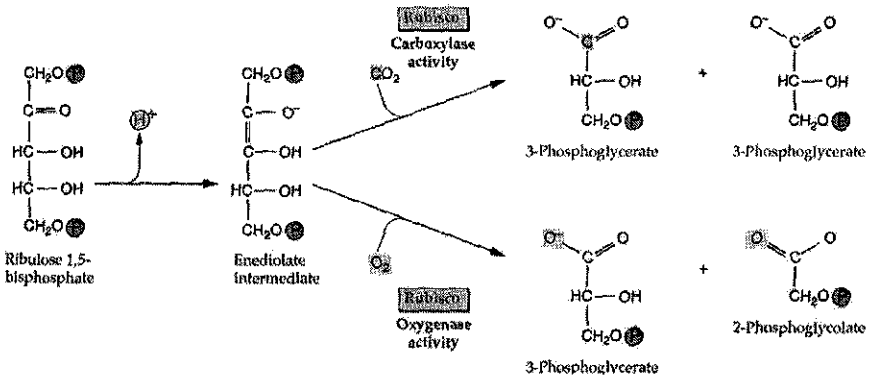
สรุปการทำงานของ Rubisco

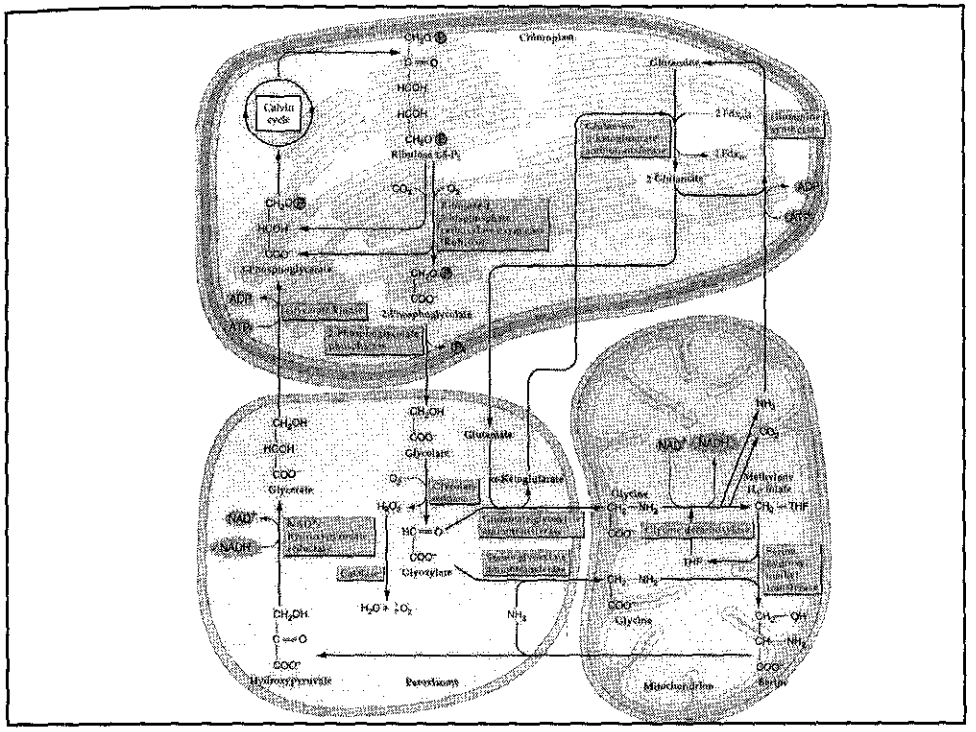
- ผ่าน **carboxylation** ต้องใช้ Rubis 1,5 P 1 โมเลกุลเพื่อให้ได้ 3-PGA 2 โมเลกุล

  ผ่าน **oxygenase** ต้องใช้ Rubis 1,5 P อย่างน้อย 2 โมเลกุลเพื่อให้ได้ 3-PGA 3 โมเลกุล

ข้อเสียของ Photorespiration ต้องใช้ ATP 2 โมเลกุล, ลด PGA

ข้อดี ป้องกัน photodamage, สังเคราะห์ glutamate ใน choroplast เพื่อใช้ใน N-metabolism





3. ปัจจัยที่มีผลต่อการ Photosynthesis (Environmental effects on photosynthesis)

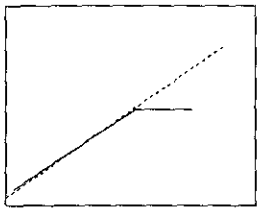
1. แสง

2. ปริมาณ [pigment]

3. ปริมาณ metabolites ใน chloroplast เช่น ADP , Pi

4. $[CO_2] / [O_2]$

1. แสง



Light intensity

อิทธิพลของแสงต่อ light reaction

- hv ➡ P_{680}^{+} ➡ phe-

  hv ➡ P_{700}^{+} ➡ A_0^{-}

เมื่อมีความเข้มแสงสูง Reaction center C จะปิด ทำให้พลังงานแสงศูนย์เสียไปในรูป

- fluorescense/heat หรือ
- เกิด ^{3}Chl

Chlorophyll + E แสง ➡ ^{1}Chl

เมื่อ ^{1}Chl ถูกกระตุ้นต่อ จะทำให้เกิด ^{3}Chl ซึ่งมี half life ยาวมาก พลังงานของ ^{3}Chl สามารถทำปฏิกิริยากับ O_2 เกิดเป็น $^1O_2$ (singlet oxygen)

- มักเกิดมากที่ PS II มากกว่า PS I

- การถ่ายทอด e- จาก Q_A^- มาให้ PQ ช้าลง แสดงว่า PQ อยู่ในภาวะ reduced stage (PQ^{2-}) เพราะ PQ^{2-} ส่งต่อ e- ไปให้ cytochrome b6f ไม่ได้ ซึ่ง จะทำให้ $P680^+$ ส่ง e- ให้ Phe^- ไม่ได้ ทำให้ life time ของ $P680^+$ ยาวขึ้น จนเกิด ^{3}P680 (^{3}Chl) ซึ่งจะไปทำปฏิกิริยากับ O_2 เกิดเป็น $^1O_2$ (singlet oxygen)

Pseudocyclic e- transfer ที่ PS I (Mehler's reaction)

แทนที่ ferredoxin จะส่ง e- ให้ NADP+ แต่กลับส่งให้ O_2 เกิดเป็น OH^* และ O_2^- (super oxide) ซึ่ง O_2^- สามารถทำปฏิกิริยากับH_2O ที่ PS II เกิดเป็น H_2O_2

ทั้ง $^1O_2$ (singlet oxygen) OH^* และ O_2^- (super oxide) เป็นโมเลกุลที่มีความ active สูง สามารถวิ่งชน particle ต่างๆ ได้ เช่น Fe-S, Lipids, protein, reaction center,

ผลของการวิ่งชน ของ acitve radicles

Lipids จะเกิดเป็น RCOO* ซึ่งเกิดอย่างต่อเนื่อง -- membrane damage

Protein เกิด breaked protein -- non-function

protein ที่ photosystems --D1 สลาย P680 no function-- no e- transport

เมื่อ membrane ถูกทำลาย -- no ATP ,ทำให้การสังเคราะห์แสงลดลง ใบไหม้เกรียม เรียก เหตุการณ์นี้ว่า photosynthesis damage / photo inhibition

พืชมีกลไกป้องกัน photoinhibition ได้หลายวิธี

1. physiological adaptation

leaf movement : ปรับมุมให้ขนานกับลำแสง , chloroplast movement, antioxidance เพื่อกำจัด active radicles

2. Biochemical adaptation

LHC II movement , Zeoxanthin for thermal discipation

Cyclic e- flow, Photorespiration , Scarvenging of reactive oxygen

1) LHC II movement

ในภาวะที่มีความเข้มแสงสูงมาก จะเกิดการสะสมของ PQH_2 เนื่องจาก E แสงมากๆ นี้ ทำให้ P680 มี e- เป็นจำนวนมาก แต่ e- เหล่านี้ไม่สามารถส่ง e- ไปให้ PQ ได้หมดเพราะความสามารถในการส่ง e- ของ PQH_2 ไปให้ cyt b6f เกิดขึ้นอัตราเร็วที่จำกัด

↓

ทำให้เกิดภาวะ excessive reduction stage ของส่วนต่างๆ ใน photosynthetic system

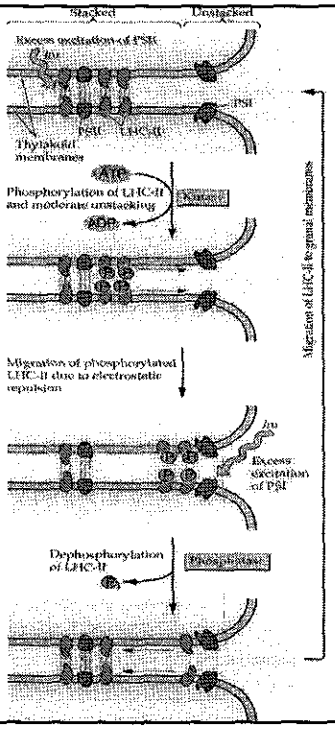
↓

เพื่อที่จะ ให้ e- สามารถส่งผ่านไปจนถึง PS I ได้ และ เพื่อระบาย e- จาก PS II ดังนั้นจึงมีกลไกการเคลื่อนย้าย e- จาก PS II ไปให้ PS I โดยตรง โดยการสะสมของ PQH_2 จะกระตุ้นให้ protein kinase ไปเติมหมู่ P ให้กับ OH gr ของ protein ที่อยู่รอบนอกที่เป็นที่จับของ antenna chlorophyll ของ LHC II

↓

ทำให้ LHC II สามารถเคลื่อนที่ออกจาก stacking membrane แล้วเคลื่อนเข้าหา LHC I และส่งถ่าย e- ไปให้ PS I

**เอนไซม์ phosphatase จะทำหน้าที่ในปฏิกริยาย้อนกลับกับ protein kinase ทำให้ LHC II สามารถจับกับ stacked memnrane ของ thylakoid เหมือนเดิม



2) Zeoxanthine : Thermal dissipation

Zeoxanthine ทำหน้าที่กำจัดพลังงานส่วนเกินที่ได้จากแสงออกไปในรูป ความร้อน

ในภาวะที่มีความเข้มแสงสูง ทำให้เกิดการ pump H+ เข้าสู่ lumen มาก (เพราะมีการถ่ายทอด e- มากขึ้น) ทำให้ lumen pH เป็นกรดมาก

⇓

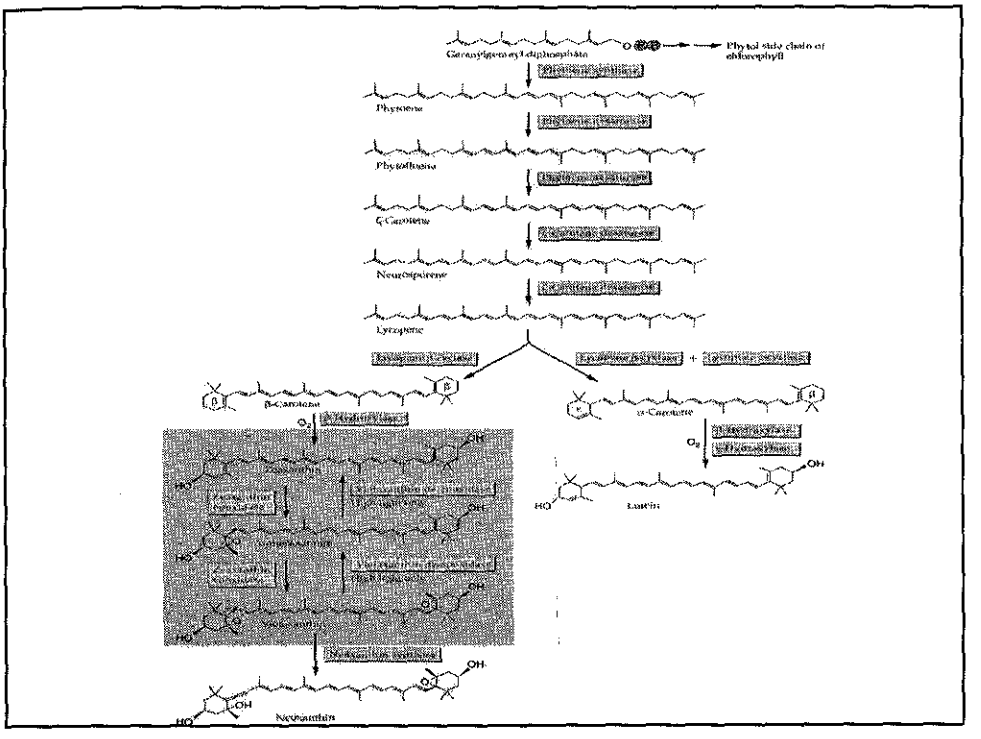
pH ที่เป็นกรดนี้จะไปกระตุ้นการเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เปลี่ยนสารตั้งต้นให้มาเป็น zeoxanthin ทำงาน และยับยั้งเอนไซม์ที่เร่งปฏิกริยาย้อนกลับ ซึ่งทำงานที่ pH เป็นเบส

⇓

เนื่องจาก zeoxanthin มีระดับ energy state ต่ำกว่า chlorophyll ทำให้ E ส่วนเกิน จาก chlorophyll ใน PS II ถ่ายเข้าสู่ zepxathin ได้

⇓

จากนั้น zeoxanthin จะปล่อยพลังงานนี้ออกมาในรูปของ ความร้อน



3) Cyclic electron flow ปกติการเคลื่อนย้าน e- จะเป็น nonclyclic จาก PSII ไปให้ PS I แทนที่ ferredoxin จะส่ง e- ให้ NADP+ แต่กลับส่งให้ O_2 เกิดเป็น OH^* และ O_2^- (super oxide) ซึ่ง O_2^- สามารถทำปฏิกิริยากับH_2O ที่ PS II เกิดเป็น H_2O_2

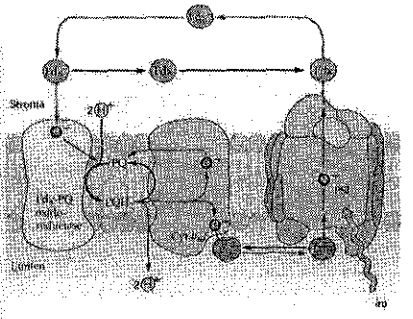
- ดังนั้นเพื่อลดโอกาสการเกิด active radicle ดังกล่าว จึงเกิด cyclic e- flow โดย Ferredoxin จะนำ e- มาส่ง ให้ PQ

•Fdx ที่ได้รับ e- จาก PS I จะกลายเป็ น Fdx-,

• Fdx- จะเคลื่อนมาส่ง e- ให้ PQ ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย Fdx-PQ oxido-reductase

• Fdx- จึงกลับมเป็น Fdx และย้อนกลับไปที่ PS I อีก

•ผลิต ATP ได้ แต่ สร้าง NADPH ไม่ได้



4) Photorespiration เมื่อแสง มีมากเกินไป

$$O_2 + RuBP \xrightarrow{\text{Rubisco}} 3PGA + \text{phosphoglycolate}$$

เพื่อลด $O_2 \longrightarrow {}^1O_2$

5) Scarvenging of reactive oxygen

โดยใช้สารบางชนิดไปจับ active radicle เพื่อช่วยลดปริมาณ active radicle ตัวอย่างสารที่ทำหน้าที่นี้ ได้แก่

- Carotenoid : B-carotene และ xanthophyll เปลี่ยน ${}^1O_2$ ไปเป็น O_2
  ${}^3Chl$ ไปเป็น ${}^1Chl$
- a-Tocopherol (Vit E) จับกับ O_2^- และ OH^*
- Ascobic acid (Vit C) จับกับ O_2^- และ OH^*
- Glutathione (เป็น small peptide, Glu-Cys-Gly) ${}^1O_2$ และ OH^* และ regenerate a-Tocopherol

อิทธิพลของแสงต่อ dark reaction

เนื่องจากใน chloroplast มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ และย่อยสลาย carbohydrate อยู่ด้วยกัน (e.g. aldolase, transketolase, G-3P dehydrogenase) พืชจึงจำเป็นที่จะต้องควบคุมให้ synthetic apparatus ทำงาน และให้ degradative apparatus ไม่ทำงานในขณะที่มีแสง

ในขณะที่มีแสง จะเกิด light reaction ทำให้ H^+ จาก stroma เคลื่อนเข้าสู่ thylakoid lumen ขณะเดียวกัน Mg^{2+} ก็จะถูกแลกเปลี่ยน โดยจะเคลื่อนออกจาก lumen ไปที่ stroma ทำให้ $[Mg^{2+}]$ ใน stroma เพิ่มขึ้นจาก ~ 1-3 mM ไปเป็น 3-6 mM

การเปลี่ยนแปลงของ pH และ $[Mg^{2+}]$ ใน stroma นี้มีความสำคัญต่อการควบคุม regulators ที่ควบคุมการทำงานของ enzymes หลายชนิด เช่น Rubisco, fructose 1,6-bisphosphatase, และ phosphoribulokinase

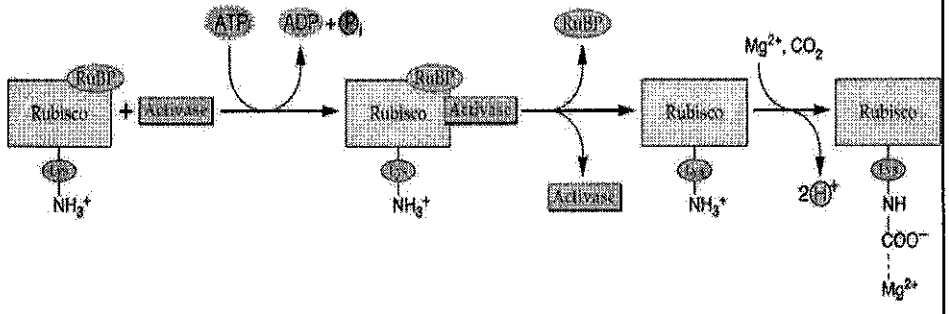
<u>ตัวอย่าง : กลไกการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ Rubisco</u>

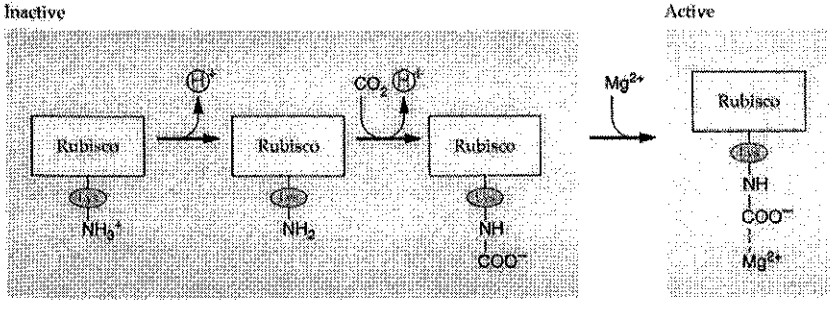
ที่ active site ของเอนไซม์ Rubisco จะมี RuBP เกาะอยู่ ทำให้เอนไซม์อยู่ในรูป inactive form

Rubico จะทำงานต่อเมื่อมีแสง โดยแสงจะกระตุ้นให้ Rubisco activase ทำงาน Rubisco activase จะแยก RuBP ออกจาก active site ของ Rubisco จากนั้นหมู่ NH_2 ของกรดอะมิโน lysine ที่อยู่ตรง active site ของ Rubisco จะทำปฏิกิริยากับ CO_2 (เป็นคนละตัวกับ CO_2 ที่จะทำปฏิกิริยาเพื่อเกิด product) เกิดเป็น Rubisco-carbamate ซึ่งเอนไซม์ยังอยู่ในสภาพ inactive form

เมื่อมี Mg^+ จาก lumen แพร่เข้าสู่ stroma จะทำให้ $[Mg^{2+}]$ ใน stroma สูงขึ้น Mg^{2+} จะเข้าจับกับ Rubico-cabamate เกิดเป็น Rubisco-carbamate-Mg^{2+} ทำให้ Rubisco อยู่ในสภาพ active form

นอกจากนี้ ยังมีกลไกการควบคุม Rubisco แบบอื่นๆ เช่นที่พบในพืชที่ปรับตัวภายใต้ความมืด (dark-adapt plant) พืชกลุ่มนี้จะใช้ CA1P (2-carboxyarabinitol-1, สังเคราะห์ในช่วงไม่มีแสง) เกาะกับ Rubisco ทำให้เอนไซม์อยู่ใน สภาพ inactive จนกระทั่งมีแสง Rubisco activase ซึ่งถูกกระตุ้นโดยแสง จะทำให้สารนี้แยกออกไปจาก active site





Light-linked covalent modification is important in regulating the Calvin cycle

- แสงทำหน้าที่เป็นตัวทำให้เกิด Covalent modification ของเอนไซม์หลายชนิดใน Calvin cycle ซึ่งจะทำให้เกิดการควบคุมการทำงานของเอนไซม์ให้เกิดเฉพาะในช่วงที่มีแสง
- Redox-dependent regulatory system ที่เกี่ยวข้องกับการเกิด covalent modification ได้แก่ ferredoxin, thioredoxin และ ferredoxin-thioredoxin reductase

แสงที่กระตุ้นให้ เกิด Light reaction ที่ PS I ทำให้
Oxidized ferredoxin เปลี่ยนไปเป็น Reduces ferredoxin

⬇

Reduces ferredoxin จะไปทำให้ oxidized thioredoxin เกิดเป็น reduced thioredoxin
ซึ่งขั้นตอนนี้ถูกเร่งปฏิกิริยาโดย Ferredoxin-thioredoxin reductase

⬇

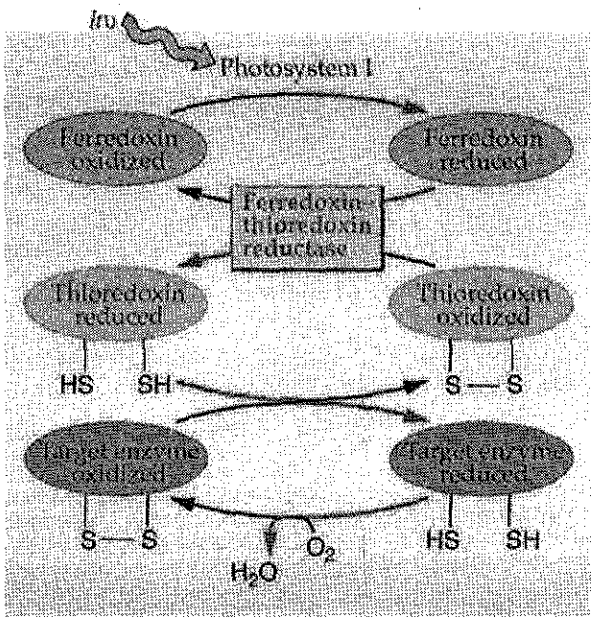
Reduced thiredoxin สามารถเปลี่ยน conformation ของเอนไซม์เป้าหมายที่อยู่ใน Calvin cycle
จากสภาพ oxidized form ไปเป็น reduced form ซึ่งจะมีผลทำให้
เกิดการปรับเปลี่ยนการทำงานของ enzyme เหล่านี้

⬇

เมื่ออยู่ในช่วงที่ไม่มีแสงเอนไซม์เหล่านี้จะกลับมาสู่สภาพ oxidized (deactivation) อีก

- การควบคุมที่เกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับขั้นนี้ แสดงถึงการส่งสัญญาณจาก light reaction ไปสู่ CO_2 fixation pathway เพื่อให้ carbohydrate synthesis เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องในภาวะที่มีแสง
- เอนไซม์ ใน Chloroplast enz ที่ ถูกควบคุมโดยวิธีนี้ ได้แก่

  Fructose 1,6-Bisphosphatase, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, phosphoribulokinase, NADP+-glyceraldehyde-3-P Dehydrogenase, Ribulose activase, ATP synthase.



2. ปริมาณ [pigment]

- ใบไม้สามารถ ดูดกลืนแสงได้ทุกความยาวคลื่นระหว่าง 400-700 nm ซึ่งต้องมี pigments ที่จะดูดกลืนแสงช่วงนั้นๆ ได้
- สัดส่วนของ PS II : PS I สามารถเปลี่ยนแปลงได้ ขึ้นกับสภาพแสงสูงหรือต่ำ เพื่อให้ photosynthetic ทำงานได้ถึงจุดสูงสุด
- การสังเคราะห์ chlorophyll, carotenoids แปรผันตาม แสง, N, Mg (องค์ประกอบของรงควัตถุ) เป็นต้น

3. ปริมาณ metabolites ใน chloroplast

เช่น ADP , Pi ซึ่งจะสัมพันธ์กับ metabolic pathway อื่นๆ

4. $[CO_2] / [O_2]$

เนื่องจาก active site ของ Rubisco สามารถจับได้ทั้ง CO_2 (carboxylase activity) และ O_2 (oxygenase activity) ดังนั้นสัดส่วนของ carboxylase activity/ oxygenase activity จึงขึ้นอยู่กับ $[CO_2]/[O_2]$

Rubisco specificity :

= carboxylase activity/ oxygenase activity

= $[CO_2]/[O_2]$

เช่น = 2.8/1 หมายถึง Rubisco ทุกๆ 4 โมเลกุล จะเกิด carboxylase activity 3 โมเลกุล, oxygenase activity 1 โมเลกุล

III. Plant Respiration

Outline

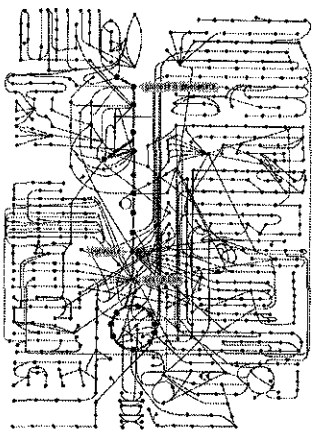
- Introduction
- Glycolysis
- Citric acid cycle
- Electron transport chain**
- Alternative pathways

Introduction

Metabolism

หน้าที่

1. ให้ได้พลังงาน และแลกเปลี่ยนพลังงาน ระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อม
2. ย่อยสลายสารอาหารหรือเปลี่ยนแปลงสาร โมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุลหน่วยการสร้าง (building block) หรือสารต้นกำเนิด (precursor)
3. สังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่จาก building block
4. เพื่อสร้าง หรือ เปลี่ยนแปลงชีวโมเลกุลต่างๆ ให้อยู่ในรูปที่สามารถทำหน้าที่ได้, ทำลายสารพิษ



3 types of Metabolic Pathway

1. วิถี catabolism 3 ขั้นตอน

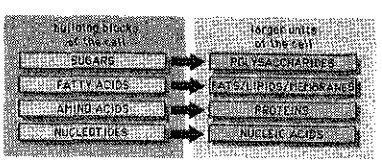
ขั้นตอนที่ 1 การสลายสารโมเลกุลใหญ่ให้เป็นโมเลกุล building block

ขั้นตอนที่ 2 การเปลี่ยน building block ให้เป็นโมเลกุลขนาดเล็ก โดยมีผลผลิตร่วมกัน ที่สำคัญ Acetyl CoA

ขั้นตอนที่ 3 การนำ Acetyl CoA เข้าสู่ citric acid cycle และการถ่ายทอด electron ได้น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงาน ATP

2. วิถี Anabolism

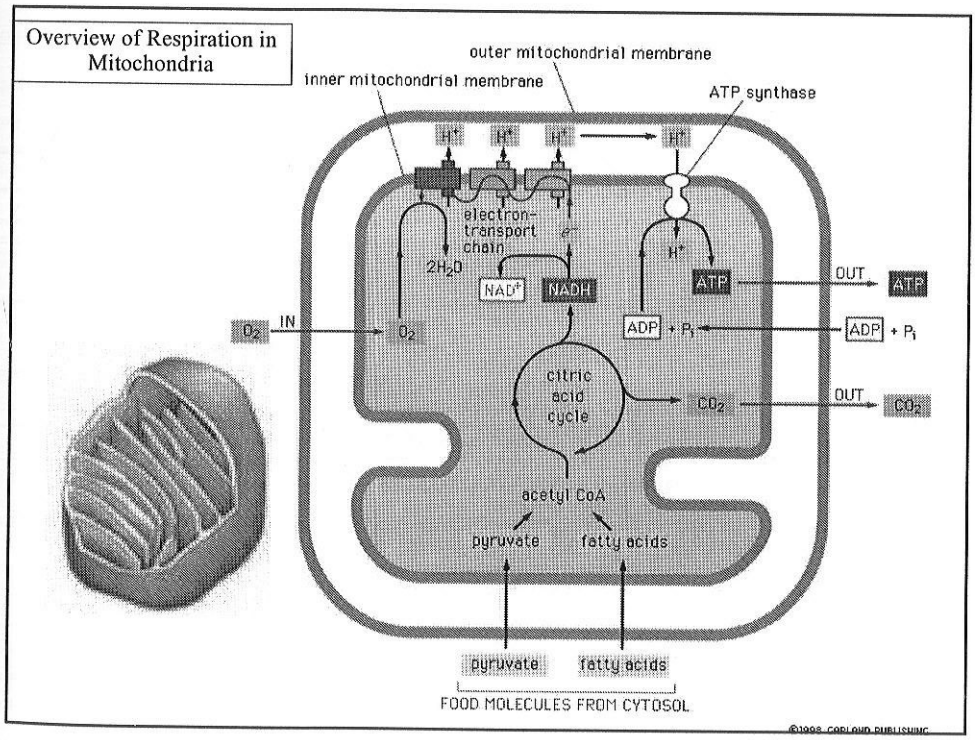
สังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่จาก building block



3. amphibolic pathway วิถี citric acid cycle เป็นทั้ง catabolism และ anabolism (ทำหน้าที่เป็นแหล่งของ precursor ของวิถี ในการสังเคราะห์สารต่างๆ)

Respiration (carbon catabolism)

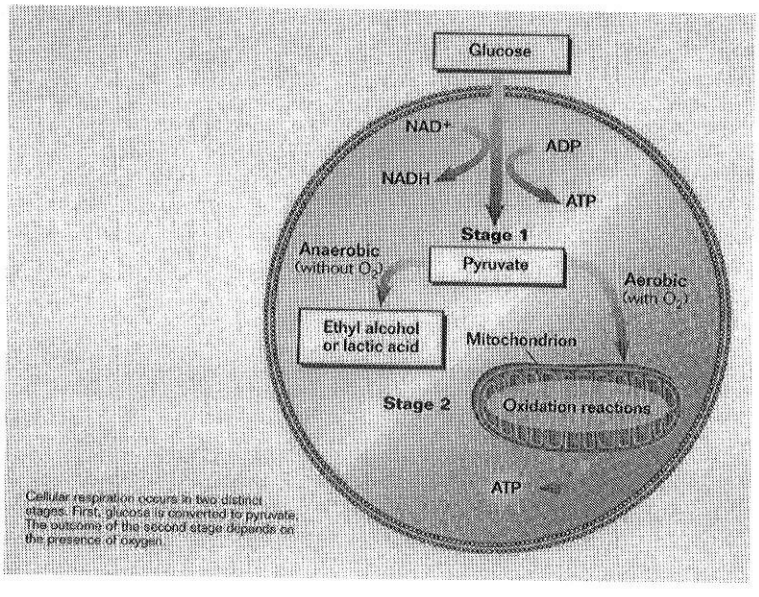
- Glycolysis pathway
- Fate of pyruvate
- Citric acid cycle
- Electron transport chain and oxidative phosphorylation



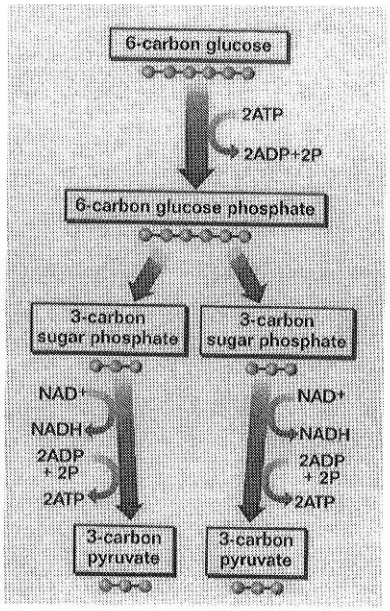
I. การสลาย Glucose (Glucose Catabolism)

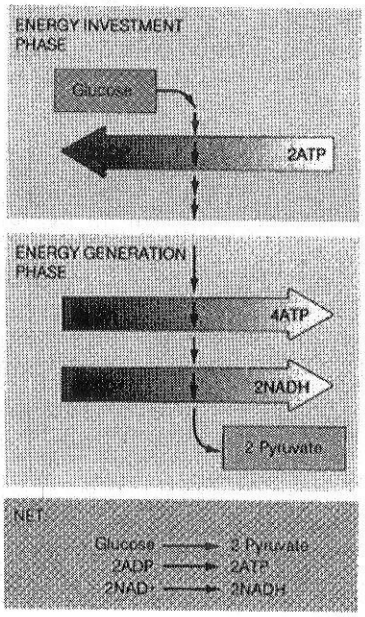
แบ่งเป็น 4 ขั้นตอน

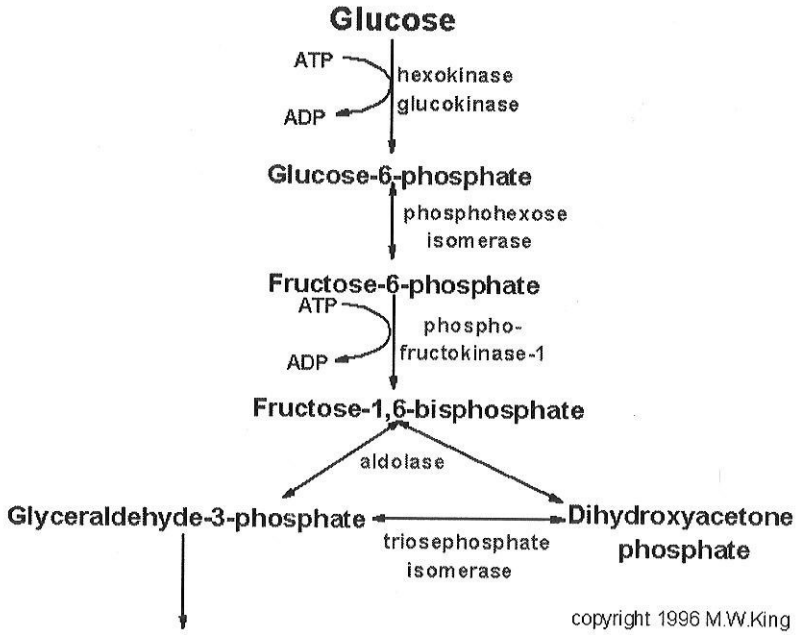
1. การสลายกลูโคสโดย glycolysis pathway ได้ pyruvate, ATP, NADH
2. Catabolism ของ pyruvate (Fate of Pyruvate)
   - anaerobic respiration เพื่อเปลี่ยน pyruvate เป็น EtOH, lactate
   - aerobic respiration เพื่อเปลี่ยน pyruvate เป็น Acetyl CoA
3. การนำ Acetyl CoA เข้าสู่ citric acid cycle โดยรวมตัวกับ oxaloacetate ได้ CO_2 NADH, $FADH_2$ .ATP
4. NADH และ $FADH_2$ จะส่งถ่ายอิเล็กตรอนผ่าน electron transfer and oxidative phosphorylation pathway ได้น้ำและพลังงาน

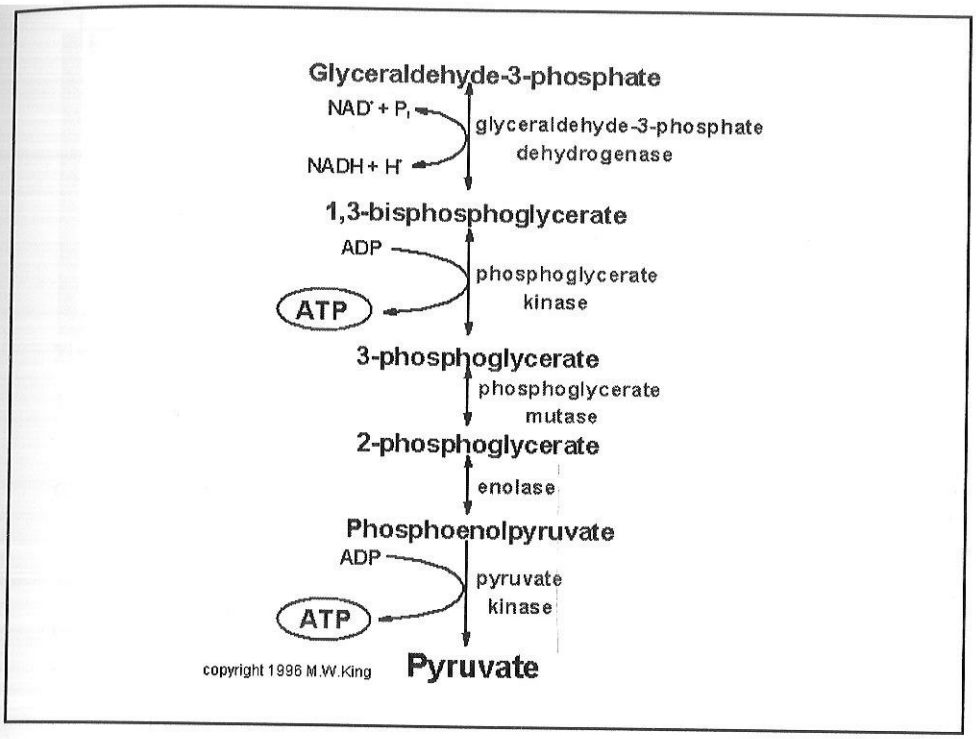


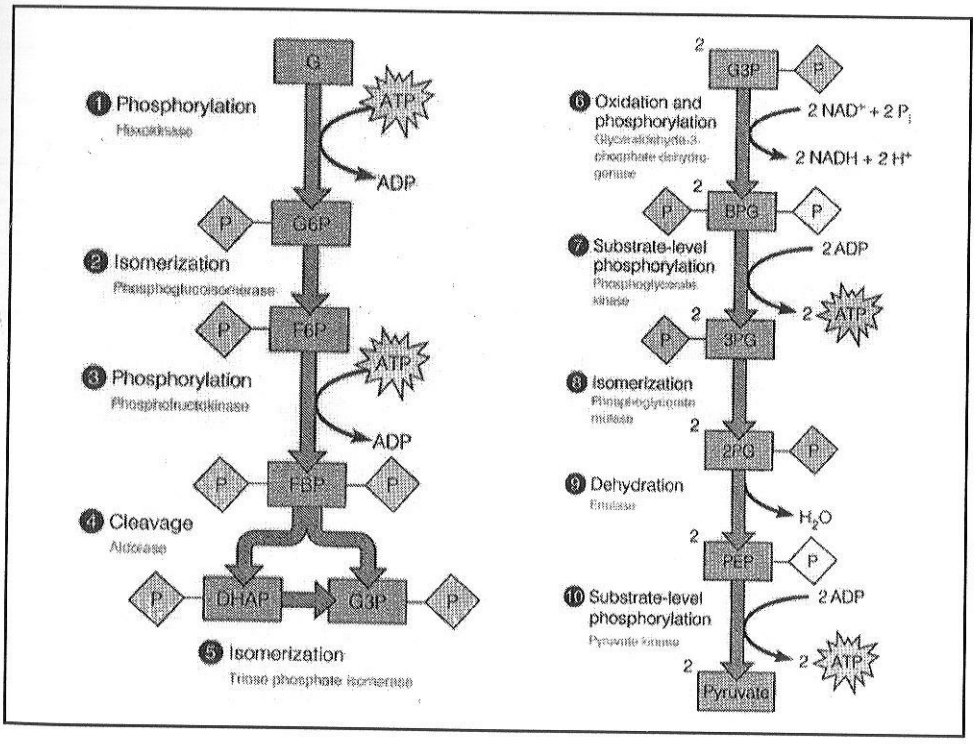
STEPS of GLYCOLYSIS.

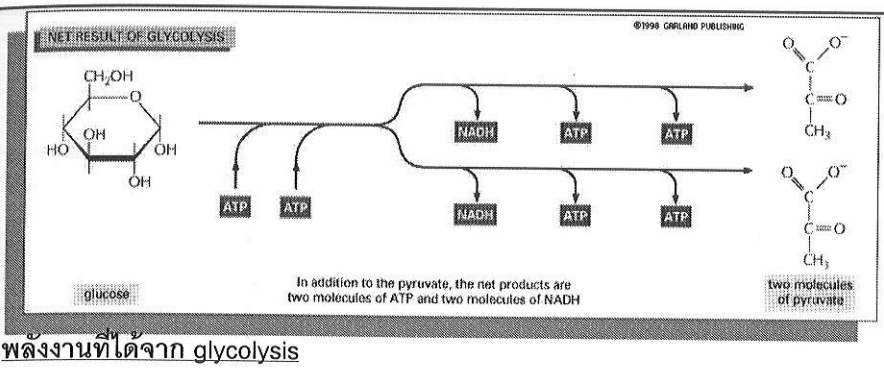







Glyceraldehyde-3-phosphate
NAD+ + Pi
NADH + H+
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
1,3-bisphosphoglycerate
ADP
ATP
phosphoglycerate kinase
3-phosphoglycerate
phosphoglycerate mutase
2-phosphoglycerate
enolase
Phosphoenolpyruvate
ADP
ATP
pyruvate kinase
Pyruvate
copyright 1996 M.W.King


G
ATP
ADP
1 Phosphorylation
Hexokinase
P
G6P
2 Isomerization
Phosphoglucoisomerase
P
F6P
ATP
ADP
3 Phosphorylation
Phosphofructokinase
P
FBP
P
4 Cleavage
Aldorase
P
DHAP
G3P
P
5 Isomerization
Triose phosphate isomerase
2
G3P
P
6 Oxidation and phosphorylation
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
2 NAD+ + 2 Pi
2 NADH + 2 H+
2
P
BPG
P
7 Substrate-level phosphorylation
Phosphoglycerate kinase
2 ADP
2 ATP
2
P
3PG
8 Isomerization
Phosphoglycerate mutase
2
2PG
P
9 Dehydration
Enolase
H2O
2
PEP
P
10 Substrate-level phosphorylation
Pyruvate kinase
2 ADP
2 ATP
2
Pyruvate



<u>พลังงานที่ได้จาก glycolysis</u>

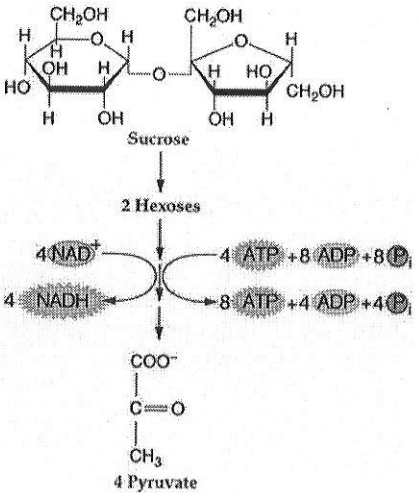
1 glucose ใช้ 2 ATP เพื่อเปลี่ยนเป็น G-3-P

ได้4 ATP 2 NADH เพื่อเปลี่ยน G-3-P เป็น pyruvate

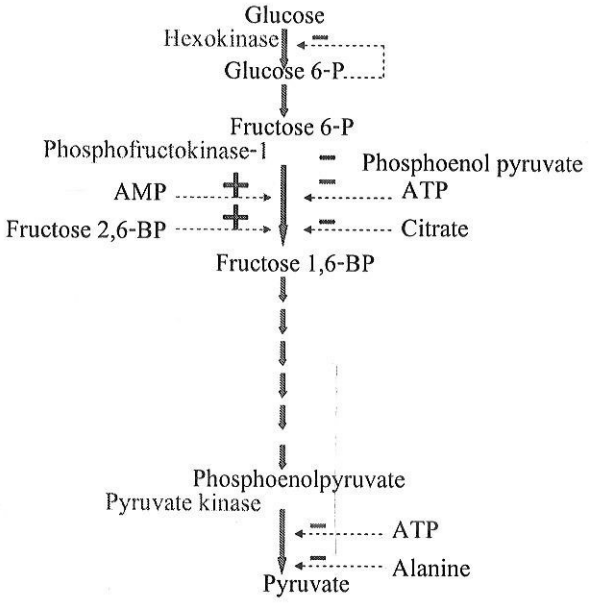
Glucose+ 2 Pi+ 2 ADP+2 NAD+ ⟹ 2 pyruvate+ 2ATP + 2NADH + $4H^+$ + $2H_2O$

NADH จาก glycoysis ไม่สามารถผ่านผนังชั้นในเข้าสู่ matrix ได้ ต้องอาศัยการลำเลียง (shuttle system) ระบบ Malate-aspatate หรือระบบ glyceral phosphate ซึ่งได้ ATP =3 หรือ 2 โมเลกุล ตามลำดับ

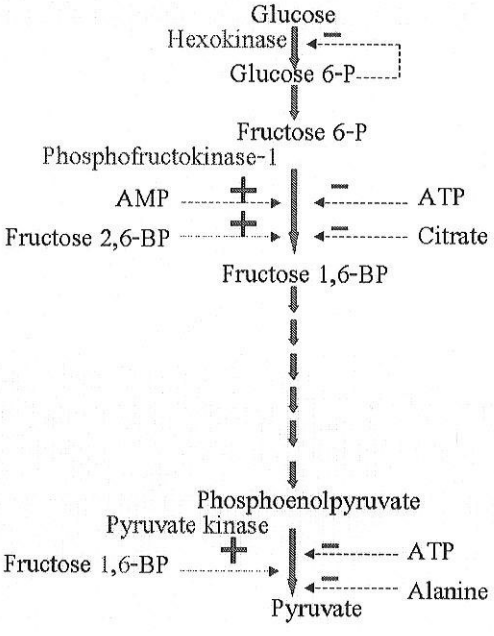
Glycolysis of sucrose



การควบคุมวิถี glycolysis ในพืช

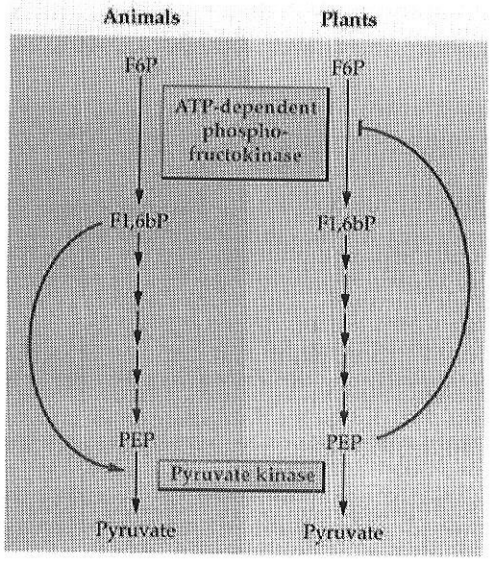


การควบคุม glycolysis ในสัตว์



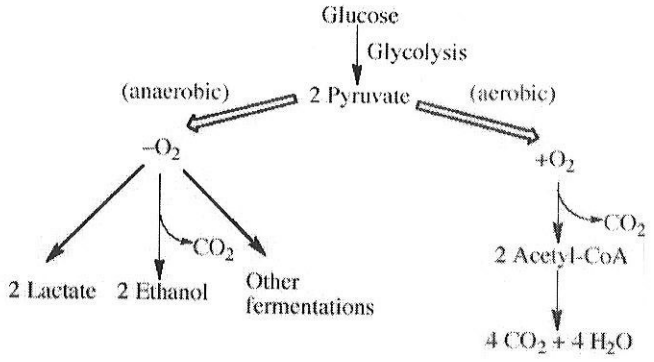
Difference in the regulation of glycolysis

in plants and animal cells

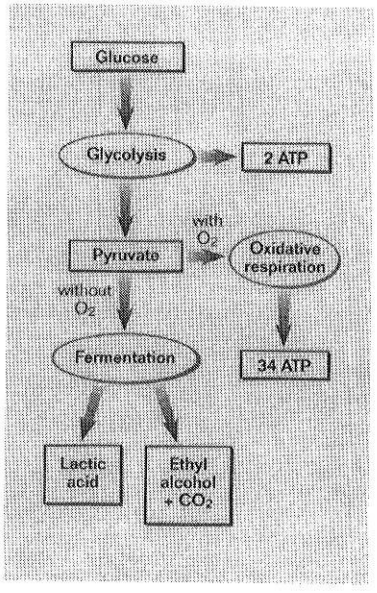


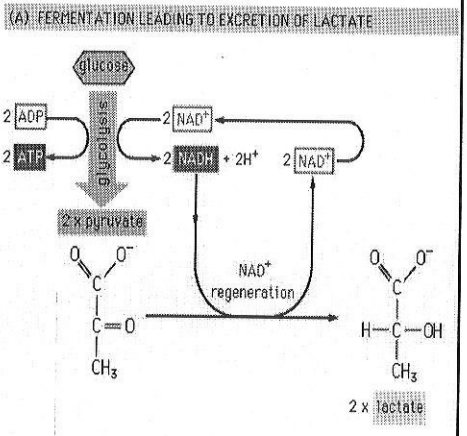
2) Catabolism ของ pyruvate (Fate of Pyruvate)

Fates of Pyruvate

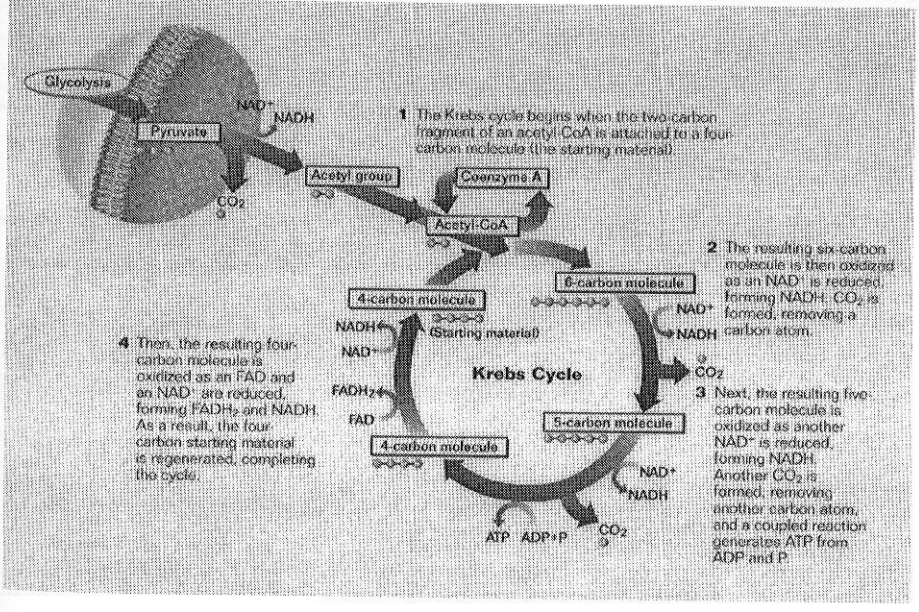


ANAEROBIC RESPIRATION.



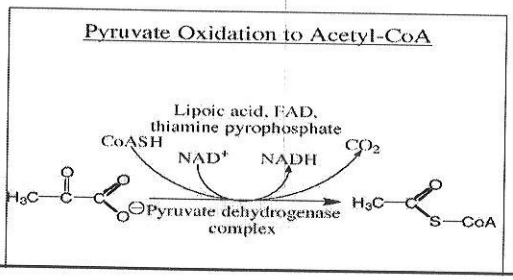


AEROBIC RESPIRATION: the Krebs cycle



การเปลี่ยน pyruvate เป็น Acetyl CoA

- pyruvate จาก cytoplasm จะผ่านเข้าสู่ mitochondria ได้ และถูกเปลี่ยนเป็น acetyl CoA โดย Pyruvate dehydrogenase complex ใน mitochondria
- ปฏิกิริยานี้การสูญเสีย H จาก pyruvate ให้ NAD+ ได้เป็น NADH + H^+ และปฏิกิริยาขจัด carboxyl gr เรียก oxidative decarboylation
- Pyruvate dehydrogenase complex ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดและ
  - ต้องการ coenzyme 5 ชนิด คือ TPP, FAD, NAD+, CoASH และ lipoic acid
  -ถูกยับยั้งด้วย ATP, NADH และ Acetyl CoA

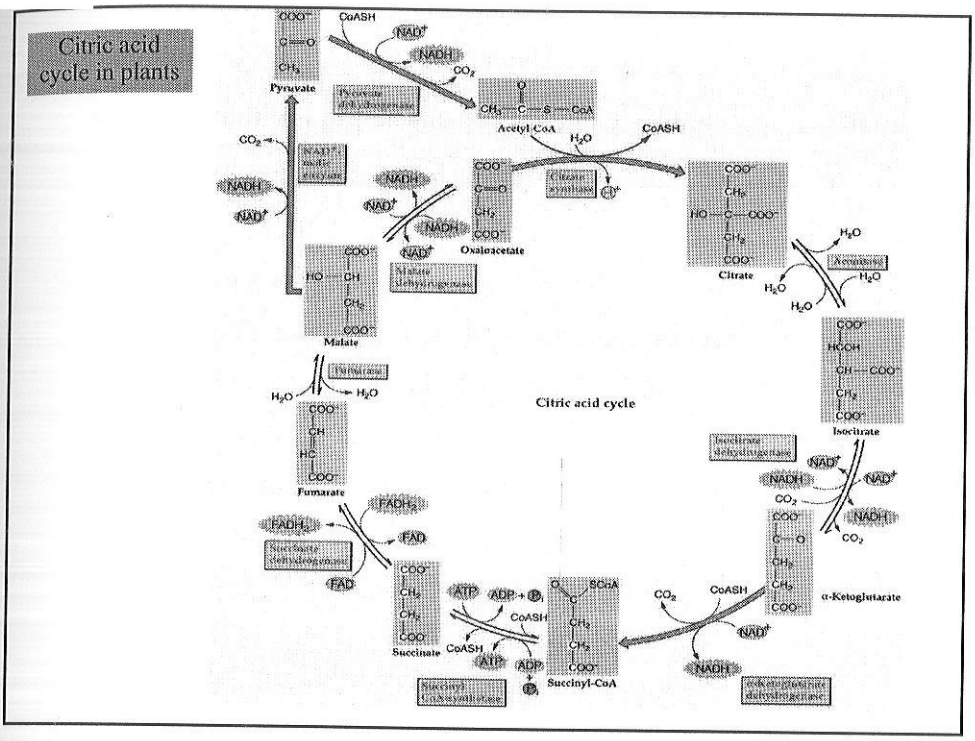


3. Citric acid cycle

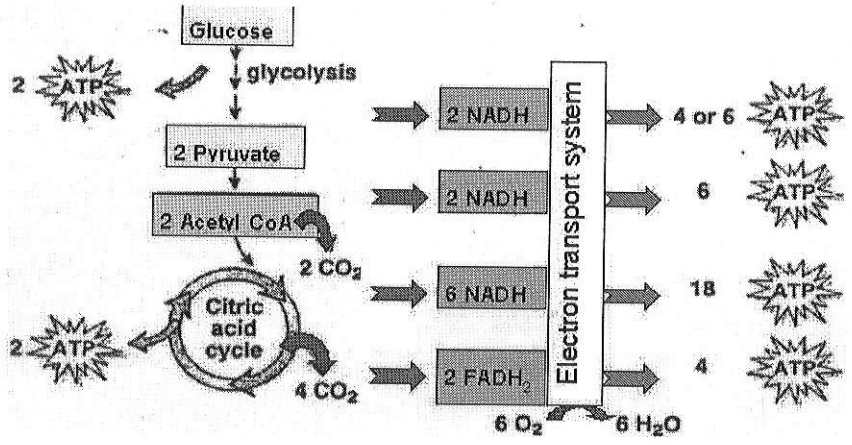
- เป็น metabolism ของ Acetyl CoA เกิดใน Matrix ของ mitochondria
- เป็นวิถีร่วมสุดท้ายของการสลายสารอาหารต่าง ๆ ที่ให้พลังงาน และ intermediate ใน cycle ยังเป็นprecursor ของการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลต่าง ๆ
- <u>โดยสรุป ใน 1 รอบของ cycle</u>

หมู่ acetyl (C2)จะเข้ารวมกับ oxaloacetate (C4) ได้ citrate (C6) จากนั้นจะมีการสูญเสีย C ในรูป CO2 จำนวน 2 โมเลกุล และท้ายที่สุดได้ oxaloacetate กลับคืนมาอีก

- ได้ 2 ATP, 6 NADH, 2 $FADH_2$



Total ATP Yield จากการสลาย glucose 1 โมเลกุล = 36 or 38 ATP

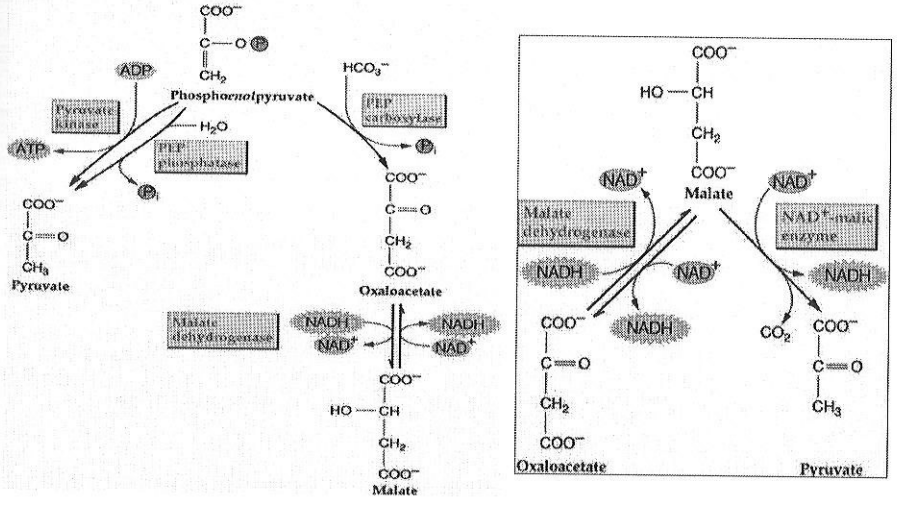


ในขณะที่เอนไซม์ใน Citric acid cycle เกือบทั้งหมดเป็น NAD^+-linked (สังเคราะห์ $NADH + H^+$), แต่ Isocitrate dehydrogenase และ malate dehydrogenase ยังมีแบบ $NADP^+$-dependent isoforms (สังเคราะห์ $NADPH + H^+$)

NADPH ที่ผลิตจากเอนไซม์ทั้งสองนี้ สามารถนำไปใช้ในกิจกรรมต่างๆได้ เช่น

- เป็น e- donor ใน e- transfer chains ใน mitochondria เพื่อผลิต ATP
- Reduction of duhydrofolate to tetrahydrofolate ซึ่งเป็น substrate ใน Photorespiration
- production of reduced glutathione ที่ใช้ในการกำจัด reactive oxygen
- reduction of mitochondria thioredoxin

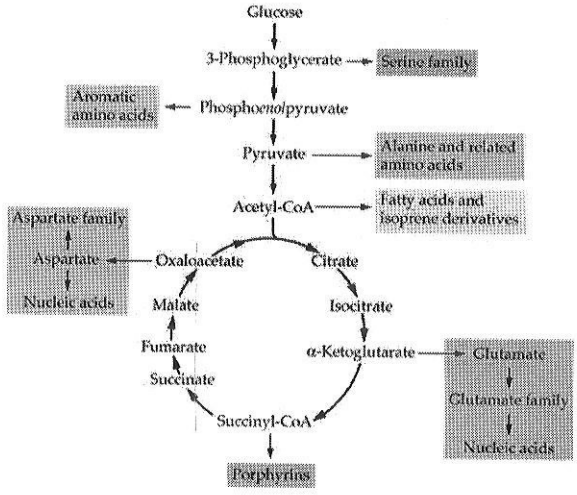
Phosphoenol pyruvate (PEP) ที่ได้จาก glycolysis rx ที่ 9 นอกจากจะสามารถเปลี่ยนเป็น pyruvate แล้ว ยังเปลี่ยนเป็น oxaloacetate ซึ่งเป็น intermediate ใน Citric acid cycle



Glycolysis และ Kreb cycle กับการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล

- Intermediate ใน Glucose metabolism pathway ที่หน้าที่ให้สารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุล
- ดังนั้นโมเลกุล sucrose หรือ hexose ไม่ใช้ไปในการผลิต ATP ทั้งหมด เพราะส่วนหนึ่งเอาไปใช้เปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารอื่น

การสังเคราะห์สารจาก intermediates ใน Glycolysis และ Citric acid cycle ในพืช



การที่สาร intermediate ใน Kreb cycle สามารถถูกดึงไปใช้ในการสังเคราะห์สารอื่นๆ มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง conc และ Flux ของสารเหล่านี้ใน cycle จนอัตราเร็วของ cycle จะลดลง จึงต้องมีการผลิตสาร intermediate ขึ้นมาทดแทน เพื่อรักษาระดับของสาร intermediate ให้คงที่อยู่เสมอ

ในภาวะปกติ กระบวนการต่างๆ เหล่านี้จะถูกควบคุมให้เกิดขึ้นอย่างมีสมดุล เกิดขึ้นในหลายวิธี

1. Pyruvate + CO_2 + ATP + H_2O ➡ Oxaloacetate + ADP + Pi (เป็นปฏิกิริยาหลัก) เร่งปฏิกิริยาโดย pyruvate decarboxylase ซึ่งเป็น allosteric enzyme

การสะสมของ acetyl CoA เป็นสัญญาณ บ่งถึงการเข้าสู่ kreb cycle เกิดขึ้นช้า เนื่องจากปริมาณของ intermediate ใน cycle ไม่เพียงพอ acetyl CoA จะไปกระตุ้น pyruvate decarboxylase ให้เปลี่ยน pyruvate ไปเป็น oxaloacetate เพื่อนำมาใช้ใน cycle

2. Phosphoenol pyruvate + HCO_3^+ ➡ oxaloacetate + Pi เร่งโดย pyruvate decarboxylase พบในพืชและแบคทีเรียบางชนิด

3. การ**สลาย** amino acid และ fatty acid เพื่อเปลี่ยนมาเป็น succinyl CoA

Electron transport chain

- Complex I : NAD dehydrogenase มี FMN เป็น co-factor เร่งปฏิกิริยา

  $NADH + H^+ \longrightarrow NAD^+ + 2H^+ + 2\ e^-$

- Complex II : - Succinate dehydrogenase มี FAD เป็น coenzyme, Fe เป็น center เร่งปฏิกิริยา Oxidation ของ Succinate เพื่อเปลี่ยนไปเป็น Fumalate

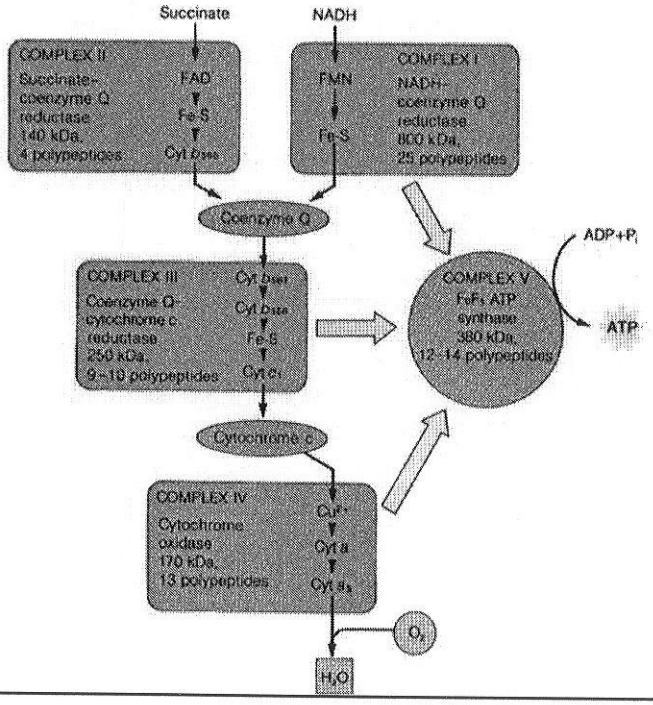
  succinate $\longrightarrow$ fumarate $+2e^- + 2H^+$

- 2e- จาก Cpx I และ II จะ reduce Ubiquinone (UQ) ให้เป็น Ubiquinol (UQH_2)
- Complex III : Ubiquinol cytochrome c oxidoreductase (Cyt C6f complex)

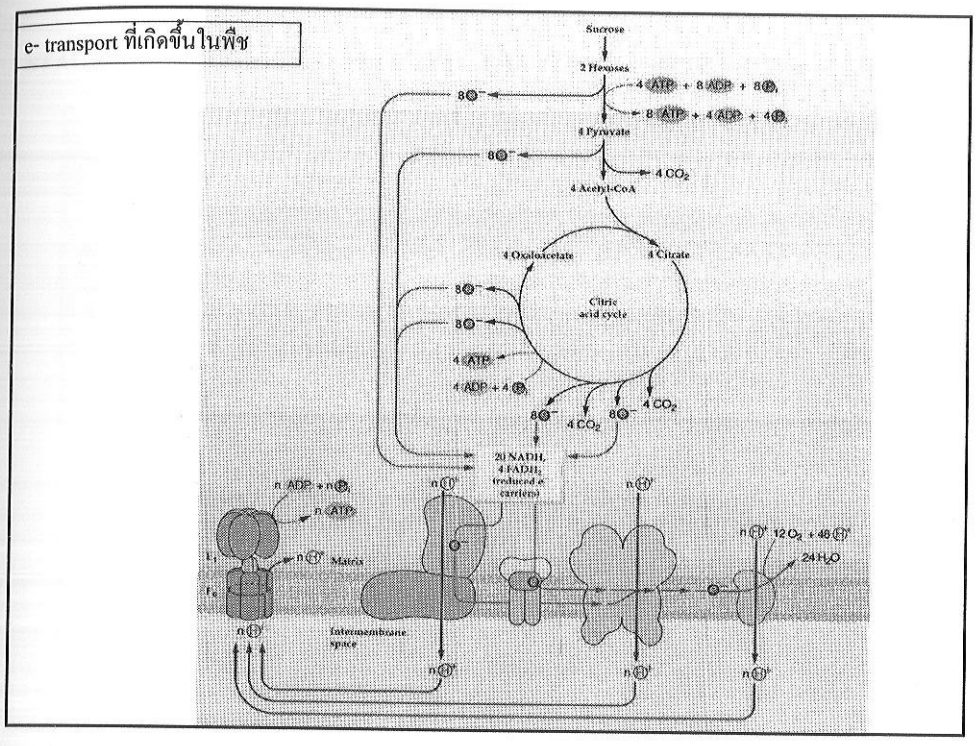
  รับ 2e- จาก UQH2
- Complex IV : Cytochrome C oxidase complex : CuA, CuB, Cyta, Cyt a3

e- จาก Cpx III จะ reduce Fe^{3+} ไปเป็น Fe^{2+} และ e- จะถูกส่งต่อไปยัง cyta, Cyt a3, O_2 เกิดน้ำในที่สุด

- Complex V : ATP Synthase complex



e- transport ที่เกิดขึ้นในพืช



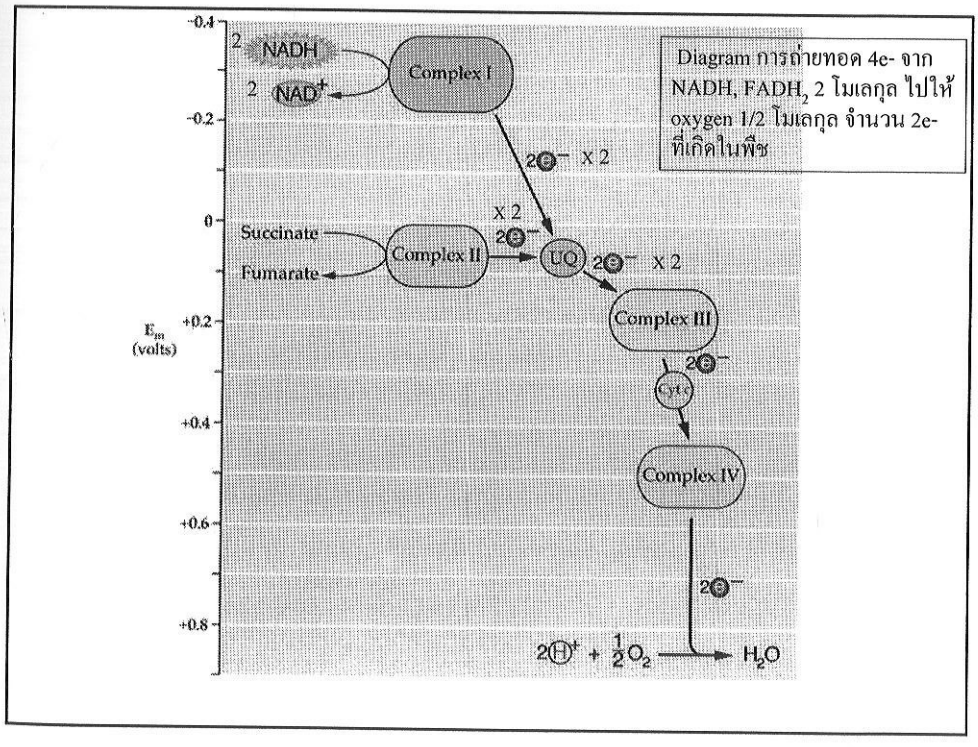
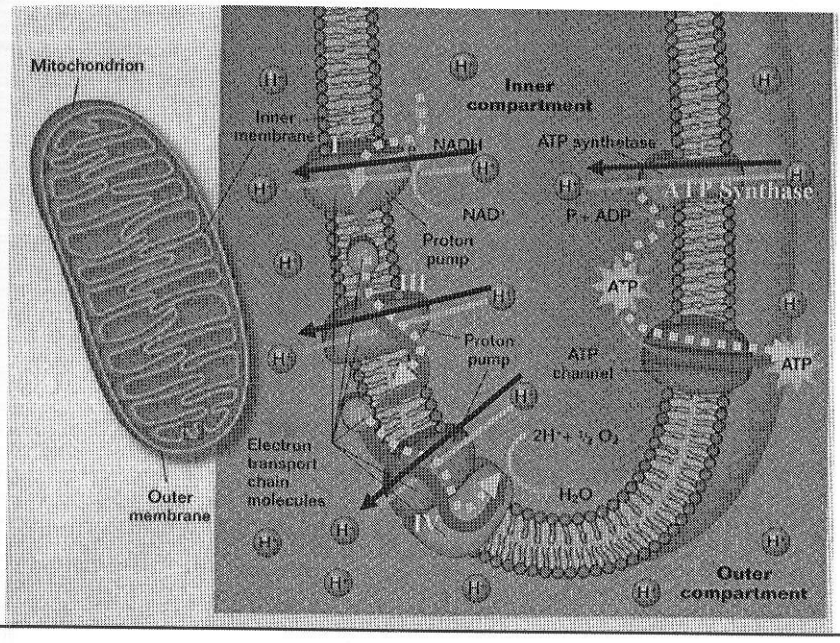
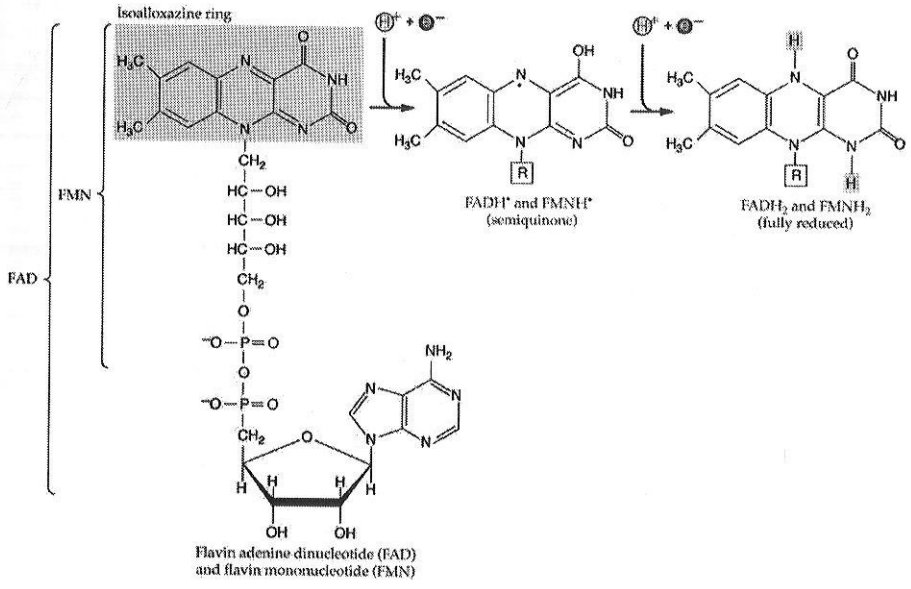


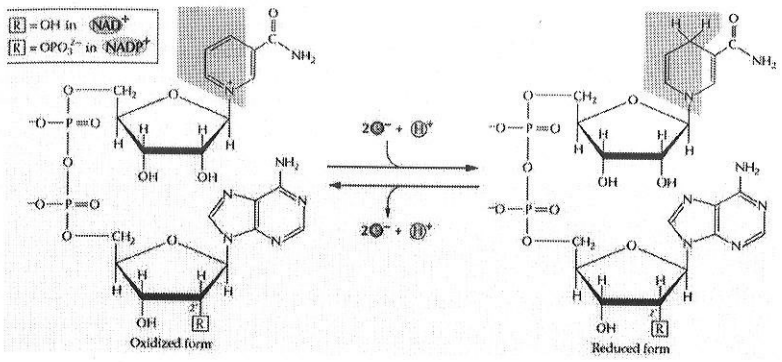
Diagram การถ่ายทอด 4e- จาก NADH, $FADH_2$ 2 โมเลกุล ไปให้ oxygen 1/2 โมเลกุล จำนวน 2e- ที่เกิดในพืช

STAGE 2 OF AEROBIC RESPIRATION THE ELECTRON TRANSPORT CHAIN

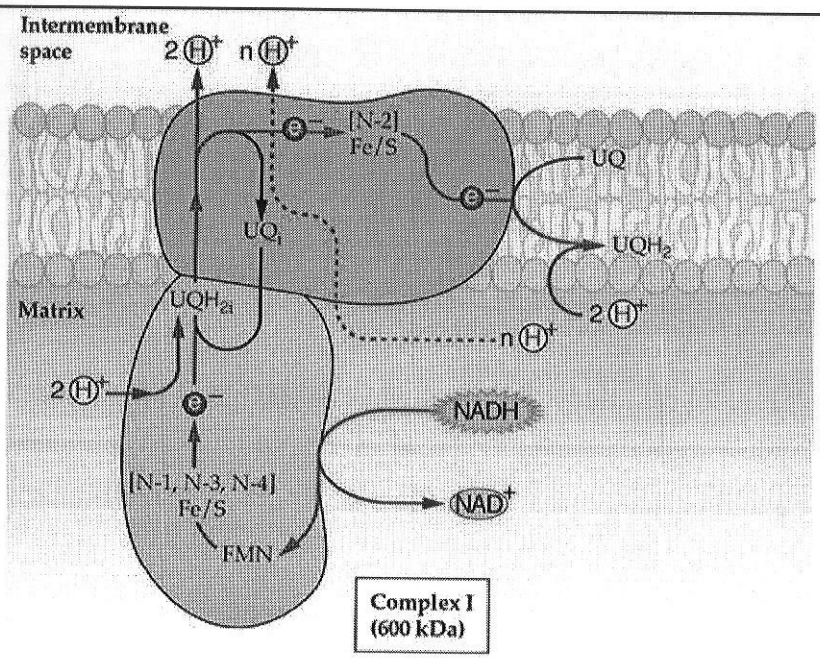


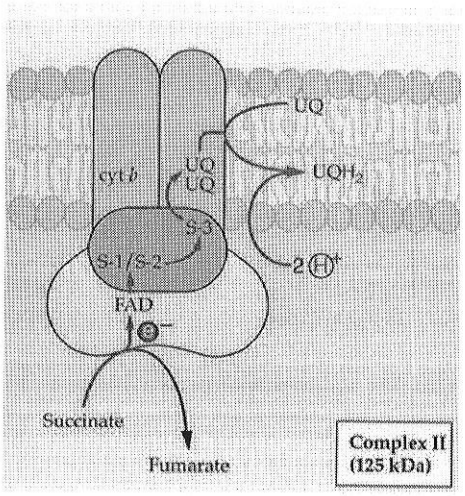


FAD, FMD

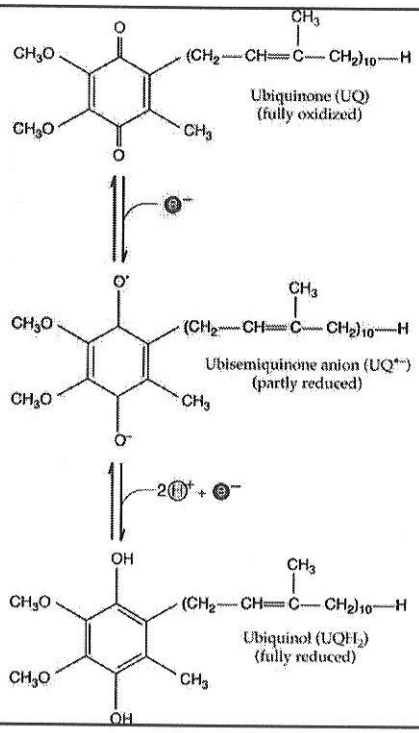

R = OH in NAD+
R = OPO3 2− in NADP+
2e− + H+
2e− + H+
Oxidized form
Reduced form

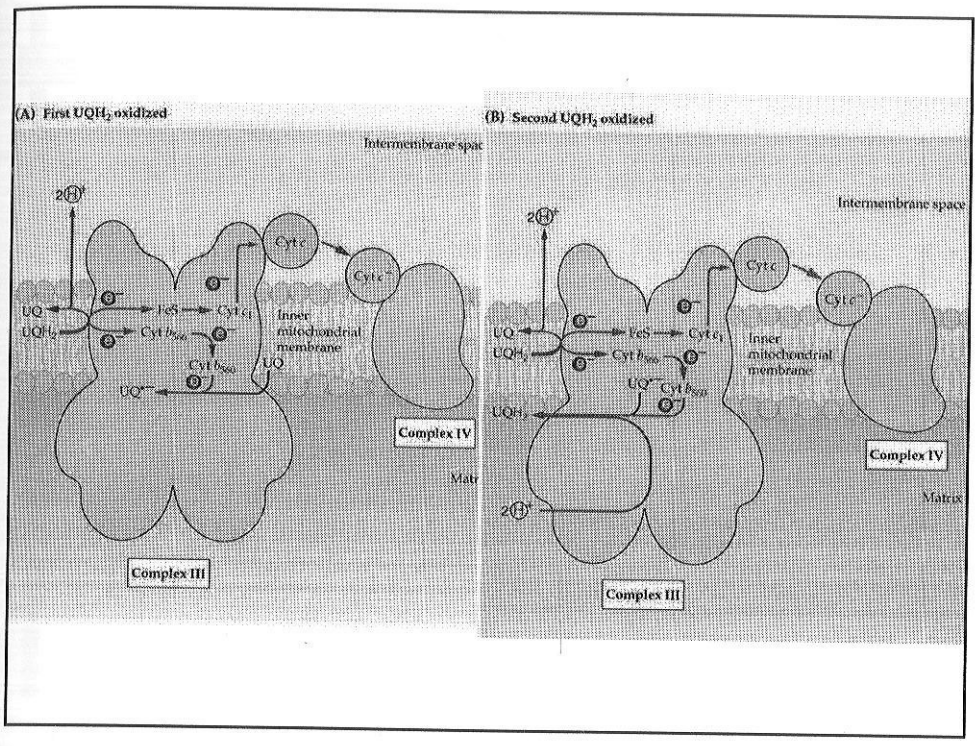
NAD$^+$, NADP$^+$

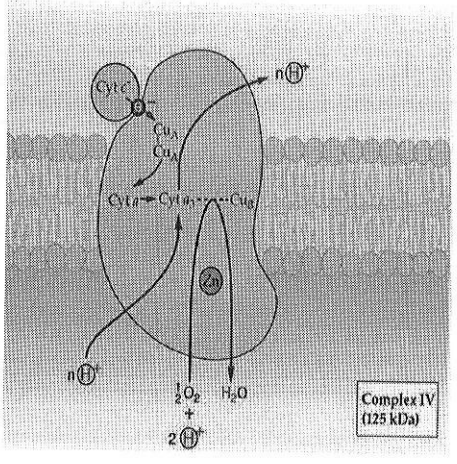

Intermembrane space
2 H+
n H+
e−
[N-2] Fe/S
UQ
UQ1
UQH2
UQH2i
Matrix
2 H+
n H+
NADH
NAD+
[N-1, N-3, N-4] Fe/S
FMN
Complex I (600 kDa)


UQ
cyt b
UQ
UQ
UQH2
S-3
S-1/S-2
2 H+
FAD
e−
Succinate
Fumarate
Complex II
(125 kDa)

Ubiquinone


CH3
O
CH3O
(CH2—CH=C—CH2)10—H
CH3O
CH3
O
Ubiquinone (UQ)
(fully oxidized)
e−
O·
CH3
CH3O
(CH2—CH=C—CH2)10—H
CH3O
CH3
O−
Ubisemiquinone anion (UQ·−)
(partly reduced)
2 H+ + e−
OH
CH3
CH3O
(CH2—CH=C—CH2)10—H
CH3O
CH3
OH
Ubiquinol (UQH2)
(fully reduced)

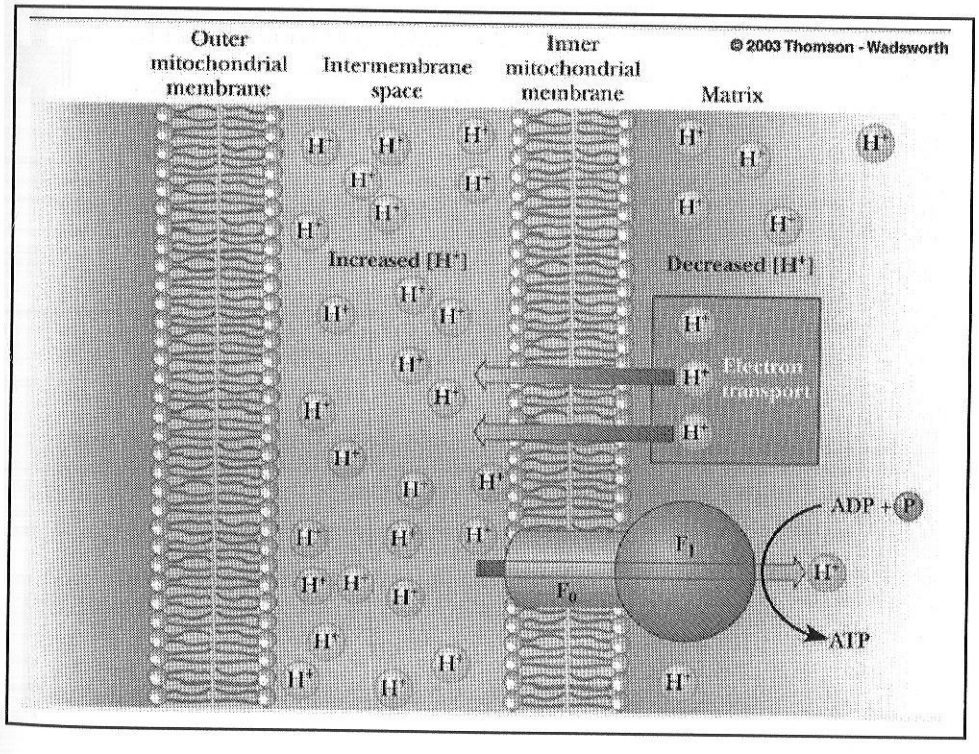

(A) First UQH_2 oxidized
Intermembrane spac
$2H^+$
UQ
UQH_2
FeS
Cyt c_1
Cyt c
Cyt c^{++}
Cyt b_{566}
Cyt b_{560}
UQ
UQ^-
Inner mitochondrial membrane
Complex IV
Matr
Complex III
(B) Second UQH_2 oxidized
Intermembrane space
$2H^+$
UQ
UQH_2
FeS
Cyt c_1
Cyt c
Cyt c^{++}
Cyt b_{566}
UQ^-
Cyt b_{560}
UQH_2
Inner mitochondrial membrane
Complex IV
Matrix
$2H^+$
Complex III

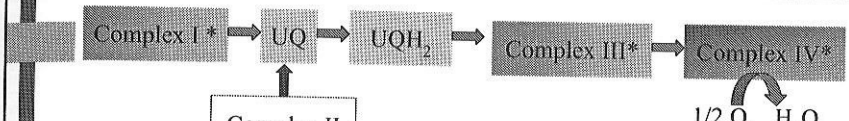

Cyt c
$n H^+$
Cu_A
Cu_A
Cyt a
Cyt a_3
Cu_B
Zn
$n H^+$
$\frac{1}{2}O_2$
+
$2H^+$
H_2O
Complex IV
(125 kDa)

เมื่อมีการขนส่งอิเล็คตรอน จะมีการขับเคลื่อน H^+ ออกจาก metrix ออกสู่ช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มทั้งสองของไมโตคอนเดรีย (intermembrane space)

ความเข้มข้นของ H^+ ตรง intermembrane space สูงกว่า ใน metrix ทำให้เกิด proton motive force ที่ช่วยผลักดัน H^+ ให้ไหลกลับเข้าสู่ metrix ผ่านทางช่องว่างของ ATP synthase complex

พลังงานที่เกิดขึ้นจากการที่ H^+ ไหลผ่านถูกนำไปใช้ปฏิกิริยาการเติมหมู่ Pi ให้กับ ADP ได้เป็น ATP ซึ่งเร่งโดย ATP synthase





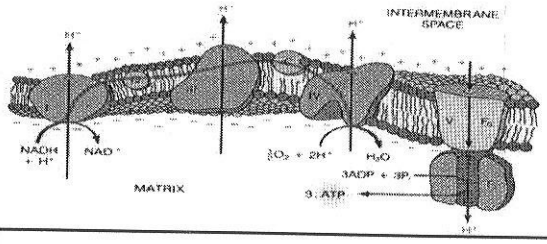
* มี H^+ pump

Cpx I, III, IV จะวางตัวทอดข้าม inner membrane แต่ Cpx II จะอยู่ด้าน matrix เท่านั้น จึงไม่มีการ transfer H^+ ไป ที่ intermembrane space

- การ transfer e- จาก Cpx I -- III --- IV จะเกิด H+ Pump 3 sites
- การ transfer e- จาก Cpx II-- III --- IV จะเกิด H+ Pump 2 sites

การ transfer e- จาก Cpx I -- III --- IV จะเกิด H+ Pump 3 sites ได้ 3 ATP ใช้ O_2 10 โมเลกุล

การ transfer e- จาก Cpx II-- III --- IV จะเกิด H+ Pump 2 sites ได้ 2 ATP ใช้ O_2 10 โมเลกุล



Mitochondria Stage

มี 4 Stage โดยวัดจาก O_2 uptake

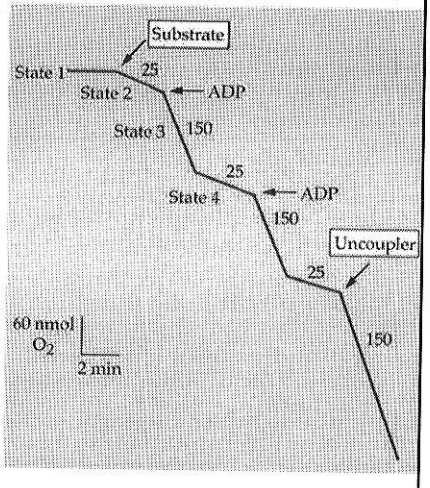
Stage 1 สภาวะที่มีเพียว O_2 กับ Mitochondria

Stage 2 สภาวะที่มี substrate ที่เกิด reducing equivalent (NADH, NADPH)

Stage 3 สภาวะที่มีกาเติม ADP เพื่อไปรับ E ที่เกิดจาก H+ pump ทำให้ respiration เดินหน้าและ e- tranfer ได้เรื่อยๆ

Stage 4 ADP เปลี่ยนไปเป็น ATP ในที่สุด ADP หมด

- Stage 3 และ 4 ทำให้อัตราการหายใจอยู่ภายใต้การควบคุมของ ADP



Effect of ADP on Mitochondria respiration

- Repiratory control rate = $\frac{\text{Rate of } O_2 \text{ uptake in Stage 3}}{\text{Rate of } O_2 \text{ uptake in Stage 4}}$

Mitochondra ที่อยู่ในสภาพที่เกิด oxidative phosphorylation ที่ดี จะต้องมีค่า Respiratory control rate สูง เนื่องจาก Stage 3 และ 4 มี ADP เป็นตัวกำหนด

Inhibitors

Inhibitor ที่ยับยั้ง e- transfer

•แต่จะไม่ได้ยับยั้งการเกิด proton gradient

•การที่มี Inhibitor ไป block ตามจุดต่างๆ เหล่านี้จะมีผลต่อ Complex ต่างๆ อย่างไร ?

Cpx I : Rotenone, amytol ทำให้ e- ไม่ transfer ไป UQ

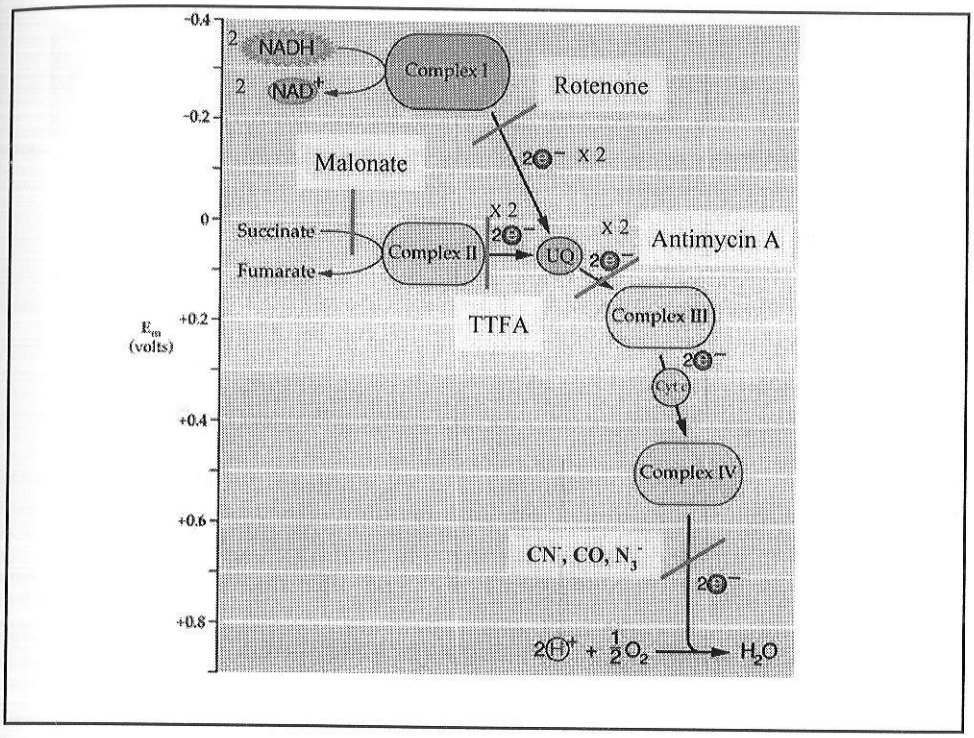
Cpx II : Malonate

Cpx III : Antimycin A

Cpx IV : CO, Aside, Cyanide

จุดที่ inhibitor ไป block เรียก crossing point

crossing point มีความสำคัญต่อการศึกษาขั้นตอนใน e- transport pathway



Another inhibitor

Uncoupling agent

- ทำให้ไม่เกิด proton gradient จึงไม่เกิดการสังเคราะห์ ATP
- ADP ไม่มีผลต่อ O_2 uptake เช่น SHAM

Vealinomycin - K^+ : ทำให้ membrane รั่ว ทำให้ไม่เกิด membrane potential ปกติแล้ว K^+ จะผ่าน membrane ยาก แต่เมื่อต่ออยู่กับ Vealinomycin (ไม่มีขั้ว) ทำให้ K^+ ผ่าน membrane เข้าไปด้วย ทำให้เกิดการแลก H^+ แบบ symport ทำให้ H^+ ไหลกลับสู่ matrix จึงไม่เกิด H^+ gradient

Oligomycin : ยับยั้ง ATP synthase ไม่ให้เกิดการทำปฏิกิริยา ADP + Pi ➡ ATP ถึงจะเกิด H^+ gradient แต่ก็ไม่เกิดการสร้าง ATP

Alternative pathways

•เมื่อเติม CN- เข้าที่ Cyt a (Cpx IV) ปรากฏว่า O_2 ยังคงถูก uptake อยู่ ทั้งที่ CN^- ยับยั้งไม่ให้เกิดการส่ง e- จาก Cyt a ไปที่ O_2

เมื่อเติม Rotenone พบว่า NADH ยังถูก Oxidize ไปเป็น NAD^+

เมื่อเติม Actinomycin UQ ยังถูก reduced ไปเป็น UQH_2

•ดังนั้นจึงน่าจะมี alternative pathway ที่ทำให้ e- เคลื่อนที่ไปได้หลายทาง โดยที่ไม่ต้องผ่าน complex ต่างๆ ตามลำดับขั้น

Alternative pathway of e- transport ในพืชได้แก่

1. NAD(P)H Dehydrogenase ($ND_{external}$)

• อยู่ด้านนอกของ inner membrane สามารถ oxidized NADH หรือ NADPH ที่มาจาก cytoplasm ได้

• การ Oxidize NADH จาก glycolysis อยู่ภายใต้การควบคุมของ $[Ca^{2+}]$ K_m for Ca^{2+} = 0.3 uM

• การ Oxidize NADPH จาก Penthose Phosphate pathway อยู่ภายใต้การควบคุมของ $[Ca^{2+}]$ K_m for Ca^{2+} > 0.3 uM

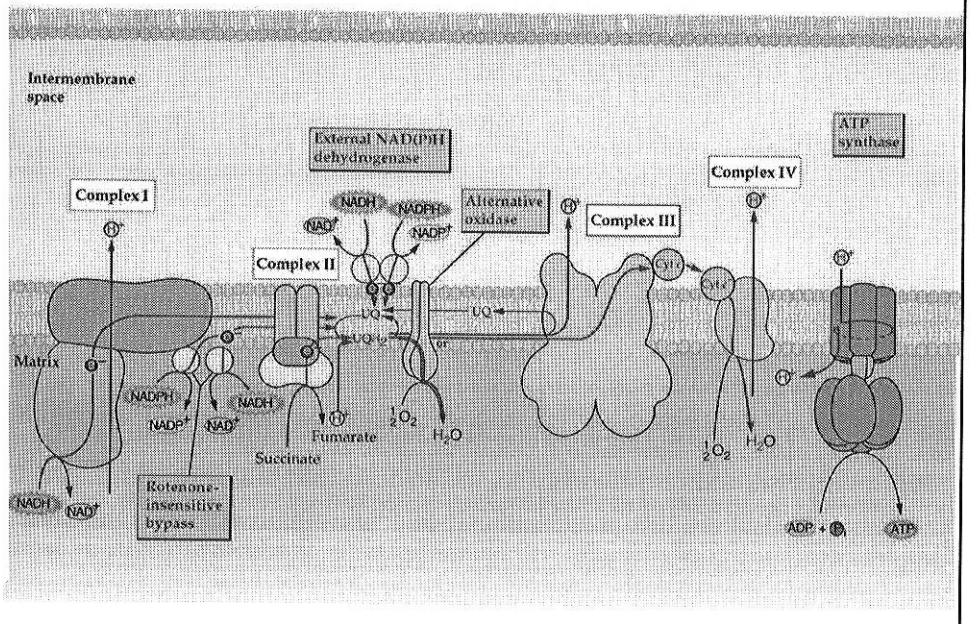
แต่ในเซลล์พืชมี $[Ca^{2+}]$ เพียง 0.1-0.2 uM ดังนั้นเอนไซม์ NAD(P)H Dehydrogenase จึงทำงานน้อยมาก แต่ในสภาวะที่เกิด stress $[Ca^{2+}]$ จะสูงมากจึงทำให้เอนไซม์นี้ทำงานได้

2. NAD(P)H Dehydrogenase (ND_{in}) อยู่เฉพาะด้าน matrix สามารถ catalyse oxidation ของ NADH และ NADPH และถ่ายทอด e- จากไปให้ UQ) โดยไม่ถูกยับยั้งด้วย Rotenone เรียก pathway นี้ว่า Rotenone-resistant pathway

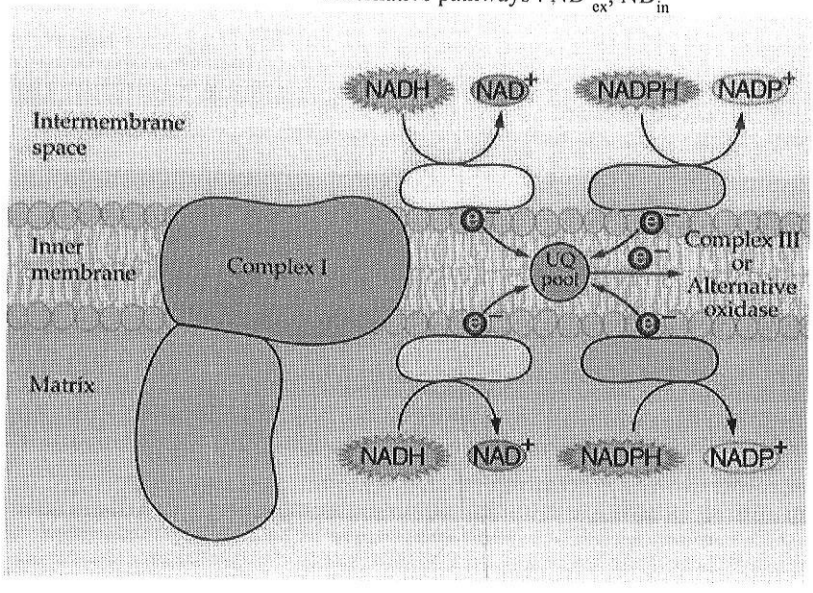
- ND_{in} (NADH) K_m > CpxI นั่งคือเอนไซม์นี้จะทำงานได้เมื่อ [NADH] สูงมาก ซึ่งในภาวะที่ [NADH] สูงมาก แสดงว่า ปริมาณ NAD+ มีน้อยลง (เพราะถูกเอาไปสังเคราะห์ NADH มาก โดยเฉพาะที่ Kreb cycle) พืชจึง regenerate เอา NAD+ กลับไปใช้โดย ND_{in} นี้
- ND_{in} (NADPH) K_m ~ 25 uM เอนไซม์นี้จึงน่าจะทำงานได้ดีเมื่อ NADPH ต่ำๆ ได้ เพราะค่า K_m ต่ำ

3. Alternate Oxidase (AOX) เป็น alternate pathway ของการ reduce O_2 โดย pathway จะทำงานเมื่อ [UQH_2]เพิ่มมาก pathway นี้จะไม่ถูกยับยั้งโดย CN^-, CO, N_3^- เรียก e- transport pathway นี้ว่า cyanide-resistant respiration แต่ pathway นี้ถูกยับยั้งโดย SHAM (Salicylhydroxamic acid)

หน้าที่: คือช่วยลด e- over flow ซึ่งจะทำให้เกิด Reactive Oxygen sp เพราะที่ AOX e- จะไม่ได้ transfer มาที่ O_2 ทีละตัว แต่จะมา 2 e- พร้อมกัน



Alternative pathways : ND_{ex}, ND_{in}



สรุป

- เมื่อ [NADH] สูงมาก จะช่วยลดโดย ND_{in}
- เมื่อ [UQH_2] เพิ่มมาก จะลดโดย AOX
- ส่วน ND_{ext} จะทำงานเมื่อเกิด stress

- เมื่อ e- ผ่าน จาก Cpx I มาที่ UQ และ alternative oxidase ตามลำดับจะมีการสังเคราะห์ ATP ไม่เท่ากับวิถีปกติ
- ถ้า e- ผ่านจาก Cpx II มาที่ UQ และมาที่ AOX จะไม่มีการสร้าง ATP เลย
- ^G ที่เกิดจากการผ่าน e- ไป O_2 โดย AOX เมื่อไม่ถูกใช้ไปในการ pump H^+ ^G นี้จะเสียไปเป็นความร้อน

Alternative Oxidase (AOX)

- ถ่ายทอด e- จาก UQH_2 ไปให้ O_2
- Non oxidationtive phosphorylation
- CN- resistance but inhibit by SHAM

หน้าที่ของ AOX

ทำให้เกิด Thermogenic respiration

Energy Overflow, Balance C metabolism, prevent form of harmful active oxygen species

ตอบ : เมื่อ Activity ของเอนไซม์ใน TCA cycle ที่ให้ product เป็น reducing equivalent = NADPH, NADH ซึ่งจะเข้าสู่ e- transport นั้นเมื่อถึงจุดที่มีอยู่มากเกินไป ทำให้จุดต่างๆใน e- transport อยู่ในภาวะ reduced state และการสังเคราะห์ ATP ก็เกิดไม่ทัน สุดท้าย TCA cycle จะหยุดได้ พืชจึงหลีกเลี่ยงไม่ให้เกิดเหตุการณ์นี้ขึ้น เพราะ TCA cycle ไม่ได้เป็น แค่ Key ใน ATP synthesis เท่านั้น แต่ intermediate ใน TCA เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สารอื่นเป็นลูกโซ่

⇒ พืชจึงมีวิธีเลี่ยงโดยแบ่ง e- ที่จะส่งไปให้ UQ (UQH2 เป็นจุดจำกัดอัตราเร็วของ e- transport) โดยส่ง e- ให้ AOX ทำให้ TCA ดำเนินต่อไปได้

การทำงานของ AOX จะมีหลายปัจจัยมากระตุ้น ดังนี้

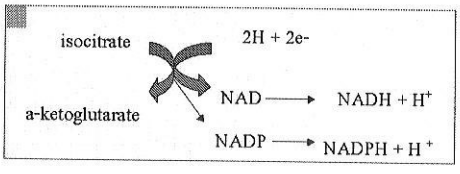
1) การกระตุ้นโดย UQH_2 : AOX จะเริ่มทำงานเมื่อ [UQH_2] สูงถึงระดับหนึ่ง

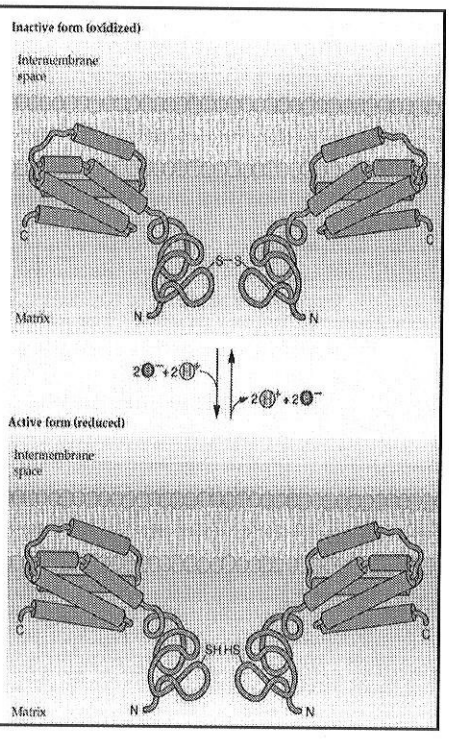
2) เมื่อมี NADH + H^+ และ NADPH + H^+ อยู่มากเกินไป ทำให้ ETC อยู่ภาวะ reduced state ก็จะกระตุ้นให้ AOX ทำงานในการลด Reduce state ของ ETC

เอนไซม์ใน **Kreb cycle คือ Isocitrate dehydrogenase** ในการเปลี่ยน isocitrate ไปเป็น alpha-ketoglutarate และ **malate dehydrogenase** ซึ่งเปลี่ยน malate ไปเป็น oxaloacetate ซึ่งทั้ง 2 ปฏิกิริยาจะมีการสังเคราะห์ NADPH + H^+ ออกมาด้วย

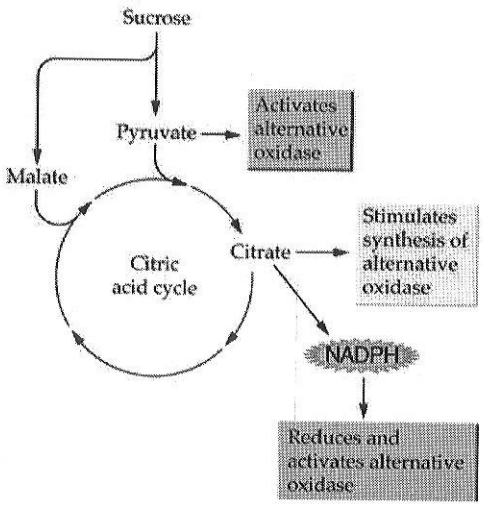
NADPH + H^+ ทำหน้าที่เป็น reducing agent ทำให้

$$AOX_{oxd}\ (\text{less active}) + NADPH + H^+ \Longrightarrow AOX_{red}\ (\text{active})$$

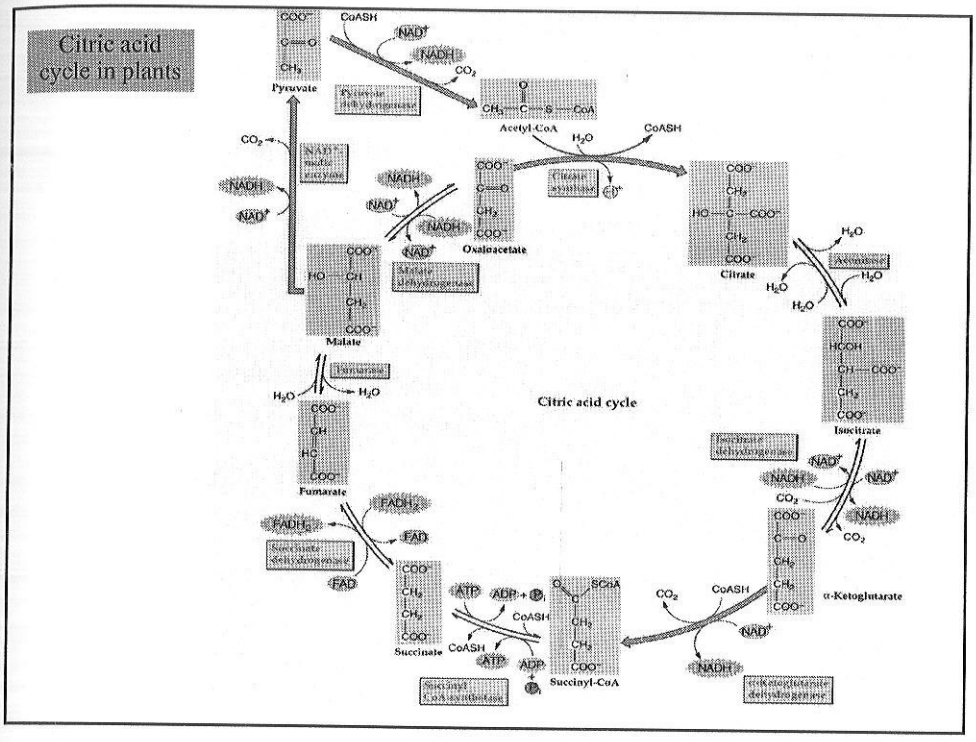


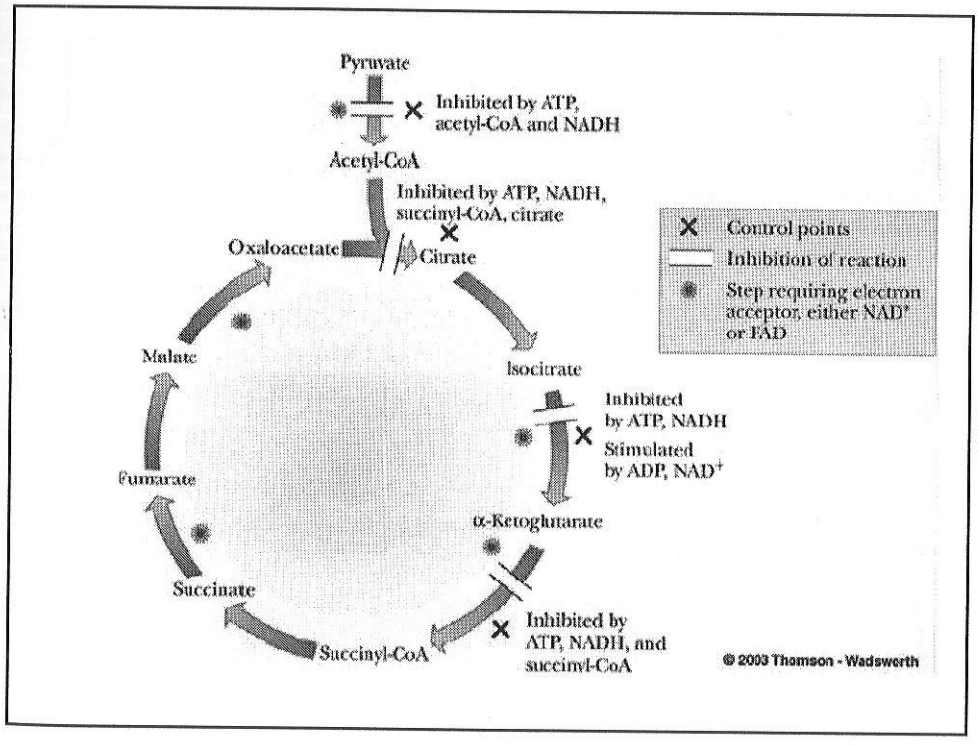


3) สาร intermediates ใน TCA cycle เช่น pyruvate, citrate ที่สะสม เนื่องจาก rx ดำเนินไปข้างหน้าได้ช้าลง ก็จะเป็นตัวกระตุ้น AOX ให้ทำงานอีกด้วย



- นอกจากนี้ NADPH + H^+ ที่เพิ่มขึ้นมาก จะทำให้เอนไซม์ที่เปลี่ยน Isocitrate ไปเป็น a-ketoglutarate ไม่ทำงาน ทำให้เกิดการสะสมของ Isocitrate และเกิด rx ย้อนกลับเปลี่ยน isocitrate ไปเป็น citrate ทำให้ [Citrate] สูงขึ้น citrate จะไปยับยั้งการทำงานของ pyruvate dehydrogenase จึงไม่สามารถเปลี่ยน pyruvate มาเป็น acetyl CoA ได้ พืชจึงต้องลด citrate ลงโดยย้าย citrate ออกจาก mitochondria โดยนำไปใช้ในการสังเคราะห์สารอื่น เช่น amino aicd, acetyl CoA, Fatty acid


Citric acid cycle in plants
Pyruvate
CoASH
NAD+
NADH
CO2
Acetyl-CoA
H2O
Oxaloacetate
Citrate
Isocitrate
α-Ketoglutarate
Succinyl-CoA
Succinate
Fumarate
Malate
FADH2
FAD
ATP
ADP + Pi
Citric acid cycle

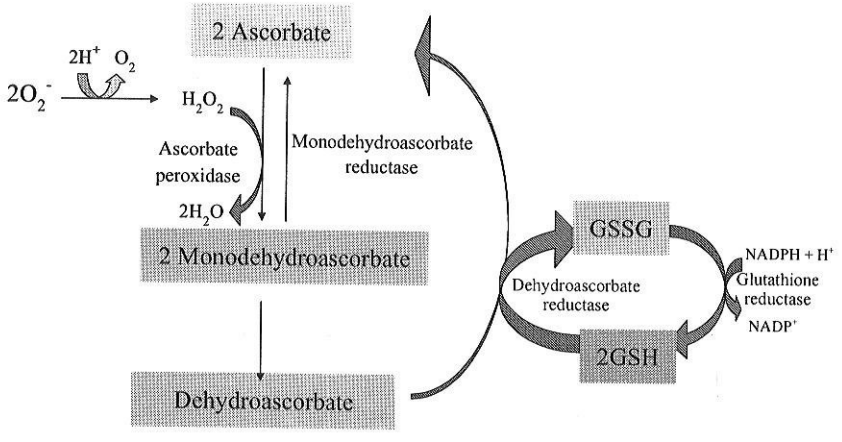

Pyruvate
Inhibited by ATP, acetyl-CoA and NADH
Acetyl-CoA
Inhibited by ATP, NADH, succinyl-CoA, citrate
Oxaloacetate
Citrate
Isocitrate
Inhibited by ATP, NADH
Stimulated by ADP, NAD+
α-Ketoglutarate
Inhibited by ATP, NADH, and succinyl-CoA
Succinyl-CoA
Succinate
Fumarate
Malate
Control points
Inhibition of reaction
Step requiring electron acceptor, either NAD+ or FAD
© 2003 Thomson - Wadsworth

หากมี Reactive oxygen species มาก พืชจะมีวิธีจัดการ โดย Detoxification systems ดังนี้

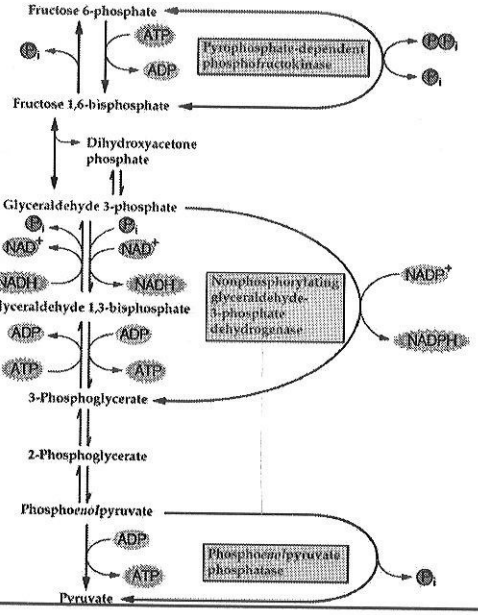
1. SOD (Superoxide dimutase)

$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ แล้วกำจัด H_2O_2 catalase

2. Ascorbate-glutathione cycle
   - Ascorbate peroxidase
   - Dehydroascorbate reductase
   - Monodehydroascorbate reductase
   - Glutathione reductase
3. Glutathione peroxidase
4. Thioredoxin/ Thioredoxin reductase system



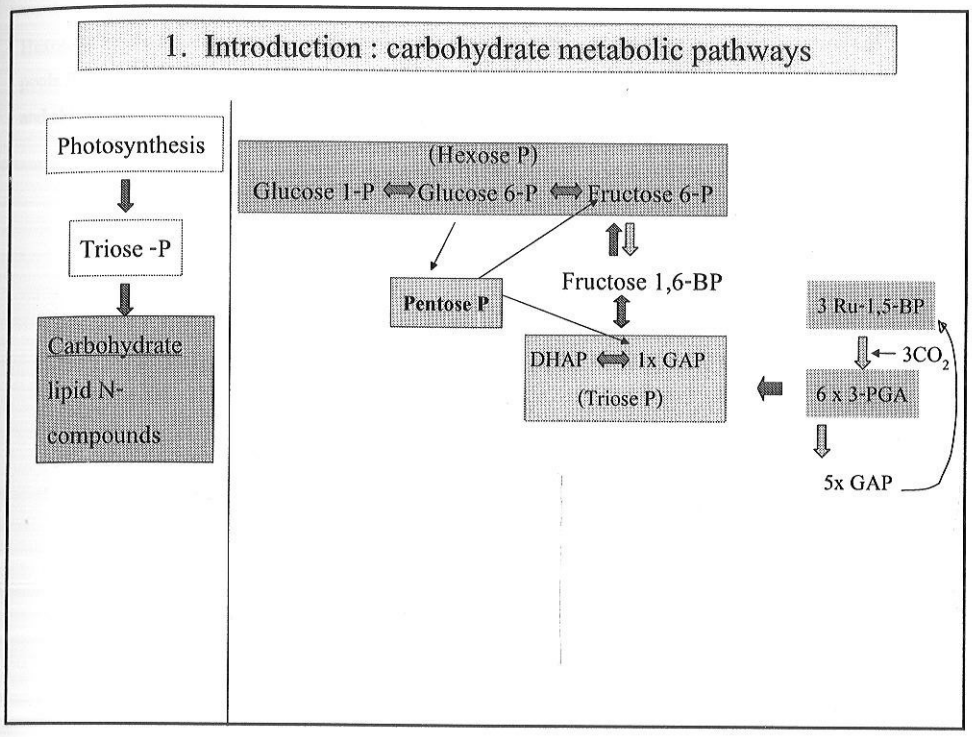
By pass reactions give plants metabolic flexibility see pp 669

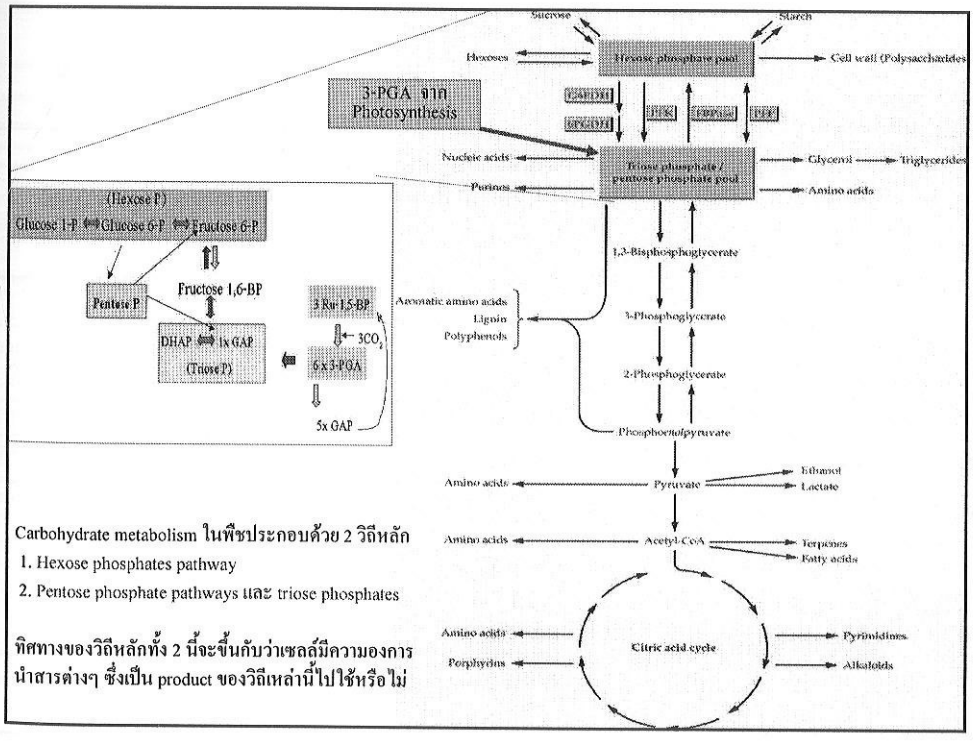


IV. Plant Carbohydrate Metabolisms

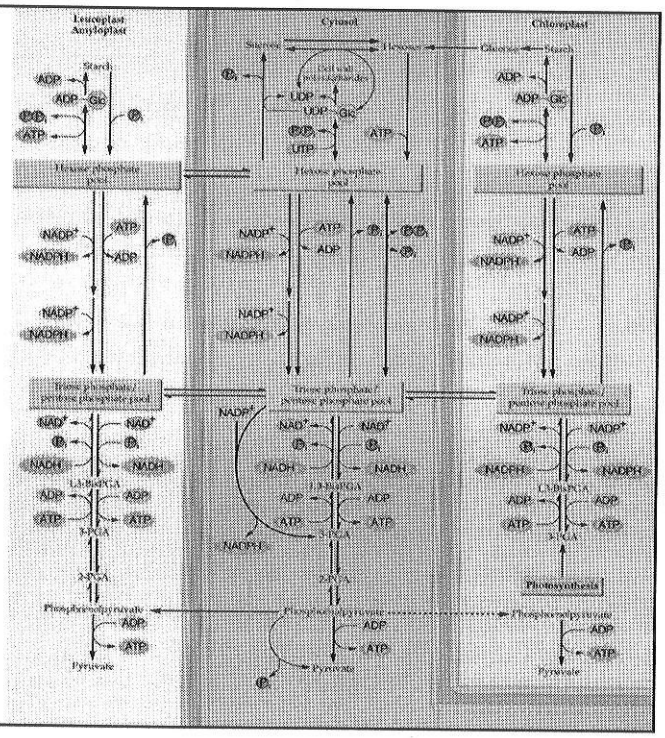
Outline

1. Introduction : carbohydrate metabolic pathways
2. The hexose phosphate pools
3. Biosynthetic pathways that consume hexose P
   - Synthesis of sucrose
   - Synthesis of starch
4. Catabolisms pathways that generate hexose phosphate
   - Degradation of sucrose
   - Degradation of starch
5. The triose P/ pentose P metabolisms


1. Introduction : carbohydrate metabolic pathways
Photosynthesis
Triose -P
Carbohydrate
lipid N-
compounds
(Hexose P)
Glucose 1-P ⟺ Glucose 6-P ⟺ Fructose 6-P
Fructose 1,6-BP
Pentose P
DHAP ⟺ 1x GAP
(Triose P)
3 Ru-1,5-BP
3CO2
6 x 3-PGA
5x GAP


Sucrose
Starch
Hexoses
Hexose phosphate pool
Cell wall (Polysaccharides
3-PGA จาก
Photosynthesis
Nucleic acids
Purines
Triose phosphate /
pentose phosphate pool
Glycerol
Triglycerides
Amino acids
(Hexose P)
Glucose 1-P ⟺ Glucose 6-P ⟺ Fructose 6-P
Pentose P
Fructose 1,6-BP
DHAP ⟺ 1x GAP
(Triose P)
3 Ru-1,5-BP
3CO2
6 x 3-PGA
5x GAP
1,3-Bisphosphoglycerate
Aromatic amino acids
Lignin
Polyphenols
3-Phosphoglycerate
2-Phosphoglycerate
Phosphoenolpyruvate
Amino acids
Pyruvate
Ethanol
Lactate
Amino acids
Acetyl-CoA
Terpenes
Fatty acids
Amino acids
Porphyrins
Citric acid cycle
Pyrimidines
Alkaloids
Carbohydrate metabolism ในพืชประกอบด้วย 2 วิถีหลัก
1. Hexose phosphates pathway
2. Pentose phosphate pathways และ triose phosphates
ทิศทางของวิถีหลักทั้ง 2 นี้จะขึ้นกับว่าเซลล์มีความต้องการ
นำสารต่างๆ ซึ่งเป็น product ของวิถีเหล่านี้ไปใช้หรือไม่

Hexose P, Triose P/ pentose P pools flows in plastids, cytosol, and chloroplasts

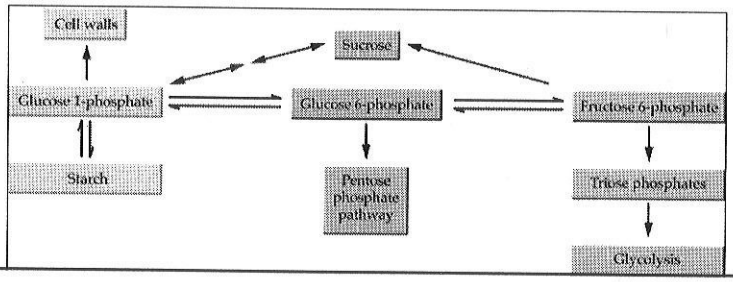


2. The Hexose Phosphate

น้ำตาลที่จัดอยู่ในกลุ่ม Hexose phosphate มี 3 ชนิดคือ : glucose 6-P, glucose 1-P และ fructose 6-P

• Hexose P ได้มาจากหลายทาง ดังนี้
- สังเคราะห์ขึ้นจาก triose phosphate ซึ่งเป็น products ของ photosynthesis
- phosphorylation of free hexoses ซึ่งเป็น product จากการสลาย starch และ sucrose
- gluconeogenesis

• Hexose P สามารถนำไปใช้ใน metabolisms ต่างๆ ดังนี้
- สังเคราะห์ sucrose และ starch
- สราง cell wall
- สังเคราะห์ penthose phosphate โดย pentose P pathway
- สลายเพื่อให้ได้ ATP หรือให้ได้สารที่ใช้ในการสังเคราะห์สารอื่นใน glycolytic pathway และ citric acid cycle

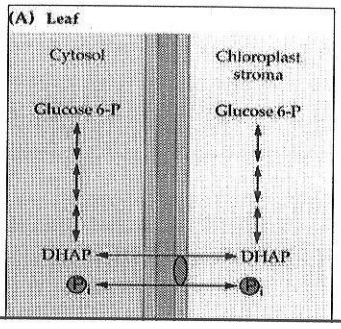


การขนส่ง Hexose P ระหว่าง chloroplasts, colorless plastids และ cytoplasm

Hexose P pools สามารถพบได้ทั้งใน cytoplasm และ plastids

การขนส่ง Hexose P ระหว่าง cytoplasm กับ chloroplast

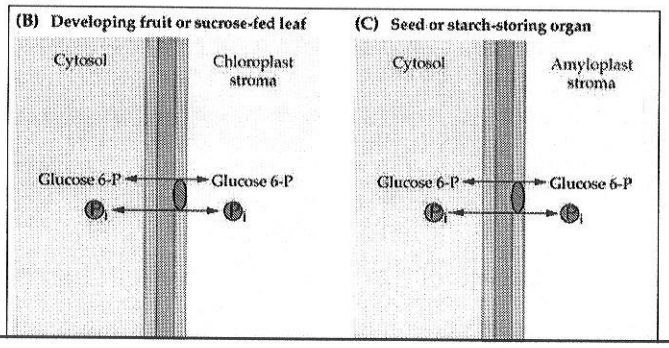
- **โดยทั่วไปแล้ว Leaf chloroplasts ไม่มี hexose phosphate carrier ดังนั้น การแลกเปลี่ยน/ ขนส่ง Hexose P pools ระหว่าง chloroplast และ cytoplasm ทำได้โดย การเปลี่ยน Hexpe P pools ไปเป็น C3 intermediates ซึ่งได้แก่ DHAP (dihydroaxy acetone-P) GAP (glyceraldehyde 3- P) แล้วจึงเปลี่ยนกลับมาเป็น Hexose P pools อีกครั้งหนึ่ง**
- **ที่ inner membrane ของ chloroplast จะมี triose phosphate translocator (TPT), ซึ่งการแลกเปลี่ยนหรือขนส่งสารไปมาระหว่าง chloroplast และ cytoplasm เกิดขึ้นโดยกลไก antiporter ซึ่งเป็นการแลกเปลี่ยน C3 intermediates กับ inorganic phosphate (Pi)**



- **แต่ Chloroplasts ในเนื้อเยื่อบางชนิด เช่น Developing fruit หรือ sucrose-fed leaf (ใบที่สะสม sucorse) สามารถ นำ hexose P เข้าสู่ chloroplast ได้โดยตรง เพื่อนำมาใช้ในการสังเคราะห์สาร**

การขนส่ง Hexose P ระหว่าง cytoplasm กับ amyloplasts

Amyloplasts เป็นแหล่งสะสม starch ที่สามารถขนส่ง glucose 6-P หรือ glucose 1-P, จาก cytoplasm เข้ามาใน plastids นี้ ได้โดยตรง



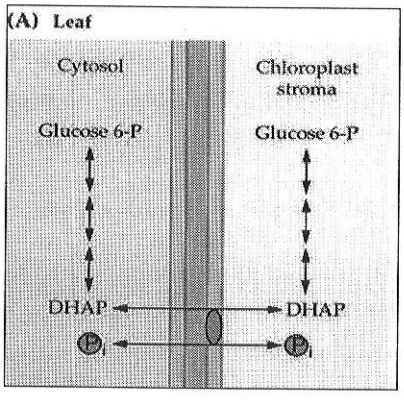
3. Biosynthetic pathways that consume hexose phosphates

3.1 Synthesis of sucrose

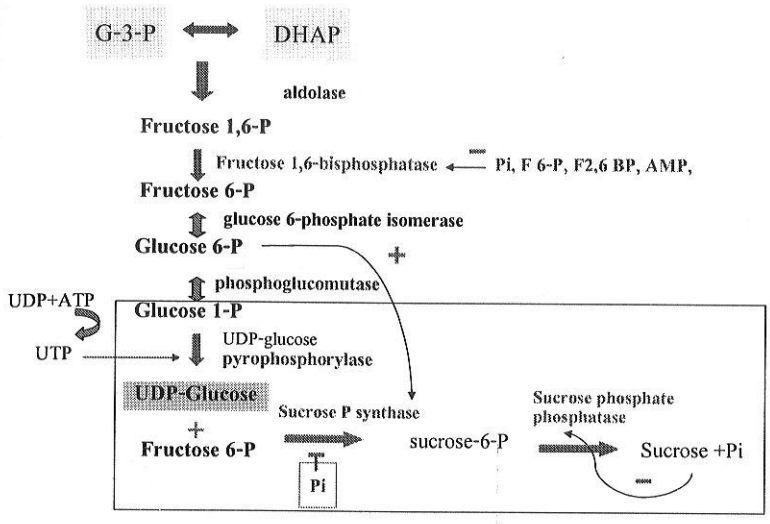
3.2 Synthesis of starch

3.1 Sucrose is synthesized in cytosol from UDP-glucose & fructose 6-phosphate

- **Sucrose เป็น product หลัก ที่ได้จาก photosynthesis**
- **หน้าที่ ของ Sucrose :**
  - **the principal long-distance transport compound in most plants**
  - **a storage compound in some plants : sugar beat, sugar cane, carrot.**
- **เหตุที่มีการขนส่งน้ำตาลในรูป Sucrose ไปตามส่วนต่างๆ ของพืชเนื่องจากการเชื่อม carbonyl carbons (alpha-Carbon) ของ glucose และ fructose ด้วยพันธะ glycosidic ช่วยป้องกันการเกิด oxidation ของ OH ที่ต่ออยู่กับ alpha C (เป็น potentially reactive groups)**
- **การสังเคราะห์ sucrose เกิดขึ้นที cytoplasm : โดย triose P (DHAP) ที่ส่งออกมาจาก chloroplast ทาง triose P transportor (TPT) ถูกนำมาใช้สังเคราะห์เป็น Hexose P ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ sucrose**
- **ในพวก oil-rich tissues ซึ่งไม่มี vascular connectors ต่อกับ photosynthetic tissues จะนำ lipid มาเปลี่ยนเป็น triose P เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ sucrose**



การขนส่ง Triose P (DHAP) จาก Chloroplast ออกสู่ cytoplasm เพื่อสังเคราะห์ Glucose 6- P



Overall picture of sucrose synthetic pathway

- การสังเคราะห์ sucrose เกิดจาก 3 reactions หลักที่สำคัญ :

UDP-glucose pyrophosphorylase.

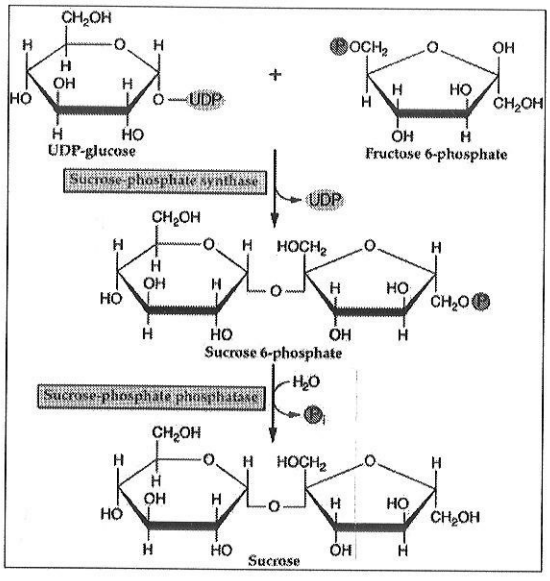
Glucose 1-P + UTP ⟷ UDP-glucose + PPi

Sucrose 6-P synthase

UDP-glucose + fructose 6-P ⟷ Sucrose 6-P + UDP

Sucrose phosphate phosphatase

Sucrose 6-P + H_2O ⟷ Sucrose + Pi



การควบคุมการสังเคราะห์ Sucrose

1. ควบคุมที่การทำงานของsucrose phosphate synthase (SPS) โดยใช้วิธี covalent modification & allosteric modulation การควบคุมการทำงานของเอนไซม์นี้ จะสัมพันธ์กับปริมาณ hexose P

- เมื่อ glucose-6-phosphate มีมาก และ Pi มีน้อย ใน cytoplasm (เนื่องจาก Pi ถูกแลกกับ Triose P จาก chloroplast เพื่อนำมาสังเคราะห์ glucose-6-phosphate)

glucose-6-phosphate จะกระตุ้นเอนไซม์ SPS ในขณะเดียวกัน glucose 6-P จะไปยับยั้งการทำงานของ SPS kinase (ซึ่งทำหน้าที่ในการเติม P ให้ SPS ทำให้ SPS อยู่ในสภาพ less active) ทำให้ SPS อยู่ในสภาพ active form ทำให้เกิดการสังเคราะห์ sucrose

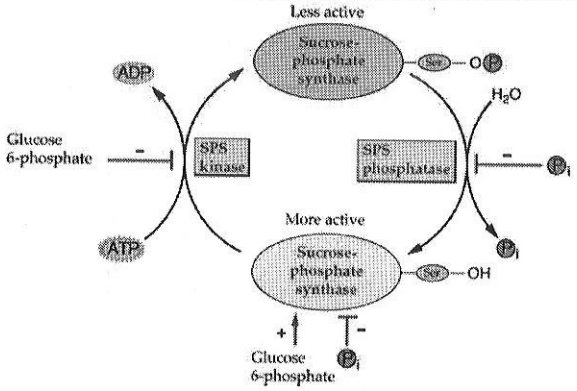
จากข้อมูลในปัจจุบัน พบว่าการทำงานของ SPS kinase ถูกกระตุ้นโดย 14-3-3 proteins ด้วย

- เมื่อ ความเข้มข้นของ Phosphate (Pi) ใน cytoplasm เพิ่มสูงขึ้นมาก (แสดงว่า glucose-6-phosphate ใน cytoplasm มีน้อย)

Pi จะยับยั้งการทำงานของ SPS และ SPS phosphatase (ทำหน้าที่ในการตัด P ออกจาก SPS ทำให้ SPS อยู่ในสภาพ active form) ทำให้ SPS ไม่สามารถเปลี่ยนมาอยู่ในรูป active form ได้ จึงไม่สามารถสังเคราะห์ sucrose ได้

2. ควบคุมที่การทำงานของ Sucrose phosphate phosphatase : เมื่อมีการสังเคราะห์ sucrose ได้มากพอแล้ว sucrose จะไปยังยับเอนไซม์ นี้ โดยวิธี allosteric modulation

Regulation of Sucrose phosphate synthase (SPS)



- จากรูป SPS จะถูกควบคุมโดย allosteric effectors และ phosphorylation/dephosphorylation ของกรดอะมิโน Serine residue ใน enzyme
- SPS ในสภาพ active form จะไม่มี P ต่ออยู่ และจะถูกกระตุ้นต่อด้วย glucose 6-P (เป็น allosteric effector) แต่ SPS จะถูกยับยั้งการทำงานโดย Pi
- glucose 6-P ยับยั้ง SPS kinase และ Pi ยับยั้ง SPS phosphatase.

3.2 การสังเคราะห์แป้งใน Chloroplast และ Amyloplast

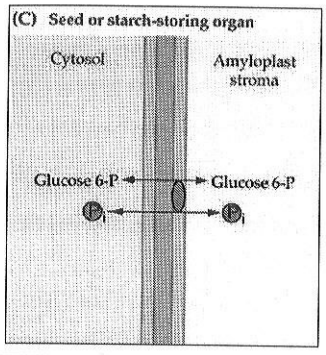
- **แป้งจะถูกสังเคราะห์และสะสมชั่วคราวใน Chloroplast แต่หากพืชจะสะสมแป้งไว้เป็นระยะเวลานานๆ เช่นใน รากสะสมหรือเมล็ด กระบวนการสังเคราะห์และสะสม จะอยู่ใน amyloplast**
- **ในการสังเคราะห์แป้ง พืชจะใช้ ADP-glucose เป็นสารตั้งต้น**

การสังเคราะห์แป้งใน Chloroplasts

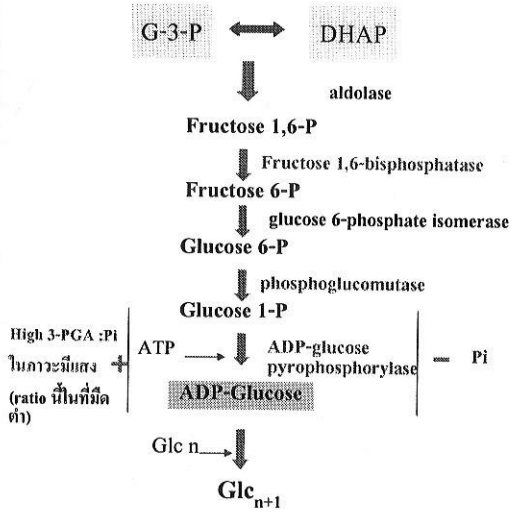
- **การสังเคราะห์แป้งจะเกิดขึ้นเมื่อ อัตราการขนส่ง sucrose ออกจากเซลล์ลดลง (เซลล์ปลายทางอาจอิ่มตัวด้วย sucrose) ซึ่งจะทำให้เกิดการสะสมของ Triose P ที่ได้จาก Calvin cycle**
- **พืชจะเปลี่ยน Triose P ไปเป็น hexose P (Glucose 1-P) จากนั้น Glucose 1-P จะถูกเปลี่ยนมาเป็น ADP-glucose เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์เป็นแป้งสะสมไว้ใน chloroplast**

การสังเคราะห์แป้งใน amyloplasts

จะมีการขนส่ง Glucose 6-P จาก cytoplasm เข้าสู่ amyloplasts เพื่อนำไปใช้ในการสังเคราะห์แป้งได้โดยตรง



การขนส่ง Glucose 6-P จาก cyotoplasm เข้าสู่ amyloplast



Overall picture of starch synthetic pathway

การควบคุมการสังเคราะห์แป้งใน chloroplasts

จุดควบคุมการสังเคราะห์แป้ง อยู่ที่การควบคุมทำงานของ ADP-glucose pyrophosphorylase

ADP-glucose pyrophosphorylase

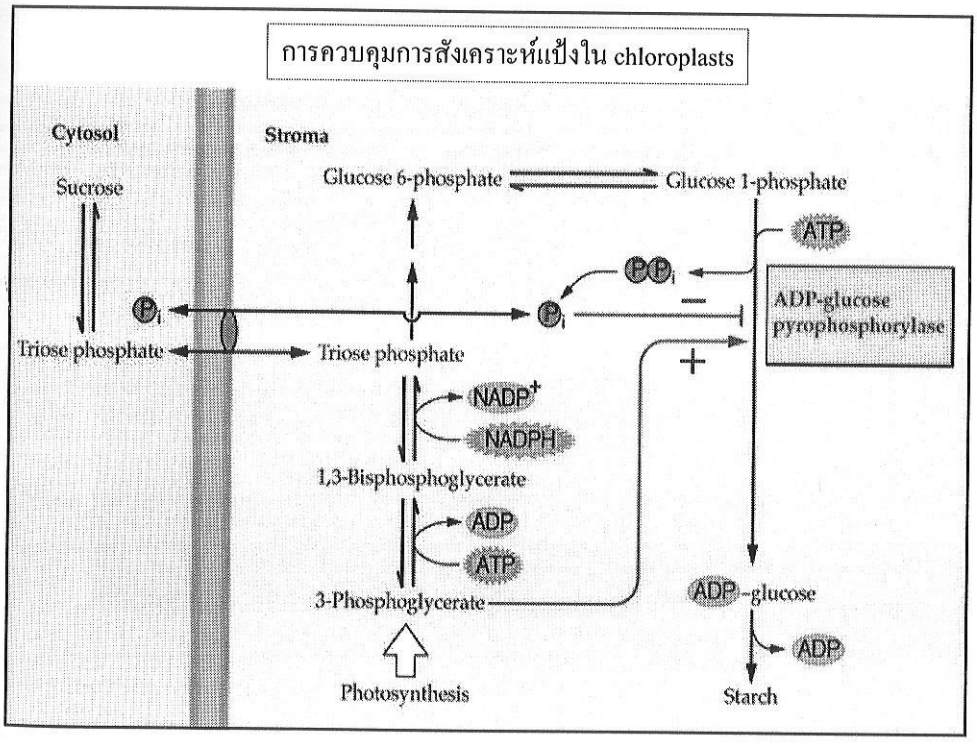
Glucose 1-P + ATP ⟺ ADP-glucose + PPi

ADP-glucose-pyrophosphorylase (AGP)

- เป็น heterodimer ประกอบด้วย 2 large & 2 small subunits
- มีหลาย isozymes (tissue specific, แต่บทบาทในแต่ละ tissue ยังไม่ทราบ)

ADP-glucose-pyrophosphorylase ถูกกระตุ้นการทำงานโดย 3-PGA และถูกยับยั้งโดย Pi

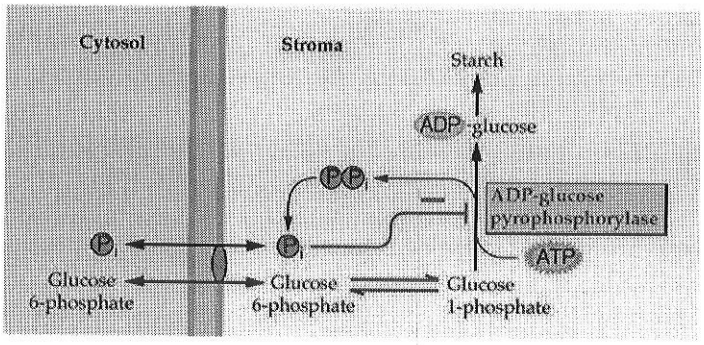
- 3-PGA/ Pi ratio เป็นปัจจัยหลักในการควบคุมการสังเคราะห์แป้ง กลไกควบคุมนี้เชื่อมการทำงานร่วมกันระหว่างการทำงานของ ADP-glucose pyrophosphorylase กับ ปริมาณ Product (3-PGA) ที่ได้จาก photosynthesis โดยเอนไซม์จะทำงานเมื่อ 3-PGA มีมาก ในทางตรงข้าม เมื่อ photophosphorylation (ใน light rx) เกิดช้า ทำให้ [Pi] ใน chloroplast สูง (แสดงว่า triose P สังเคราะห์ลดลง) Pi จะยับยั้งการสังเคราะห์แป้ง
- ในขณะที่มีการสังเคราะห์ sucrose หรือในช่วงที่ไม่มีการสังเคราะห์แสงในตอนกลางคืนจะมีการส่ง Triose P ออกสู่ cytoplasm และแลกเปลี่ยนเอา Pi เข้ามาใน chloroplast ทำให้ *3-PGA/Pi* ratio ใน chloroplast ลดลง ซึ่งจะไปยับยั้งการสังเคราะห์แป้งเช่นกัน



การควบคุมการสังเคราะห์แป้งใน Amyloplasts

- การควบคุมการทำงานของ ADP-glc pyrophosphorylase ใน amyloplast โดยจะควบคุมโดยปริมาณ Pi แต่ระดับการควบคุมจะเกิดขึ้นน้อยกว่าใน chloroplast

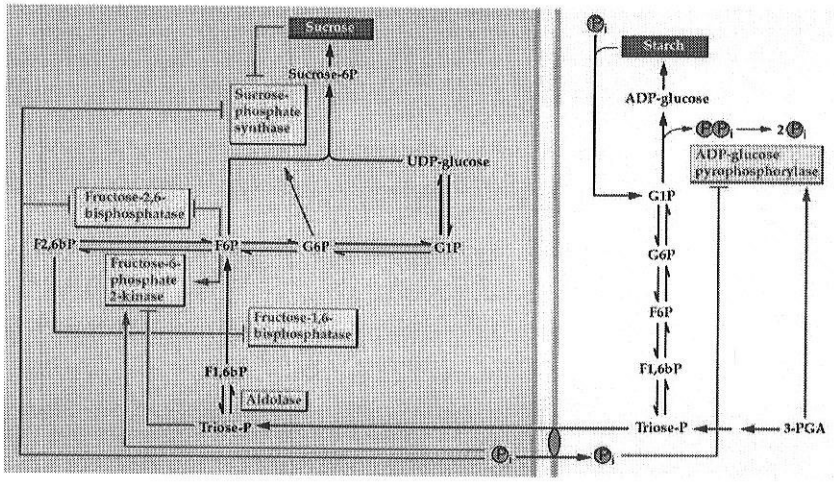
เนื่องจาก Glucose 6-P จากการสังเคราะห์แป้งใน amyloplast เกิดจากการขนส่งโดยวิธี Glucose 6-P/Pi antiporter ดังนั้น ในขณะที่มี Pi สูงใน amyloplast แสดงว่า ปริมาณ Glucose 6-P ใน amyloplast มีน้อย (เนื่องจากส่งออกสู่ cytoplasm มาก) ทำให้การสังเคราะห์แป้งถูกยับยั้ง



การควบคุมการสังเคราะห์แป้งใน Amyloplasts

Home work 2 (2.5 pt)

Regulation of the interconversion of starch and sucrose



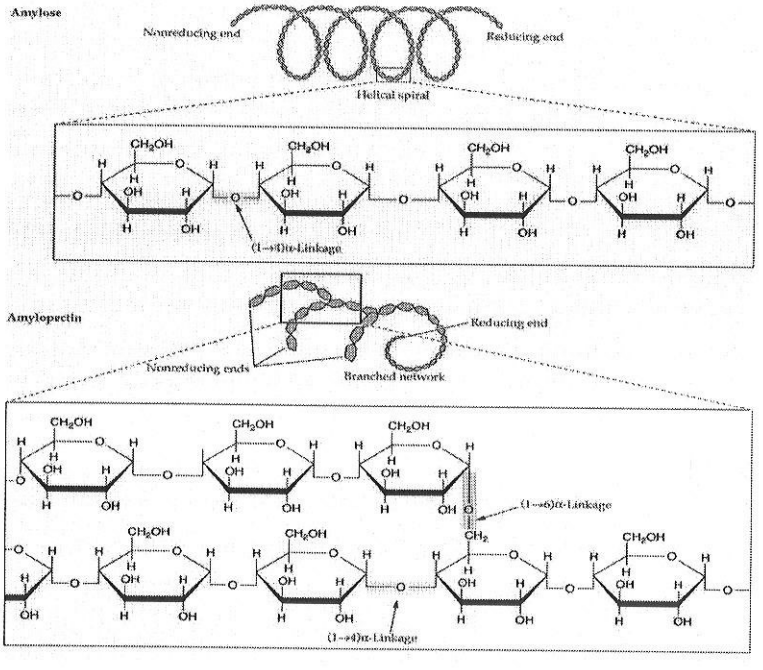
การสังเคราะห์ Amylose & Amylopectin

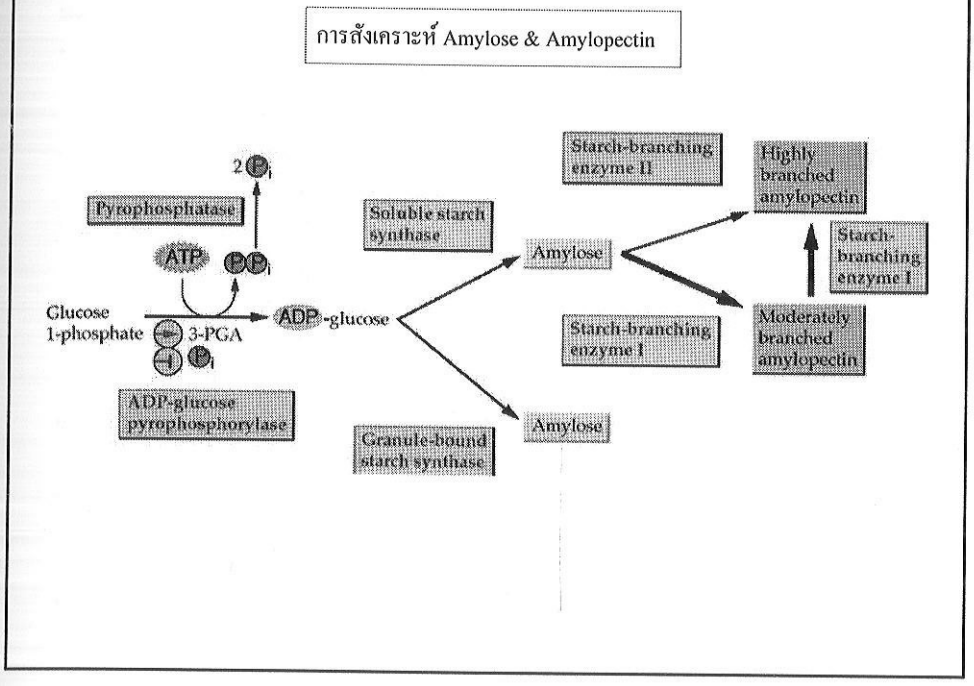
- สัดส่วนของ amylose : amylopectin รวมทั้งขนาด และโครงสร้างของเม็ดแป้ง ทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน ซึ่งมีความสำคัญต่อการนำแป้งไปใช้ในอาหารและอุตสาหกรรม
- ขนาดของเม็ดแป้งจะแตกต่างกันในพืชและเนื้อเยื่อแต่ละชนิด
- เอนไซม์ 3 ชนิดที่ ทำหน้าที่ในการนำ hexose P มาสังเคราะห์แป้ง :

1. **Glucose 1-P + ATP** $\xrightleftharpoons{\text{ADP-glucose pyrophosphorylase}}$ **ADP-glucose + PPi**

2. **ADP-glc + a-glucan$_{(n)}$** $\xrightleftharpoons{\text{Starch synthase}}$ **a-glucan $_{(n+1)}$ +ADP**

3. **Linear (1-4) a-glucan** $\xrightleftharpoons{\text{Starch-branching enzyme}}$ **Branched (1-6), (1-4) a-glucan**





Starch synthase

- ทำหน้าที่นำ glucose จาก ADP-gluose ไปเติมให้ nonreducing end ของ preexisting amylose หรือ amylopectin chain ทีละโมเลกุล โดยต่อด้วยพันธะ (1-4) alpha-glycosidic
- Starch synthase มีหลาย isoenzymes
  - insoluble stroma of plastids
  - bound within growing starch granules

การเกิด mutation ของ starch synthse แต่ละ isozyme (single isozymes mutants) ทำให้โครงสร้างแป้งเปลี่ยนแปลงไป การทดลองนี้แสดงว่า starch synthse แต่ละ isozymes มีหน้าที่แตกต่างกัน

ตย. waxy mutants ซึ่งพบในพืชหลายชนิด mutants นี้ทำให้พืชไม่มี granule-bound starch synthase พืชพวกนี้จะสังเคราะห์แป้งที่ไม่มี amylose เป็นส่วนประกอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า

- การสังเคราะห์ amylose เกิดจากการทำงานของ bound starch synthase isozyme

- สำหรับการสังเคราะห์ amylopectin เกิดจากการทำงานของ เอนไซม์ 2 ชนิด :
  1. soluble form starch synthase ทำหน้าที่สังเคราะห์ (1-4) alpha-glucan
  2. branching enz สังเคราะห์ amylopectin จาก (1-4) alpha-glucan ที่ได้จาก 1.

starch-branching enzyme

- ทำหน้าที่สร้างแขนง polysaccharides ให้กับแป้ง โดยเอนไซม์นี้จะตัด พันธะ (1-4) alpha-linkages ของ amylose สายหลัก แล้วนำ polysaccharide ที่ตัดออกมาไปเชื่อมต่อกับ C-6 ของ glucose บน amylose สายหลัก ที่ถัดออกไปอีก 20 ตัว ด้วยพันธะ (1-6) alpha-linkage
- มี 2 isozymes : branching enz I และ II ซึ่งจากการทดลองในหลอดทดลองพบว่า isozymes ทั้ง 2 มีความจำเพาะต่อ substrate ต่างกัน

  Isozyme I : a higher affinity for unbrance starch (amylose)

  Isozyme II : preferentially brances amylopectin, produce a more branced form of amylopectin.

  พืชต้องใช้ทั้ง 2 isozyme ในการสร้าง เม็ดแป้งที่สมบูรณ์ และมีคุณสมบัติ และรูปร่างต่างๆ กัน

สรุป การสังเคราะห์แป้ง ต้องใช้เอนไซม์ 3 ชนิด : ADP-glucose pyrophosphorylase, starch synthase, และ starch-branching enzyme

- Isozymes ชนิดต่างๆ ของเอนไซม์เหล่านี้สามารถทำงานร่วมกัน จนทำให้ได้ชนิดแป้งที่มีคุณสมบัติหลากหลาย ซึ่งแป้งบางชนิดมีประโยชน์ต่ออุตสาหกรรม : paper, fiber, boards, paint, packaging, bioplastics, foods
- การปรับเปลี่ยนการทำงานของ isozymes แต่ละชนิด (manipulation of isozymes) โดยวิธี genetic engineering production สามารถผลิตแป้งที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม

4. Catabolic pathways that generate hexose phosphates : sucrose and starch degradation.

4.1 Sucrose Degradation in cytoplasm

Sucrose สามารถย่อยสลายได้เป็น free hexoses หรือ UDP-glucose + fructose

- เมื่อ Sucrose ถูกลำเลียงมาตาม pholem เพื่อส่งไปยังเซลล์ที่ต้องการใช้ sucrose เมื่อมาถึงเซลล์เป้าหมาย sucrose จะเข้าสู่ cell ได้ 2 ทาง

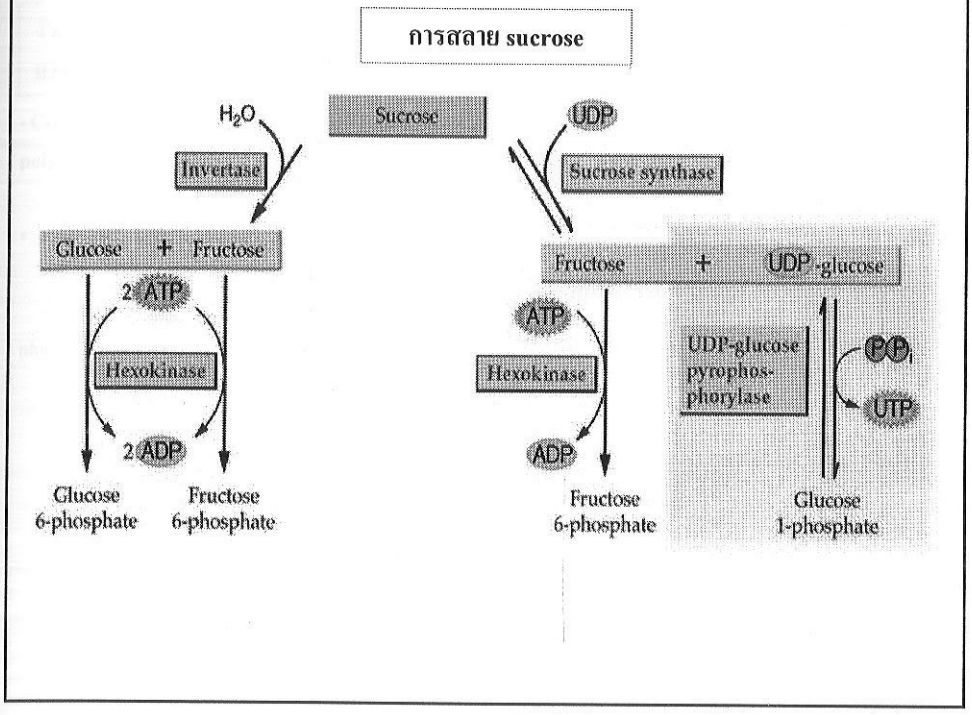
  1. Plasmodesmata เข้าสู่ cytoplasm ย่อยสลายหรือเก็บสะสมใน vacuole

หรือ 2. Enter cell membrane (against a conc gradient) ผ่านเส้นทาง apoplastic pathway พบใน embryo ที่กำลังพัฒนา.

- การย่อยสลาย sucrose ใน cyotplasm เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด

$$\text{Sucrose} + \text{UDP} \xrightleftharpoons{\text{sucrose synthase}} \text{UDP-Glucose} + \text{fructose}$$

$$\text{Sucrose} + H_2O \xrightleftharpoons{\text{invertase}} \text{Glucose} + \text{fructose}$$

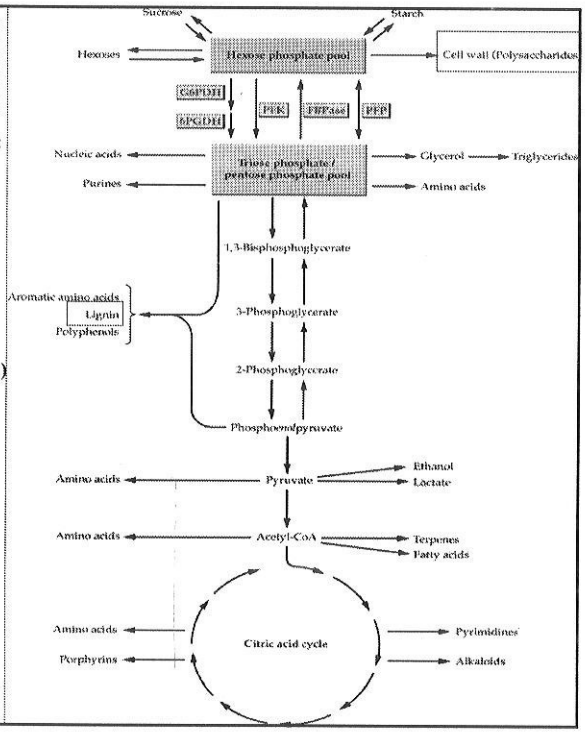


- ปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่แน่ชัดของ invertase และ sucrose synthase ว่าการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 นี้ จะเกิดขึ้นในสภาวะใด เนื่องจากสามารถพบเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดนี้ ได้ในเวลาเดียวกัน
- เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดยังมีหลาย isozyme ซึ่งแสดงออกของยีนที่สังเคราะห์ isozymes เหล่านี้จะถูกควบคุมให้เกิดขึ้นในภาวะที่เซลล์ต้องการใช้
- ความแตกต่างที่สำคัญ ของ invertase และ sucrose synthase
  - invertase rx -- ผลิต free hexoses ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็น hexose-P ได้ต่อเมื่อเซลล์มี ATP.
  - แต่ sucrose synthase - ผลิต UDP-glucose ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ pyrophosphate (PPi) ได้ glucose 1-P และ UTP การเกิด hexose phosphorylation โดยเส้นทางนี้ จึงจัดเป็น ATP-independent pathway เนื่องจากไม่ต้องใช้ ATP

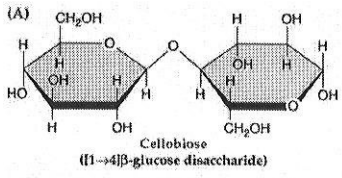
Product ที่ได้จากการสลาย Sucrose สามารถนำไปใช้ สังเคราะห์ cell wall

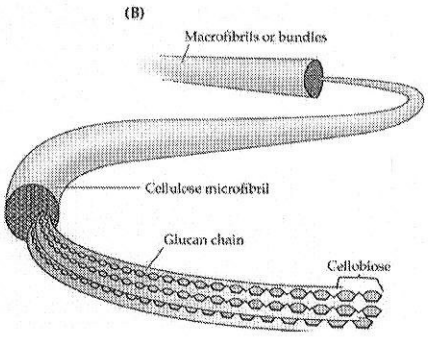
- Cell walls มีองค์ประกอบหลัก 2 ประเภท : polysaccharides และ lignins

- สารตั้งต้นในการสังเคราะห์
  - polysachharides คือ hexose-P pool,
  - lignins คือ erythrose 4-P (จาก Pentose phosphate pathway) และ PEP (จาก glycolysis)



- **Polysaccharides ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ cell walls คือ cellulose และ noncellulose polysaccharides**
- **Cellulose เป็น (1-4) B-linked polyglucan ที่มี glucose ต่อกัน 2,000 - 20,000 หน่วย fibril 1 มัด ประกอบด้วย cellulose ~ 36 สาย ซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะ intra-และ inter chain hydrogen bonds ที่เกิดขึ้นระหว่าง OH groups ของ glucose**





- Cellulose ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการทำงานของ cellulose synthase complex
- substrate ที่ใช้ใน cellulose synthesis คือ UDP-glc ซึ่งสังเคราะห์จาก hexose phosphates (glucose 1-P) โดย UDP-glc pyrophospholylase และจากการสลาย sucrose โดย sucrose synthase

UDP-glucose pyrophosphorylase

Glucose 1-P + UTP ⟺ UDP-glucose + PPi

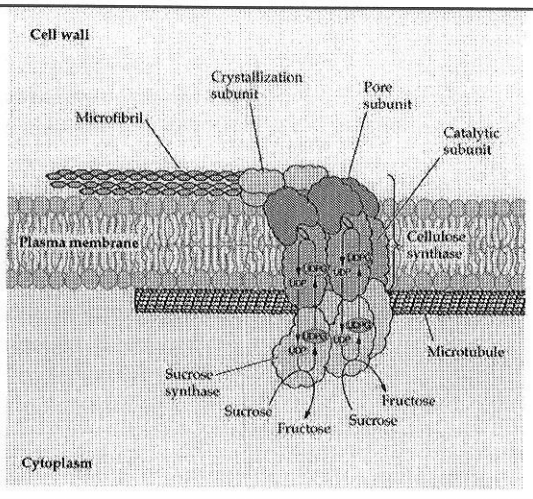
Sucrose synthase

Sucrose + UDP ⟺ UDP-Glucose + fructose

Model ในการสร้าง cellulose โดย Cellulose synthase complex มี 2 สมมติฐาน

1. Cellulose synthase ที่วางตัวอยู่บริเวณ plasma membrane จะนำ UDP-glucose จาก cytoplasm (product ที่ได้จาก 2 rx ข้างบน) ไปใช้สังเคราะห์ cellulose

* 2. sucrose synthase ชนิด plasma membrane-bound isoenzymes จะเกาะอยู่กับcellulose synthase เกิดเป็น complex ตรง plasma membrane ในกรณีนี้ UPD-glucose ที่ได้จากการสลายsucrose โดยเอนไซม์ sucrose synthse จะถูกส่งต่อให้ cellulose synthase ไปใช้สังเคราะห์ cell wall ได้โดยตรง



Noncellulose polysaccharides

- ประกอบด้วย hexoses, pentoses และ uronic acids
- สารตั้งต้นคือ UDP-glc จาก cytoplasm ซึ่งจะถูกส่งเข้าไปใน golgi apparatus เพื่อสังเคราะห์ polysaccharides ⇨ บรรจุ polysaccharides ใน vesicles ⇨ ออกสู่ external surface ของ plasma membrane เพื่อไปใช้สังเคราะห์ cell wall

4.2 Starch Degradation in plastids

- กลไกควบคุม starch degradation ยังไม่ทราบแน่ชัด

Phosphorolytic Starch degradation

มีอย่างน้อย 3 เอนไซม์ที่ร่วมกันสลายแป้ง starch phosphorylase, debraching enzyme, และ glucosyltransferase

starch phosphorylase

$a\text{-glucan}_{(n)} + Pi \Longleftrightarrow a\text{-glucan}_{(n-1)} + \text{glucose 1-P}$

Debranching enz

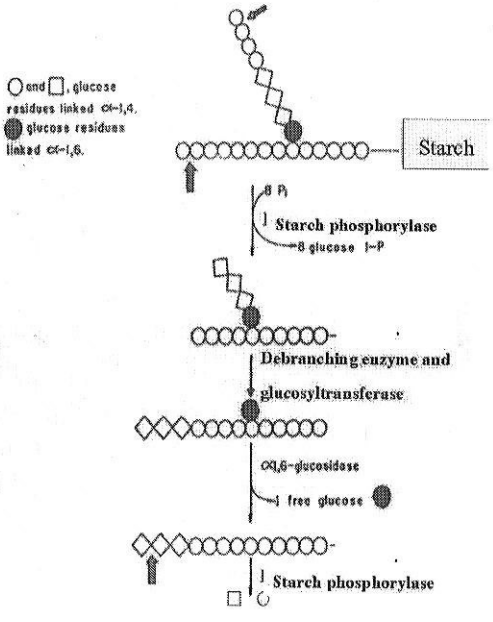
Branched (1-6),(1-4) a-glucan $\Longleftrightarrow$ linear (1-4)a-glucans

glucosyltransferase

$a\text{-glucan}_{(m)} + a\text{-glucans}_{(n)} \Longleftrightarrow a\text{-glucan}_{(m+n-1)} + \text{glucose}$

Starch phospholyrase ตัด glc จากด้านปลาย non reducing end ของโมเลกุลแป้งออกทีละหน่วย และเติม Pi ให้กับ glucose ได้เป็น Glc 1-P เอนไซม์นี้สามารถตัด glucose ต่อไปเรื่อยๆ จนกระทั่งเหลือ glucose 4 หน่วย ห่างจากจุดแขนง (branch point) จึงจะหยุดตัด

จากนั้น debraching enzyme จะตัด (1-6) a-glycosidic bonds ตรงจุดแขนง ซึ่งจะได้ กิ่ง alpha-glucans สายสั้นๆ หลุดออกมา จากนั้น glucosyltransferase จะนำ glucans นี้ ไปเชื่อมกับ glucans สายหลัก เกิดเป็น glucans ที่เป็นสายตรง ซึ่งจะทำให้ starch phospholyrase ตัด glucose ได้ต่อไป



- **Starch phosphorylase**

  - มีหลาย isozymes, พบมากใน plastids

  - เนื่องจากเอนไซม์นี้ต้องใช้ Pi เติมให้กับ glucose ที่ถูกตัดออกมา ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์อาจถูกควบคุมโดยปริมาณ inorganic phosphate (Pi) ซึ่งในสภาวะที่เกิดการสลายแป้ง แสดงว่าในขณะนั้น เซลล์ต้องการนำ Hexose P / triose P ไปใช้ใน metabolisms ซึ่งการส่ง Triose P / Hexose P ออกสู่ cytplasm จะมีการแลกเปลี่ยนเอา Pi เข้าสู่ plastids ทำให้ [Pi] ใน plastids สูงขึ้นซึ่งจะทำให้เอนไซม์ starch phopholyrase ทำงานได้ต่อไปเรื่อยๆ

Hydrolytic starch degradation

- นอกจากการสลายแป้งโดยใช้ **Phosphorolytic degradation ดังที่กล่าวมาแล้ว ยังพบว่าใน ในเมล็ดที่กำลังงอก มีการสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์ amylases ซึ่งเป็น hydrolytic enzyme**

alpha-amylase

$$\text{(1-4)a-D-glucans}_{(n)} \Longleftrightarrow \text{(1-4)a-D-glucans}_{(x)} + \text{(1-4)a-D-glucan}_{(y)}$$

beta-amylase

$$\text{(1-4)a-D-glucans}_{(n)} \Longleftrightarrow \text{(1-4) a-D-glucans}_{(n-2)} + \text{maltose}$$

alpha-glucosidase

$$\text{(1-4)a-D-glucans}_{(n)} \Longleftrightarrow \text{(1-4)a-D-glucans}_{(n-1)} + \text{D-glucose}$$

การกระตุ้นให้เกิดการทำงานของ Hydrolytic enzymes ขณะเมล็ดกำลังงอก

Alpha- amylase และ alpha-glucosidase : ในขณะเมล็ดกำลังงอก จะมี gibberellins หรั่งออกจาก embryo ไปที่เซลล์ที่อยู่บริเวณ Aleurone layer (อยู่รอบๆ endosperm) เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ gene และสังเคราะห์เอนไซม์ทั้ง 2 ชนิดขึ้นมา

Beta-amylase : ปกติจะอยู่ในเมล็ดตั้งแต่เมล็ดยังไม่งอก โดยเก็บอยู่ในรูป precursor beta-amylase (in active form) เมื่อเมล็ดงอก ก็จะมีการสร้าง proteolytic enzyme ไปย่อย peptides ทางด้าน C-terminus ของเอนไซม์ออกไปบางส่วน ทำให้เอนไซม์เปลี่ยนมาอยู่ในรูป active form

↓

เอนไซม์ต่างๆ เหล่านี้จะถูกส่งไปย่อยแป้งใน endosperm ได้ glucose

↓

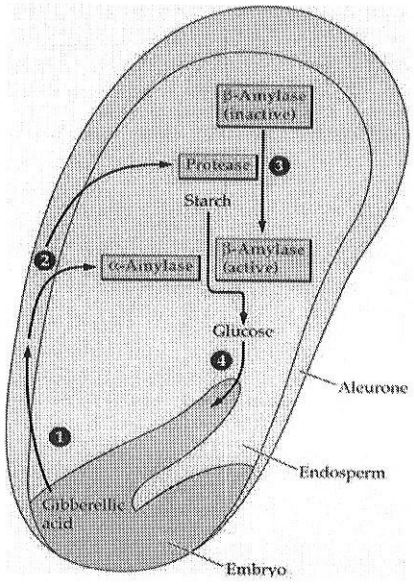
hexokinase จะเติม Pi ให้กับ glucose

↓

นำ glucose-P ไปสังเคราะห์ sucrose ที่บริเวณ sutellum

↓

ขนส่ง sucrose ไปยัง embryo เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต

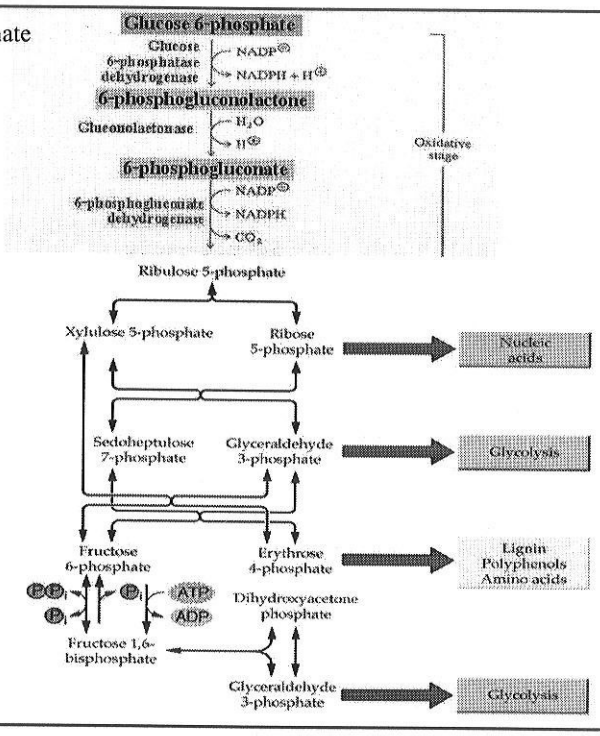


การทำงานของเอนไซม์ต่างๆขณะที่เมล็ดกำลังงอก

Triose-P/ Pentose-P pools

พืชใช้ triose P / pentose P pools ในการสังเคราะห์สาร intermediates หลายชนิดเพื่อใช้เป็น carbon skeleton ในการสังเคราะห์สารต่างๆ

Pentose Phosphate pathway



V. Plant Lipids metabolisms

Outline

1. โครงสร้างและหน้าที่ของ Lipids
2. การสังเคราะห์ fatty acid และ unusual fatty acids
3. การสังเคราะห์และสลาย triacylglycerol
4. การสังเคราะห์และหน้าที่ของ membrane lipids
5. Genentic engineering of lipids

Introduction

- metabolism ของ fatty acid และ lipids ในพืชมีลักษณะทั่วไปคล้ายกับที่เกิดในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น อย่างไรก็ตาม lipid pathways ของพืชมีความซับซ้อนมากกว่า เนื่องจากเกิดขึ้นใน organelles หลายส่วน มีการแลกเปลี่ยน lipids กันระหว่างส่วนต่างๆ ภายในเซลล์ (Fig 1)
- ในพืชมี fatty acid > 200 ชนิด -- ซึ่งต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดร่วมกันสังเคราะห์ขึ้นมา

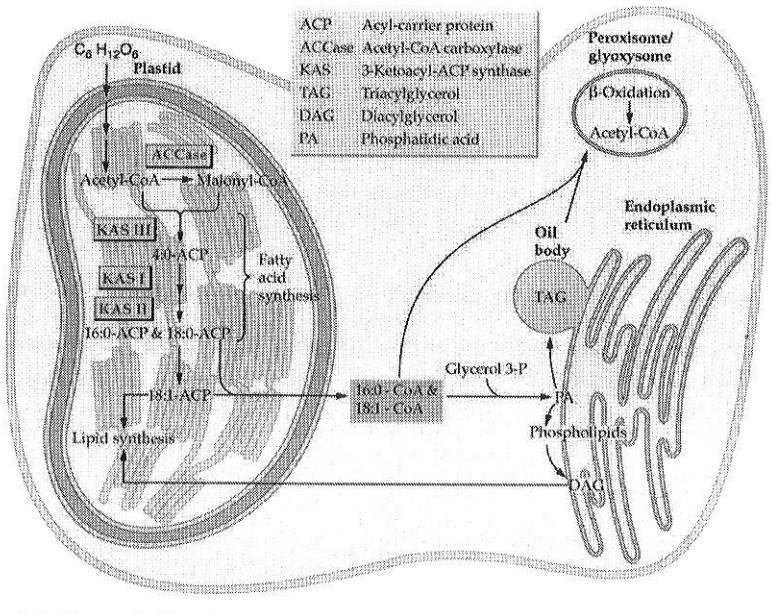


Fig. 1 Lipids synthesis and metabolism take place in various organelles and in some cases involve movement of lipids from one cellular compartment to another

1. โครงสร้างและหน้าที่ของ Lipids

หน้าที่ของ Lipids ในพืช (Table 10.1)

1) ส่วนประกอบหลักของ biological membranes - phospholipids

2) ส่วนประกอบหลักของthylakoid membrane - galactolipids

3) แหล่งพลังงานสำรอง - triacylglycerols

4) เป็นสารตั้งต้นสำหรับสังเคราะห์สารประกอบอื่นๆ ในพืช เช่น fatty acid, steroid

5) ปกป้องพืชจากสิ่งแวดล้อม -waxes, cutin, suberin

6) ส่วนประกอบใน signal transduction pathways : Jasmonate, phosphatidylinositol and its derivatives

7) ควบคุม cellular processes ต่างๆ โดยกลไกการเกิด acylation ให้กับ proteins.

ประเภทของ lipids ที่สำคัญ

Lipids แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ใหญ่ :

- Glycerol lipids : triacylglycerols, phospholipids, galactolipids, sulfolipid. shingolipids
- Non-glycerol lipids : Steroid etc.

- ส่วนประกอบหลักของ Glycerol lipids คือ fatty acids, glycerol และ/หรือ หมู่ function อื่นๆ
- Fatty acid (FA) ที่เป็นองค์ประกอบหลักในพืช คือ polyunsaturated fatty acids ได้แก่ linoleic acid ($18:2^{\Delta 9,12}$) และ linolenic acid ($18:2^{\Delta 9,12,15}$) โดยทั่วไปจะพบ FA ที่มีจำนวน C 16 และ 18 อะตอม

Glycerol lipids ที่สำคัญ

- Triacylglycerols :

  - พบในเมล็ด และ pollen ทำหน้าที่เป็นสารสะสมพลังงานและ carbon skeleton สำหรับสังเคราะห์สารประกอบอื่นๆ

  - ไม่ละลายใน aqueous phase ของ cells จึงไม่มีผลต่อค่า osmotic potential ของ cell

- Phospholipids :

  - มีทั้งส่วน polar และ non polar เป็นส่วนประกอบของ membrane

  - มี 7 classes (Table 10.3 major classes of membrane lipids)

- Galactolipids : พบที่ plastid membranes lipids นี้จะมี galactosyl หรือ sulfoquinovosyl group แทนที่ phosphoryl head gr ของ phospholipids

  - glycolipid ในพืชมี 2 กลุ่ม : 18:3 (สังเคราะห์ใน ER) , 16:3 (สังเคราะห์ใน plastids)

- Sphingolipids : พบที่ plasma membrane ประกอบด้วย ceramide และ glycosylceramides

2. Fatty acid biosynthesis

2.1 การสังเคราะห์ Fatty acids (fig 2)

- สังเคราะห์ใน chloroplast
- ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ FA มีหลายขั้นตอน โดยจะเกิดขึ้นซ้ำๆ เพื่อนำเอา acetyl moieties ของ acetyl-CoA มาต่อกันจนได้สาย hydrocarbon ที่มี C 16 หรือ 18
- Enzymes ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ FA คือ acetyl-CoA carboxylase (ACCase) และ fatty acid synthase (FAS)

ขั้นตอนการสังเคราะห์

- ขั้นที่1 ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ malonyl-CoA โดยใช้ acetyl- CoA เป็นสารตั้งต้น ปฏิกิริยานี้เร่งโดย acetyl-CoA carboxylase (ACCase)

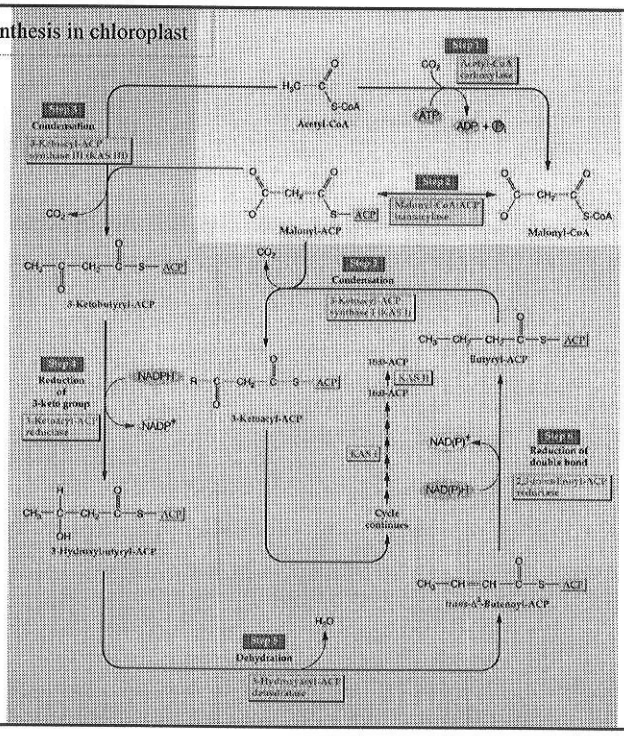
  ในขั้นแรก biotin ซึ่งเป็น prosthetic gr ที่เกาะอยู่กับ ACCase จะทำปฏิกิริยากับ CO_2 เกิดเป็น carboxybiotin ปฏิกิริยานี้ใช้พลังงานในรูป ATP จากนั้น carboxybiotin ทำปฏิกิริยากับ Acetyl CoA ได้ malonyl-CoA เป็นผลิตผล

- ขั้นที่ 2 Malonyl-CoA : ACP transacylase จะนำ malonyl-CoA ไปเชื่อมต่อกับ Acyl-carrier protein (ACP) เกิดเป็น Malonyl-ACP
- ขั้นที่ 3 เป็นปฏิกิริยาการรวมตัวกันระหว่าง Acetyl CoA (C2) และ malonyl-ACP (C2) เกิดเป็น acetoacetyl-ACP หรือ 3-ketobutyryl-ACP (C4) และมีการปล่อย CO_2 ออกมา 1 โมเลกุล
- ขั้นที่ 4-6 เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่อง 3 ขั้นตอน คือ reduction, dehydration และ reduction จนกระทั่งได้ saturated acyl-ACP ซึ่งทีจำนวน C 4 อะตอม (Butyryl-ACP) เป็นผลิตผล

ปฏิกิริยาที่ 3-6 จะเกิดขึ้นวนซ้ำหลายรอบ ทำให้จำนวน C ของ acyl-ACP เพิ่มขึ้นทีละ 2 ตัวต่อรอบ โดยมี malonyl CoA เป็นตัวให้ Carbon ให้กับ saturated acyl-ACP ปฏิกิริยาจะดำเนินไปจนกระทั่งได้ acyl-ACP ซึ่งมี C 16 (16:0-ACP) หรือ 18 ตัว (18:0 -ACP) สุดท้าย ACP จะถูกตัดออกไปได้เป็น Fatty acid ชนิด 16: 0 หรือ 18:0

ปฏิกิริยาขั้นที่ 3-6 เร่งโดย Fatty synthetic synthase (FAS) FAS เป็น enzyme complex ประกอบด้วยเอนไซม์หลายชนิดอยู่ด้วยกัน และมี Acyl-carrier protein (ACP) ทำหน้าที่เป็น protein cofactor

Fig 2. Fatty acid synthesis in chloroplast



- ACCase reaction ใน chloroplast เป็นจุดควบคุมอัตราเร็วในการสังเคราะห์ Fatty acid ในปัจจุบันพบว่า ACCase ถูกควบคุมโดยกลไก thioredoxin (ดูกลไกใน Photosynthesis) และ phosphorylation
- ปฏิกิริยาต่างๆ ในการสังเคราะห์ FA ต้องใช้ NAD(P)H เข้าร่วมปฏิกิริยา โดยได้จาก Photosynthesis ในช่วงที่มีแสง และจาก Pentose phosphate pathway ในช่วงไม่มีแสง

- การเพิ่มความยาวของ fatty acid ให้ยาวเกินกว่า 16 หรือ 18 carbon เกิดขึ้นจากการทำงานของ elongase ใน cytoplasm

- การเติมพันธะคู่ให้กับกรดไขมัน (fatty acid desaturation) จะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ใน chloroplasts และ ER (Table 10.4) แต่ยังไม่ทราบกลไกควบคุม (Fig 3)

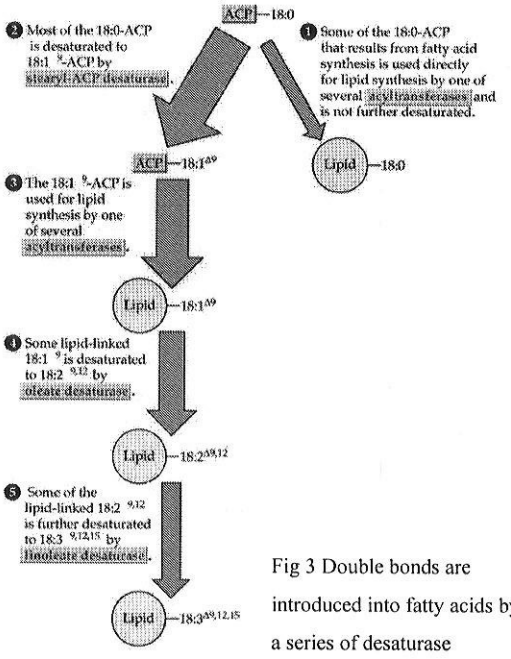


Fig 3 Double bonds are introduced into fatty acids by a series of desaturase

2.2 Acetyl CoA เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ fatty acid ได้มาจากหลายแหล่งทั้งภายในและภายนอก chloroplast (Fig 4)

Acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้นที่ใช้เป็น carbon skeleton ที่ใช้สังเคราะห์ fatty acids ทุกชนิด รวมทั้งสารประกอบอื่นๆ เพื่อใช้ใน metabolism ต่างๆ ภายในเซลล์ ดังนั้น Acetyl CoA จึงถูกสังเคราะห์ขึ้นมา และนำไปสังเคราะห์ ในปฏิกิริยามากมายที่เกิดขึ้นในเซลล์

แหล่งที่มาของ acetyl CoA ที่นำมาใช้สังเคราะห์ fatty acid มาจากหลายทางและหลายปฏิกิริยา ดังนี้

1) ภายใน chloroplasts จะมี pyruvate dehydrogenase ทำหน้าที่เปลี่ยน pyruvate (มาจาก –3-PGA จากการสังเคราะห์แสง) ให้กลายเป็น acetyl-CoA ได้โดยตรง

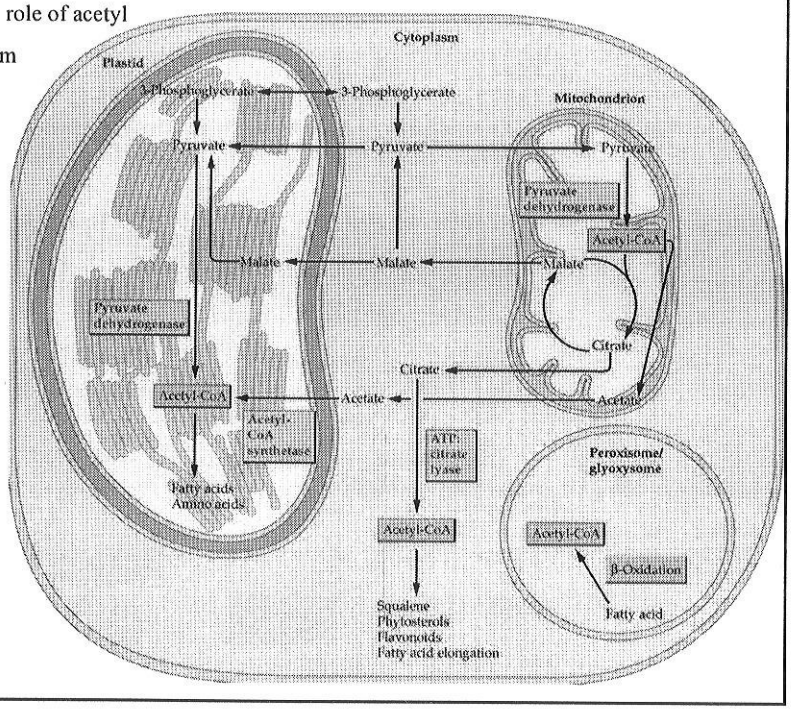
จากการทดลองพบว่า อัตราการทำงานของ pyruvate dehydrogenase ใน chloroplast ของ oilseed (เมล็ดสะสมน้ำมัน) มีอัตราใกล้เคียงกันกับ อัตราการสังเคราะห์ fatty acid synthesis ภายในเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า pyruvate เป็นสารตั้งต้นหลักที่สำคัญในการสังเคราะห์ fatty acids ใน chloroplast ของ oilseed

2) มีการศึกษาใน chloroplasts ชนิดที่มี pyruvate dehydrogenase activity ต่ำๆ พบว่าการเติม acetate ให้กับ chlrorplast ทำให้ chloroplast สามารถสังเคราะห์ fatty acid ภายในเซลล์เกิดได้ตามปกติ แต่การเติม pyruvate กลับพบว่า chloroplast ไม่สามารถรักษาอัตราการสังเคราะห์ fatty acid ไว้ได้

แสดงให้เห็นว่า chloroplast สามารถนำเอา acetate จากภายนอกมาใช้สังเคราะห์ fatty acid ได้ แต่ต้องอาศัยเอนไซม์หลายชนิดเข้าร่วมในปฏิกิริยา เช่น

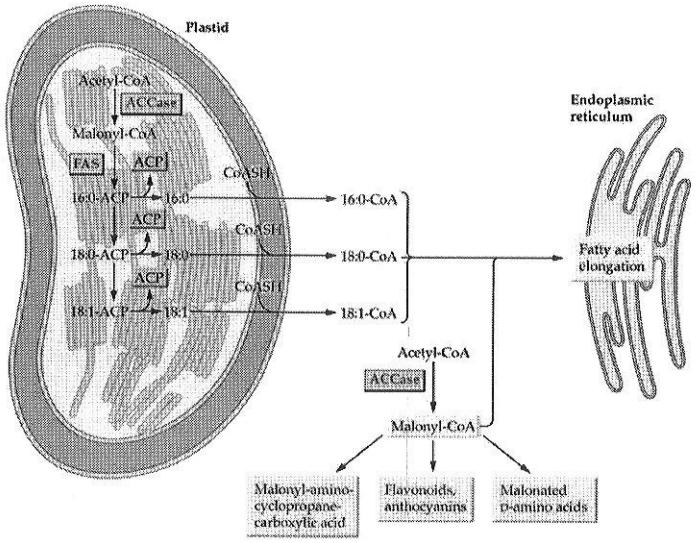
- mitochondrial pyruvate dehydrogenase ใน mitochondria (เพื่อเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น Acetyl CoA
- cytosolic ATP -citrate-lyase ใน cytoplasm เพื่อเปลี่ยน citrate, ATP, และ coenzyme A ไปเป็น acetyl CoA, oxaloacetate, ADP, และ iorganic phosphate.
- จากนั้น Acetyl CoA อาจเปลี่ยนไปเป็น acetate ก่อน แล้วจึงส่งเข้าไปใน chloroplast จากนั้นจึงเปลี่ยนกลับมาเป็น acetyl CoA ซึ่งเร่งโดยเอนไซม์ Acetyl CoA synthetase ใน stroma เนื่องจาก acetyl CoA ไม่สามารถเคลื่อนผ่าน chloroplast membranes โดยการแพร่ได้ และปัจจุบันก็ยังไม่พบว่ามี transporters ที่สามารถนำ Acetyl CoA เข้าสู่ chloroplast ได้

Fig 4. The central role of acetyl CoA in metabolism



- pathway ที่มีการใช้ malonyl-CoA มากที่สุด คือ การสังเคราะห์ fatty acid ใน chloroplast
- ใน cytoplasm ก็มีการสังเคราะห์ malonyl-CoA เพื่อใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับ
  - flavonoid biosynthetic pathways
  - fatty acid elongation reactions ที่ ER
  - malonylation of some amino acid,
  - the ethylene precursors
  - aminocyclopropanecarboxylic acid (Fig 5)

Fig 5. Multiple fates of malonyl CoA



2.3 การสังเคราะห์ unusual fatty acids

- พืชมี fatty acid มากกว่า 200 ชนิด

  Fatty acids ที่พบโดยทั่วไปส่วนใหญ่จะเป็น membrane และ storage lipids ชนิด C16 และ C18 FA ซึ่งมีพันธะคู่ (ชนิด cis-double bonds) จำนวน 0 ถึง 3 พันธะ ที่ Carbon อะตอมตั้งแต่ตำแหน่งที่ 9 เป็นต้นไป

- Fatty acids ที่ไม่อยู่ในกลุ่มที่กล่าวมาจัดเป็น unusual fatty acids ซึ่งมักจะพบเฉพาะ seed oil ของพืชบางชนิดเท่านั้น ซึ่งมีประโยชน์ทางด้านอุตสาหกรรม เช่น lauric (12:0), erucic (20: 1^14), ricinoleic (12-OH, 18:1^9)

- unusual fa ที่พบมากใน seed oils อาจทำหน้าที่เกี่ยวกับ defense function เนื่องจาก fa เหล่านี้มี
  - ความเป็นพิษ หรือสัตว์ย่อยไม่ได้ ซึ่งอาจช่วยปกป้องพืชเหล่านี้จากสัตว์กินพืช เช่น

    acetylenic fa, alpha-fluoro fa, cyclopropenoid fa ยับยั้งการสลาย fa; Malvalic และ sterculic acids ใน conton ยับยั้งการเจริญเติบโตของ lepidopteran larvae
  - เป็น antifungal agents

Fig 6 Unusual fatty acids

$H_3C[CH_2]_{10}CH{=}C{=}CH[CH_2]_3COOH$

Laballenic acid, an allenic acid

$H_3C[CH_2]_7C{\equiv}C[CH_2]_7COOH$

Stearolic acid, a monoacetylenic acid

$HC{\equiv}C[CH_2]_7C(CH_2)C[CH_2]_6COOH$

Sterculynic acid, a cyclopropene-containing acid

$[CH_2]_{12}COOH$

Chaulmoogric acid, a cyclopentenyl acid

$CH_3[CH_2]_5C(OH)CH_2CH{=}CH[CH_2]_7COOH$

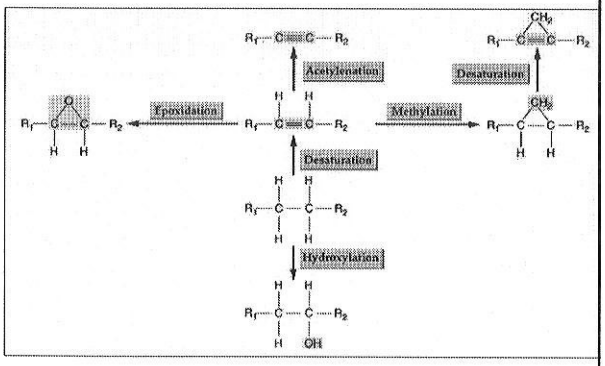
Ricinoleic acid, a hydroxy fatty acid

$CH_3[CH_2]_4CH(O)CHCH_2{-}CH{=}CH[CH_2]_7COOH$

Vernolic acid, an epoxy fatty acid

$H_3C[CH_2]_6$ (H, H, O) $[CH_2]_7COOH$

A furan-containing fatty acid



ปฏิกิริยาต่างๆ ที่ใช้ในการสังเคราะห์ unusual fatty acids

- เอนไซม์หลายชนิดที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ **unusual FA** จะคล้ายคลึงกับเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ **fatty acid** โดยทั่วไป
- **งานวิจัยส่วนใหญ่ที่ศึกษา unusual FA จะมุ่งสนใจที่ การค้นหา fatty acid ที่มีโครงสร้างใหม่ๆ หรือการจัดกลุ่ม FA ที่พบในพืชชนิดต่างๆ มีงานวิจัยเพียงส่วนน้อยที่ศึกษาถึงกลไกการสังเคราะห์, การสะสมและบทบาทหน้าที่ของ unusual FA ในพืช**

ปัจจุบันมีการได้มีการโคลน gene ของเอนไซม์ oleate ^12-hydroxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ ricinoleic (12-OH, 18:1^9) และ hydroxylated FA อื่นๆ จาก เมล็ดละหุ่ง และ *Lesquerella fenderli* พบว่าลำดับกรดอะมิโนของเอนไซม์นี้มีความคล้ายคลึงกับ microsomal oleate^12 desaturase (ในพืชชนิดเดียวกัน) ถึง ~ 70%

➠ จากนั้นจึงได้มีการศึกษาโดยใช้วิธี site-directed mutagenesis เพื่อที่จะทราบว่า กรดอะมิโนชนิดใดที่เป็นตัวกำหนดบทบาทหน้าที่ของเอนไซม์ oleate ^12-hydroxylase ให้ทำหน้าที่แตกต่างจาก oleate^12 desaturase จากการศึกษานี้พบว่าการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนเพียง 7 ตำแหน่งของ hydroxylase ทำให้ geometry ของ active site ของ hydroxylase เปลี่ยนไป จนทำให้เอนไซม์นี้เปลี่ยนมาทำหน้าที่เป็น desaturase ได้

3. Synthesis and catabolism of storage lipids

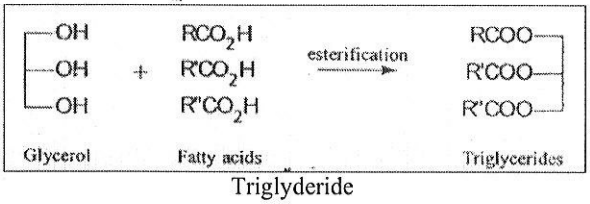
- triacylglycerols เป็น lipids หลักที่เป็นแหล่ง carbon skeleton และ สะสมพลังงาน ที่พบใน เมล็ด ผลไม้ และ pollen grains (ละอองเรณู)
- ข้าม การสังเคราะห์

<u>การสลาย Lipids เพื่อเข้า hexose p pools (Fig 7)</u>

- **triacylglycerols ใน oil bodies จะถูกสลายโดย lipases ได้ glycerols กับ fatty acids จากนั้น fatty acids จะถูกดึงเข้าสู่ glyoxisomes เพื่อสลายต่อโดยวิถี beta-oxidation ได้เป็น Acetyl CoA โมเลกุล Acetyl CoA 2 โมเลกุลจะถูกนำเข้าสู่ glyoxolate cycle เพื่อเปลี่ยนไปเป็น succinate 1 โมเลกุล จากนั้น succinate จะถูกส่งไปยัง mitochondria เพื่อเปลี่ยนเป็น malate malate จะเปลี่ยนเป็น oxaloacetate ที่ cytoplasm เพื่อใช้ในการสังเคราะห์ hexose โดย gluconeogenesis pathway**
- การสลาย fatty acids ในสัตว์มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อให้ได้พลังงานไปใช้ใน metabolism ต่างๆ ภายในเซลล์ แต่ในพืชมีวัตถุประสงค์ต่างไปจากสัตว์ beta-oxidation pathway ในพืช นอกจากจะใช้เพื่อการสลายเพื่อให้ได้พลังงานแล้ว ยังมีไว้เพื่อ สังเคราะห์สารที่ใช้เป็นสารตั้งต้น (precursors) ในการสังเคราะห์สารอื่น เช่นที่พบใน เมล็ดที่กำลังงอก triacylglycerols ที่ถูกสะสมอยู่ในเมล็ดถูกเปลี่ยนเป็น glucose และ สาร metabolites ต่างๆ มากมาย **(Fig 8)**

<u>ไขมันและน้ำมัน (fat and oil)</u>

ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชั่น



Triglyderide

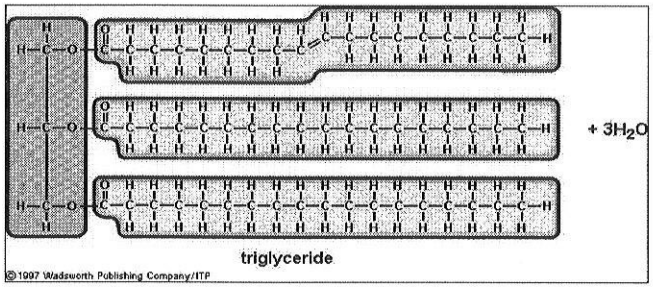


Fig 7
การสลาย Lipids เพื่อเข้า hexose p pools

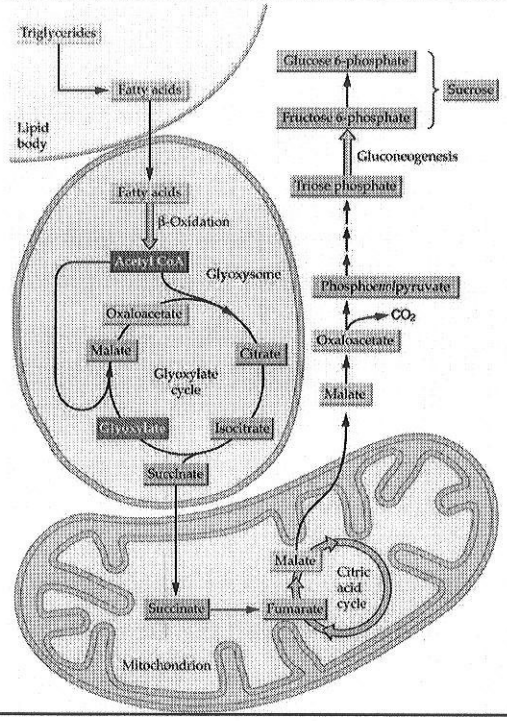
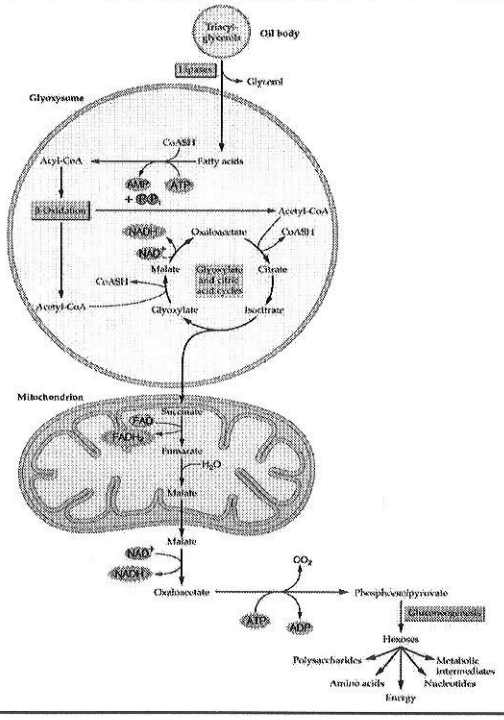


Fig 8
การสลาย Lipids เพื่อเข้า hexose p pools และ สังเคราะห์สารประกอบต่างๆ



4. Synthesis of membrane lipids

4.1 การสังเคราะห์ membrane lipids ในพืช (Fig 9)

- lipid ที่เป็นองค์ประกอบของ membrane ของพืช มีหลายชนิดได้แก่ phosphatidylglycerol, galactolipids
- pathway ที่ใช้สังเคราะห์ phospholipids มี 2 pathways โดย 16:0, 18:0 และ 18:1^9 -ACP ซึ่งเป็นผลิตผลจากการสังเคราะห์ fatty acid ภายใน chloroplast อาจจะนำไปใช้ในการสังเคราะห์ phosphatidic acid (Fig 10) โดย
- Prokaryotic pathway ภายใน chloroplast
- Eukaryotic pathway ภายใน ER
- Phosphatidic acid (PA) ที่ได้จาก Prokaryotic pathway และ Eukaryotic pathway จะถูกนำไปรวมกับ glycerol ได้เป็น phosphatidylglycerol แต่ phosphatidylglycerol ที่ได้จาก pathway ทั้งสองแตกต่างกันตรงที่ fatty acid ที่ต่ออยู่กับ sn-1 และ sn-2 ของ glycerol แตกชนิดกัน
  - prokaryotic pathway : ที่ตำแหน่ง sn-2 จะเป็นชนิด 16:0 และที่ sn-1 จะเป็น 18:1^9
  - Eukaryotic pathway : ที่ตำแหน่ง sn-2 จะเป็นชนิด C18 FA และที่ sn-1 จะเป็น 16:0

- phosphatidic acid ที่สังเคราะห์ใน chloroplast โดย prokaryotic pathway นอกจากจะถูกนำไปสังเคราะห์ phosphatidylglycerol แล้ว ยังสามารถไปสังเคราะห์เป็น diacylglycerol ได้โดยเอนไซม์ phosphatidic acid-phosphatase ที่อยู่ที่ inner membrane ของ chloroplast
  diacylglycerol สามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ lipids หลักชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ chloroplast เช่น monogalactosyldiacylglycerol, digalactosyldiacylglycerol, และ sulfoquinovosyldiacylglycerol (SQD) (Fig 9)

- phosphatidic acid ที่สังเคราะห์โดย eukaryotic pathway ได้แก่ phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol, and phosphatidylserine, phospholipids เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของ membranes ซึ่ง lipids บางส่วนจะส่งกลับไปใน chloroplast เพื่อสังเคราะห์ chloroplast membrane ซึ่งแสดงถึงการแลกเปลี่ยน lipids กันระหว่าง ER และ chloroplast อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถทราบได้ว่าการแลกเปลี่ยน lipids นี้เกิดขึ้นโดยวิธีใด (ดู model fig 11)

Fig 9 membrane lipids synthesis by prokaryotic and eukaryotic pathways

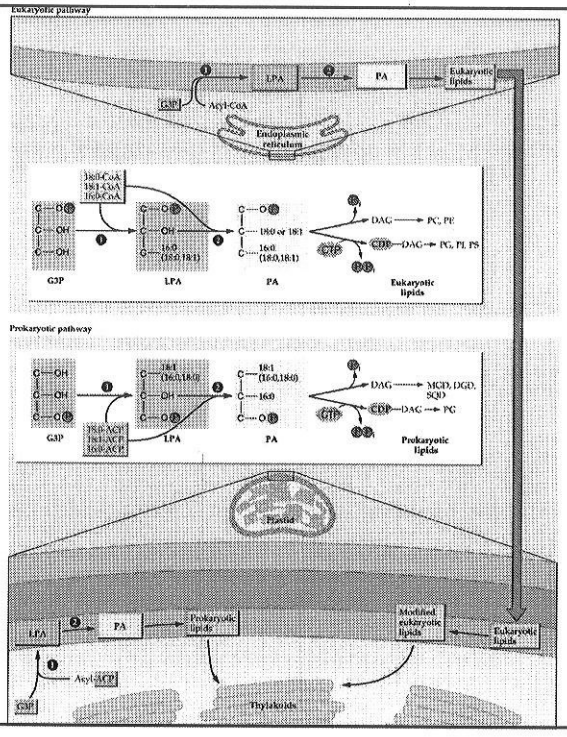
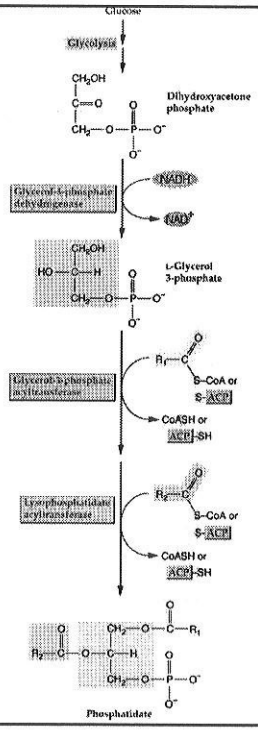


Fig 10 The biosynthetic pathway to phosphatidic acid (PA)



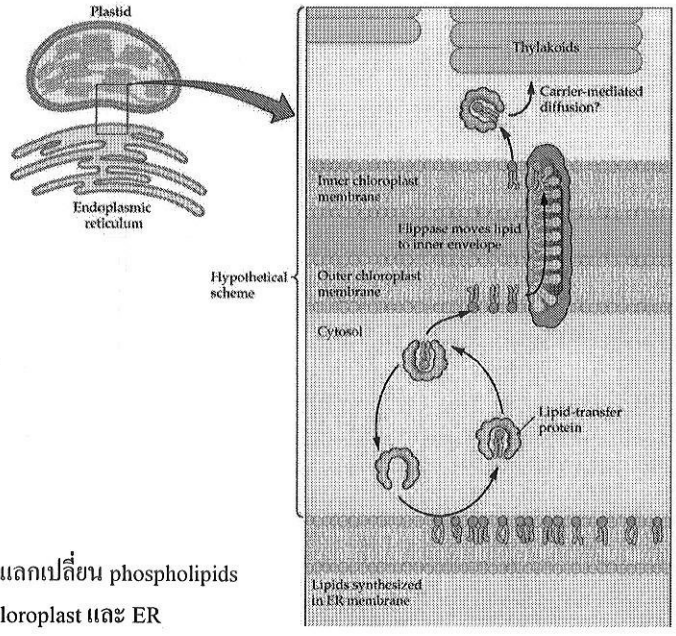


Fig 11 การแลกเปลี่ยน phospholipids ระหว่าง chloroplast และ ER

4.2 หน้าที่ของ membrane lipids

สัดส่วนของ Membrane lipid ซึ่งเป็น องค์ประกอบของ membrane มีผลต่อการทำงานของ metabolism และ รูปทรงของพืช

- membrane ในแต่ละส่วนของเซลล์พืชมีชนิดของ lipids ที่เป็นองค์ประกอบแตกต่างกัน ในปัจจุบันก็ยังไม่สามารถทราบได้ว่าเพราะเหตุใดชนิด lipids ในพืชจึงมีความหลากหลายมาก สาเหตุอาจจะมาจากการที่พืชสังเคราะห์ lipids แต่ละชนิดขึ้นมา ให้มีสัดส่วนของ lipids แต่ละชนิด ที่เหมาะสมต่อระยะการเติบโตของพืชในช่วงนั้นๆ หรือมีความสำคัญในการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อม
- มีงานวิจัยที่ศึกษาผลของชนิด lipids ที่เป็นองค์ประกอบของ membrane ต่อการเปลี่ยนแปลง phenotypes ของพืช จากการศึกษาใน Arabidopsis พบว่า mutant plant ชนิด *fab2* *fab2* plants มีต้นขนาดเล็กลง เมื่อเปลี่ยบเทียบกับ wild type plant ทั้งนี้เป็นผลจาก การสะสม fatty acid ชนิด 18:0 ใน membrane lipids (Fig 12a)
- ใบที่มีขนาดเล็กลงเป็นผลมาจากเซลล์ที่ใบหลายชนิดมีขนาดลดลง ได้แก่ mesophyll cells และ epidermal cells (Fig10.43bc).

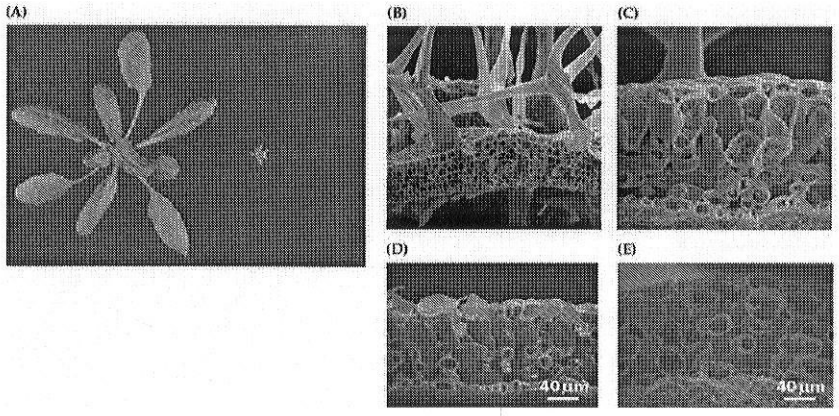


Fig 12 Arabidobsis *fab2* mutants

พืชที่ไม่มี polyunsaturated membrane lipids มีผลต่อ Photosynthesis

- membrane ของ chloroplast มี lipids ชนิด monogalactosyldiacylglycerol เป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 90% (Fig 13) ตรง thylakoid membrane มี unsaturated $18:3^{\Delta 9,12,15}$ และ $16:3^{\Delta 7,10,13}$ fatty acids เป็นองค์ประกอบอยู่ถึง 70%
- เนื่องจาก free radical ซึ่งเป็น byproducts photosynthetic light reactions จะกระตุ้นการเกิด oxidation ของ polyunsaturated fatty acid ได้ ดังนั้น การที่พืชมี unsaturation สูงมากใน thylakoids จึงน่าจะเสี่ยงต่อการเกิด oxidation มาก แล้วเหตุใด thylakoids จึงมี fatty acids กลุ่มนี้อยู่มาก ? photosynthesis ขึ้นอยู่กับสัดส่วนของ unsaturated fa หรือไม่ ?
- เป็นที่น่าแปลกใจว่า Arabidopsis triple mutant (fad3, fad7, fad8) ซึ่งไม่มี $18:3^{\Delta 9,12,15}$ and $16:3^{\Delta 7,10,13}$ fa อยู่เลย มีอัตราการเติบโตของ vetgetative growth และ photosynthesis ที่ 22 C ตามปกติ (Fig 14) การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า fatty acids ทั้ง 2 ชนิดนี้ ไม่มีความจำเป็นต่อการสังเคราะห์แสงของพืช แต่พบว่าการขาด fatty acid 2 ชนิดนี้มีผลต่อการสังเคราะห์แสงที่อุณหภูมิ <10 C และ>30 C .... Lipids composition ใน thylakoid มีความสำคัญอย่างไรในกรณีนี้ ?

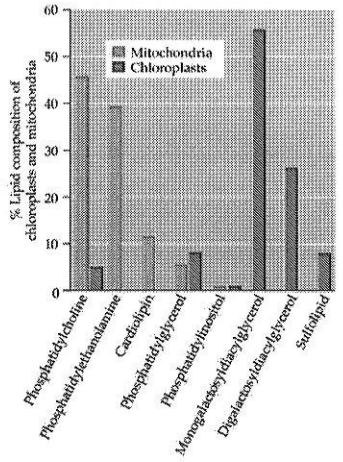


Fig 13 Lipid composition of chloroplast และ mitochondria

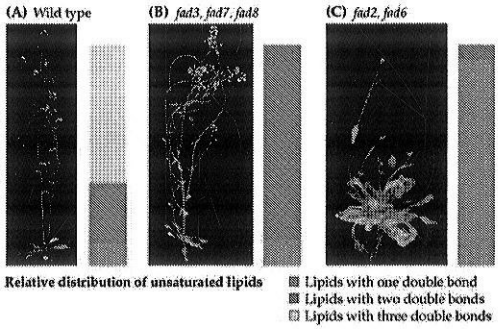
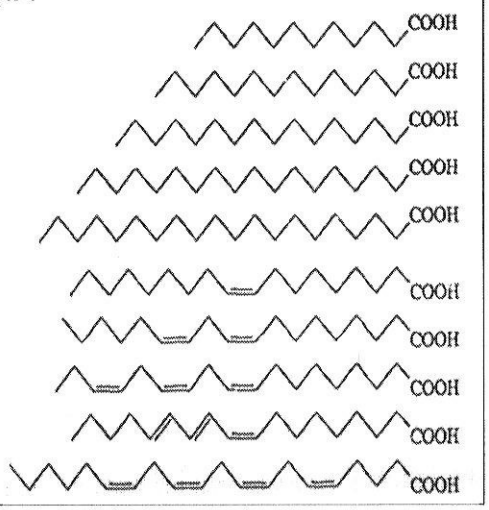


Fig 14

สมบัติของกรดไขมันที่สามัญบางชนิด

Name	Carbon	Melting Point (°C)
• lauric acid	12	44
• myristic acid	14	59
• palmitic acid	16	64
• stearic acid	18	70
• arachidic acid	20	76
• oleic acid	18	4
• linoleic acid	18	-5
• linolenic acid	18	-11
• eleostearic acid	18	49
• arachidonic acid		20



- Arabidopsis mutant (fad2 fad6) ซึ่งไม่มี $18:2^{\Delta 9,12}$,$16:2^{\Delta 7,10}$,$18:3^{\Delta 9,12,15}$ และ $16:3^{\Delta 7,10,13}$ อยู่เลย มีผลต่อทำให้ mutant plants ไม่สามารถสังเคราะห์แสงได้
- อย่างไรก็ตาม fad2fad6 plants ที่โตในสารละลาย sucrose มีการเจริญเติบโตได้ตามปกติ แสดงว่า.... ?
- จากการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า unsaturated fatty acid ซึ่งเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของ membrane มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์แสง

<u>lipid composition มีผลต่อการตอบสนองต่อความเย็น</u>

- ในพืชที่ไวต่อความเย็น (chilling-sensitive plants) หลังจากที่เซลล์ถูกแช่แข็ง จะเกิดการเปลี่ยนสถานะของน้ำแข็งภายในเซลล์มาเป็นวุ้น จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง metabolism ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ถูกทำลายและตายในที่สุด
- เนื่องจาก การเกิด desaturation ของ membrane lipids เป็นปัจจัยสำคัญต่อ membrane fluidity จึงมีงานวิจัยที่พยายามค้นหาความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของ lipids ใน membrane ต่อความไวต่อความเย็นของพืช ผลการวิจัยในปัจจุบันระบุว่าความสัมพันธ์ระหว่าง membrane unsaturation ต่อการตอบสนองของพืชต่อความเย็นมีความซับซ้อน และยากแก่การเข้าใจ
- ความเข้มข้นของ disaturated phosphatidylglycerol (60% of total phosphatidylglycerol) ใน transgenic Arabidopsis ทำให้เซลล์พืชที่ปลูกในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำๆ ถูกทำลายได้เร็วขึ้น แต่พืชบางชนิดกลับสามารถเจริญเติบโตได้ตามปกติ

หน้าที่ของ Membrane lipids : signaling transduction และกระบวนการป้องกันเซลล์

- พืช, สัตว์ และจุลินทรีย์ ต่างใช้ membrane lipids เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารประกอบที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณภายในเซลล์และ เป็น second messengers ในการส่งสัญญาณระหว่างเซลล์อื่นๆ
- Phosphatidylinositols หรือที่นิยมเรียก phosphoinositides มีหน้าที่สำคัญใน signal transduction pathways

5. Genetic engineering of lipids

- Fatty acid สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในหลายๆ อุตสาหกรรมได้ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตสบู่, detergents, สี, พลาสติก, น้ำมันหล่อลื่น, น้ำมันเคลือบเงา
- fatty acid ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมมากที่สุดคือ lauric acid (C12) จากมะพร้าวและปาล์ม ในการผลิต detergents ปัจจุบันมีความพยายามที่จะเพิ่มปริมาณน้ำมันในธัญพืช เพื่อขยายแหล่งผลิตน้ำมัน เพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานเชื้อเพลิง

1). การเพิ่มคุณภาพของน้ำมัน

- การลดปริมาณ saturated fatty acid กลุ่ม 16:0, 18:0 และลด polyunsaturated fa กลุ่ม18:2$^{\Delta 9,12}$, 18:3$^{\Delta 9,12,15}$ แต่เพิ่ม 18:1$^{\Delta 9}$ (monosaturated fa) ในน้ำมัน เพื่อช่วยลดการอุดตันของไขมันในเส้นเลือด (น้ำมันที่มี 18:2$^{\Delta 9,12}$, 18:3$^{\Delta 9,12,15}$ อยู่น้อยมีความเสถียรมาก โดยเฉพาะในการทอดที่อุณหภูมิสูง)
- เป้าหมายที่จะสามารถลด polyunsaturated fa อยู่ที่เอนไซม์ desaturase ใน ER จากการศึกษาในถั่วเหลืองพบว่า mutant ที่ไม่มีการทำงานของเอนไซม์ desaturase บางชนิด สามารถเพิ่มปริมาณ 18:1$^{\Delta 9}$ จาก <10% ไปเป็น 85% ของ fa ทั้งหมด และสามารถลด saturated fa จาก 15% เหลือ 5%

2). การเพิ่มปริมาณน้ำมันในเมล็ด

เนื่องจากมีมากกว่า 30 ปฏิกิริยาที่ต้องใช้ในการเปลี่ยน Acetyl CoA ไปเป็น triacylglycerols ดังนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำมันในเมล็ดโดยการเปลี่ยนการทำงานของยีนที่สังเคราะห์เอนไซม์ที่เข้าร่วมในปฏิกิริยาจึงไม่ใช่เรื่องง่าย เช่นการเปลี่ยนการทำงานของ ACCase ไม่สามารถทำได้เลยเนื่องจาก เมื่อ ACCase ทำงานสูงมาก เซลล์จะมีการปรับสมดุลโดยให้เอนไซม์นี้ทำงานลดลง

VI. Nitrogen Metabolism

Outline

1. การเปลี่ยน nitrate ไปเป็น NH_4^+
2. การควบคุม Nitrate assimilation
3. การสังเคราะห์ กรดอะมิโน ซึ่งเป็น end-product ของ nitrate assimilation

Introduction

- **Nitrogen เป็นส่วนประกอบของ proteins, nucleic acid, และสารประกอบ nitrogen ต่างๆ**
- **ที่มาของ Nitrogen ที่ใช้ในการสังเคราะห์ organic compound มาจาก 2 ทาง**

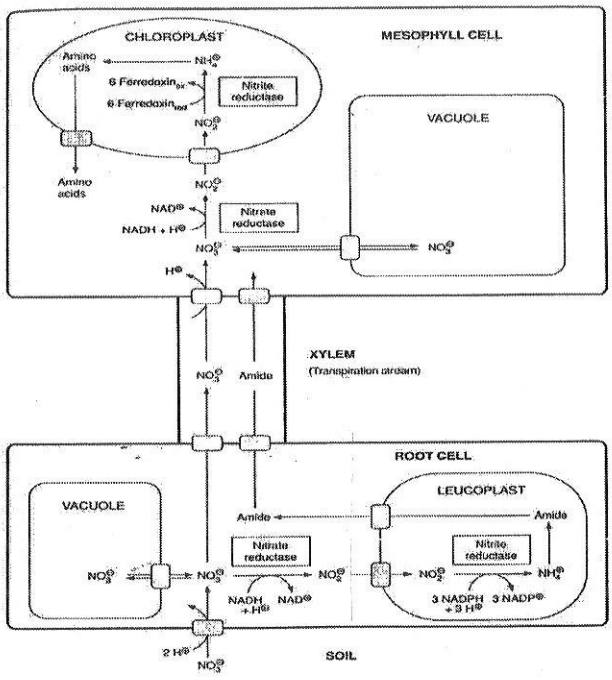
  ตรึง N_2 จากอากาศ

  ดูด nitrate หรือ ammonia ในน้ำหรือดิน
- **99% ของ nitrogen compound ใน สิ่งมีชีวิตมาจาก nitrate**

1. การเปลี่ยน nitrate ไปเป็น NH_4^+ (The reduction of nitrate to NH_4^+)

- Nitrate assimiration เกิดขึ้นที่ใบและราก (Fig. 10.1).

- ในพืชล้มลุก nitrate assimilation จะเกิดขึ้นที่ใบเป็นส่วนใหญ่ ส่วน nitrate assimilation ที่รากจะมีบทบาทสำคัญในระยะต้นกล้าเท่านั้น ในทางตรงกันข้ามไม้ยืนต้นและไม้พุ่ม และพืชตระกูลถั่ว จะเกิด nitrate assimilation ทางรากเป็นส่วนใหญ่
- ระบบการดูด nitrate ที่รากจะอาศัยพลังงาน (energy-dependent uptake system) (Fig 10.1) ประสิทธิภาพของระบบนี้ทำให้พืชสามารถเติบโตได้แม้ความเข้มข้นของ nitrate ในดินจะน้อยมากๆ
- การดูด nitrate เข้าสู่รากจะใช้วิธี symport โดยแลกเปลี่ยนกับ 2 protons พลังงาน (ATP) ที่ใช้ในการ pump proton ได้จากการหายใจใน mitochondrial
- nitrate ที่ถูกดึงเข้ามาในเซลล์รากสามารถเก็บไว้ได้ชั่วคราวใน vacuole nitrate บางส่วน จะถูก reduced ต่อเป็น NH_4^+ ใน leucoplast ของราก NH_4^+ ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปสังเคราะห์เป็น glutamine และ asparagine (รวมเรียก amide) เป็นส่วนใหญ่ amino acids ทั้ง 2 ชนิด สามารถขนส่งไปยังใบโดยใช้แรงจากการคายน้ำ (transpiration stream) ภายในท่อลำเลียงน้ำ (xylem)
- ในบางครั้ง พืชสามารถขนส่ง nitrate จากรากไปที่ไปสู่ใบทาง xylem เช่นกัน เมื่อมาถึงใบ nitrate เหล่านี้จะถูกดึงเข้าสู่ mesophyll cells (อาจจะโดยใช้วิธี proton symport) เพื่อนำไปเก็บสะสมที่ vacuole หรือส่งเข้า chloroplast เพื่อเปลี่ยนเป็น NH_4^+ ไว้ใช้สังเคราะห์ amino acids



1.1 ขั้นตอนการเปลี่ยน nitrate ไปเป็น NH_4^+ ที่เกิดขึ้นใน mesophyll cells ของใบ

1) Nitrate ใน mesophyll cells จะถูก reduced ไปเป็น nitrite โดย nitrate reductase ที่อยู่ใน cytosol โดยใช้ NADH เป็น reductant, แต่พืชบางชนิดสามารถ NADPH เป็น reductant ได้เช่นกัน (Fig10.2 a)

NADH ที่นำมาใช้ใน nitrate reduction ใน cytosol นี้อาจได้มาจาก การสลายของ glucose โดย glycolytic pathway หรือจากแหล่งอื่น ทั้งในช่วงไม่มีแสง / มีแสง

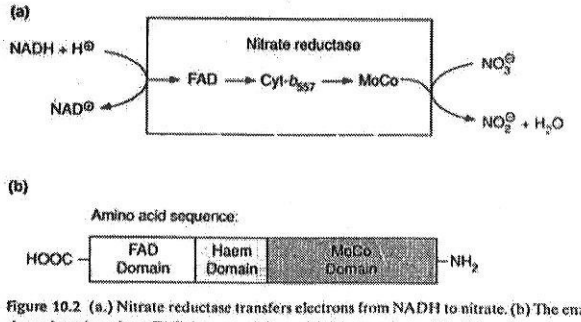


Figure 10.2 (a.) Nitrate reductase transfers electrons from NADH to nitrate. (b) The enzyme contains three domains where FAD, haem, and the molybdenum cofactor (MoCo) are bound.

2) จากนั้น nitrite จะถูกเปลี่ยนเป็น NH_4^+ โดย nitrite reductase ใน chloroplasts ปฏิกิริยา reduction ที่ใช้ในการเปลี่ยน nitrite ไปเป็น NH_4^+ เกิดขึ้นนี้ต้องใช้ e- ถึง 6 ตัว (Fig 10.4)

nitrite reductase จะใช้ reduced ferredoxin ที่ได้จาก Photosystem I ใน light reaction เป็น electron donor แต่ในช่วงที่ไม่มีแสง พืชจะใช้ NADPH จาก pentose phosphate pathway มา reduced ferredoxin เพื่อนำมา reduced nitrite ให้เป็น NH_4^+ แทน

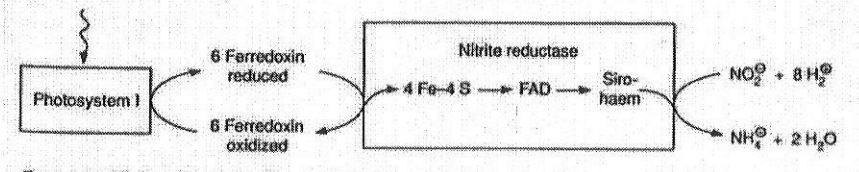


Figure 10.4 Nitrite reductase in chloroplasts transfers electrons from ferredoxin to nitrite. Reduction of ferredoxin by photosystem I is shown in Fig. 3.16.

3) Glutamine synthetase ใน chloroplasts จะนำ NH_4^+ ไปทำปฏิกิริยากับ glutamate เกิดเป็น glutamine ปฏิกิริยานี้ใช้ ATP เข้าร่วมปฏิกิริยา (Fig A และ 10.6)

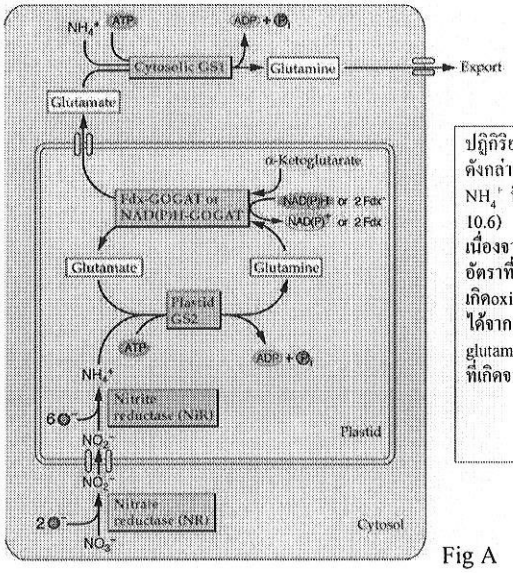


Fig A

ปฏิกิริยาการตรึง NH_4^+ เพื่อนำมารวมกับ glutamate ดังกล่าวเกิดขึ้นในลักษณะเดียวกันกับปฏิกิริยาการตรึง NH_4^+ ที่เกิดขึ้นใน photorespiration (จำได้ไหม) (fig 10.6)
เนื่องจาก photorespiration ที่เกิดขึ้นในพืชมักเกิดในอัตราที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นปริมาณ NH_4^+ ที่ได้จากการเกิดoxidation ของ glycine จึงสูงกว่าปริมาณ NH_4^+ ที่ได้จาก nitrate assimilation ประมาณ 5-10 เท่า ดังนั้น glutamine ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในใบจึงมีเพียงส่วนน้อยที่เกิดจากการนำ NH_4^+ ที่ได้จาก nitrate assimilation

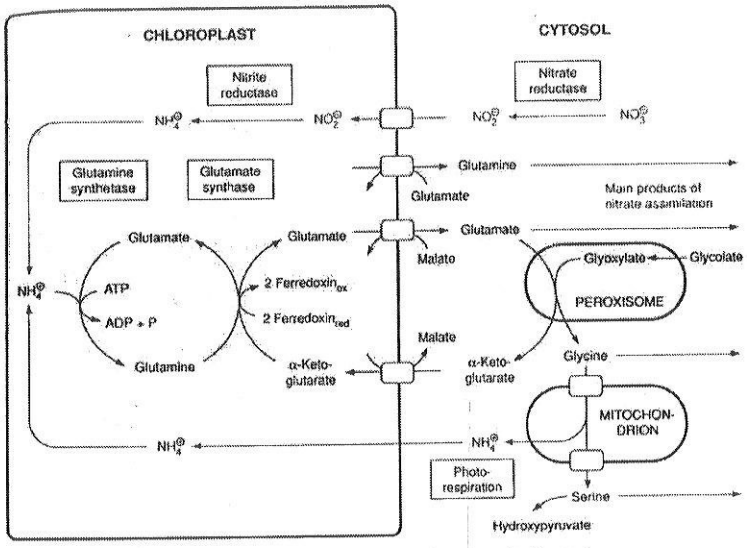
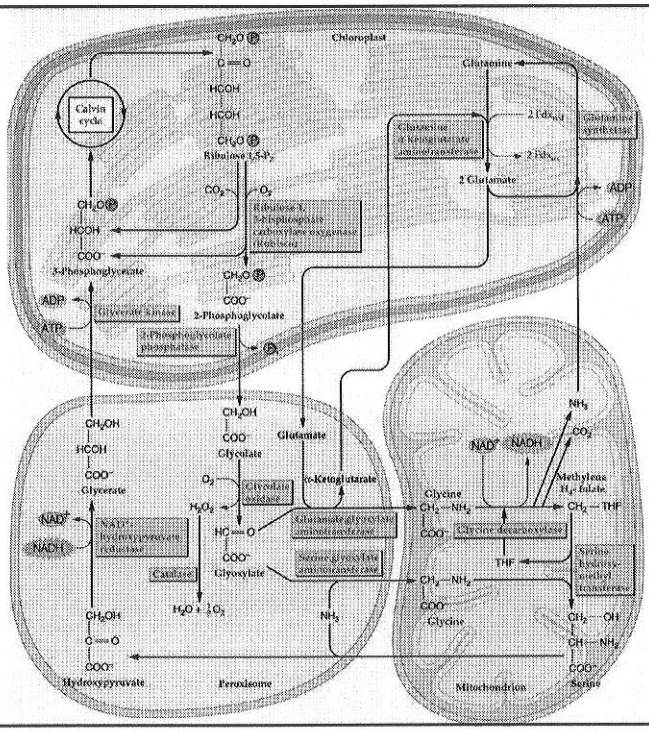


Figure 10.6 Compartmentalization of partial reactions of nitrate assimilation and the photorespiratory pathway in mesophyll cells. NH_4^+ formed in the photorespiratory pathway is coloured black and NH_4^+ formed by nitrate assimilation coloured red. The main products of nitrate assimilation are marked with a red arrow.

Photorespiration



4) จากนั้น Glutamine ที่สังเคราะห์ขึ้นใน chloroplasts จะถูกเปลี่ยนกลับมาเป็น glutamate 2 โมเลกุล ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย glutamate synthase (หรือในอีกชื่อหนึ่ง glutamine-oxoglutarate amino transferase, GOGAT) โดย glutamine จะทำปฏิกิริยากับ alpha-ketoglutarate โดยมี ferredoxin เป็นตัวให้ electron (reductant) (บาง chloroplasts ยังมี glutamate synthase ที่สามารถใช้ NADPH เป็น reductant ได้ด้วย)

- alpha- ketoglutarate ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ glutamate นี้ มาจาก mitochondria โดย alpha-ketoglutarate จะถูกส่งออกจาก mitochondria มาที่ cytosol และถูกส่งเข้ามาใน chloroplast ทาง translocator โดยใช้การแลกเปลี่ยนกับ malate
- หรือมาจาก Citrate จาก Kreb cycle ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น alpha-ketoglutarate ใน cytosol แล้วจึงถูกส่งเข้า chloroplast

5) glutamate ที่สังเคราะห์ขึ้นในขั้นตอนที่ 4 ใน chloroplast จะถูกส่งออกไปสู่ cytosol ทาง translocator อีกชนิดหนึ่ง โดยการแลกเปลี่ยนกับ malate glutamate เหล่านี้จะถูกนำไปใช้สังเคราะห์ amino acid ชนิดต่างๆ และสารประกอบอื่นๆ ต่อไป (Fig 10.6, Fig B, C).

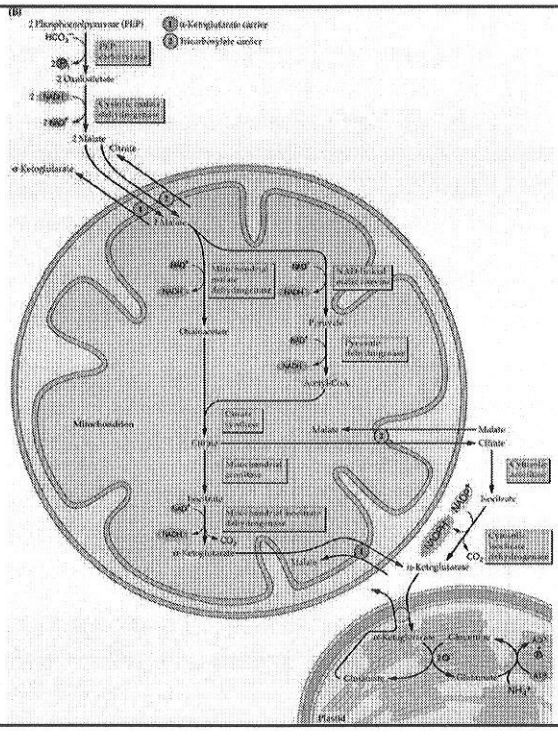


Fig B

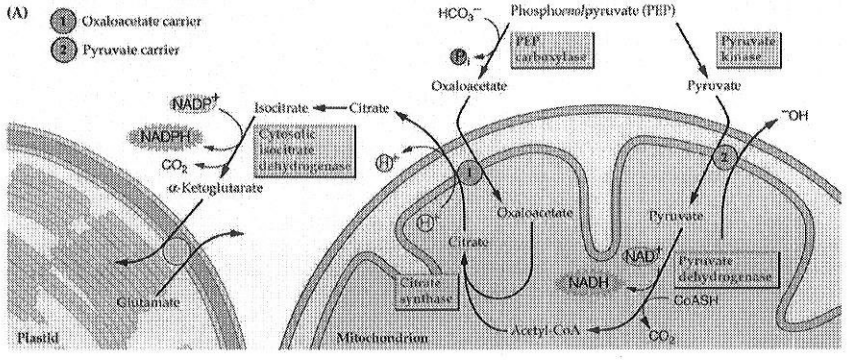


Fig C

1.2 ขั้นตอนการเปลี่ยน nitrate ไปเป็น NH_4^+ ที่เกิดขึ้นในราก

- กระบวนการ reduction ของ nitrate และ nitrite รวมทั้งการเปลี่ยน nitrite ไปเป็น NH_4^+ (NH_4^+ fixation) ที่เกิดขึ้นในเซลล์ราก เกิดขึ้นเหมือนกับที่เกิดใน mesophyll cells ของใบ แต่ในรากจะต่างกับใบตรงที่ reducing equivalents ที่นำมาเข้าร่วมในปฏิกิริยาต่างๆ เหล่านี้ จะได้มาจากกระบวนการสลาย carbohydrates

- ปฏิกิริยา reduction ของ nitrate ไปเป็น nitrite เกิดขึ้นใน cytoplasm และ ปฏิกิริยา redcution ของ nitrite และ NH_4^+ fixation เกิดขึ้นใน leucoplasts (Fig 10.8)

- NADPH ที่ได้จาก pentose phosphate pathway ทำหน้าที่เป็น reducing equivalents โดย NADPH จะไป reduced ferredoxin ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในปฏิกิริยา reduction ของ nitrite, NH_4^+ fixation และปฏิกิริยาการสังเคราะห์ glutamate ต่อไป

- การสังเคราะห์ glutamine ใน chloroplast จำเป็นต้องใช้ ATP เข้าร่วมปฏิกิริยาเช่นเดียวกัน โดย ATP ที่ถูกผลิตขึ้นใน mitochondria จะถูกส่งมาที่ leucoplasts ทาง ATP translocator ซึ่งจะถูกแลกเปลี่ยนกับ ADP

- จากนั้น glutamine จะถูกเปลี่ยนเป็น glutamate โดยทำปฏิกิริยากับ alpha-ketoglutarate glutamate ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจะถูกส่งออกสู่ cytosol และเปลี่ยนเป็น glutamine และ asparagine เพื่อส่งไปที่ใบทาง xylems

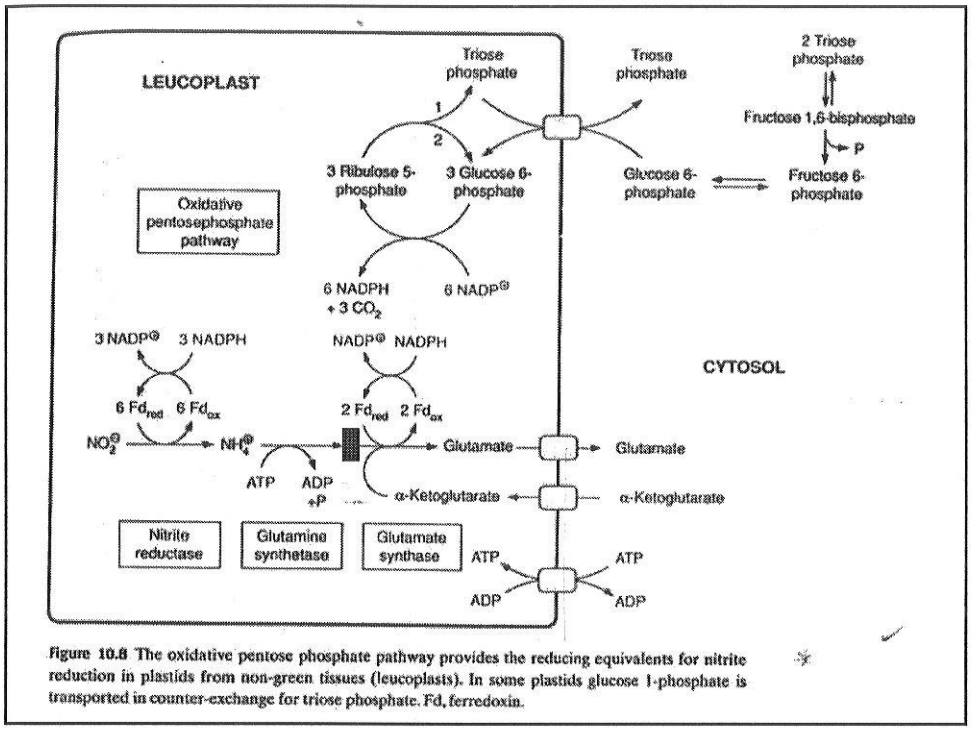
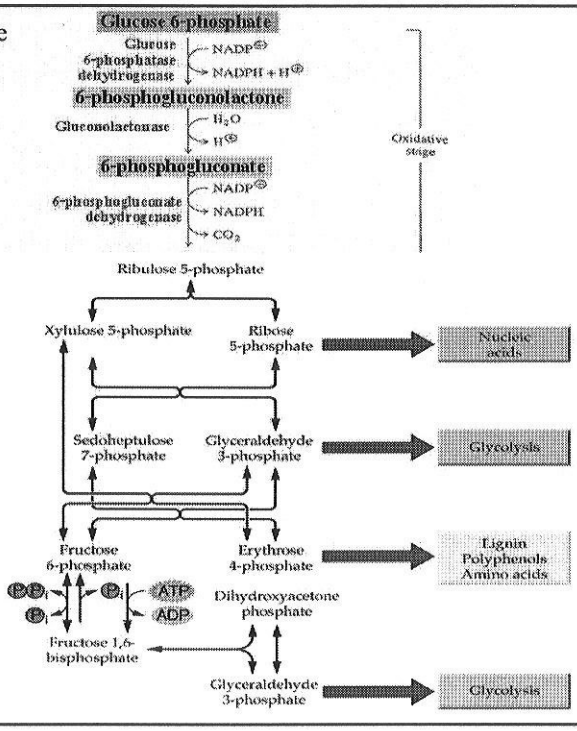


Figure 10.8 The oxidative pentose phosphate pathway provides the reducing equivalents for nitrite reduction in plastids from non-green tissues (leucoplasts). In some plastids glucose 1-phosphate is transported in counter-exchange for triose phosphate. Fd, ferredoxin.

Pentose Phosphate pathway



2. การควบคุม Nitrate assimilation

สิ่งสำคัญที่จำเป็นจะต้องควบคุม Nitrate assimilation ให้เกิดขึ้นอย่างเหมาะสม มีดังนี้

•1 ในขณะที่เกิดการสังเคราะห์แสง/ , CO_2 assimilation และ nitrate assimilation จะต้องทำงานอย่างสัมพันธ์กัน เนื่องจาก Nitrate assimilation จำเป็นต้องใช้ Carbon skeletons ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จาก CO_2 assimilation ในการสังเคราะห์แสง/ photorespiration มาเข้าร่วมในการสังเคราะห์ amino acids

•2 Nitrate assimilation จำเป็นจะต้องถูกควบคุมเป็นอย่างดีเพื่อให้การผลิต amino acids ไม่เกิดขึ้นเกินปริมาณที่ร่างกายต้องการใช้

•3 Nitrate reduction จะถูกควบคุมไม่ให้เกิดขึ้นมากกว่า/ เร็วกว่า nitrite reduction เนื่องจาก nitrite มีความเป็นพิษต่อเซลล์ หาก การเปลี่ยน Nitrate ไปเป็น nitrite เกิดขึ้นเร็วกว่า การเปลี่ยน nitrite ไปเป็น NH_4^+ จะทำให้เกิดการสะสม nitrite ในระดับที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ เหตุการณ์นี้มักจะเกิดขึ้นในราก เช่นในภาวะที่ถูกน้ำท่วม รากพืชจะมีวิธีกำจัด nitrite โดยปล่อยออกจากรากลงสู่น้ำที่อยู่รอบๆ ราก แต่ที่ใบไม่สามารถกำจัดโดยวิธีนี้ได้ ดังนั้นพืชจึงจำเป็นต้องใช้กลไกควบคุม metabolism และการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ใน nitrate reduction ให้เกิดขึ้นอย่างสมดุล

Nitrate assimilation เกิดขึ้นได้ทั้งในช่วงมีแสง และไม่มีแสง

- **ในช่วงที่มีแสง NADH ที่นำมาใช้ใน nitrate reduction ใน cytosol ได้จากการสลาย glucose โดย glycolysis ส่วน nitrite reduction NH_4^+ fixation ใน chloroplasts จะใช้ reducing equivalents (reduced ferredoxin, NADPH) และ ATP ซึ่งได้จาก การสังเคราะห์แสง ดังนั้น การควบคุม nitrate assimilation ในช่วงไม่มีแสงจึงไม่ค่อยมีปัญหาเพราะถูกกำหนดโดยการสังเคราะห์แสงเป็นหลัก**
- **ในช่วงไม่มีแสง NADH ที่นำมาใช้ใน nitrate reduction ใน cytosol ได้จากการสลาย glucose โดย glycolysis เช่นเดียวกัน แต่ nitrite reduction และ NH_4^+ fixation ใน chloroplasts จะใช้ reducing equivalents (reduced ferredoxin, NADPH) จาก การสลาย glucose โดย pentose phosphate pathway เป็นหลัก แต่ปริมาณ reducing equivalents ได้มีปริมาณน้อยมากเมื่อเทียบกับการสังเคราะห์แสง ดังนั้นในช่วงที่ไม่มีแสงอัตราการเกิด nitrite reduction ในใบจะลดลง หรือไม่เกิดเลยเพื่อป้องกันการสะสม nitrite ในเซลล์**
- **ดังนั้นจุดควบคุมที่สำคัญก็ คือ เอนไซม์.....**

การควบคุมการสังเคราะห์ nitrate reductase

โดยควบคุมระดับการแสดงออกของยีน (gene expression)

•Nitrate reductase เป็นโปรตีนที่มีอายุการทำงานสั้น (short-lived protein) เพียงไม่กี่ชั่วโมง เอนไซม์จะถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ทุกครั้งในช่วงที่เซลล์ต้องการเปลี่ยน nitrate ไปเป็น nitrite หลังจากที่สังเคราะห์ nitrite ได้เพียงพอแล้ว เอนไซม์ก็จะถูกสลายไป ดังนั้นอัตราการสังเคราะห์เอนไซม์นี้จึงสูงมาก เซลล์จึงต้องมีกลไกควบคุมการสังเคราะห์ และกลไกกระตุ้นการทำงานของ nitrate reductase ให้เกิดขึ้นในเวลาอันรวดเร็ว (ภายใน 1 ชั่วโมง)

• ปัจจัยที่ควบคุมระดับการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ nitrate reductase (Fig 10.9)

- Nitrate, glucose, carbohydrate ชนิดต่างๆ และแสง เป็นตัวกระตุ้นการสังเคราะห์เอนไซม์
- glutamine และ amino acids อื่นๆ ทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง

อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่ทราบว่าปัจจัยต่างๆ เหล่านี้ไปควบคุมการแสดงออกของยีนโดยวิธีใด

• อาจจะมี Sensors บางอย่างในเซลล์ที่คอยควบคุมระดับการสังเคราะห์ nitrate reductase ให้มีปริมาณที่เหมาะสม โดยสัมพันธ์กับทั้งความต้องการในการสังเคราะห์ amino acids และปริมาณ carbon skeletons จาก CO_2 assimilation

- เนื่องจาก nitrate reductase ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ในช่วงที่เซลล์ต้องการเปลี่ยน nitrate ไปเป็น nitrite เท่านั้น แต่หลังจากที่สังเคราะห์ nitrite ได้เพียงพอแล้ว เอนไซม์ก็จะถูกสลายไป ในช่วงที่เกิดการสลายนี้ อาจกินเวลานานจนทำให้มีเอนไซม์บางส่วนยังทำงานต่อ จนเกิดการสะสม nitrite ได้ ดังนั้นเซลล์จึงมีกลไกหยุดการทำงานของ nitrate reductase ภายในเสี้ยวนาที โดยวิธี covalent modification โดยการทำงานของ protein kinase ชนิด Nitrate reductase kinase ซึ่งจะไปเติม Phosphate ที่ กรดอะมิโน serine ตรง active site ของ nitrate reductase (Fig 10.9)
- Nitrate reductase kinase จะถูกกระตุ้นให้ทำงานโดย Ca+ ions และยับยั้งโดย DHAP (dihydroxy acetone phosphate) and glucose 6-P
- หลังจากที่ serine ถูกเติม phosphate เข้าไปแล้ว จะมี 14-3-3 protein ซึ่งทำหน้าที่เป็น inhibitor มาจับ ซึ่งจะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ nitrate reductase ในการส่งถ่าย electron จาก NADH ไปให้ nitrate (Fig 10.2)

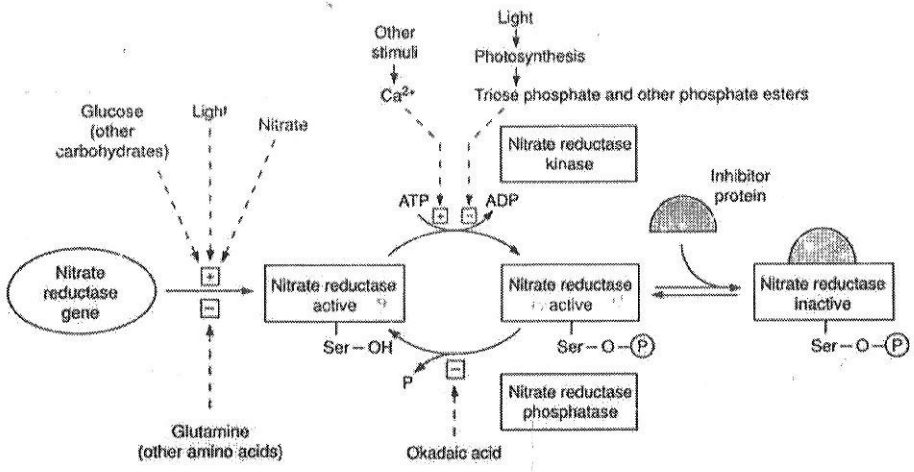


Figure 10.9 Regulation of nitrate reductase (NR). Synthesis of the NR protein is stimulated by carbohydrates (perhaps glucose or its metabolic products) and light [+], and inhibited by glutamine or other amino acids [−]. The newly formed NR protein is degraded within a time span of a few hours. Nitrate reductase is inhibited by phosphorylation of a serine residue and the subsequent interaction with an inhibitor protein. After hydrolytic liberation of the phosphate residue by a protein phosphatase, the inhibitor is dissociated and nitrate reductase regains its full activity. The activity of the nitrate reductase kinase is inhibited in the light, yielding nitrate reductase active in the light. Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatases, prevents the activation of nitrate reductase. (After Huber *et al.* 1996.)

3. การสังเคราะห์ กรดอะมิโน ซึ่งเป็น end-product ของ nitrate assimilation

- การสังเคราะห์ amino acids ส่วนใหญ่เกิดขึ้นใน chloroplasts
- รูปแบบการสังเคราะห์ amino acids มีหลากหลาย
- ผลผลิต ที่ได้จาก CO_2 assimilation นำมาใช้เป็น carbon skeletons ในโครงสร้างของamino acids ซึ่งได้มาจากหลายแหล่ง ได้แก่ glycolysis, photosynthesis, pentose phosphate pathway, citric acid cycle
- ภาพรวมของการสังเคราะห์ amino acids แสดงในรูป 10.10
- amino acid ที่สังเคราะห์ขึ้นมาสามารถนำไปใช้สังเคราะห์ protein นอกจากนี้ amino acids บางชนิดยังทำหน้าที่อื่นๆ ดังนี้

  - ใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ secondary metabolites หลายชนิดในพืช เช่น Hormone และสารประกอบที่ใช้ปกป้องพืชจากการถูกบุกรุก (defense compound)

  - ทำหน้าที่ขนย้าย nitrogen ที่ได้จาก nitrogen assimilation จาก sources ยัง sinks ในต้นพืช

ดังนั้นการสังเคราะห์ amino acids จึงสัมพันธ์กับ metabolism ต่างๆ ในพืช ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน จึงมักจะถูกควบคุมโดย metabolic, environment, และ develeopmental factors

- อย่างไรก็ตาม pathways ของการสังเคราะห์ amino acid ในพืช ในหลายส่วน อ้างอิงมาจาก pathway ที่เกิดขึ้นใน E. coli และ yeast จนปัจจุบันเรายังไม่ทราบว่าการสังเคราะห์ และกลไกควบคุมการสังเคราะห์ amino acid ในพืชเป็นอย่างไร
- อย่างไรก็ตาม ยังคงมีการศึกษาถึงกระบวนการสังเคราะห์ amino acid ในพืชโดยใช้ molecular biology techniques ใน Arabidopsis
- Amino acid pathways ในพืชจึงเป็นเป้าหมายสำคัญของการศึกษาในงานวิจัยพื้นฐานและประยุกต์ต่างๆ โดยเป้าหมายที่สำคัญ ได้แก่

  - กลไกควบคุมการสังเคราะห์ amino acid ในพืช

  - ศึกษาปัจจัยที่ควบคุมการสังเคราะห์ secondary compounds จาก amino acid precursors

  - manipulating amino acid synthesis pathways in transgenic plants เช่น

  - enzymes หลายชนิดใน pathways การสังเคราะห์ amino acid ถูกใช้เป็นเป้าหมายของยากำจัดวัชพืช -- จึงนำไปสู่การปรับเปลี่ยนยีนใน transgenic plant ให้ ต้านทางต่อยากำจัดวัชพืชดังกล่าว; ปรับเปลี่ยนพืชให้ต่านทานต่อ osmotic และ salt stress; เพิ่มสัดส่วนของกรดอะมิโนบางชนิดในโปรตีนของพืชอาหาร

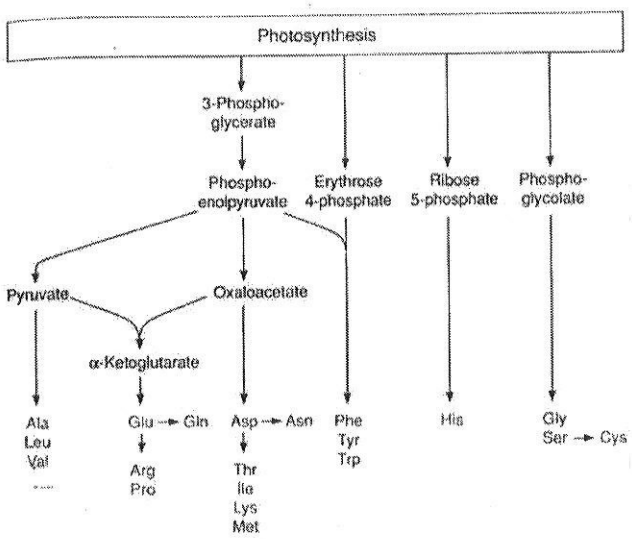
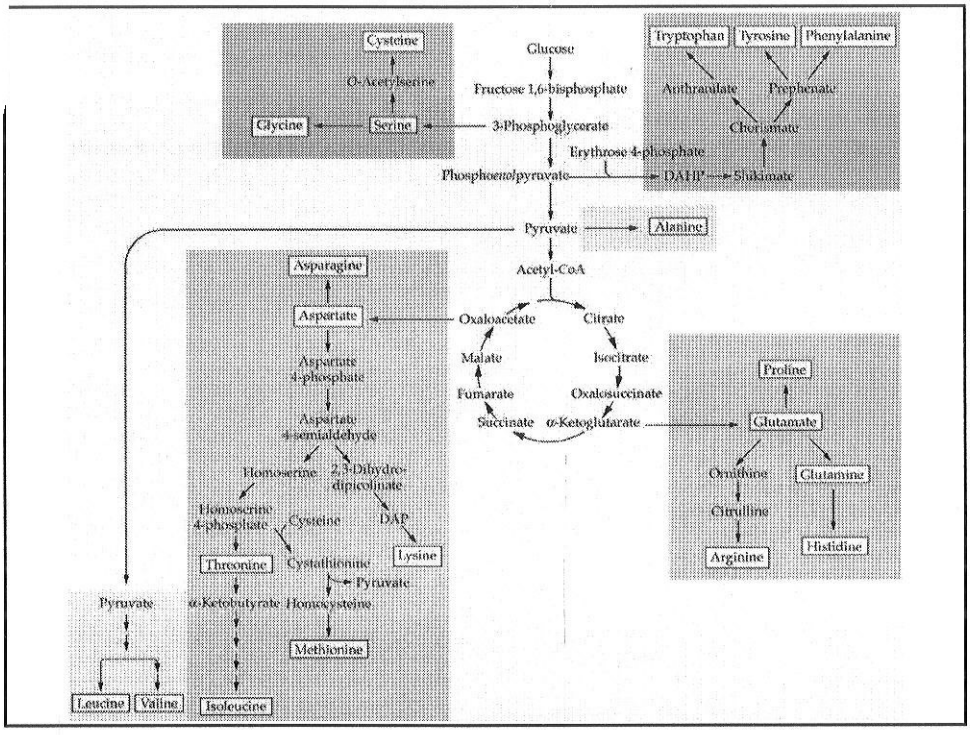
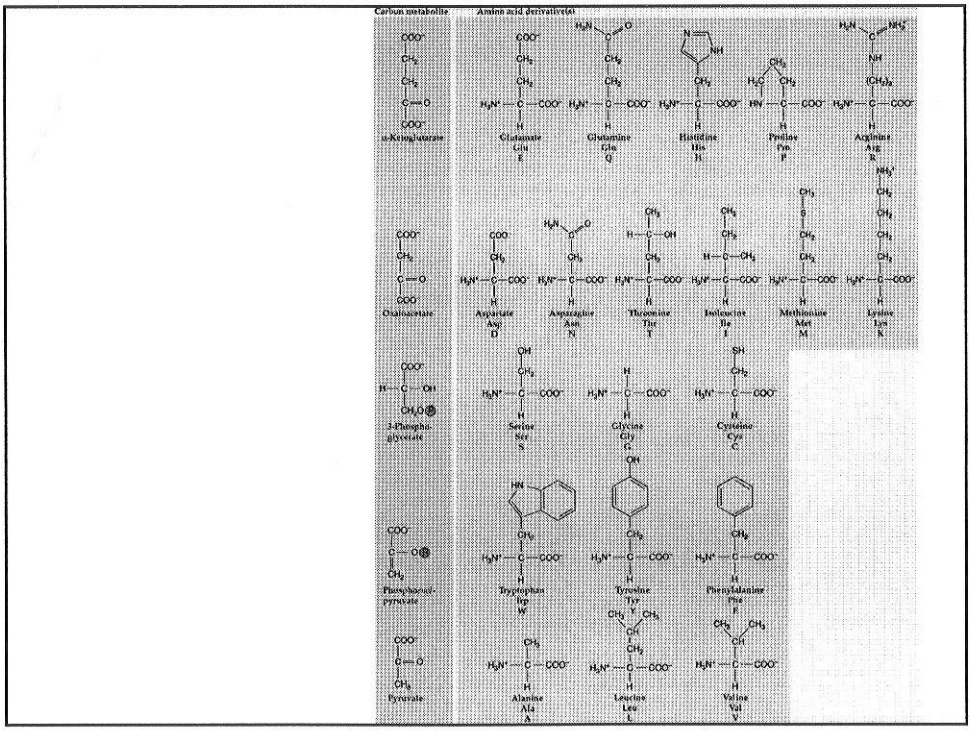


Figure 10.10 Origin of carbon skeletons for various amino acids.


Cysteine
O-Acetylserine
Glycine
Serine
Glucose
Fructose 1,6-bisphosphate
3-Phosphoglycerate
Erythrose 4-phosphate
Phosphoenolpyruvate
DAHP
Shikimate
Tryptophan
Tyrosine
Phenylalanine
Anthranilate
Prephenate
Chorismate
Pyruvate
Alanine
Asparagine
Aspartate
Acetyl-CoA
Oxaloacetate
Citrate
Malate
Isocitrate
Fumarate
Oxalosuccinate
Succinate
α-Ketoglutarate
Aspartate 4-phosphate
Aspartate 4-semialdehyde
Homoserine
2,3-Dihydro-dipicolinate
Homoserine 4-phosphate
Cysteine
DAP
Lysine
Threonine
Cystathionine
Pyruvate
α-Ketobutyrate
Homocysteine
Methionine
Leucine
Valine
Isoleucine
Proline
Glutamate
Ornithine
Glutamine
Citrulline
Arginine
Histidine


Carbon metabolite
Amino acid derivative(s)
α-Ketoglutarate
Glutamate
Glutamine
Histidine
Proline
Arginine
Oxaloacetate
Aspartate
Asparagine
Threonine
Isoleucine
Methionine
Lysine
3-Phospho-glycerate
Serine
Glycine
Cysteine
Phosphoenol-pyruvate
Tryptophan
Tyrosine
Phenylalanine
Pyruvate
Alanine
Leucine
Valine

1. การสังเคราะห์ Glutamine, Proline และ Arginine จาก glutamate

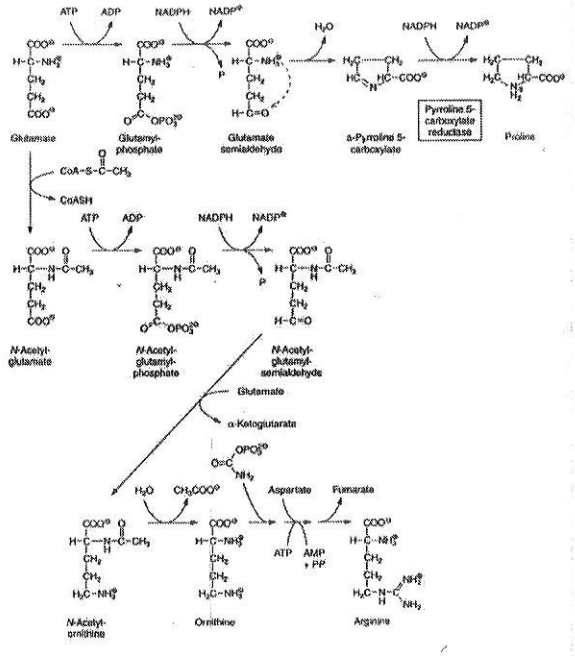


Figure 10.12 Pathway for the formation of amino acids from glutamate.

2. การสังเคราะห์ Asparagine, Lysine, Threonine และ Methionine จาก Aspatate

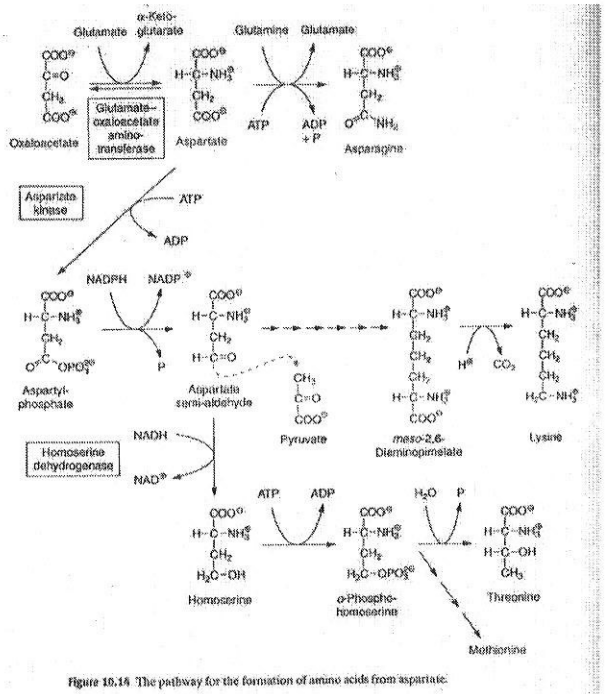


Figure 10.14 The pathway for the formation of amino acids from aspartate.

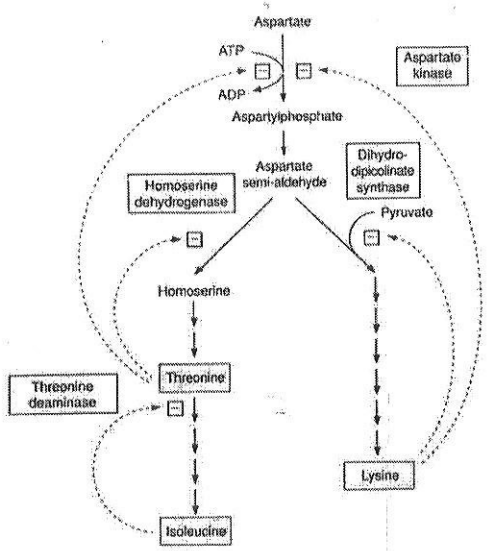


Figure 10.15 Feedback inhibition by end-products regulates the first enzyme for the synthesis of amino acids from aspartate according to demand. [−] indicates inhibition.

3. การสังเคราะห์ Leucine, Valine จาก Pyruvate และการสังเคราะห์ Isoleucine จาก Threonine

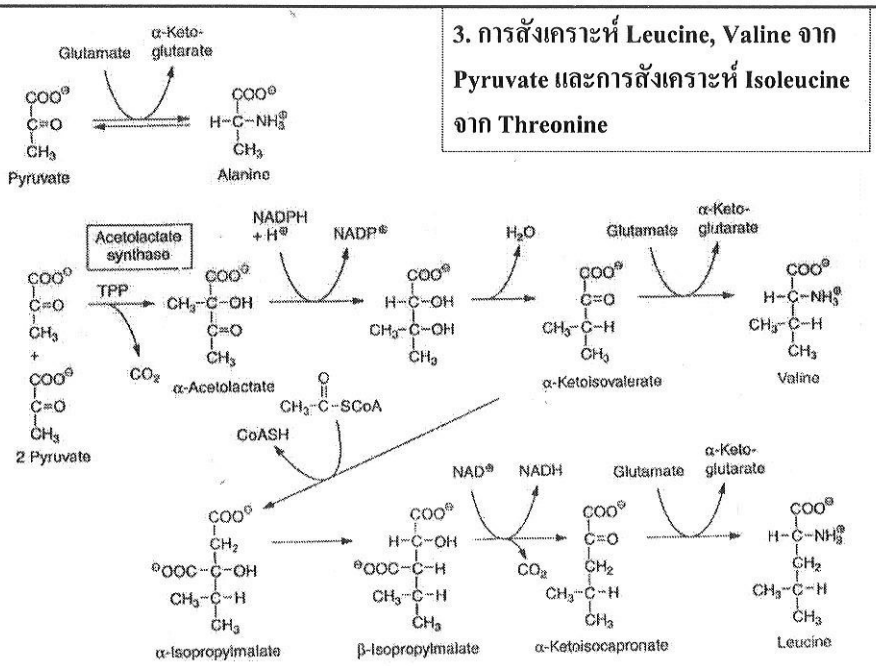


Figure 10.16A Pathways for the formation of amino acids from pyruvate.

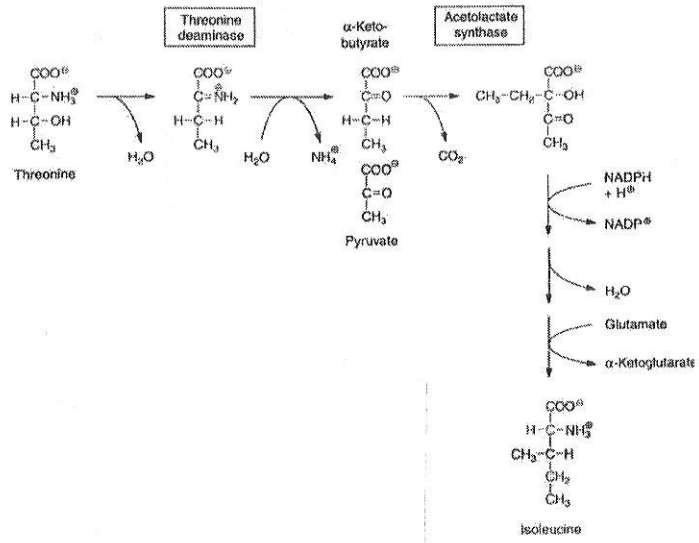


Figure 10.16B Pathways for the formation of amino acids from pyruvate.

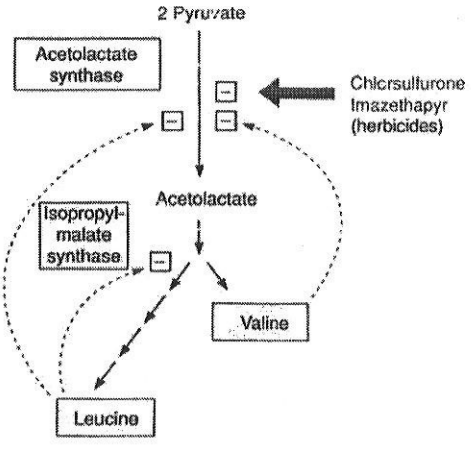
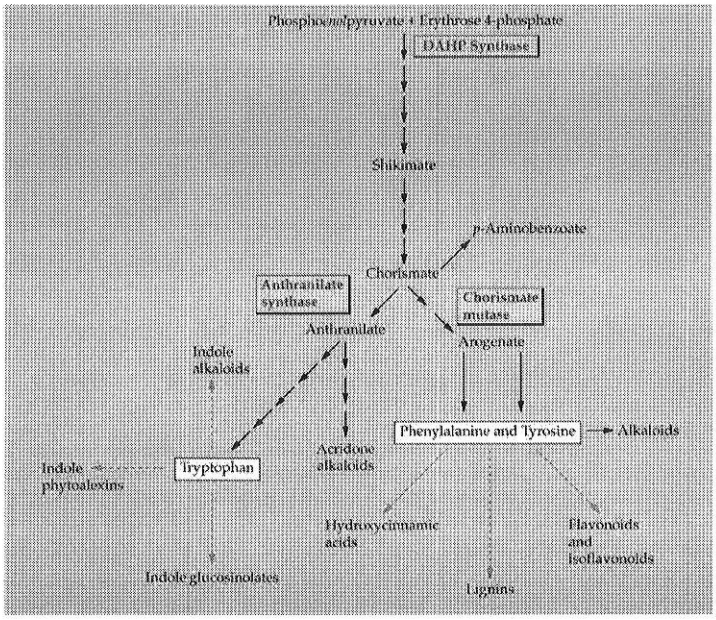


Figure 10.17 Synthesis of valine and leucine is adjusted to demand by the inhibitory effect of both amino acids on acetolactate synthase and the inhibition of isopropylmalate synthase by leucine. The herbicides chlorsulfurone and imazethapyr inhibit acetolactate synthase. ⊟ indicates inhibition.

การสังเคราะห์ Tryptophan, Phenylalanine, และ Tyrosine จาก PEP และ Erythrose 4-P



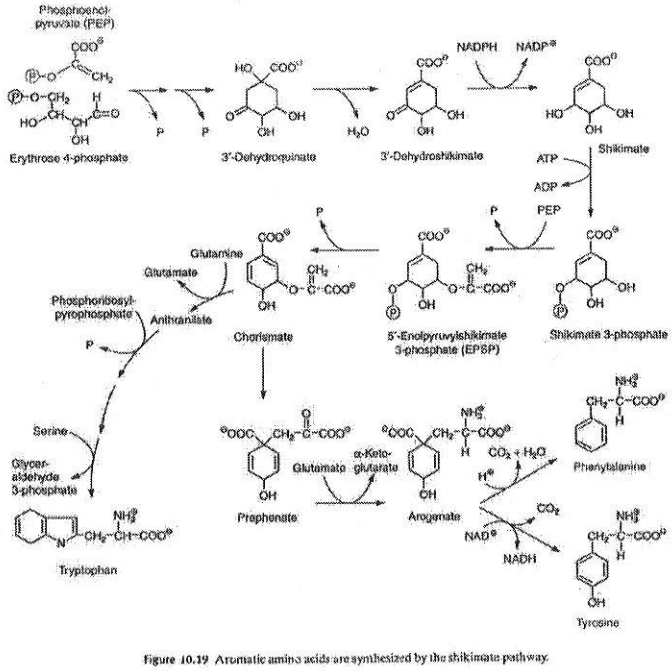


Figure 10.19 Aromatic amino acids are synthesized by the shikimate pathway.

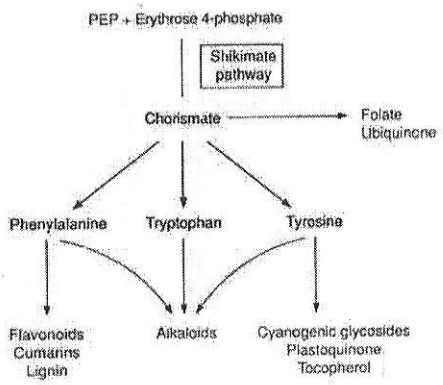


Figure 10.21 Several secondary metabolites are synthesized via the shikimate pathway.

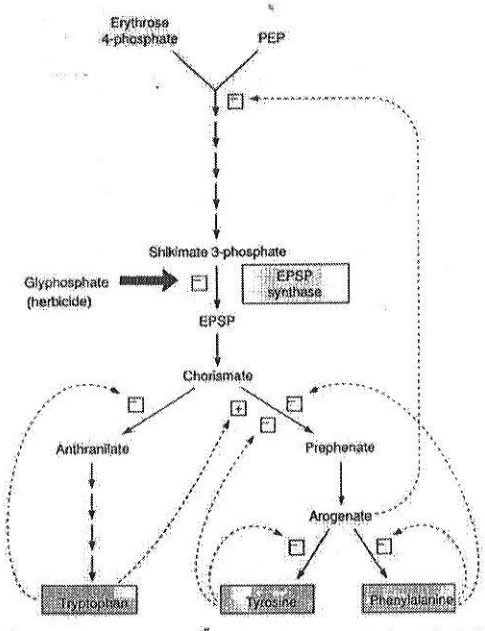
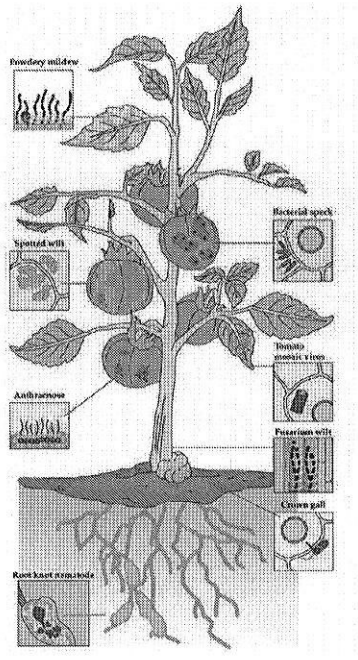


Figure 10.20 Several steps in the synthesis of aromatic amino acids are regulated by product feedback inhibition, thus adjusting the rate of synthesis to demand. Tryptophan stimulates the synthesis of tyrosine and phenylalanine [+]. The herbicide glyphosate (Fig. 10.19) inhibits EPSP synthase [−].

VII. RESPONSE TO PLANT PATHOGEN

Out line

1. Ways in which plant pathogen cause disease
2. Genetic basis of plant-pathogen interaction
3. Biochemistry of plant defense reactions



1. Ways in which plant pathogen cause disease

- บริเวณสัมผัสโรค (plant pathogen) มักจะอยู่บริเวณรากและใบของพืช
- เชื้อแต่ละชนิดได้มีการพัฒนาวิธีการที่จะบุกรุกเข้าไปในเซลล์พืช ซึ่งเกิดขึ้นได้หลายทาง เช่น mechanical pressure, ใช้เอนไซม์ย่อยผนังเซลล์, ผ่านเข้าไปทางปากใบ หรือบาดแผลบนต้นพืช
- เมื่อเชื้อเข้าไปในเซลล์พืชได้แล้ว จะใช้พืชเป็นแหล่งอาหาร และเพิ่มจำนวน
- แบ่งเชื้อออกได้ 3 กลุ่ม necrotrophy (cell death)
  biotrophy (use resource in live cell)
  hemibiotrophy
- กระบวนการตั้งแต่การบุกรุงเข้าเซลล์ (infection), เพิ่มจำนวน (colonization), และ สืบพันธุ์ (reproduction) รวมเรียกว่า การก่อโรค (pathogenesis) เชื้อที่ก่อโรคเรียก virulent

- การที่เชื้อสามามารถก่อโรคต่างๆ ในพืชได้ เกิดขึ้นจากหลายปัจจัย ดังนี้ :

- เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วและมีจำนวนสูงมากในระยะที่เริ่มมีการเพาะปลูกพืช
- เชื้อสามารถแพร่กระจายไปในที่ต่างๆ ได้ดี โดยอาศัย ลม, น้ำ, สิ่งมีชีวิตที่เป็นพาหะ
- เชื้อจะมีวิธีการสืบพันธ์ได้หลายแบบ โดยมากมักจะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) ในช่วงปลายของการเพาะปลูกพืช จากนั้นจะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น สร้าง spore เพื่อเพิ่มโอกาสในการอยู่รอดได้เป็นเวลานาน
- เชื้อมีประสิทธิภาพสูงมากในการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ซึ่งเป็นผลจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ จนได้ recombinant genotype ใหม่ๆ ที่เหมาะต่อการบุกรุกพืช
- การปลูกพืชแบบ Monoculture มักจะทำให้เชื้อเหล่านี้มีการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ๆ ได้เรื่อยๆ

เชื้อราโรคพืช (Fungal plant pathogens) มีวิธีการก่อโรคได้หลายวิธี

- มีเชื้อราน้อยกว่า 2% จาก เชื้อราทั้งหมด ~100,000 ชนิด ที่สามารถก่อโรคในพืชได้
  - Necrotrophic fungi : ใช้ toxins ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในพืช ทำให้เกิดการกระตุ้น cell death program ในพืช (Fig 1)
  - Biotrophic fungi : ใช้ haustorium เจาะทะลุ plasma membrane เข้าไปในเซลล์พืช (Fig 2)

เชื้อแบคทีเรีย (Bacteria pathogens)

- แบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Pseudomonas, Xanthomonas, Erwinia ซึ่งเป็น gram negative rod-shaped bacteria
- ส่วนใหญ่จะอาศัยใน intercellular space หรือใน xylem
- แบคทีเรียจะทำลายเนื้อเยื่อพืชโดยใช้ toxin หรือ extracellular polysaccharides และ cell-wall degrading enzymes (เช่น pectic enzymes)

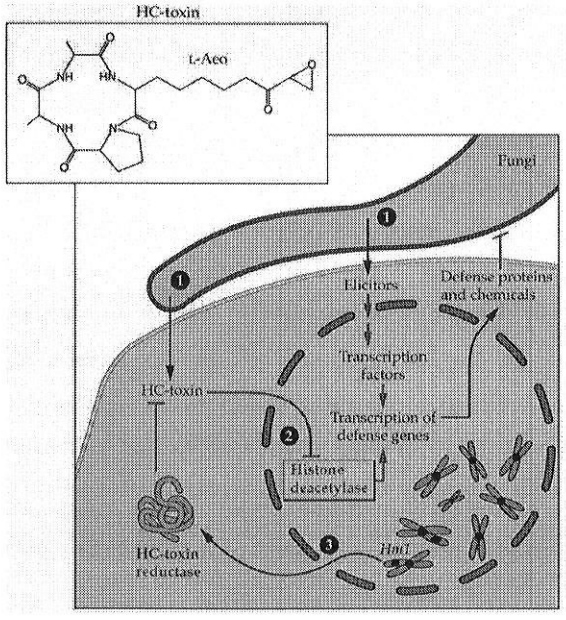


Fig 1

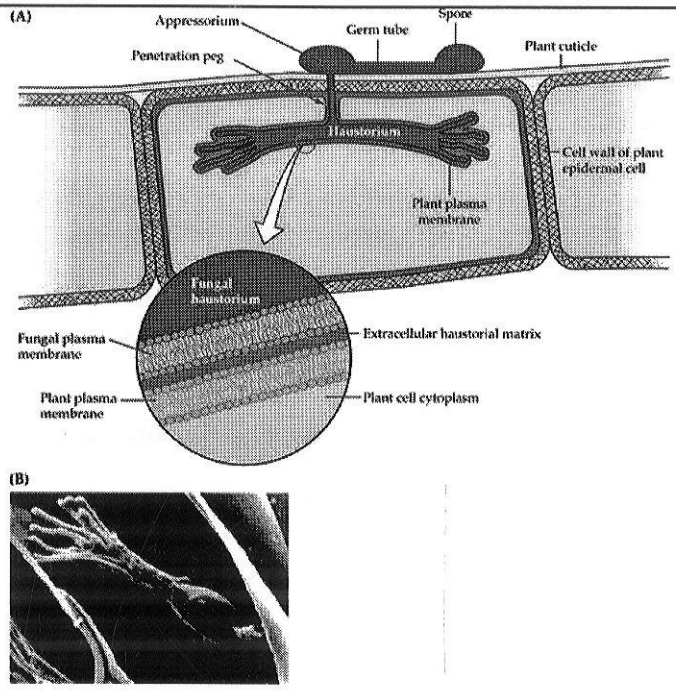


Fig2

4 สาเหตุหลักที่ทำให้เชื้อไม่สามารถก่อโรคในพืชได้สำเร็จ ได้แก่

1) ชนิดของพืชที่เชื้อบุกรุกเข้าไปไม่สามารถเป็นแหล่งอาหาร/ทรัพยากรอื่นๆ แก่เชื้อชนิดนั้นๆ ได้ เรียกพืชกลุ่มนี้ว่า nonhost

2) พืชมี structural barriers หรือ toxic compounds เพื่อใช้ต่อต้านเชื้อบางชนิด เรียกพืชกลุ่มนี้ว่า nonhost resistance

3) หากพืชสามารถจดจำเชื้อที่เข้ามาบุกรุกได้ ก็จะมีการกระตุ้นระบบป้องกันเซลล์พืช (defense response)ให้ทำงาน

4) การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทำให้เชื้อตายก่อนจะบุกรุกเซลล์พืชได้สำเร็จ

- เรียก 1-3 ว่า **genetic incompatibility**
- เชื้อที่บุกรุกเซลล์และก่อโรคได้สำเร็จเรียก **compatibility** ซึ่งจะเกิดขึ้นก็ต่อเมื่อสิ่งแวดล้อมเหมาะสม, defense mechanism ของพืชไม่สามารถต้านทานเชื้อได้, พืชไม่สามารถจดจำเชื้อได้, การกระตุ้นกลไกการป้องกัน (defense response) ของพืชไม่มีประสิทธิภาพ

2. Genetic basis of plant-pathogen interactions

• การต้านทานต่อโรคของพืช มักเกิดขึ้นจากการทำงานของ dominant resistance genes ในพืช แต่ก็มี recessive resistance genes บางชนิดทำงานด้วยเช่นกัน

• "The gene-for-gene model" เป็น ทษ ที่ระบุไว้ว่า การต้านทานโรคของพืชจะเกิดขึ้นเฉพาะกับพืชที่มี dominant resistance gene (R) ซึ่งผลิตผลของยีนนี้ จะสามารถจัดการกับโปรตีน/enzyme ซึ่งเป็นผลิตผลของ complementary avirulence gene (Avr) จากเชื้อได้ (Fig 3)

•โมเดลนี้เป็นจริงเฉพาะกับ biotrophic plant-pathogen แต่กลุ่มเชื้อ neutrophic จะใช้อีกโมเดลหนึ่ง (Fig 4)

• มี avirulence genes (Avr) เพียงไม่กี่ชนิด ที่ถูกแยกออกมาศึกษาถึงคุณสมบัติด้านต่างๆ

• Avr genes จัดเป็นยีนของเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคในพืชชนิดหนึ่งๆ (incompatibility) ส่วน avr gene จัดเป็นยีนก่อโรค (compatibility)

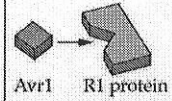
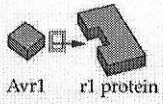
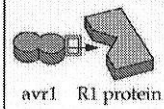
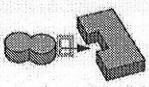
Pathogen genotype	Host plant genotype	
	R1	*r1*
Avr1	 Avr1 R1 protein No disease (Plant and pathogen are **incompatible.**)	 Avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are **compatible.**)
avr1	 avr1 R1 protein Disease (Plant and pathogen are **compatible.**)	 avr1 r1 protein Disease (Plant and pathogen are **compatible.**)

Fig 3

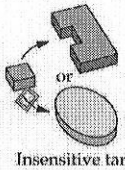
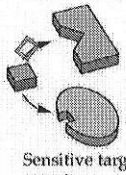
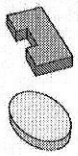
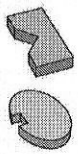
Pathogen genotype	Host plant genotype	
	RR or *Rr*	*rr*
Tox	Enzymatic detoxification  Insensitive target protein **No disease**	No enzymatic detoxification  Sensitive target protein **Disease**
tox	No toxin  **No disease**	No toxin  **No disease**

Fig 4

R genes และ disease resistance

- R proteins อาจจะทำหน้าที่พื้นฐาน 2 อย่าง : ทำหน้าที่จดจำ Avr gene และ กระตุ้นการส่งสัญญาณ ไปยังส่วนต่างๆ ในเซลล์เพื่อให้ defense system ทำงาน (Fig 5)
- ตั้งแต่ปี 1980 งานทดลองในหลายแห่งได้เริ่มต้นค้นหา R gene ชนิดต่างๆ แต่เนื่องจาก ณ ขณะนั้น ยังไม่สามารถศึกษาถึงบทบาททางชีวเคมีของ R gene product เหล่านี้ได้ งานวิจัยจึงมุ่งไปที่

1) หาตำแหน่งของ R gene บน chromosome โดยใช้ Quantitative trait loci ในประชากรพืช 2 กลุ่มคือพืชต้านทาน (resistant plant) และพืชอ่อนแอ (susceptible plant) ต่อโรค (Fig 6)

2) ค้นหาลำดับ nucleotide ของ R gene โดยวิธีการแทรก transposon (a mobile genetic element) เพื่อยับยั้งการทำงานของยีน อาจใช้ร่วมกับ binary cosmid แล้วตรวจดูลักษณะ resistance phenotype ในพืช (Fig 7)

- ระหว่างปี 1992-1999 มีการแยก R genes จาก monocot 3 ชนิด และ dicots 5 ชนิด R gene เหล่านี้ทำให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อชนิดต่างๆ โดยเชื้อส่วนใหญ่ไม่มีความสัมพันธ์ในทาง taxonomy เลย

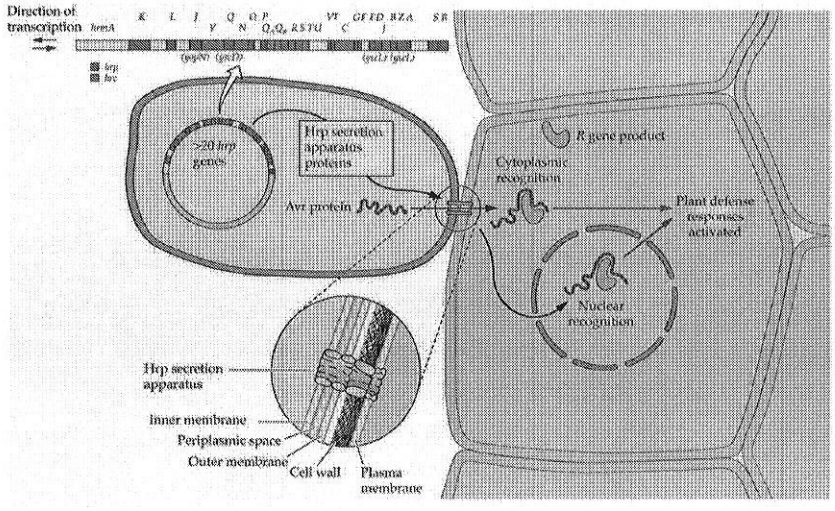


Fig 5

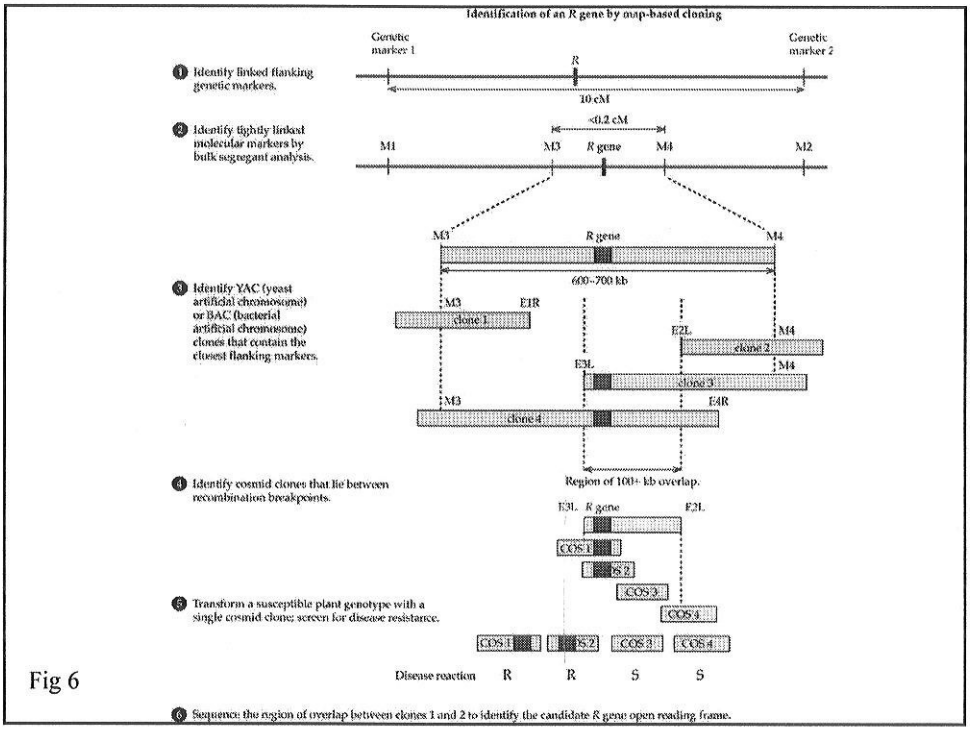

Identification of an R gene by map-based cloning
Genetic marker 1
Genetic marker 2
R
10 cM
1 Identify linked flanking genetic markers.
<0.2 cM
M1
M3
R gene
M4
M2
2 Identify tightly linked molecular markers by bulk segregant analysis.
M3
R gene
M4
600–700 kb
3 Identify YAC (yeast artificial chromosome) or BAC (bacterial artificial chromosome) clones that contain the closest flanking markers.
M3
E1R
clone 1
E2L
M4
clone 2
E3L
M4
clone 3
M3
E4R
clone 4
4 Identify cosmid clones that lie between recombination breakpoints.
Region of 100+ kb overlap.
E3L
R gene
E2L
COS 1
S 2
COS 3
COS 4
5 Transform a susceptible plant genotype with a single cosmid clone; screen for disease resistance.
COS 1
S 2
COS 3
COS 4
Disease reaction
R
R
S
S
6 Sequence the region of overlap between clones 1 and 2 to identify the candidate R gene open reading frame.

Fig 6

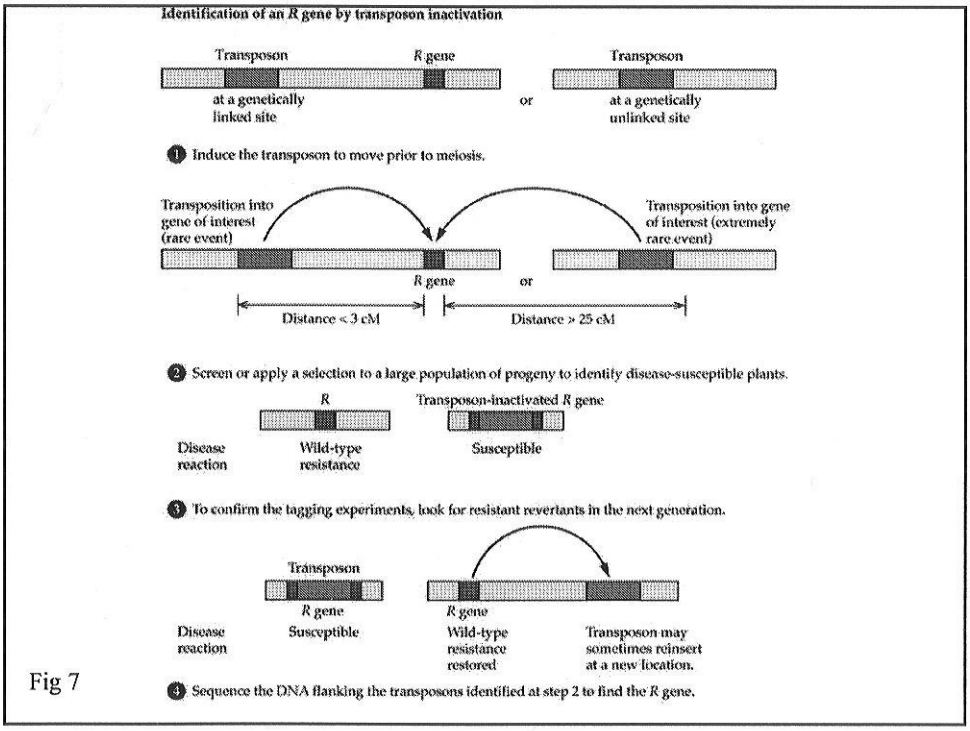

Identification of an R gene by transposon inactivation
Transposon
R gene
at a genetically linked site
or
Transposon
at a genetically unlinked site
1 Induce the transposon to move prior to meiosis.
Transposition into gene of interest (rare event)
Transposition into gene of interest (extremely rare event)
R gene
or
Distance < 3 cM
Distance > 25 cM
2 Screen or apply a selection to a large population of progeny to identify disease-susceptible plants.
R
Transposon-inactivated R gene
Disease reaction
Wild-type resistance
Susceptible
3 To confirm the tagging experiments, look for resistant revertants in the next generation.
Transposon
R gene
R gene
Disease reaction
Susceptible
Wild-type resistance restored
Transposon may sometimes reinsert at a new location.
4 Sequence the DNA flanking the transposons identified at step 2 to find the R gene.

Fig 7

- R protein ส่วนใหญ่มีโครงสร้าง leucine-rich repeats (LRRs) เป็นองค์ประกอบ LRR motifs นี้มักพบใน proteins ที่ทำหน้าที่ใน signal transduction pathways
- LRR motif (Fig 8)
  - สามารถแสดงถึง race-specific resistance (ลักษณะสายพันธุ์ต้านทานของพืช) (fig 21.26)
  - มีส่วนสำคัญใน protein-protein และ receptor-ligand interactions ในพืชหลายชนิด
  - The xxLxLxx region เป็นบริเวณพื้นผิวของโปรตีนที่สามารถจดจำ และมีโครงสร้างที่เหมาะกับที่จะจับกับผลิตผลของเชื้อ (pathogen-derived ligands) ที่มีโครงสร้างต่างๆ กันได้ (different binding specificities)
  - บางบริเวณของ LRR motif อาจเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณไปกระตุ้นให้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ defense response ทำงาน
  - มี nucleotide-binding site (NBS) ซึ่งมี conserved motifs อยู่หลายบริเวณ แต่ยังไม่ทราบถึงหน้าที่
- อย่างไรก็ตาม ยังไม่ทราบว่า R และ Avr gene products กระตุ้นการทำงานของ plant defense responses ได้อย่างไร

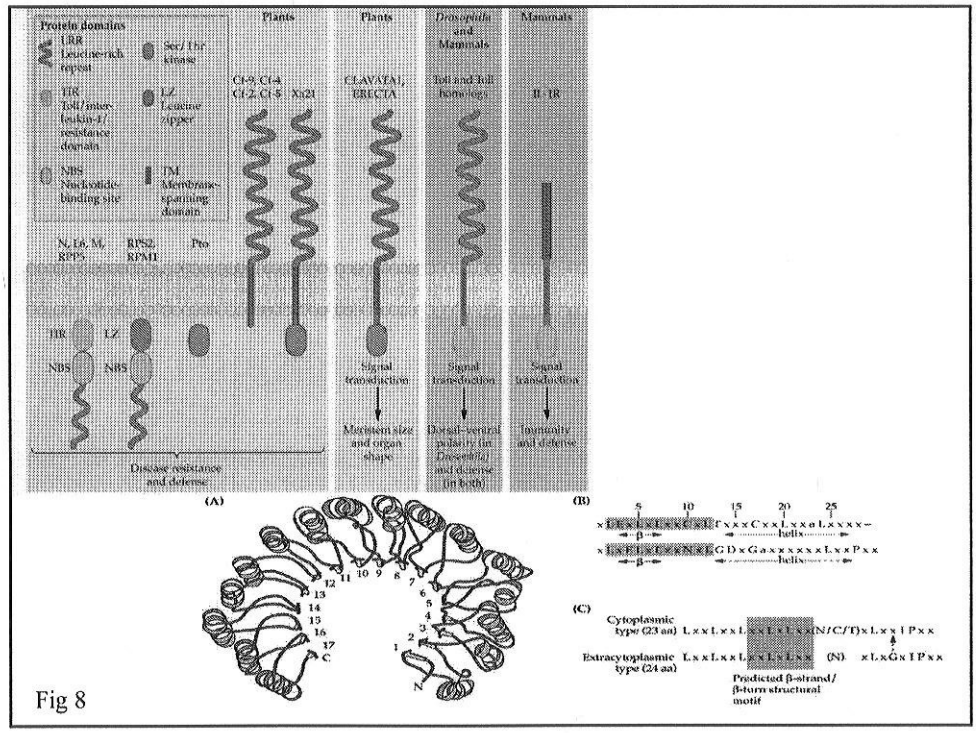


Fig 8

ความผันแปรของลำดับ DNA ของ R gene loci

- เชื้อโรคพืชหลายชนิดสามารถ mutate จาก avirulence (สายพันธุ์ไม่ก่อโรค)ไปเป็น virulence (สายพันธุ์ก่อโรค) ซึ่งช่วยให้มันสามารถต้านทานกับ R gene ได้ โดยวิวัฒนาการนี้สามารถเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว *พืชจะตอบสนองต่อวิวัฒนาการของเชื้อสายพันธุ์ใหม่ ที่เกิดขึ้นในลักษณะนี้ได้อย่างไร ?*
- ประชากรพืชป่า (wild plant) มีกระบวนการปรับเปลี่ยนลำดับ DNA (polymorphism) ของ R gene loci (เฉพาะเท่าที่ศึกษาและทราบชนิดแล้ว) จนเกิดเป็น R gene แบบใหม่ๆ ขึ้นมา ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในอัตราที่สูงกว่าบริเวณ gene loci อื่นๆ ดังนั้นโอกาสที่เชื้อก่อโรคสายพันธุ์ใหม่จะสามารถทำลายพืชจึงมีน้อย
- ดังนั้นเชื้อก่อโรคสายพันธุ์ใหม่จะทำลายพืชได้สำเร็จต่อเมื่อ ในประชากรพืชเหล่านั้นมี R gene อยู่น้อย และมีวิวัฒนาการของ R gene loci ต่ำ จึงทำให้ไม่สามารถจดจำ และจัดการกับ Avr gene ใหม่ๆ ได้

จากการศึกษาโดยใช้ genetic and molecular analysis เพื่อวิเคราะห์ความผันแปรของ DNA sequence ตรงบริเวณ R gene loci (Fig 9, 10) พบว่า

- R genes เกือบทั้งหมดจัดอยู่ในกลุ่ม multigene families ซึ่งเรียงอยู่ติดๆ กันเป็นกลุ่มตรงบริเวณใดบริเวณหนึ่งบน chromosome จนเกิดเป็น complex R gene locus ความผันแปรของ R gene กลุ่มนี้ในพืชชนิดเดียวกันจะสูงมาก
- R gene อีกส่วนหนึ่งจะอยู่เป็น ยีนเดี่ยวๆ ในบางบริเวณบน chromosome เรียกบริเวณนี้ว่า simple R gene locus ความผันแปรของ R gene กลุ่มนี้ในพืชชนิดเดียวกันจะมีน้อยมาก

- ความผันแปรของ R gene sequence เกิดขึ้นได้อย่างไร ?

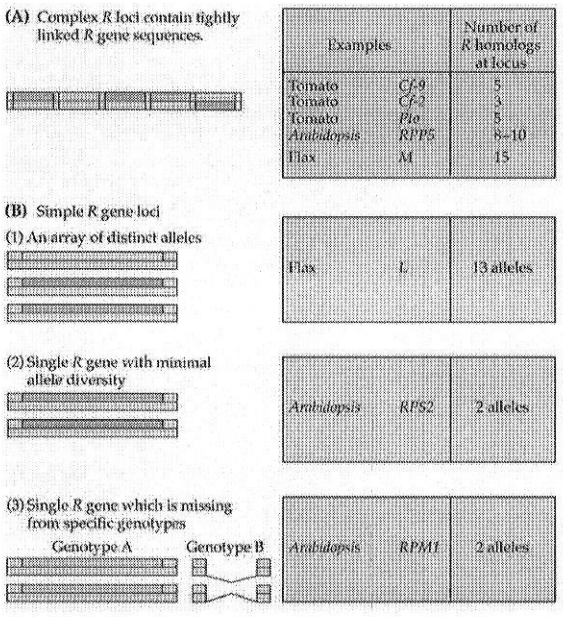

(A) Complex R loci contain tightly linked R gene sequences.
Examples
Number of R homologs at locus
Tomato Cf-9 5
Tomato Cf-2 3
Tomato Pto 5
Arabidopsis RPP5 8–10
Flax M 15
(B) Simple R gene loci
(1) An array of distinct alleles
Flax L 13 alleles
(2) Single R gene with minimal allele diversity
Arabidopsis RPS2 2 alleles
(3) Single R gene which is missing from specific genotypes
Genotype A
Genotype B
Arabidopsis RPM1 2 alleles

Fig 9

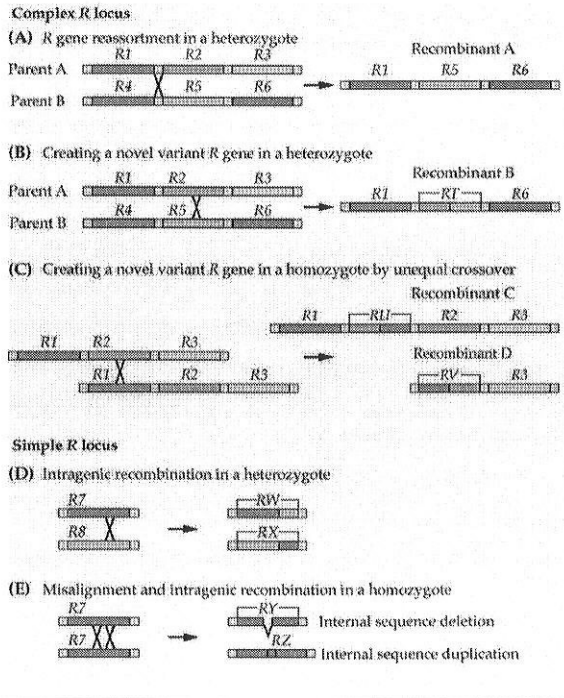
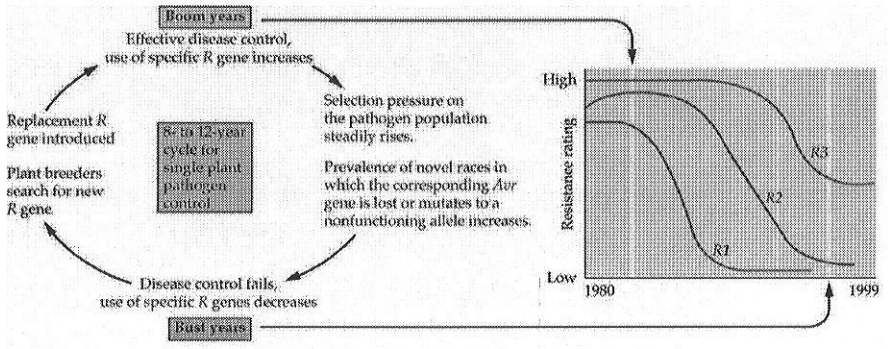

Complex R locus
(A) R gene reassortment in a heterozygote
Parent A
Parent B
Recombinant A
(B) Creating a novel variant R gene in a heterozygote
Recombinant B
(C) Creating a novel variant R gene in a homozygote by unequal crossover
Recombinant C
Recombinant D
Simple R locus
(D) Intragenic recombination in a heterozygote
(E) Misalignment and intragenic recombination in a homozygote
Internal sequence deletion
Internal sequence duplication

Fig 10



3. Biochemistry of plant defense reactions

- ความต้านทานต่อโรคพืช สัมพันธ์กับกระบวนการกระตุ้นการทำงานของ defense mechanisms ให้เกิดขึ้นในหลายรูปแบบ และหลายระดับ (ดู Fig 11)
- การตอบสนองเหล่านี้มักเกี่ยวข้องกับ

  1) การกระตุ้น transcription ของ defense-related genes หลายชนิด ซึ่งทำได้หลายวิธีได้แก่

  - opening of ion channels
  - modifications of protein phosphorylation status
  - activation of preformed enzymes to undertake specific modifications to primary and secondary metabolism (Box 21.8)

  2) การผลิต secondary signaling molecules เพื่อสื่อสัญญาณให้เกิดการประสานงานกันใน defense system

- โดยทั่วไป พืชมักจะตอบสนองต่อเชื้อแบบ broad-spectrum defense response กับเชื้อแทบทุกชนิด (เท่าที่ศึกษาได้)

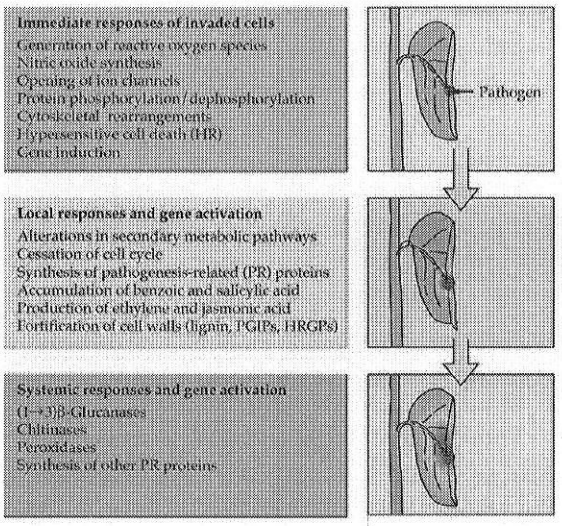

Immediate responses of invaded cells
Generation of reactive oxygen species
Nitric oxide synthesis
Opening of ion channels
Protein phosphorylation / dephosphorylation
Cytoskeletal rearrangements
Hypoesensitive cell death (HR)
Gene induction
Local responses and gene activation
Alterations in secondary metabolic pathways
Cessation of cell cycle
Synthesis of pathogenesis-related (PR) proteins
Accumulation of benzoic and salicylic acid
Production of ethylene and jasmonic acid
Fortification of cell walls (lignin, PGIPs, HRGPs)
Systemic responses and gene activation
(1→3)β-Glucanases
Chitinases
Peroxidases
Synthesis of other PR proteins
Pathogen

Fig 11

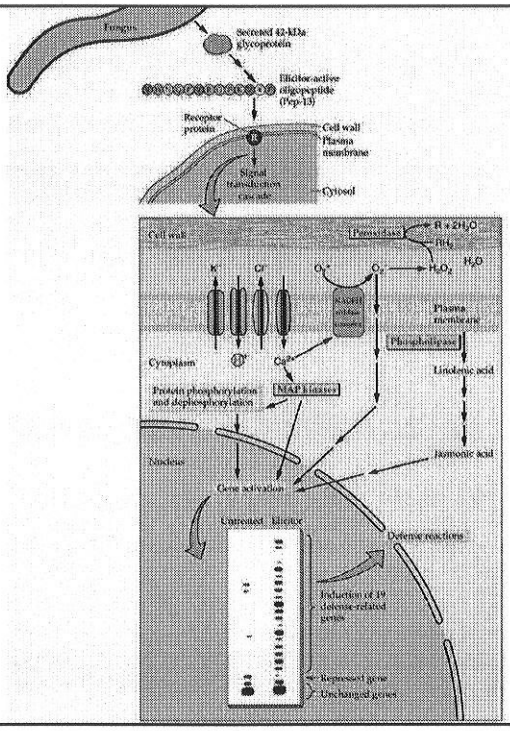

Fungus
Secreted 42-kDa glycopeptein
Elicitor-active oligopeptide (Pep-13)
Receptor protein
Cell wall
Plasma membrane
Signal transduction cascade
Cytosol
Cell wall
Peroxidase
Cl⁻
Cytoplasm
Plasma membrane
Phospholipase
Linolenic acid
Protein phosphorylation and dephosphorylation
MAP kinases
Nucleus
Jasmonic acid
Gene activation
Defense reactions
Induction of 19 defense-related genes
Unchanged genes

Fig 11

ระบบป้องกันเซลล์พืช (Defense systems)

- เป็นกลไกการตอบสนองของพืชต่อเชื้อโรคเพื่อป้องกันพืชไม่ให้ถูกทำลาย
- พืชจำเป็นต้องมีกลไกการจดจำและจำแนก signal ที่อยู่ภายในเซลล์พืชเอง และ signal ที่มาจากเชื้อที่เข้ามาบุกรุก เพื่อจะทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ defense system ให้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วตรงบริเวณที่ถูกเชื้อบุกรุก
- ความสามารถในการจดจำ genetically incompatible pathogen เป็นผลให้เกิดการกระตุ้นกระบวนการ defense responses เพื่อทำให้เซลล์พืชสามารถปรับสภาวะภายในเซลล์ให้ไม่เหมาะต่อการเติบโตและเพิ่มจำนวนของเชื้อ ในขณะเดียวกันระบบป้องกันนี้จะกำจัด toxin และ enzyme อันตรายต่างๆที่ปล่อยออกมาจากเชื้อ

Plant defense systems มีรูปแบบต่างๆ ดังนี้

1) Hypersensitive response (Hr) results in rapid locallized cell death
2) Reactive oxygen species are often produced during the early stages of a plant resistance response
3) Production of nitric oxide, a signaling molecule in mammals, is induced during incompatible interactions in plants.
4) Cell wall fortifications and extracellular activities contribute to plant disease resistance responses.
5) Benzoic acid, Salicylic acid, Jasmonic acid and ethylene
6) PR protein
7) Phytoalexins

1) Hypersensitive response (HR) results in rapid locallized cell death

- การตอบสนองเหล่านี้จะเกิดขึ้นภายใน 24 ชม ซึ่งจะทำให้เซลล์ที่ถูกเชื้อบุกรุกตายลง เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อแพร่กระจายไปยังเซลล์อื่นๆ
- เรียกกระบวนการกระตุ้นกลไกป้องกันที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เพื่อทำให้เกิดการตายของเซลล์นี้ว่า hypersensitive response (HR)
- การเกิด HR เกิดจาก 2 กลไก ซึ่งมีประสิทธิภาพมาก ได้แก่

1) การที่เชื้อบุกรู้โจมเซลล์พืชจะทำให้ cell death program เริ่มทำงาน

2) เซลล์ที่ถูกรู้โจมหรือเซลล์ข้างเคียงจะผลิตสารพิษ และ Free radicals ขึ้นอย่างรวดเร็วเพื่อทำลายเซลล์ที่ถูกบุกรุก และเชื้อโรค

ดู Fig 12, 13

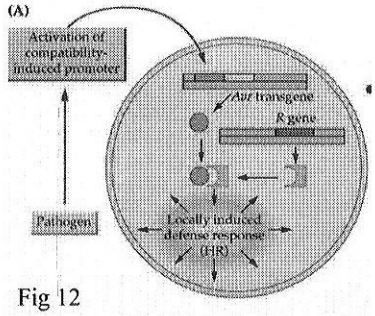


Fig 12

2) Reactive oxygen species are often produced during the early stages of a plant resistance response

- เมื่อถูกเชื้อบุกรุก เซลล์พืชหลายชนิดจะผลิต reactive oxygen sp (ROS) เป็นปริมาณมาก มักจะเป็นปฏิกิริยาตอบสนองแรกที่ตรวจพบ โดนเกิดขึ้นภายใน 5 นาที ROS ส่วนใหญ่ที่พบเป็น O_2^- และ H_2O_2
- ROS มีบทบาทใน defense response (Fig 13) เช่น

H_2O_2 - อาจเป็นพิษต่อเซลล์เชื้อโรค (รวมทั้งพืชด้วย) ซึ่งทำให้เกิดการตายของเซลล์

- มีส่วนร่วมในการปรับเปลี่ยนโครงสร้างของผนังเซลล์พืชให้ต้านทานไม่ให้เชื้อเจาะทะลุเข้ามาในเซลล์ (อาจช่วยในการเกิด cross-linking ของ hydroxyproline และ proline-rich glycoproteins กับ polysaccharide matrix หรือเพิ่มอัตราการสร้าง lignin)
- อาจเป็นตัวส่งสัญญาณระหว่างเซลล์
- กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้สังเคราะห์ Salicylic acid (SA)
- ชักนำการแสดงออกของยีนของโปรตีนที่มีส่วนร่วมในการปกป้องเซลล์พืช

- ROS อาจจะเปลี่ยน redox balance ในเซลล์ที่เข้าร่วมในการตอบสนอง โดยมีส่วนในการควบคุม transcription factor

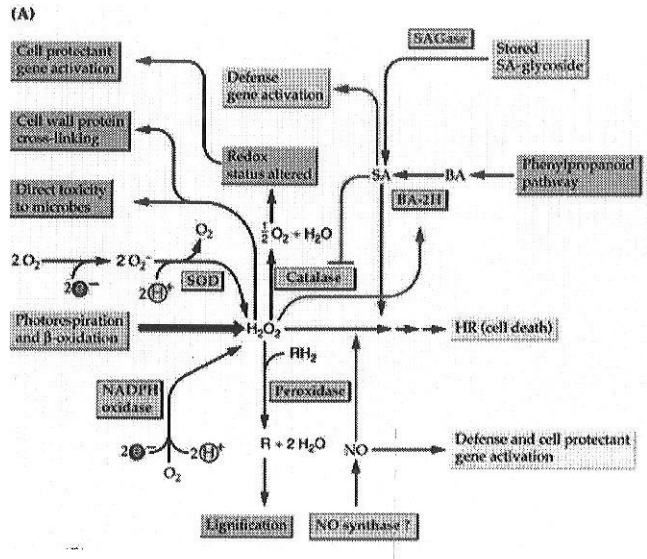


Fig 13

3) Production of nitric oxide, a signaling molecule in mammals, is induced during incompatible interactions in plants.

- NO เป็น signal molecule ที่ใช้ใน mammals เพื่อควบคุม biological processes ของระบบ immune, nervous, และ vascular systems
- ในพืช NO มีส่วนชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ร่วมกับ ROS (Fig 13)
- NO สามารถยับยั้ง catalase และ ascorbate peroxidase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ทำลาย H_2O_2
- NO ยังชักนำให้เกิดการเพิ่มปริมาณการสังเคราะห์ mRNAa ของยีนหลายชนิดที่เข้าร่วมใน การปกป้องเซลล์
- การยับยั้งการสร้าง NO ใน transgenic plant พบว่า HR ลดลง และความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น

4) Cell wall fortifications and extracellular activities contribute to plant disease resistance responses.

ขณะที่เชื้อกำลังเจาะทะลุเข้ามาในเซลล์พืช พืชจะสร้าง (Fig 14) papillae ซึ่งประกอบไปด้วย callose [(1-3) Beta-glucan polymers] และ lignin ขึ้นมาป้องกันไม่ให้เชื้อบุกเข้ามาในเซลล์

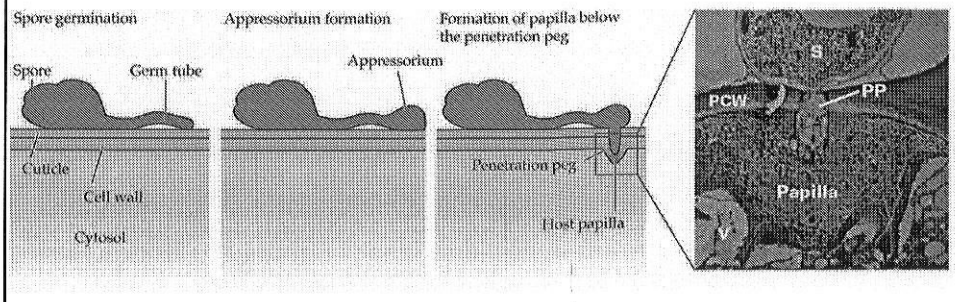


Fig 14

5) Benzoic acid, SA, Jasmonic acid and ethylene

- BA (phenolic cpd), และ SA (salicylic acid) จะถูกสังเคราะห์ขึ้นในทันทีที่เซลล์พืชถูกบุกรุก สารทั้ง 2 ชนิดสังเคราะห์มาจาก Phynylpropanoid pathway Trangenic plant ที่มีปริมาณ SA ต่ำๆ พบว่า R gene ทำงานน้อยลง
- JA เป็น oxylipin-like hormone สังเคราะห์ขึ้นจาก oxygenated linolenic acid JA จะถูกสังเคราะห์ในปริมาณขณะที่เซลล์พืชถูกบุกรุก
- ทั้ง SA และ JA ทำหน้าที่ชักนำให้ defense genes ทำงาน
- นอกจากนี้ JA และ Ethylene ยังเป็นส่วนสำคัญที่กระตุ้นการทำงานของ protease inhibitor genes และ Pathogen resistant (PR) genes และ chitinase genes

6) Pathogen resistant protein (PR)

- ใน incompatible interaction การ transcription ของ PR genes และ defense-related genes จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเซลล์ได้รับเชื้อตั้งแต่ 1 นาที- 1 ชม แต่ใน compatible interaction การเกิด transcription ของ ยีนดังกล่าวจะเกิดขึ้นเช่นกัน แต่อยู่ในระดับต่ำ และช้ามาก
- PR proteins บางชนิด เช่น chitinases และ glucanases สามารถย่อยสลาย polysachharides ของ cell walls ของเชื้อรา และลดการเจริญเติบโตของเชื้อราได้ (Fig 14)
- PR genes หลายชนิดถูกกระตุ้นการทำงานโดย SA, JA, ehtylene

7) Phytoalexin (Fig 15)

- Phytoalexins เป็น lipophilic antimicrobial compounds มักจะสะสมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วตรงบริเวณที่เซลล์ถูกบุกรุก
- การสังเคราะห์ phytoalexins จะเกิดขึ้นหลังจาก primary metabolic precursors ถูกปรับมาเพื่อใช้ใน secondary metabolic pathway
- การสังเคราะห์ phytoalexins จำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดเข้าร่วม ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยการประสานงานผ่าน signal transduction ภายในเซลล์ ส่วนใหญ่ยีนของเอนไซม์เหล่านี้จะมีตำแหน่ง *cis-acting DNA sequence element* ภายในบริเวณ promoter ของ gene จึงทำให้การควบคุมผ่าน signal transduction เกิดขึ้นได้ดี

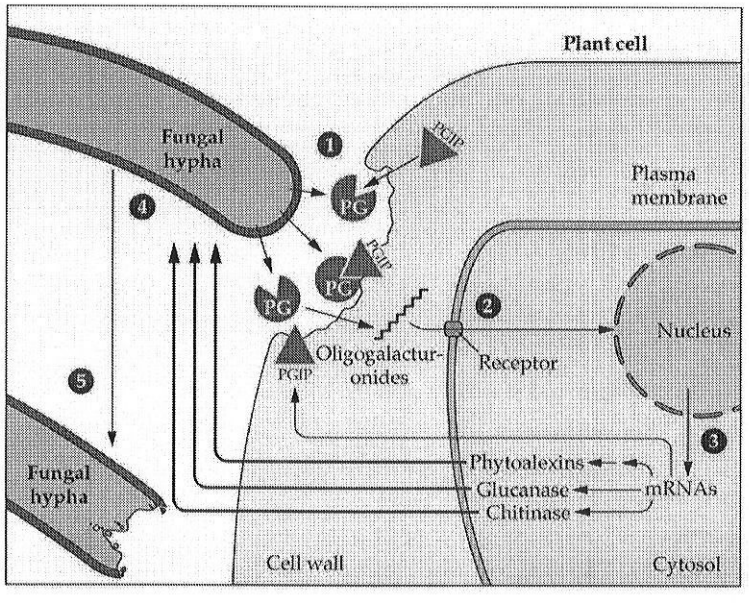


Fig 15

Parallel signaling pathways coordinate the complex, highly localized plant defense responses.

- ภาพรวมของ signal transduction pathways ซึ่งมีความสำคัญต่อการกระตุ้นและประสานงานกันของส่วนต่างๆในเซลล์พืชเพื่อให้เกิด defense responses ดังแสดงใน Fig 16

ลักษณะโดยทั่วไปของการกระตุ้น defense response มีดังนี้

1) ภายในเวลาเพียง 1 นาที เซลล์พืชแต่ละเซลล์จะถูกปรับจาก primary metabolism มาเป็น secondary metabolism defense pathways และมีการกระตุ้น defense enzymes และ genes ต่างๆ เกิดขึ้น และทุกๆ บริเวณภายในเซลล์จะถูกปรับเข้าสู่ defense mode

2) ตัวควบคุมกระบวนการ defense response มีหลายชนิด ได้แก่ ion channels, phosphorylation/dephosphorylation , รวมทั้ง signaling molecules ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาใหม่ (H_2O_2, NO, ethylene, และ JA)

3) การทำงานของระบบต่างๆ ซึ่งได้แก่ signaling pathways และ metabolic pathways จะมีทั้งแบบ Synergies, antagonisms, และ positive- negative feedback loops จนเกิดเป็น complex network ที่มีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์พืชไม่ให้ถูกทำลาย

- The plant defense signal transduction net work จะเชื่อมโยงและสัมพันธ์กับ stress-response pathways อื่นๆของพืช

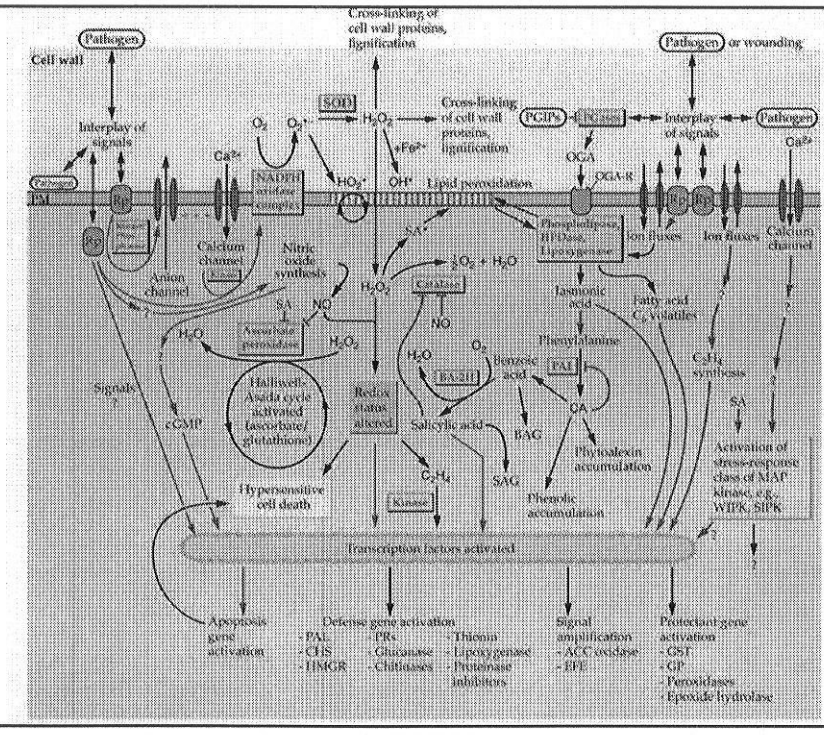


Fig 16

ศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี