

BEATA MYŚLIWA-KURDZIEL, MICHAŁ GABRUK

*Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin
Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii UJ
Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
E-mail: b.mysliwa-kurdziel@uj.edu.pl
michal.gabruk@uj.edu.pl*

BIOSYNTETA CHLOROFILU: DWA MECHANIZMY REDUKCJI PROTOCHLOROFILIDU

WPROWADZENIE

Fotosynteza, wieloetapowy i złożony proces zachodzący w organizmach autotroficznych, w którym dochodzi do syntezy materii organicznej z dwutlenku węgla przy wykorzystaniu energii promieniowania elektromagnetycznego docierającego do Ziemi ze Słońca, jest podstawą życia na Ziemi. Barwnikami, które absorbują światło i umożliwiają zamianę tej zaabsorbowanej energii w użyteczną dla nas energię chemiczną, są chlorofile w przypadku sinic, glonów i roślin oraz bakteriochlorofile w przypadku bakterii fotosyntetyzujących. Rocznie absorbowane przez nie jest ponad 3 000 miliardów miliardów dżuli energii (3×10^{21} J) (NEALSON i CONRAD 1999). Trudno objąć wyobraźnią tak abstrakcyjnie duże liczby. Odpowiada to energii zawartej w ponad 0,8 milionów miliardów litrów benzyny ($8,53 \times 10^{17}$ l). Gdybyśmy dysponowali samochodem spalającym 7 litrów benzyny na 100 km, nieskończenie długim życiem i autostradą w kosmiczną przestrzeń to, wykorzystując ilość energii zużywanej do ziemskiej fotosyntezy w czasie czterech lat, w naszym zasięgu byłyby trzy duże galaktyki i 37 mniejszych. W sumie około 700 000 000 000 gwiazd¹ (700 mld).

Zamiast na transgalaktyczne podróże, autotrofy wykorzystują tę energię do syn-

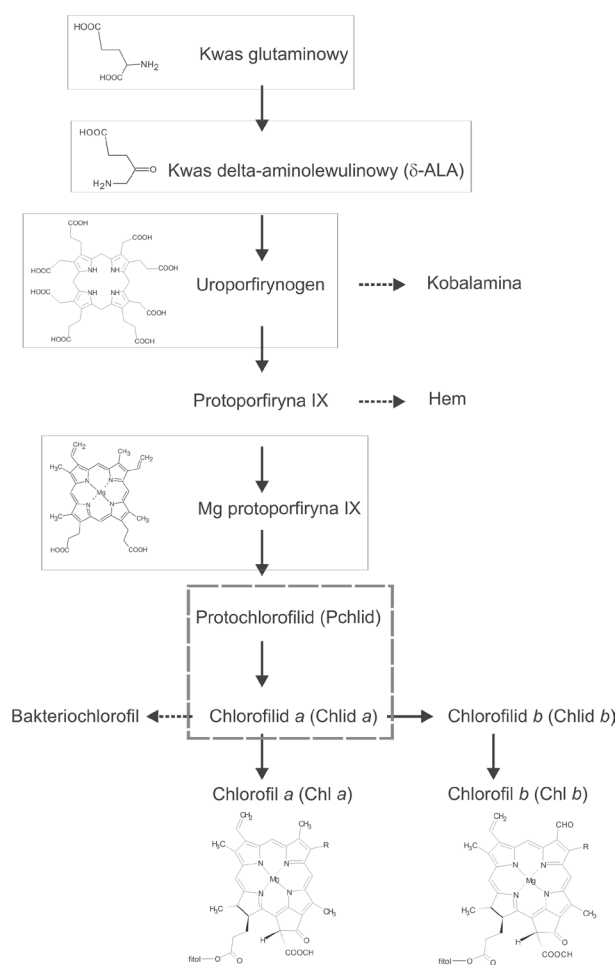
tezy cząsteczek organicznych. Roczny przyrost ich biomasy (po odliczeniu „strat” energii wykorzystanej na własne procesy życiowe) szacowany jest na $104,9 \times 10^{15}$ g, z czego większość (53,8%) to produkcja lądowa, a reszta (46,2%) – morska (FIELD i współaut. 1998). Biomasa ta stanowi źródło energii, a zatem podstawę egzystencji dla niemal wszystkich heterotroficznych organizmów na naszej planecie, w tym dla człowieka. Globalna ilość syntetyzowanego chlorofilu (odpowiadająca ilości degradowanego) jest co do rzędu wielkości równa łącznej masie wszystkich żyjących dziś ludzi i wynosi około 10^{14} g rocznie (HENDRY i współaut. 1987), co wystarczy do pokrycia każdego metra kwadratowego Ziemi (łącznie lądy i oceany) prawie 0,2 gramami chlorofilu.

Wyżej przedstawione dane oznaczają, że w każdej sekundzie na świecie wytwarzane są prawie 3,2 tony chlorofilu. Wieloetapowy szlak syntezy tego związku jest przedmiotem licznych badań, podsumowanych ostatnio w kilku pracach przeglądowych (WILLOWS 2003, ECKHARDT i współaut. 2004, BOLLIVAR 2006, MASUDA 2008, MASUDA i FUJITA 2008).

¹<http://wszechswiat.astrowww.pl/copyright.html>

BIOSYNTeza CHLOROFILU

Początkowe etapy tego szlaku przebiegają podobnie do odpowiednich etapów biosyntezy innych tetrapiroli, m. in. hemu i kobalaminy, zarówno w komórkach roślin, glonów jak i wielu gatunków bakterii (Ryc. 1). Enzymy katalizujące poszczególne reakcje tego szlaku w różnych organizmach, od bakterii do roślin wyższych, wykazują duży stopień homologii. Pierwszym wspólnym związkim pośrednim biosyntezy tetrapiroli jest kwas delta-aminolewulinowy (δ -ALA). Dwie cząsteczki δ -ALA ulegają dehydratacji, tworząc



Ryc. 1. Uproszczony schemat biosyntezy chlorofilu: Chl *a* i Chl *b*.

Wskazano miejsca odgałęzienia szlaków biosyntezy innych tetrapiroli: hemu, kobalaminy oraz bakteriochlorofilu. Wyróżniony fragment szlaku biosyntezy Chl, tj. redukcja protochlorofilidu do chlorofilidu, przedstawiony na rycinie 2, jest tematem niniejszej pracy. R – oznacza $\text{CH}=\text{CH}_2$ oraz CH_2-CH_3 odpowiednio dla diwinylowych i monowinylowych form Chl *a* i Chl *b*.

porfobilinogen, heterocykliczny związek stanowiący punkt wyjścia do syntezy porfiryń. W wyniku kolejnych reakcji osiem cząsteczek δ -ALA ulega przekształceniu do protoporfiryny IX.

Warto wspomnieć, że np. u ssaków synteza hemu przebiega analogicznie jak u roślin, z wyjątkiem reakcji inicjacji (RYTER i TYRRELL 2000). W komórkach zwierzęcych δ -ALA powstaje w reakcji glicyny i bursztynilo-CoA, natomiast w szlaku biosyntezy tetrapiroli roślinnych substratem wyjściowym syntezy kwasu δ -ALA jest glutaminian, włączany w szlak jako glutaminylo-tRNA i redukowany przez specyficzną reduktazę, która jest allosterycznie hamowana hemem (ECKHARDT i współaut. 2004).

Pierwszą reakcją charakterystyczną dla szlaku biosyntezy chlorofilu jest chelatacja kationu Mg^{2+} , prowadząca do powstania Mg-protoporfiryny IX (Ryc. 1), katalizowana przez chelatazę magnezową (BOLLIVAR 2006, MASUDA 2008). W kilku kolejnych reakcjach Mg-protoporfiryna IX zostaje przekształcona w protochlorofilid (Pchlid), który jest następnie redukowany do chlorofilidu (Chlid). Szlak biosyntezy Chl *a* kończy reakcja estryfikacji Chlid 20-węglowym alkoholem, najczęściej fitolem. Chlid *a* może być utleniony do Chlid *b* w reakcji katalizowanej przez oksygenazę Chlid *a*, a następnie przekształcony w Chl *b* (BOLLIVAR 2006, MASUDA 2008). W mieszaninie reakcyjnej *in vitro* stwierdzono brak specyficzności tej oksygenazy dla Chl *a*, co oznacza, że punktem rozgałęzienia szlaków biosyntezy Chl *a* i Chl *b* jest chlorofilid.

Biosynteza chlorofilu podlega złożonej regulacji, z których najbardziej istotną rolę odgrywają trzy etapy: synteza δ -ALA, chelatacja protoporfiryny IX oraz redukcja Pchlid (CORNAH i współaut. 2003, MASUDA i FUJITA 2008). Szybkość syntezy δ -ALA limituje cały szlak syntezy tetrapiroli. Chelatacja protoporfiryny IX kationami Fe^{2+} , kierująca protoporfirynę IX na szlak syntezy hemu, zachodzi spontanicznie i jest odwracalna zarówno w mitochondriach, jak i plastydach, jednak to te drugie są głównym miejscem syntezy hemu w komórce roślinnej. Mg-chelataza występuje tylko w plastydach. Najwyższy poziom ekspresji tego enzymu notuje się przy uprawie roślin w świetle, podczas gdy maksimum ekspresji Fe-chelatazy przypada na wstępną fazę wzrostu rośliny w ciemności (ECKHARDT i współaut. 2004).

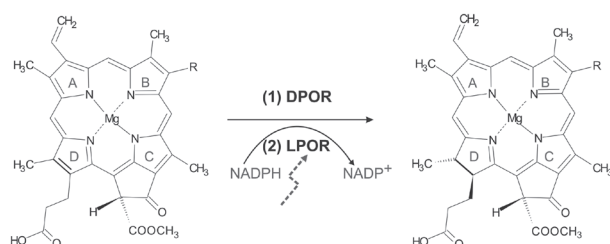
Redukcja protochlorofilidu pełni funkcję regulatorową w procesie biosyntezy chlorofilu w roślinach okrytonasiennych oraz uczestniczy w regulacji wykształcania sprawnych fotosyntetycznie chloroplastów, jak również w regulacji morfogenezy siewki. Podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat istniejących w przyrodzie mechanizmów re-

akcji redukcji protochlorofilidu jest celem niniejszej pracy. Z uwagi na obszerność materiału w wielu miejscach odsyłamy czytelnika jedynie do licznych prac przeglądowych, jakie ukazały się w literaturze światowej, zachęcając jednocześnie do zapoznania się z cytowanymi w nich pracami oryginalnymi.

DWA MECHANIZMY REDUKCJI PROTOCHLOROFILIDU

Przemiana protochlorofilidu (Pchlid) do chlorofilidu (Chlid) polega na redukcji podwójnego wiązania w jednym z pierścieni pirolowych w układzie porfiryńowym (Ryc. 2). Cząsteczki Pchlid (substrat) i Chlid (produkt) różnią się liczbą sprzężonych wiązań podwójnych, zatem charakteryzują się różnym położeniem maksimum w widmach absorpcji i fluorescencji. Umożliwia to zastosowanie spektroskopii absorpcyjnej lub fluorescencyjnej do analizy postępu reakcji w czasie rzeczywistym. Rycina 3 przedstawia przykładowe widma fluorescencji etiolowanych siewek *Triticum aestivum* zarejestrowane w temperaturze 77 K przed i po fotoredukcji protochlorofilidu pozostającego w kompleksie enzym-substrat.

Redukcja Pchlid→Chlid może zachodzić na dwa sposoby (Ryc. 2): (1) niezależny od światła i katalizowany przez niezależną od światła reduktazę protochlorofilidu (określaną w literaturze jako DPOR) oraz (2) indukowany światłem i katalizowany przez zależną od światła oksydoreduktazę protochlorofilid: NADPH (określaną jako LPOR). Poza tym, że katalizują tę samą reakcję, LPOR i DPOR różnią się pod każdym względem: budowy czą-

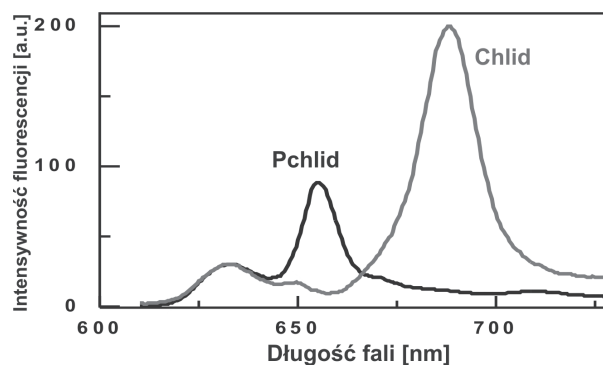


Ryc. 2. Redukcja protochlorofilid (Pchlid) → chlorofilid (Chlid).

Enzymy katalizujące tę reakcję: (1) niezależna od światła reduktaza protochlorofilidu (DPOR) i (2) indukowana światłem (zależna od światła) reduktaza protochlorofilid:NADPH (LPOR). R – oznacza CH=CH₂ oraz CH₂-CH₃, odpowiednio dla diwinylowych i monowinylowych form Pchlid i Chlid.

steżki białka, genów kodujących te białka, mechanizmu reakcji oraz występowania w organizmach zdolnych do fotosyntezy (SCHOFFS i FRANCK 2003, WILLOWS 2003, BOLLIVAR 2006, MASUDA 2008, REINBOTHE i współaut. 2010).

Beztlenowe bakterie fotosyntetyzujące, m.in.: *Rhodobacter capsulatus*, *Chlorobium tepidum*, *Chloflexus aurantiacus*, posiadają wyłącznie geny kodujące DPOR i prowadzą biosyntezę chlorofilidu w sposób niezależny od światła. Większość sinic, glonów i roślin za wyjątkiem okrytonasiennych posiada jednocześnie geny kodujące DPOR i LPOR. Dotychczas nie stwierdzono występowania genów kodujących DPOR w roślinach okrytonasiennych. Jedynym enzymem redukującym protochlorofilid w okrytonasiennych



Ryc. 3. Widmo fluorescencji zmierzone dla etiolowanych siewek pszenicy (t.j. środkowej części siewki) w temperaturze 77 K (praca własna autorów).

Krzywą oznaczoną „Pchlid” otrzymano dla siewki przygotowanej do pomiaru w słabym zielonym świetle; jest to fluorescencja protochlorofilidu zgromadzonego w etiolowanej siewce. Krzywą oznaczoną „Chlid” otrzymano dla siewki przygotowanej do pomiaru w słabym zielonym świetle, ale oświetlonej fotograficzną lampą błyskową przed zamrożeniem. Pasma fluorescencji z maksimum przy ok. 690 nm pochodzi od chlorofilidu powstałego w wyniku fotoredukcji protochlorofilidu.

jest LPOR. W przypadku siewek okrytonasiennych uprawianych w ciemności obserwuje się zatrzymanie procesu syntezy chlorofilu na etapie utworzenia protochlorofilidu i jego kontrolowaną akumulację. Wygląd siewek rosnących w ciemności różni się od tych rosnących na świetle. Są one bladożół-

tawe, wiotkie, wydłużone i są określane jako etiolowane (wyplonione). Nie posiadają one odpowiednio wykształconych chloroplastów oraz kompleksów białkowo-barwnikowo-lipidowych biorących udział w fazie świetlnej („jasnej”) fotosyntezy.

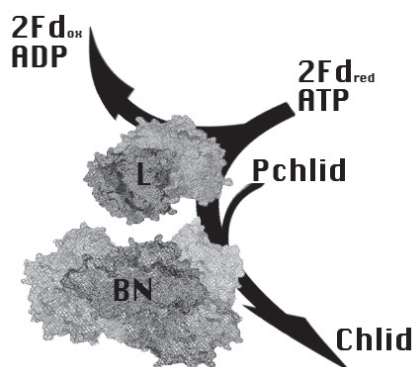
NIEZALEŻNA OD ŚWIATŁA REDUKTAZA PROTOCHLOROFILIDU (DPOR)

Niezależna od światła reduktaza Pchlid (DPOR) jest ewolucyjnie starsza niż LPOR (ARMSTRONG 1998, SCHOEFS i FRANCK 2003, YANG i CHENG 2004, MASUSDA 2008, REINBOTHE i współaut. 2010). DPOR jest białkiem o budowie podjednostkowej, zbudowanym z podjednostek L, N i B, określanymi jako BchB, BchN i BchL w przypadku białek bakteryjnych oraz ChlB, ChlN i ChlL, w przypadku roślinnych. Roślinna DPOR kodowana jest przez genom chloroplastowy. Na podstawie stwierdzonej homologii sekwencji aminokwasowych odpowiednio między podjednostkami L, B i N enzymu DPOR, a podjednostkami H, K i D nitrogenazy oraz wrażliwości na tlen zasugerowano analogiczną budowę i podobny mechanizm reakcji DPOR i nitrogenazy (ARMSTRONG 1998). Częsteczkę DPOR tworzy heterotetramer powstały z dwóch par podjednostek BN, któremu przypisano rolę jednostki katalitycznej DPOR oraz dimer złożony z dwóch podjednostek L, który pośredniczy w dostarczeniu elektronu do redukcji Pchlid (FUJITA i BAUER 2000). W badaniach aktywności enzymatycznej zrekonstruowanego kompleksu DPOR *in vitro* wykazano jego aktywność ATPazową, zdolność do utleniania ferredoksyny, dużą wrażliwość na tlen podjednostki L (NOMATA i współaut. 2006) oraz stwierdzono, że do przeprowadzenia reakcji optymalna jest interakcja między podjednostkami L i BN w stosunku 2:1 (NOMATA i współaut. 2008).

Potwierdzeniem podobieństwa DPOR i nitrogenaz są otrzymane ostatnio struktury krystaliczne dimeru podjednostki L (tj. BchL₂) ([pdb:3fwy](#); SARMA i współaut. 2008) oraz heterotetramery złożonego z dwóch par podjednostek BN (tj. [BchB-BchN]₂) ([pdb:3aek](#); MURAKI i współaut. 2010, oraz [pdb:2xdq](#); BRÖCKER i współaut. 2010a). Struktura BchL₂ otrzymana z rozdzielczością 1,6 Å jest podobna do struktury odpowiedniej podjednostki nitrogenazy, zarówno jeśli chodzi o miejsce wiązania MgATP, jak i centrum [4Fe-4S], jednak zaobserwowano różnice w rejonie

dokowania podjednostki L do podjednostki BN. Strukturę heterotetramery [BchB-BchN]₂ otrzymano dla białka ze związaną cząsteczką Pchlid w centrum katalitycznym oraz bez substratu, odpowiednio z rozdzielczością 2,3 i 2,8 Å (MURAKI i współaut. 2010). Heterotetramer [BchB-BchN]₂ tworzą dwa funkcjonalne dimery BchB-BchN, z których każdy posiada jedno centrum [4Fe-4S] i wiąże jedną cząsteczkę Pchlid. Cząsteczka substratu utrzymywana jest w centrum katalitycznym utworzonym z podjednostek BchB-BchN przy udziale oddziaływań hydrofobowych. Związanie cząsteczki Pchlid powoduje zmianę ułożenia reszt tryptofanu i tyrozyny. W prezentowanej strukturze nie udało się zobrazować C-końcowego fragmentu podjednostki BchB o długości 100 reszt aminokwasowych i opisano go jako nieuporządkowany fragment (MURAKI i współaut. 2010). Fragment ten, konserwatywny w przypadku DPOR (REINBOTHE i współaut. 2010), który jest nieobecny w odpowiedniej podjednostce nitrogenazy, jest prawdopodobnie zaangażowany w redukcję Pchlid→Chlid.

Jak dotąd nie pokazano struktury całego kompleksu białka DPOR, dlatego też niewiele można powiedzieć o miejscu oddziaływania BchL₂ z [BchB-BchN]₂. Na rycinie 4 pokazano dimer podjednostek BchL (oznaczony jako „L”) i tetramer BchB-BchN (oznaczony jako „BN”), zachowując proporcje ich wielkości. Wciąż nie jest rozstrzygnięte czy Pchlid w centrum katalitycznym w podjednostce BN oddziałuje bezpośrednio z podjednostką L. Ostatnio zaproponowano opis cyklu działania enzymu DPOR (BRÖCKER i współaut. 2010b), w którym reakcja redukcji Pchlid inicjowana jest poprzez przyłączenie cząsteczki ATP do zredukowanej dwiema cząsteczkami ferredoksyny („Fd” na Ryc. 4) podjednostki L. Indukuje to zmiany konformacyjne całej podjednostki, zwiększając jej powinowactwo do kompleksu BchB-BchN-Pchlid. Dochodzi do hydrolizy ATP do ADP, co umożliwia spontaniczne przeniesienie elektronu z cen-



trum [4Fe-4S] w BchL na centrum [4Fe-4S] obecne w podjednostce BchB-BchN, a potem na PchlId (Ryc. 4). Obecność ADP znacząco obniża powinowactwo obu podjednostek, w wyniku czego BchL oddysocjowuje, uwalniając ADP. Możliwa jest wówczas redukcja białka L ferredoksyną i cykl może się powtórzyć.

Do redukcji PchlId potrzebne są dwa elektrony i dwa protony. MURAKI i współaut. (2010) zaproponowali dokładny mecha-

Ryc. 4. Model reakcji redukcji protochlorofilidu (PchlId) do chlorofilidu (ChlId) katalizowanej przez niezależną od światła reduktazę protochlorofilid:NADPH (DPOR).

Zarys kształtu dimeru podjednostek L (tj. BchL₂) oraz tetrameru podjednostek BN (tj. [BchB-BchN]₂), oznaczonych na rycinie odpowiednio jako L oraz BN narysowano na podstawie modeli struktur krystalicznych opublikowanych przez MURAKI i współaut. (2010) oraz SARMA I WPOŁAUT. (2008). Fd_{red} i Fd_{ox} oznacza odpowiednio ferredoksynę w formie zredukowanej i utlenionej.

nizm przeniesienia protonów na podstawie otrzymanej struktury krystalicznej kompleksu BchB-BchN-PchlId, przypisując rolę donora protonu reszcie kwasu propionowego, przyłączonej do węgla C17 pierścienia IV (D) układu porfiryнового PchlId (patrz Ryc. 2); oraz reszcie asparagianinu, stanowiącej 274 aminokwas (numeracja dla *Rhodobacter capsulatus*, numer identyfikacyjny w bazie Swiss-Prot: P26163) podjednostki BchB.

ZALEŻNA OD ŚWIATŁA REDUKTAZA PROTOCHLOROFILIDU (LPOR)

Zależna od światła reduktaza protochlorofilid:NADPH (LPOR) jest obiektem intensywnych badań od połowy ubiegłego wieku. Przez wiele lat w badaniach tych wykorzystywano etiolowane siewki roślin okrytonasiennych takich jak: *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris* i inne. Etiolowane siewki są wygodnym dla eksperymentatora układem doświadczalnym ponieważ światło indukuje w nich nie tylko fotoredukcję nagromadzonego PchlId, ale też tzw. zielenienie (deetiologację) siewki, w czasie którego w plastydach zachodzi wykształcenie sprawnych kompleksów fotosyntetycznych wbudowanych w błony tylakoidów. Deetiologacja jest do pewnego stopnia zsynchronizowana, co umożliwiło wyróżnienie kolejnych etapów tego procesu (SUNDQVIST i DAHLIN 1997). W ostatnich latach otrzymano rekombinowane białko LPOR, które obecnie jest stosowane w badaniach aktywności enzymatycznej. Dzięki tym długoletnim badaniom, podsumowanym w licznych pracach przeglądowych (m.in. SCHOEFS i FRANCK 2003, ECKHARDT i współaut. 2004, MASUDA i TAKAMIYA 2004, HEYES i HUNTER 2005, SCHOEFS 2005, MASUDA 2008, MYŚLIWA-KURDZIEL i STRZAŁKA 2010, REINBOTHE i współaut. 2010), funkcjonowanie LPOR zostało dość dobrze poznane i opisane, mimo

że struktura przestrzenna tego białka nie została eksperymentalnie wyznaczona.

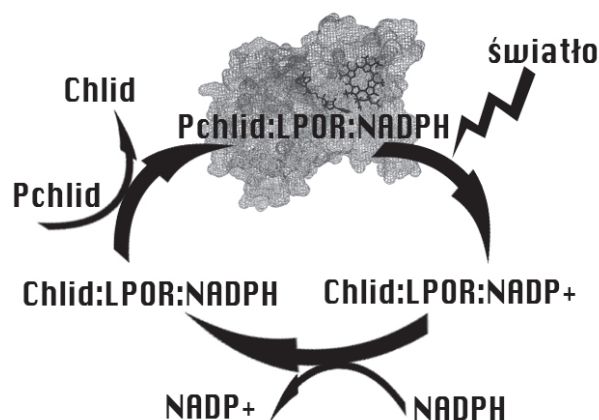
Cząsteczkę LPOR tworzy jeden łańcuch polipeptydowy o masie 35–38 kDa. Jest ona kodowana przez jądrowe geny *por* i transportowana posttranslacyjnie do plastydów (ARONSSON i współaut. 2003, BOLLIVAR 2006, MASUDA 2008). Sekwencja dojrzałego białka wykazuje duży stopień homologii, na poziomie 40,7–79,5% w przypadku sinic oraz 50,3–98,1% dla fotosyntetyzujących eukariontów (YANG i CHENG 2004). LPOR może występować w jednej, dwóch lub trzech izoformach w zależności od gatunku rośliny, przy czym każda izoforma kodowana jest przez inny gen (SCHOEFS i FRANCK 2003, MASUDA i TAKAMIYA 2004, MASUDA 2008). W modelowej *A. thaliana* stwierdzono obecność trzech izoform LPOR, nazwanych PORA, PORB i PORC. Dwie z nich, PORA i PORB, wykryto też m.in. w *Hordeum vulgare* i *Pinus mungo*. Wysoki poziom ekspresji PORA obserwuje się w etiolowanych siewkach, w których białko to tworzy kompleksy z PchlId i NADPH, zgromadzone w wewnętrznych błonach etioplastów (tzw. ciałach prolamellarnych, scharakteryzowanych przez SOLYMOSSI i SCHOEFS 2008, 2010). Rola PORA ogranicza się do pierwszych etapów deetiologacji, następnie enzym ten jest degradowany, a jego eks-

presja hamowana światłem. Ekspresja PORB jest niezależna od światła. Ta forma LPOR jest prawdopodobnie związana z ciągłą biosyntezą chlorofilu. Ekspresja PORC, izoformy zidentyfikowanej dotychczas tylko w *A. thaliana*, jest indukowana światłem. Analizując regulację światłem poszczególnych genów *por*, w przypadku *Pinus taeda* zidentyfikowano rodziny genów kodujących PORA i PORB liczące odpowiednio 2 i 11 genów (SCHOEFS i FRANCK 2003). Natomiast jeden gen światłozależnej reduktazy obecny jest m.in. w *Chlamydomonas reinhardtii*, *Cucumis sativus* oraz *Pisum sativum*. U okrytonasiennych posiadających jeden gen nie wyjaśniono dotychczas mechanizmu akumulacji LPOR w czasie etiolacji siewki i jej degradacji podczas deetiolacji.

Na podstawie podobieństwa sekwencji, białka LPOR zalicza się do rodziny krótkołańcuchowych dehydrogenaz/reduktaz określanych jako białka SDR (od ang. short-chain dehydrogenases/reductase) (YANG i CHENG 2004, REINBOTHE i współaut. 2010) lub szerzej do superrodziny enzymów RED (ang. reductases-epimerases-dehydrogenases), w skład której wchodzi niektóre reduktazy, epimerazy, dehydrogenazy (SCHOEFS i FRANCK 2003, MYŚLIWA-KURDZIEL i STRZAŁKA 2010, REINBOTHE i współaut. 2010). Klasyfikacji LPOR do białek SDR lub RED dokonano na podstawie obecności w sekwencji tego białka następujących konserwatywnych motywów (1) motywu Rossmanna (ang. Rossmann fold), który stanowi β -kartkę, złożoną z kilku równoległych beta-arkuszy, (2) motywów TGxxxGxG oraz NAA uczestniczących w wiązaniu nukleotydu, którym w przypadku LPOR jest NADPH, (3) reszt Tyr (Y) i Lys (K), przedzielonych 3 resztami dowolnych aminokwasów (tj. w sekwencji YxxxK), które są ważne dla zachowania aktywności katalitycznej enzymu.

Fotoredukcję Pchlid \rightarrow Chlid można obserwować oświetlając etiolowany materiał nawet krótkim błyskiem światła (np. błyskową lampą fotograficzną) pod warunkiem umieszczenia takiej próbki w temperaturze z zakresu od około 250 K do około 315 K (MYŚLIWA-KURDZIEL i STRZAŁKA 2010). Dalsze schładzanie próbki zapobiega fotoredukcji Pchlidu, ale pozwala na obserwację produktów pośrednich tej reakcji i przyczyniło się do wyjaśnienia mechanizmu tej indukowanej światłem redukcji protochlorofilidu. Mechanizm ten opisano początkowo dla etiolowanego materiału: siewek, izolowanych etiopla-

stów bądź błon wewnętrznych etioplastów (SCHOEFS i FRANCK 2003, SCHOEFS 2005), a następnie potwierdzono, uzyskując lepszą rozdzielczość w czasie, dzięki zastosowaniu do badań kinetyki reakcji oczyszczonych rekombinowanych białek (HEYES i HUNTER 2005, SYTINA i współaut. 2009, MYŚLIWA-KURDZIEL i STRZAŁKA 2010). Na podstawie widm fluorescencji i absorpcji oraz widm absorpcji przejściowej wykonanych w niskich temperaturach, wyróżniono kilka etapów pośrednich reakcji. Pierwszym z nich i jedynym, który jest inicjowany światłem, jest absorpcja fotonu przez Pchlid związany z LPOR i NADPH w kompleks Pchlid:LPOR:NADPH (Ryc. 5) skutkująca powstaniem pierwotnego produktu reakcji, który posiada maksimum przy 696 nm w widmie absorpcji zmierzonym w temperaturze 77 K i nie wykazuje fluorescencji. Ten etap można zaobserwować przeprowadzając reakcję w temperaturze z zakresu 120-180 K. Pierwotny produkt reakcji ma charakter wewnątrzcząsteczkowego kompleksu z przeniesieniem ładunku (ang. charge-transfer complex). Przemieszczenie ładunku w osi podwójnego wiązania, które ulega redukcji w cząsteczce Pchlid (Ryc. 2), ułatwia transfer protonu z tyrozyny obecnej w motywie katalitycznym (YxxxK) i anionu wodorkowego z NADPH, pod warunkiem podniesienia temperatury powyżej 180 K. Prowadzi to do powstania chlorofilidu w kompleksie z LPOR



Ryc. 5. Model reakcji redukcji protochlorofilidu (Pchlid) do chlorofilidu (Chlid) katalizowanej przez zależną od światła reduktazę protochlorofilid:NADPH (LPOR).

Zaznaczono etap indukowany światłem. Zarys kształtu białka narysowano na podstawie modelu homologicznego cząsteczki LPOR A z *Arabidopsis thaliana* (praca własna autorów). Dalszy opis rysunku w tekście.

(tj. Chlid:LPOR:NADP⁺ patrz Ryc. 5), będącego drugim produktem pośrednim omawianej reakcji, który charakteryzuje się położeniem maksimum absorpcji i fluorescencji odpowiednio przy 681 i 684 nm w niskotemperaturowych widmach (tzn. zmierzonych w temperaturze 77 K). Dalsze podwyższanie temperatury umożliwi zajście kolejnych etapów reakcji: wymianę nukleotydu na niezredukowany, uwolnienie cząsteczki Chlid z kompleksu Chlid:LPOR:NADPH oraz rekrutację nowej cząsteczki Pchlid i odtworzenie aktywnego kompleksu Pchlid:LPOR:NADPH (Ryc. 5).

O ile mechanizm fotoredukcji protochlorofilidu wydaje się być dość dobrze scharakteryzowany, o tyle oddziaływanie LPOR

z błonami wewnętrznymi etioplastów jest w dalszym ciągu słabo poznane. Wiadomo, że trójskładnikowe kompleksy Pchlid:LPOR:NADPH mają zdolność do tworzenia agregatów i w postaci tychże agregatów, złożonych z różnej liczby jednostek enzym-substrat, gromadzą się w etioplastach. Analiza własności spektralnych protochlorofilidu w układach *in vivo* jest skomplikowana; w widmie wyróżnić można kilka składowych pochodzących od protochlorofilidu niezwiązanego z LPOR oraz związanego w kompleksy enzym-substrat, będące z kolei składowymi agregatów o różnej wielkości (SCHOEFS 2005, BELAYAEVA i LITVIN 2007; MYŚLIWA-KURDZIEL i STRZAŁKA 2010).

AKTYWNOŚĆ ENZYMATYCZNA LPOR I DPOR

Badania kinetyki reakcji redukcji Pchlid, których celem jest wyznaczenie stałej wiązania substratu i prędkości maksymalnej reakcji, prowadzone są od wielu lat w różnych laboratoriach. Z powodu różnej czułości używanego sprzętu, stosowanej metody analizy i różnic w czynnikach takich jak: temperatura pomiaru, siła jonowa i pH stosowanych buforów, skład mieszaniny reakcyjnej, a dodatkowo używania do badań enzymów z różnych organizmów; rekombinowanych, z metką lub bez niej bądź białka izolowanego i oczyszczonego z etiolowanych siewek, zebrane dane różnią się znacząco od siebie. Na podstawie prostego porównania wielkości nie można stwierdzić, który z enzymów:

DPOR, czy LPOR jest szybszy, a który silniej wiąże substrat. Stała Michaelisa, wyznaczona dla LPOR oczyszczonej z etiolowanego materiału, wynosi 0,47 μM (GRIFFITHS 1978, KLEMENT i współaut. 1999), podczas gdy dla białek rekombinowanych opublikowano różne wartości: 0,27 μM (MARTIN i współaut. 1997) oraz 8,6 μM (HEYES i współaut. 2000). Jak dotąd ukazało się jedno doniesienie (NOMATA i współaut. 2005), w którym podano wartość stałej Michaelisa wyznaczonej dla rekombinowanego DPOR (10,6 μM). Średnie prędkości reakcji podane w wyżej wymienionych pracach wynoszą kilkadziesiąt nanomoli substratu na minutę na miligram białka dla LPOR i dwa rzędy wielkości mniej dla DPOR.

WSPÓŁWYSTĘPOWANIE GENÓW KODUJĄCYCH DPOR I LPOR

Za wyjątkiem bakterii fotosyntetyzujących i roślin okrytonasiennych organizmy zdolne do fotosyntezy posiadają zarówno geny kodujące DPOR, jak i LPOR. Jednak posiadanie genów kodujących DPOR nie zawsze jest równoznaczne ze zdolnością biosyntezy chlorofilu, a tym samym zielenienia w ciemności. Spora grupa organizmów, jak np. miłorząb dwukłapowy (*Ginkgo biloba*) czy paproć (*Nephrolepis exaltata*) (ARMSTRONG 1998), dysponuje wadliwymi kopiami tych genów, tzw. pseudogenami. Rośliny te w ciemności stają się etiolowane, zatem zachowują się jak okrytonasienne. Komplikuje to wszelkie próby podziału systematycznego organizmów jedynie ze względu na posiadane geny, zaś

najlepszym kryterium podziału wydaje się być fizjologiczna zdolność do zielenienia w danych warunkach.

W przypadku współwystępowania w jednym organizmie obu rodzajów enzymów redukujących Pchlid, ich ekspresja jest ściśle regulowana czynnikami takimi jak: brak lub obecność oraz kolor i natężenie światła, warunki tlenowe środowiska, by zapewnić najlepszą wydajność syntezy chlorofilu (ARMSTRONG 1998). Współdziałanie LPOR i DPOR w jednym organizmie jest przedmiotem licznych badań prowadzonych w czasie ostatnich 20 lat, aczkolwiek w dalszym ciągu znajomość tego zjawiska jest fragmentaryczna (SCHOEFS 2005, MASUDA 2008, REINBOTHE

i współaut. 2010). W badaniach skoncentrowanych głównie na sinicach (m.in. *Leptolyngbya boryana* i *Synechocystis*) wykazano, że DPOR może uczestniczyć w biosyntezie Chl w komórkach rosnących w świetle, lecz jego udział maleje wraz ze wzrostem natężenia światła (MASUDA 2008, SHUI i współaut. 2009). Stosując odpowiednie mutanty wykazano, że DPOR zapewnia odpowiednią wydajność syntezy chlorofilu przy natężeniu światła białego mniejszym lub równym około $130 \text{ mE} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, natomiast LPOR jest niezbędny do syntezy tego barwnika przy natężeniu światła białego równym $170 \text{ mE} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ (FUJITA i współaut. 1998). Zaobserwowano również, że światło jest czynnikiem wzmacniającym ekspresję wszystkich podjednostek DPOR, zwiększając ją 2–4 krotnie (CAHOON i TIMKO 2003). Pozbawiony genów kodujących LPOR mutant *Leptolyngbya boryana* był zdolny syntetyzować Chl w ilościach porównywalnych ze szczepem dzikim tylko w atmosferze beztlenowej (YAMAZAKI i współaut. 2006). Wzrost aktywności DPOR w tym mutancie związany był z większą ilością syntetyzowanych podjednostek białka DPOR. SHUI i współaut. (2009) zauważyli korelację pomiędzy ekspresją białek LPOR i DPOR u *Fremyella diplosiphon* (sinica) a ilością oraz względną proporcją fikocyjaniny i fikoerytryny (barwniki fotosyntetyczne), a także kolorem i natężeniem światła.

Do badania aktywność DPOR stosuje się również siewki roślin nagonasiennych kiełkujące i uprawiane w ciemności, które, w przeciwieństwie do okrytonasiennych, zielnieją w ciemności. W badaniach nad *Pinus*

mugo i *Pinus sylvestris* (BREZNENOVÁ i współaut. 2010) stwierdzono, że w ciemności nie tylko zachodzi biosynteza Chl *a* i Chl *b*, ale też obserwuje się nagromadzenie Pchlid, który w większości ulega redukcji przy udziale enzymu LPOR podczas ekspozycji na światło, co przyczynia się do znacznego wzrostu stężenia Chl w pierwszych minutach oświetlania siewki. W przeciwieństwie do roślin okrytonasiennych odnotowano ekspresję niektórych białek, składników aparatu fotosyntetycznego (m. in. białek stanowiących elementy układu anten fotosyntetycznych LHC), a także wykształcenie błon tylakoidów. DEMKO i współaut. (2009) wykazali, że biosynteza Chl w rosnących w ciemności siewkach *Larix decidua* zachodzi tylko w początkowych etapach wzrostu, a następnie ulega on degradacji. W przeciwieństwie do *Larix decidua*, w siewkach *Picea abies* synteza Chl zachodziła przez cały czas prowadzenia doświadczenia w ciemności, co wskazuje na istnienie innego niż światło mechanizmu regulacji. Wyjaśnienie złożonego mechanizmu indukcji i regulacji biosyntezy Chl w ciemności u nagonasiennych oraz współdziałania enzymów DPOR i LPOR wymaga jeszcze wielu doświadczeń, w szczególności pozostaje do wyjaśnienia mechanizm „przełączania” między tymi enzymami oraz regulacji ich udziału w całościowej biosyntezie Chl. Prezentowane dotąd wyniki trudno podsumować ze względu na różnorodność gatunków stosowanych w badaniach oraz niejednakowe schematy doświadczeń stosowane przez różne grupy badawcze.

PODSUMOWANIE

Uważa się, że powstanie dwóch niezależnych dróg redukcji Pchlid było naturalną konsekwencją zmian środowiska na przestrzeni miliardów lat. W pierwotnych warunkach, jakie panowały na Ziemi w czasie ewolucji fotosyntezy, nie było tlenu, zatem reduktaza DPOR, która prawdopodobnie powstała przez mutacje w genach nitrogenazy i jest wrażliwa na tlen, mogła działać bez przeszkód. Hipotezę beztlenowej atmosfery potwierdza zdolność *Rubisco* do wiązania tlenu. Chronologiczne pierwszeństwo DPOR nad światło-zależnym rozwiązaniem potwierdzają analizy porównawcze sekwencji genów i same organizmy, posiadające geny DPOR. Są one bardziej prymitywne od tych potrze-

bujących światła do syntezy chlorofilu. Intensywna fotosynteza, stopniowo zmieniająca skład atmosfery na znany nam dzisiaj, zmusiła organizmy do przystosowania się do nowych warunków. W nieznanym dziś sposób powstał alternatywny szlak redukcji Pchlid, który w przypadku niektórych roślin zaczął dominować, prowadząc stopniowo do eliminacji genów kodujących DPOR.

Mimo olbrzymiego postępu nauki na tym niewielkim poletku wiedzy, wciąż jeszcze wiele pozostaje do odkrycia. Ewolucja biochemiczna, kinetyka i precyzyjne wyjaśnienie mechanizmu obu reakcji na poziomie molekularnym, określenie struktury przestrzennej LPOR oraz struktury całego kompleksu

DPOR, regulacja ekspresji obu białek to fascynujące zagadnienia, które czekają na rozwinięcie.

PODZIĘKOWANIE: Wydział Biochemii Biofizyki i Biotechnologii UJ jest beneficjentem programu w ramach funduszy strukturalnych UE (grant No: POIG.02.01.00-12-064/08 – “Molecular biotechnology for health”).

BIOSYNTETA CHLOROFILU: DWA MECHANIZMY REDUKCJI PROTOCHLOROFILIDU

Streszczenie

W pracy podsumowano obecny stan wiedzy na temat dwu istniejących w przyrodzie mechanizmów reakcji redukcji protochlorofilidu do chlorofilidu. Redukcja protochlorofilidu jest jedną z ostatnich reakcji szlaku biosyntezy chlorofilu i bakteriochlorofilu – podstawowych barwników fotosyntetycznych. Reakcja ta może zachodzić w sposób niezależny od światła, katalizowany przez niezależną od światła re-

duktazę protochlorofilidu (DPOR) lub w procesie indukowanym światłem i katalizowanym przez zależną od światła oksydoreduktazę protochlorofilidu (LPOR). Mimo iż katalizują tę samą reakcję, enzymy LPOR i DPOR nie są spokrewnione, kodowane są przez różne geny, posiadają inną budowę cząsteczki oraz charakteryzuje je inny mechanizm katalizowanej reakcji.

CHLOROPHYLL BIOSYNTHESIS: TWO MECHANISMS OF PROTOCHLOROPHYLLIDE REDUCTION

Summary

In the present paper, the current state of knowledge about two existing in nature mechanisms for the reduction of protochlorophyllide to chlorophyllide is presented. This reaction, which is a penultimate step of chlorophyll biosynthesis, can occur by either light-dependent or light-independent mecha-

nisms, catalysed by light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) or light-independent protochlorophyllide oxidoreductase (DPOR), respectively. LPOR and DPOR are completely different in their genes, protein structure and catalytic mechanism.

LITERATURA

- ARMSTRONG G. A., 1998. *Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms*. J. Photochem. Photobiol. 43, 87–100.
- ARONSSON H., SUNDQVIST C., DAHLIN C., 2003. *POR hits the road: import and assembly of a plastid protein*. Plant Mol. Biol. 51, 1–7.
- BELYAEVA O. B., LITVIN F. F., 2007. *Photoactive pigment-enzyme complexes of chlorophyll precursor in plant leaves*. Biochemistry (Moscow) 72, 1458–1477.
- BOLLIVAR D. W., 2006. *Recent advances in chlorophyll biosynthesis*. Photosynth. Res. 90, 173–194.
- BREZNEŇOVÁ K., DEMKO V., PAVLOVIČ A., GÁLOVÁ E., BALÁŽOVÁ R., HUDÁK J., 2010. *Light-independent accumulation of essential chlorophyll biosynthesis- and photosynthesis-related proteins in Pinus mugo and Pinus sylvestris seedlings*. Photosynthetica 48, 16–22.
- BRÖCKER M. J., SCHOMBURG S., HEINZ D.W., JAHN D., SCHUBERT W. D., MOSER J., 2010a. *Crystal Structure of the Nitrogenase-like Dark Operative Protochlorophyllide Oxidoreductase Catalytic Complex (ChlN/ChlB)₂*. J. Biol. Chem. 285, 27336–27345.
- BRÖCKER M. J., WÄTZLICH D., SAGGU M., LENDZIAN F., MOSER J., JAHN D., 2010b. *Biosynthesis of (Bacterio)chlorophylls. ATP-dependent transient subunit interaction and electron transfer of dark operative protochlorophyllide oxidoreductase*. J. Biol. Chem. 285, 8268–8277.
- CAHOON A.B., TIMKO M., 2003. *Yellow-in-the-dark mutants of Chlamydomonas lack the ChlL subunit of light-independent protochlorophyllide reductase*. Plant Cell 12, 559–568.
- CORNAH J. E., TERRY M. J., SMITH A. G., 2003. *Green or red: what stops the traffic in the tetrapyrrole pathway?* Trends Plant Sci. 8, 224–230.
- DEMKO V., PAVLOVIČ A., VALKOVÁ D., SLOVÁKOVÁ L., GRIMM B., HUDÁK J., 2009. *A novel insight into the regulation of light-independent chlorophyll biosynthesis in Larix decidua and Picea abies seedlings*. Planta 230, 165–176.
- ECKHARDT U., GRIMM B., HÖRTENSTEINER S., 2004. *Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants*. Plant Mol. Biol. 56, 1–14.
- FIELD C. B., BEGRENFIELD M. J., RANDERSON J. T., FIALKOWSKI P., 1998. *Primary Production of the Biosphere: Integration Terrestrial and Oceanic Components*. Science 281, 237–240.
- FUJITA Y., BAUER C. E., 2000. *Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits: in vitro confirmation of nitrogenase like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme*. J. Biol. Chem. 275, 23583–23588.
- FUJITA Y., TAKAGI H., HASE T., 1998. *Cloning of the gene encoding a protochlorophyllide reductase: the physiological significance of the co-existence of light dependent and independent protochlorophyllide reduction systems in the cyanobacteria Plectonema boryanum*. Plant Cell Physiol. 39, 177–185.
- GRIFFITHS W. T., 1978. *Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes*. Biochem. J. 174, 681–692.

- HENDRY G. A. F., HOUGHTON J. D., BROWN S. B., 1987. *The degradation of chlorophyll – a biological enigma*. New Phytologist 107, 255–302.
- HEYES D. J., HUNTER C. N., 2005. *Making light work of enzyme catalysis: protochlorophyllide oxidoreductase*. Trends Plant Sci. 30, 642–649.
- HEYES D. J., MARTIN G. E., REID R. J., HUNTER N., WILKS H. M., 2000. *NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from Synechocystis: overexpression, purification and preliminary characterisation*. FEBS Lett. 483, 47–51.
- KLEMENT H., HELFRICH M., OSTER U., SCHOCH S. RÜDIGER W., 1999. *Pigment-free NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase from Avena sativa L. Purification and substrate specificity*. Eur. J. Biochem. 265, 862–874.
- MARTIN G. E., TIMKO M. P., WILKS H. M., 1997. *Purification and kinetic analysis of pea (Pisum sativum L.) NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase expressed as a fusion with maltose-binding protein in Escherichia coli*. Biochem J. 325, 139–145.
- MASUDA T., 2008. *Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls*. Photosynth. Res. 96, 121–143.
- MASUDA T., TAKAMIYA K., 2004. *Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms*. Photosynth. Res. 81, 1–29.
- MASUDA T., FUJITA Y., 2008. *Regulation and evolution of chlorophyll biosynthesis*. Photochem. Photobiol. Sci. 7, 1131–1149.
- MURAKI N., NOMATA J., EBATA K., MIZOGUCHI T., SHIBA T., TAMIAMI H., KURISU G., FUJITA Y., 2010. *X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase*. Nature 465, 110–114.
- MYŚLIWA-KURDZIEL B., STRZAŁKA K., 2010. *Indukowana światłem redukcja protochlorofilidów u okrytonasiennych, a rozwój chloroplastów*. Post. Bioch. 56, 418–426.
- NEALSON K. H., CONRAD P. G., 1999. *Life: past, present and future*. Phil. Trans. R. Soc. B 354, 1923–1939.
- NOMATA J., SWEM L. R., BAUER C. E., FUJITA J., 2005. *Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from Rhodospirillum rubrum*. Biochim. Biophys. Acta 1708, 229–237.
- NOMATA J., KITASHIMA M., INOUE K., FUJITA Y., 2006. *Nitrogenase Fe protein-like Fe-S cluster is conserved in L-protein (BchL) of dark-operative protochlorophyllide reductase from Rhodospirillum rubrum*. FEBS Lett. 580, 6151–6154.
- NOMATA J., OGAWA T., KITASHIMA M., INOUE K., FUJITA Y., 2008. *NB-protein (BchN–BchB) of dark-operative protochlorophyllide reductase is the catalytic component containing oxygen-tolerant Fe-S clusters*. FEBS Lett. 582, 1346–1350.
- REINBOTHE C., EL BAKKOURI M., BUHR F., MURAKI N., NOMATA J., KURISU G., FUJITA J., REINBOTHE S., 2010. *Chlorophyll biosynthesis: spotlight on protochlorophyllide reduction*. Trends Plant Sci. 15, 614–624.
- RYTER S. W., TYRREL R. M., 2000. *The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties*. Free Rad. Biol. Med. 28, 289–309.
- SARMA R., BARNEY B. M., HAMILTON T. L., JONES A., SEEFELDT L. C., PETERS J. W., 2008. *Crystal Structure of the L Protein of Rhodospirillum rubrum Light-Independent Protochlorophyllide Reductase with MgADP Bound: A Homologue of the Nitrogenase Fe Protein*. Biochemistry 47, 13004–13015.
- SCHOEFS B., 2005. *Protochlorophyllide reduction – what is new in 2005?* Photosynthetica 43, 329–343.
- SCHOEFS B., FRANCK F., 2003. *Protochlorophyllide reduction: mechanisms and evolutions*. Photochem. Photobiol. 78, 543–557.
- SHUI J., SAUNDERS E., NEEDLEMAN R., NAPPI M., COOPER J., HALL L., KEHOE D. STOWE-EVANS E., 2009. *Light-dependent and light-independent protochlorophyllide oxidoreductases in the chromatically adapting cyanobacterium Fremyella diplosiphon UTEX 481*. Plant Cell Physiol. 50, 1507–1521.
- SOLYMOSI K., SCHOEFS B., 2008. *Prolamellar body: a unique plastid compartment, which does not only occur in dark-grown leaves*. [W:] Plant Cell Compartments – Selected Topics. SCHOEFS B. (red.). Research Sign Post, India, 152–202.
- SOLYMOSI K., SCHOEFS B., 2010. *Etioplast and etioplast formation under natural conditions: the dark side of chlorophyll biosynthesis in angiosperms*. Photosynth. Res. 105, 143–166.
- SUNDQVIST C., DAHLIN C., 1997. *With chlorophyll pigments from prolamellar bodies to light-harvesting complexes*. Physiol. Plant. 100, 748–759.
- SYTINA O.A., HEYES D. J., HUNTER C. N., GROOT M. L., 2009. *Ultrafast catalytic processes and conformational changes in the light-driven enzyme protochlorophyllide oxidoreductase (POR)*. Biochem. Soc. Trans. 37, 387–391.
- WILLOWS R. D., 2003. *Biosynthesis of chlorophylls from Protoporphyrin IX*. Nat. Prod. Rep. 20, 327–341.
- YAMAZAKI S., NOMATA J., FUJITA Y., 2006. *Differential Operation of Dual Protochlorophyllide Reductases for Chlorophyll Biosynthesis in Response to Environmental Oxygen Levels in the Cyanobacterium Leptolyngbya boryana*. Plant Physiol. 142, 911–922.
- YANG J., CHENG Q., 2004. *Origin and evolution of the light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) genes*. Plant Biology 6, 537–544.