

© Е. М. Чекунова

Кафедра генетики и селекции
биолого-почвенного факультета
СПбГУ, Санкт-Петербург

✿ В обзоре изложены результаты генетических, молекулярно-биологических и биохимических исследований двух протохлорофиллид-оксидоредуктаз (ПОР) — ферментов, обеспечивающих светозависимый (сПОР) и темновой (тПОР) пути восстановления протохлорофиллида в процессе биосинтеза хлорофилла. Обсуждаются эволюционные аспекты их происхождения и функционирования. Основное внимание уделено генетике наиболее древнего темнового биосинтеза хлорофилла.

✿ **Ключевые слова:** биосинтез хлорофилла; восстановление протохлорофиллида.

ГЕНЕТИКА БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА: ТЕМНОВОЙ И СВЕТОЗАВИСИМОГО ПУТИ

Принятые сокращения:

сПОР — светозависимая протохлорофиллид-оксидоредуктаза;

тПОР — темновая протохлорофиллид-оксидоредуктаза;

ПХЛД — протохлорофиллид;

ХЛД — хлорофиллид;

ФС — фотосистема;

ХЛ — хлорофилл;

БХЛ — бактериохлорофилл;

ОРС — открытая рамка считывания.

ВВЕДЕНИЕ

Фототрофные бактерии и пластиды содержат тетрапиррольные пигменты — бактериохлорофиллы (БХЛ) и хлорофиллы (ХЛ), обеспечивающие процессы фотосинтеза (Шестаков, 1998). Аноксигенные бактерии синтезируют их в темноте, цианобактерии — на свету и в темноте, а покрытосеменные растения — только на свету. Способность к светонезависимому и/или светозависимому образованию ХЛ или БХЛ обеспечивается ферментами, катализирующими превращение протохлорофиллида (ПХЛД) в хлорофиллид (ХЛД). В эволюции сформировались два пути осуществления этой реакции. Один из них связан с использованием не зависящей от света, или темновой протохлорофиллид-оксидоредуктазы (тПОР). В свою очередь, светозависимое образование ХЛД осуществляет НАДФН: протохлорофиллид оксидоредуктаза (сПОР). Современные представления о генетической детерминации, происхождении и функционировании этих ферментов кратко изложены в настоящем обзоре.

1. БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА

ПХЛД — последний общий биосинтетический предшественник ХЛ и БХЛ, двух структурно родственных пигментов, которые различаются, в частности, природой боковых цепей при атомах углерода тетрапиррольного макроцикла (рис. 1). Они поглощают свет и участвуют в разделении зарядов поперек энергосопрягающих биомембран, что является основой аноксигенной фототрофии у бактерий, синтезирующих БХЛ, и оксигенной фототрофии у цианобактерий, прохлорофитов, водорослей и высших растений. *In vivo* ХЛ и БХЛ существуют в форме нековалентно связанных хромофоров пигмент-белковых комплексов светособирающих антенн и реакционных центров (Пиневич, Аверина, 2002).

Биосинтез тетрапирролов у фототрофных организмов осуществляется через цепочку биохимических реакций, катализируемых как растворимыми, так и мембраносвязанными ферментами. Путь превращения тетрапиррольного макроцикла протопорфирина IX (ПП), последнего обще-

Поступила в редакцию 20.11.2009.
Принята к публикации 05.07.2010.

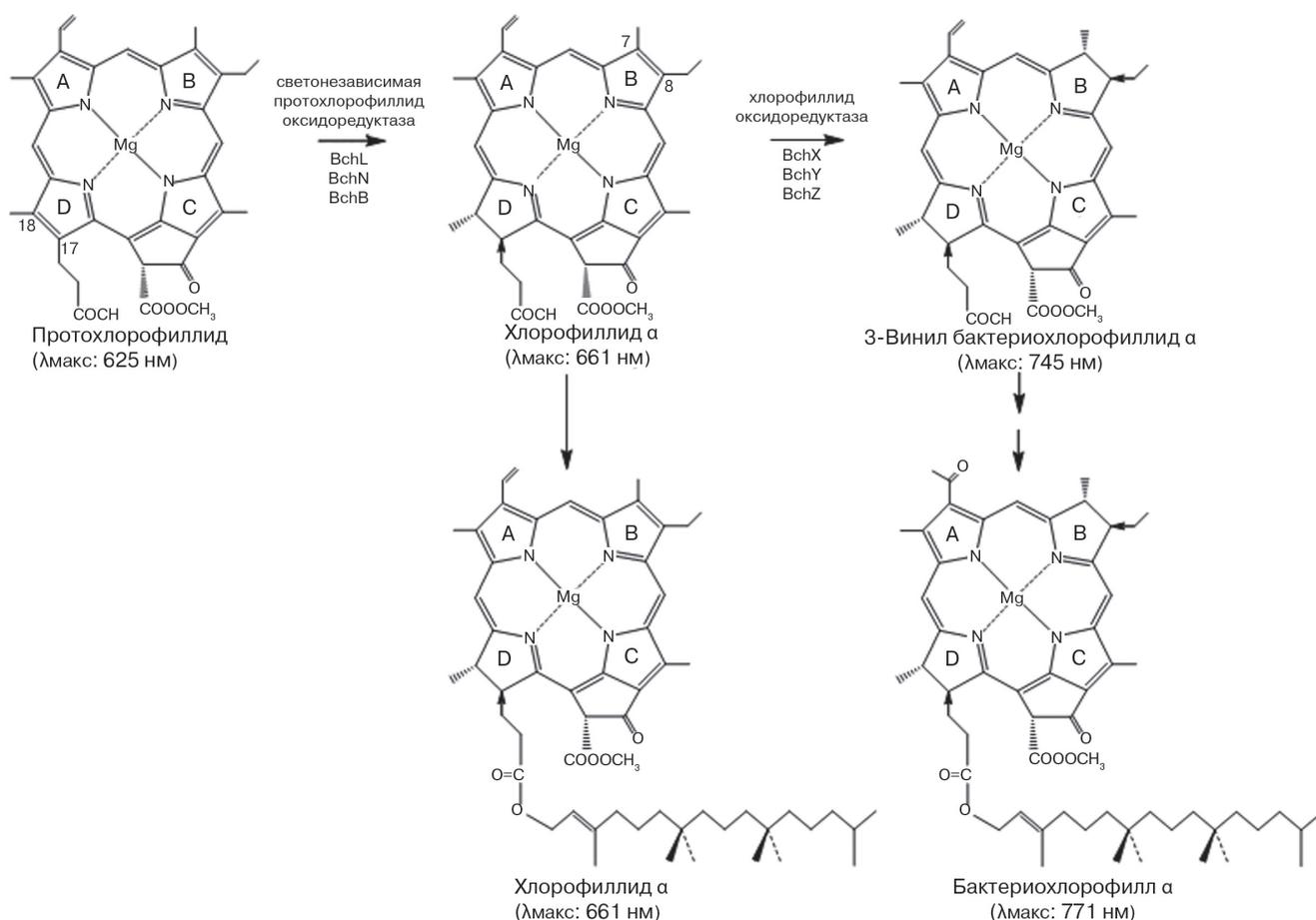


Рис. 1. Синтез хлорофилла и бактериохлорофилла из протохлорофиллида.

У анаэробной бактерии *R. capsulatus* циклический тетрапиррол ПХЛД превращается в ХЛД в результате восстановления двойной связи в положении C₁₇–C₁₈ в кольце D макроцикла ферментом тПОР, состоящим из трех субъединиц: BchLNB. Далее комплекс ХЛД-оксидоредуктазы BchXYZ, восстанавливает двойную связь в кольце В (C₇–C₈) с образованием бактериохлорофиллида, из которого синтезируется БХЛ а. Из ХЛД а у окисленных фотосинтетиков после присоединения фитола образуется ХЛ а. В скобках указаны максимумы в спектрах поглощения пигментов

го биосинтетического предшественника ХЛ и гема, в Mg-протопорфирин IX и далее через ряд интермедиатов, в ХЛ или БХЛ, известный как магниевая ветвь биосинтеза тетрапирролов (рис. 2), характерен для всех фототрофных организмов (Reinbothe, Reinbothe, 1996). Мишенью световой регуляции этого пути служит ПХЛД. *In vivo* пигмент существует в двух формах: дивинил-ПХЛД и моновинил-ПХЛД, соотношение которых варьирует у разных организмов и зависит от внешних условий и стадии онтогенеза. Биологическая целесообразность гетерогенности этих молекул до сих пор не ясна (Беляева, 2009).

ПХЛД — субстрат реакции, которая заключается в восстановлении двойной связи в четвертом кольце молекулы в положении C₁₇–C₁₈ (рис. 1). Эта реакция может проходить в темноте и на свету. Светозависимое восстановление ПХЛД свойственно окисленным фототрофам. Темновой и светозависимый биосинтез ХЛ сосуществуют у многих организмов, в том числе цианобактерий, во-

дрослей и голосеменных растений. Покрытосеменные растения не образуют ХЛ в темноте. Эта способность утеряна и у таких голосеменных, как реликтовое листопадное дерево *Ginkgo biloba*, тропическая лиана *Gnetum ula* и растущая в пустынях *Welwitschia mirabilis*, а также у папоротника *Ptilotum nudum*, зеленой водоросли *Euglena gracilis* и красной водоросли *Cyanidium caldarum*. Большинство анаэробных фототрофов, включая пурпурные и зеленые бактерии, образуют БХЛ только в темноте (Armstrong, 1998).

У организмов, синтезирующих ХЛ в темноте, качественные и количественные характеристики этого процесса сильно варьируют в зависимости от стадии развития и внешних условий. Активный темновой биосинтез ХЛ, характерный для взрослых голосеменных растений, значительно снижен у их проростков (Wettstein et al., 1995). Первичные иголки секвойи (*Metasequoia glyptostroboides*) и вторичные иголки европейской пинии (*Pinus pinea*) сохранили способность зеленеть в

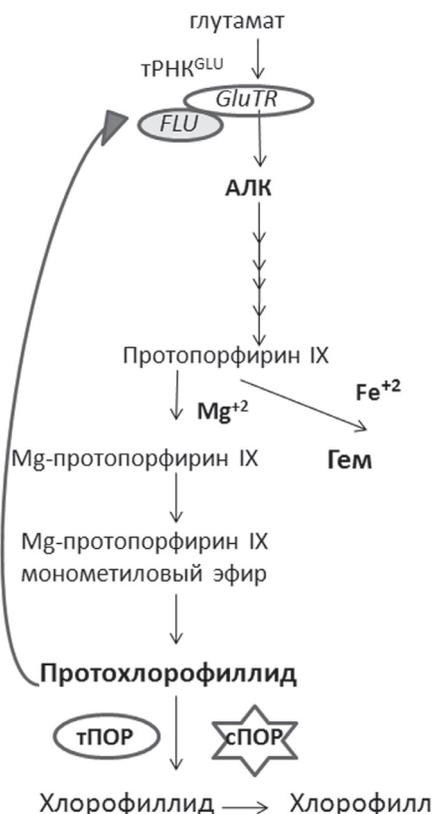


Рис. 2. Схема биосинтеза хлорофилла в фотосинтезирующей клетке.

Пигмент синтезируется из глутамата через серию ферментативных реакций, показанных стрелками. АЛК — 5-аминолевулиновая кислота — ключевой интермедиат биосинтеза. Стрелка указывает механизм регуляции биосинтеза ХЛ: протохлорофиллид через белок FLU репрессировывает GluTR-глутамат-тРНК-редуктазу (Meskauskiene R., Apel K., 2002)

темноте (Laudi, Manzini, 1975; Ou, Adamson, 1995), тогда как проростки некоторых видов лиственниц, например *Larix decidua*, ее практически утратили (Mariani et al., 1990).

2. СВЕТОНЕЗАВИСИМЫЙ БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА: ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Доказательства существования двух путей восстановления ПХЛД: желтые в темноте (yellow) мутанты зеленых водорослей

Предположение о наличии нескольких механизмов, обеспечивающих восстановление ПХЛД в процессе биосинтеза ХЛ, было высказано еще в начале 50-х годов XX века при изучении разных видов зеленых водорослей. Классический генетический анализ позволил выявить довольно обширный класс так называемых желтых (yellow) мутантов с нарушенным темновым синтезом ХЛ, которые имели желтую окраску при выращивании в темноте,

но подобно этиолированным проросткам высших растений, зеленели при освещении. Их пигментация в темноте обусловлена отсутствием ХЛ, накоплением ПХЛД и наличием желтых каротиноидов. Мутанты yellow были получены у ряда зеленых водорослей, в том числе *Chlorella*, *Scenedesmus* (Bogorad, 1976), а также *Chlamydomonas reinhardtii*, в ядерном геноме которой идентифицированы 7 локусов, мутации в которых приводят к появлению подобного фенотипа (Sager, 1955; Ford, Wang, 1980; 1980a). Сейчас известно, что кодируемые этими генами белки не входят в состав ферментного комплекса тПОР (см. раздел 2.4). Тем не менее, эксперименты, в которых было показано, что способность мутантов yellow хламидомонады зеленеть на свету может быть блокирована ядерной мутацией *ps-1*, послужили поводом говорить о сосуществовании двух генетически различных (светозависимого и светонезависимого) путей восстановления ПХЛД (Ford et al., 1981).

2.2. Светонезависимое восстановление протохлорофиллида у аноксигенных фототрофных бактерий обеспечивается продуктами генов *bchB*, *bchL* и *bchN*

Основные сведения о генетическом контроле темнового биосинтеза ХЛД из ПХЛД были получены при анализе пигментных мутантов бактерий рода *Rhodobacter*. Эти несерные пурпурные бактерии способны к аноксигенному фотосинтезу и независимо от света образуют БХЛ. Мутанты факультативных фототрофов *R. sphaeroides* и *R. capsulatus* с разными дефектами фотосинтеза и биосинтеза пигментов стали предметом генетического анализа, в результате которого был выявлен участок хромосомы протяженностью в 46 тпн, названный «фотосинтетическим генным кластером». Он состоит более чем из 40 генов, отвечающих за фотосинтетические функции (Zsebo, Hearst, 1984), и содержит всю генетическую информацию, необходимую для синтеза БХЛ из протопорфирина IX (рис. 3А). Среди индуцированных пигментных мутантов *R. capsulatus* были и бесхлорофильные штаммы, накапливающие ПХЛД. Их молекулярно-генетический анализ позволил найти три гена — *bchB*, *bchL* и *bchN*, мутации по которым блокируют темновое восстановление ПХЛД (Burke et al., 1993), и предположить, что кодируемые ими полипептиды являются субъединицами фермента, получившего название темновой (не зависящей от света) оксидоредуктазы (тПОР). При этом выяснилось, что ген *bchL* кодирует белок, гомологичный субъединице NifH нитрогеназы бактерий (Hearst et al., 1985).

2.3. Хлоропластный ген *frxC* — поиски функций

Одну из проблем не зависящего от света биосинтеза ХЛ удалось решить при сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей пластидных геномов печеночника *Marchantia polymorpha* и двух представителей покрытосеменных растений — табака *Nicotiana*

Фотосинтетический генный кластер

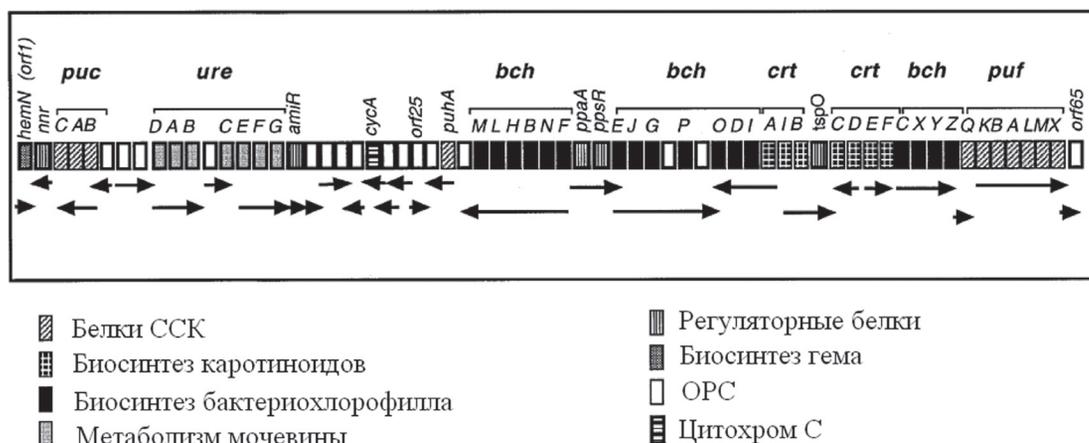


Рис. 3А. Фотосинтетический генный кластер *R. sphaeroides* 2.4 (по: Choundhary, Kaplan, 2000).

Черным цветом обозначены гены биосинтеза бактериохлорофилла (bch). Стрелками показано направление транскрипции указанных генов

tabacum и риса *Oryza sativa*. Большинство из них были сходными, но ОРС, первоначально названную *frxC* благодаря структурному сходству продукта этого гена с ферредоксином бактерий, удалось найти только в пластидном геноме *M. polymorpha* (Ohyama et al., 1986). Она оказалась гомологичной гену *R. capsulatus*, кодирующему NifH — γ -субъединицу нитрогеназы (Fujita et al., 1989). Присутствие гена *frxC* в пластидном геноме печеночника казалось парадоксом, поскольку ядерные организмы не способны фиксировать молекулярный азот. В дальнейшем, когда ортологи гена *frxC* были обнаружены в пластидных геномах зеленеющих в темноте растений — нескольких видов сосны и зеленой водоросли *S. reinhardtii*, появились предположения, что продукты этих генов вовлечены не в процесс фиксации азота, а необходимы для не зависящего от света восстановления ПХЛД (Lindholm, Gustafsson, 1991; Huang, Liu, 1992).

2.4. Некоторые пластидные геномы содержат гены, кодирующие ПОР

Существенную роль в изучении генетического контроля темнового биосинтеза ХЛ сыграли мутанты yellow хламидомонады. Помимо ядерных мутаций (см. раздел 2.1), у нее была описана хлоропластная мутация, приводящая к фенотипу yellow (Александрова, 1979). В дальнейшем подобные мутанты получали в результате инсерционного мутагенеза (Roitgrund, Mets, 1990). Ортологи одного из таких делетированных хлоропластных генов хламидомонады *gidA* (сокр. англ. по green-in-the-dark) вскоре были найдены в пластидных геномах нескольких видов сосны, где они оказались сцепленными с геном *frxC* (Lindholm, Gustafsson, 1991). Сходное взаимное расположение этих генов (рис. 3Б) было установлено в пластидном геноме *M. polymorpha* и на хромосоме ци-

анобактерии *Synechocystis sp.* PCC6803 (Ogura et al., 1992). Прямое участие генов *frxC* (*chlL*) и *gidA* (*chlN*) в темновом биосинтезе ХЛ удалось показать при анализе фенотипов инсерционных мутантов *S. reinhardtii* (Suzuki, Bauer, 1992; Choquet et al., 1992) и азотфиксирующей цианобактерии *Plectonema boryanum* (Lyngbya sp. PCC7419) (Fujita et al., 1992; 1993). Более того, как и в случае с гомологией продукта гена *chlL* и полипептида NifH (см. разделы 2.1 и 2.2) было установлено, что белок, кодируемый геном *chlN*, имеет высокую степень сходства с белками NifD и NifK (α - и β -субъединицами MoFe-белка нитрогеназы бактерий (Fujita et al., 1993).

В 1993 г. в пластидных геномах *M. polymorpha* и *S. reinhardtii* были обнаружены ортологи гена *bchB* (*chlB*) *R. capsulatus*. Функциональный анализ инсерционных мутантов хламидомонады и цианобактерий по этому гену показал, что белок, кодируемый геном *chlB*, необходим для восстановления ПХЛД в темноте, а его первичная структура имеет сходство с аминокислотной последовательностью белков NifK и ChlN (Li et al., 1993, Fujita et al., 1996).

2.5. Способность зеленеть в темноте коррелирует с наличием генов *chlB*, *chlL* и *chlN* в хлоропластных геномах

Коль скоро было установлено, что хлоропластные гены: *chlB*, *chlL* и *chlN* контролируют не зависящее от света восстановление ПХЛД, возник вопрос, коррелирует ли наличие этих генов со способностью образовывать ХЛ в темноте. ДНК-ДНК гибридизация, основанные на ПЦР методы идентификации определенных участков ДНК и прямое сравнение нуклеотидных последовательностей хлоропластных геномов — все эти методы были использованы для поисков генов *chlB*, *chlL* и *chlN*

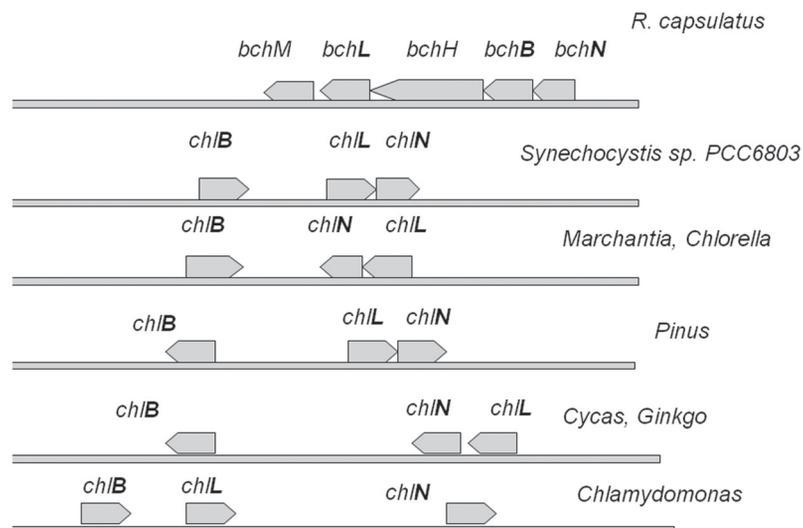


Рис. 3Б. Структурное расположение генов, кодирующих тПОР.

На диаграмме представлены ориентация и взаиморасположение генов тПОР в хромосомах аноксигенных бактерий (*bchB*, *bchL*, *bchN*), оксигенных бактерий и в хлоропластных геномах ядерных фототрофов (*chlB*, *chlL*, *chlN*), синтезирующих хлорофилл в темноте. Гены *bchH* и *bchM* кодируют Н-субъединицу магний-хелатазы и фермент магний-протопорфирин IX метилтрансферазу

у различных фотосинтезирующих организмов. В геномах всех изученных к настоящему времени покрытосеменных растений их не обнаружили. В то же время они найдены в хлоропластной ДНК голосеменных растений (за исключением не способных зеленеть в темноте представителей семейства гнетофитов — *Gnetum gnemon* и *W. mirabilis*), папоротникообразных (кроме усатых папоротников) и водорослей. Не оказалось этих генов у *E. gracilis* и бурой водоросли *Odontella sinensis*, которые не синтезируют ХЛ в темноте (Armstrong, 1998). Таким образом, выяснилось, что для темнового синтеза ХЛД из ПХЛД необходимо наличие в хлоропластных геномах генов *chlB*, *chlL* и *chlN*. Это правило оказалось неприменимым только к реликтовому представителю голосеменных *G. biloba*, проростки и листья которого не способны зеленеть в темноте, несмотря на наличие всех трех генов (Richard et al., 1994; McCoy et al., 2008). Объяснения этому феномену до сих пор не найдено.

2.6. Регуляция синтеза тПОР

Данные о регуляции экспрессии генов, кодирующих субъединицы тПОР, пока очень фрагментарны и сильно различаются в зависимости от таксономической принадлежности изучаемого организма.

Транскрипция гена *chlL* у цианобактерии *P. boranyum* имеет место только при подавлении нитрогеназной активности (Fujita et al., 1991). Этот факт позволил заключить, что связанный азот и (или) молекулярный кислород, которые ингибируют фиксацию азота — необходимые предпосылки экспрессии этого гена у цианобактерий.

Транскрипты хлоропластных генов *chlB*, *chlL* и *chlN* хламидомонады одинаково присутствуют в клетках дикого типа и мутантов yellow, растущих и на свету, и в тем-

ноте, хотя уровень их накопления на свету оказывается в 2–4 раза выше. Белки ChlN и ChlB также выявляются в сходных количествах в клетках дикого типа и мутантов yellow, растущих и на свету и в темноте, а белок ChlL — только у дикого типа в темноте. Ядерные мутанты не содержат белка ChlL за исключением мутанта у-7, который синтезирует иммунореактивный полипептид меньшего размера (Саhoon, Timko, 2000). На основе этих результатов был сделан вывод, что у *C. reinhardtii* синтез белка *ChlL* негативно регулируется светом, а ядерные гены yellow контролируют его образование или накопление.

В клетках *M. paleacea*, которые одинаково хорошо зеленеют в темноте и при освещении, содержание мРНК генов *chlB*, *chlL* и *chlN* не зависит от света (Takio, Satoh, 1995). Повышенный уровень их транскриптов на свету был обнаружен только в клеточных линиях, не синтезирующих ХЛ в темноте, т. е. в условиях, когда возможен процесс зеленения.

Изучение регуляции темнового биосинтеза ХЛ у зеленых в темноте проростков ели *Picea abies* и лиственницы *L. decidua*, способных накапливать ХЛ в темноте только на ранних стадиях онтогенеза, показало, что у обоих видов гены, кодирующие тПОР, экспрессируются конститутивно. Различия были найдены на уровне белков — пожелтение проростков лиственницы оказалось связанным со снижением уровня содержания белка CHLB (Demko et al., 2009).

2.7. тПОР сходны с нитрогеназами бактерий

Структура тПОР консервативна, она сохранялась в течение миллиардов лет эволюции. Идентичность аминокислотной последовательности белков *BchL*, *BchB* и *BchN* у *R. capsulatus* с тПОР цианобактерий, зеленых водорослей, папоротникообразных и голосеменных растений составляет 30–60 %. При этом они имеют значи-

тельное сходство с субъединицами нитрогеназы эубактерий NifHDK (Fujita, Bauer, 2000).

Нитрогеназа — это чувствительный к кислороду ферментный комплекс, который восстанавливает молекулярный азот с использованием АТФ и донора электронов:



Голофермент состоит из двух компонентов: Fe-белка и MoFe-белка. Fe-белок — это электрондонорный гомодимер, кодируемый геном *nifH*, который имеет два MgАТФ-связывающих сайта и содержит чувствительный к кислороду [Fe₄S₄]-кластер, лигандированный четырьмя остатками цистеина, по два от каждого мономера. MoFe-белок представляет собой гетеротетрамер, состоящий из субъединиц NifDK. Каждая пара субъединиц содержит Р-кластер [Fe₈S₈] и Fe-Mo кофактор [Fe₇MoS₉]. Донором электронов служит восстановленный ферредоксин. Вслед за гидролизом молекул MgАТФ Fe-белок переносит электроны от ферредоксина через Р-кластеры к Mo-содержащим редокс-центрам тетрамера NifD₂K₂, а тот, в свою очередь, трижды отдает пару электронов молекуле субстрата, восстанавливая ее до двух молекул аммиака (Rubio, Ludden, 2005).

При обилии генетических и молекулярно-генетических данных о не зависящем от света восстановлении ПХЛД, полученных в течение последних 50 лет, исследования биохимии этого процесса начались сравнительно недавно. Из *R. capsulatus* удалось изолировать тПОР, и ее активность была изучена *in vitro*. Экстракты субъединиц тПОР получали в результате сверхэкспрессии генов *bchL* и *bchN-B*, введенных в геном *R. capsulatus* с помощью сконструированных плазмид (Nomata et al., 2005). Их анализ показал, что фермент состоит из двух компонентов — гомодимера L (BchL)₂ и гетеротетрамера NB (BchN)₂(BchB)₂, и для его активности необходимы АТФ и донор электронов. В соответствии с недавно установленной кристаллической структурой тПОР *R. capsulatus*, каждая каталитическая единица BchN-BchB содержит один ПХЛД и один [Fe₄S₄] кластер, лигандированный остатком аспартата и тремя цистеинами остатками (Muraki et al., 2010). В присутствии АТФ L-белок (BchL)₂ передает 2 электрона от ферредоксина на NB-белок (BchN-BchB)₂, который содержит каталитический сайт для восстановления ПХЛД. Пространственная структура NB кластера и ПХЛД оказались соответственно идентичными Р-кластеру и Fe-Mo кофактору в MoFe-белке нитрогеназы. Сходство пространственных структур обоих ферментов свидетельствует, что субъединицы ChlL, ChlB и ChlN оказались функционально сходными с субъединицами нитрогеназы бактерий NifH, NifK и NifD.

Так же, как нитрогеназа, тПОР цианобактерий чувствительна к кислороду. В опытах *in vitro* O₂ ингибировал активность белков ChlL и ChlN-ChlB в течение 5 и 30 минут (Yamamoto et al., 2009). По-видимому, кислородные фототрофы научились защищать тПОР от воздействия

O₂, и природу соответствующих регуляторных механизмов еще предстоит выяснить.

У пурпурной бактерии *R. capsulatus* известен еще один фермент, похожий на нитрогеназу — это хлорофиллид-оксидоредуктаза (ХОР), кодируемая генами *bchXYZ* (рис. 1), которая превращает ХЛД а в БХЛ а (Nomata, 2006). Аминокислотная последовательность полипептида BchX сходна с аминокислотной последовательностью субъединицы нитрогеназы NifH и имеет 32 % идентичности с продуктом гена *bchL*. Более того, BchY и BchZ — две другие субъединицы ХОР — гомологичны белкам BchN/ChlN и BchB/ChlB, соответственно. Структурное и функциональное сходство ферментных комплексов тПОР (BchL, N, B) и ХОР (BchX, Y, Z) у *R. capsulatus* дает основания говорить об их общем происхождении. Вероятно, они появились в результате дупликации и дивергенции предковых генов, кодировавших менее специфичные по отношению к субстрату ферменты, способные восстанавливать ПХЛД (Raymond et al., 2004).

3. СВЕТОЗАВИСИМЫЙ БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛИДА

Проростки высших растений, выращенные в темноте, окрашены в желтый цвет и морфологически отличаются от зеленых, растущих на свету. Их хлоропласты не содержат тилакоидов и ХЛ, биосинтез которого прерывается на стадии образования ПХЛД, и представляют собой этиопласты с проламеллярным телом и отходящими от него протилакоидами. В темноте в них аккумулируются комплексы: ПХЛД-НАДФН-сПОР. Свет запускает процесс зеленения этиолированных проростков: ПХЛД превращается в ХЛД и далее в ХЛ, и происходит дифференциация этиопластов в хлоропласты, когда проламеллярные тела и протилакоиды трансформируются в тилакоиды с развитой ламеллярной системой. Стартовым механизмом этих структурно-функциональных изменений служит рецепция света сПОР. К настоящему времени он довольно подробно изучен (Lebedev, Timko, 1998; Беляева, 2009), и здесь мы остановимся лишь на кратком изложении истории открытия сПОР и генетических аспектов его исследований.

3.1. Генетический контроль фотопревращения ПХЛД

Впервые о выделении из этиопластов пигмент-белкового комплекса, в отсутствие которого не происходит восстановление ПХЛД, сообщили А. А. Красновский (1952), а также Смит с Бенитезом (Smith, Benitez, 1953), которые назвали его «протохлорофиллид-голохромом». Установление корреляции между уменьшением содержания ПХЛД и увеличением содержания ХЛД при освещении этиолированных листьев в условиях низких температур (Smith, Trench, 1958) позволило высказать предположение, что голохромный белок является фо-

тозависимой редуктазой. Эта гипотеза получила подтверждение в конце 70-х годов, когда сПОР молекулярной массой 36 kDa была выделена из проростков ячменя (Apel et al., 1980), а затем других растений. Ген *Por* ячменя, который кодирует сПОР, был клонирован первым среди генов, контролирующих биосинтез ХЛД у растений (Schulz et al., 1989). Авторам удалось выделить сПОР в количестве, достаточном для создания антител, которые были использованы для поисков гена этого фермента в библиотеке кДНК. В дальнейшем этот ген был идентифицирован у разных растений: пшеницы, овса, гороха, арабидопсиса и сосны, а также у хламидомонады и цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC6803 (Reinbothe, Reinbothe, 1996).

Мутанты *C. reinhardtii* по генам, кодирующим сПОР, были получены в результате мутагенеза клеток термочувствительного желтого мутанта у-1-4 (фенотип: желтый в темноте, зеленый на свету), как штаммы, неспособные зеленеть на свету при непермиссивной температуре. Генетический анализ показал, что такой фенотип обусловлен мутациями в ядерном локусе *pc-1*, картированном в I группе сцепления на 1 сМ дистальнее локуса *y-5* (Ford et al., 1981; 1983). Оказалось, что *pc-1* — это мутация, приводящая к сдвигу рамки считывания в гене *Por1*, кодирующем сПОР. Клетки мутантов генотипа *pc-1* были способны синтезировать 52 и 36 % хлорофилла дикого типа в темноте и на свету, соответственно. Это означало, что в отсутствие сПОР механизм темнового восстановления ПХЛД может функционировать и на свету (Li, Timko, 1996).

Несколько генов, кодирующих изоформы белка ПОР (PORA, PORB, PORC) имеются у *A. thaliana* (Oosawa et al., 2000), ячменя (Holtorf et al., 1995), и некоторых видов голосеменных растений (Skinner, 1999), тогда как в геноме цианобактерий и хламидомонады (Li, Timko, 1996) он мономорфен. У всех изученных растений гены *POR* по-разному регулируются светом. Он ингибирует экспрессию *PORA* — ген активно транскрибируется только в этиолированных проростках, и активирует экспрессию генов *PORB* и *PORC* при переносе растений из темноты на свет (Frick et al., 2003). Роль различных изоформ сПОР и кодирующих их генов в превращении ПХЛД в ХЛД, в биогенезе тилакоидов, в формировании комплекса сПОР, защите от фотоокисления и в процессе зеленения в настоящее время усиленно изучается (Литвин, Беляева, 2007; Беляева, 2009; Masuda, Takamiya, 2005).

3.2 Молекулярная структура сПОР

Продукт гена ячменя *Por1* — это белок из 388 аминокислот с транзитным пептидом размером 74 а. о. (Schulz et al., 1989). Гены, кодирующие сПОР, изолированы из организмов, относящихся к разным таксономическим группам, от цианобактерий до высших растений (Schoefs, Franck, 2003). Первичная структура белка сПОР характеризуется высоким содержанием

аминокислот с основными свойствами и большим количеством гидрофобных аминокислотных остатков. Все известные к настоящему времени сПОР содержат 4 консервативных остатка цистеина (у гороха в позициях: 119, 170, 280 и 307), один из которых может быть вовлечен в связывание с ПХЛД. Вторичная структура сПОР установлена на основе спектров кругового дихроизма мономерного белка — его молекула состоит из 8–9 α -спиралей (33 %), 7 β -цепей (19 %), 20 % поворотов и 28 % случайных петель (Birve et al., 1996). Показано, что молекула сПОР присоединяется к мембране двухсторонними сегментами, содержащими остатки триптофана, локализованного около С-конца, или гидрофобными петлями. Сравнение структуры сПОР со структурой других НАДФ-зависимых белков позволило отнести этот фермент к семейству алкогольдегидрогеназ (Beale, 1999).

3.3 Локализация и функционирование сПОР

In vitro очищенный белок, кодируемый геном *POR1*, — мономер молекулярной массой 35–38 kDa (Oliver, Griffith, 1980; Apel et al., 1980). В условиях *in vivo* сПОР ассоциирован с мембранами пластид. Образование комплекса этого фермента с НАДФН и ПХЛД является необходимым условием стабильной ассоциации с тилакоидами. Полагают, что в этом комплексе ПХЛД служит фоторецептором (Griffiths, 1991), а НАДФН выступает в качестве донора электронов, которые передаются ПХЛД (Griffiths et al., 1996). Если комплекс не образуется, то сПОР разрушается протеазами, содержащимися в строме (Beale, 1999).

Транскрипты ядерных генов, кодирующих сПОР, обычно накапливаются в цитозоле около поверхности пластид (Marrison et al., 1996), где и происходит их трансляция на 80S рибосомах (Batschauer et al., 1982). Молекулы пре-сПОР, содержащие хлоропластные транзитные пептиды, транспортируются в хлоропласты. В это время они взаимодействуют с белками РТС (сокр. англ. protochlorophyllide-dependent translocation complex), которые являются компонентами Toc/Tic-транслоконов, или комплексов, которые расположены по обе стороны оболочки хлоропласта и обеспечивают импорт белков из цитоплазмы (Reinbothe et al., 2004; 2005). Существование ПХЛД-зависимых транслоконов (Schemenewitz et al., 2007) подтвердило обсуждаемую с 1995 г. гипотезу об участии ПХЛД в регуляции транспорта белков в хлоропласт (Reinbothe et al., 1995). Установлено, что для ассоциации сПОР с тилакоидами в качестве кофактора необходим НАДФ (Dahlin et al., 1999). Возможная роль в этом процессе вторичной структуры сПОР активно обсуждается (Aronsson et al., 2003).

Если этиолированные проростки покрытосеменных растений (ячменя, традесканции и др.) осветить в те-

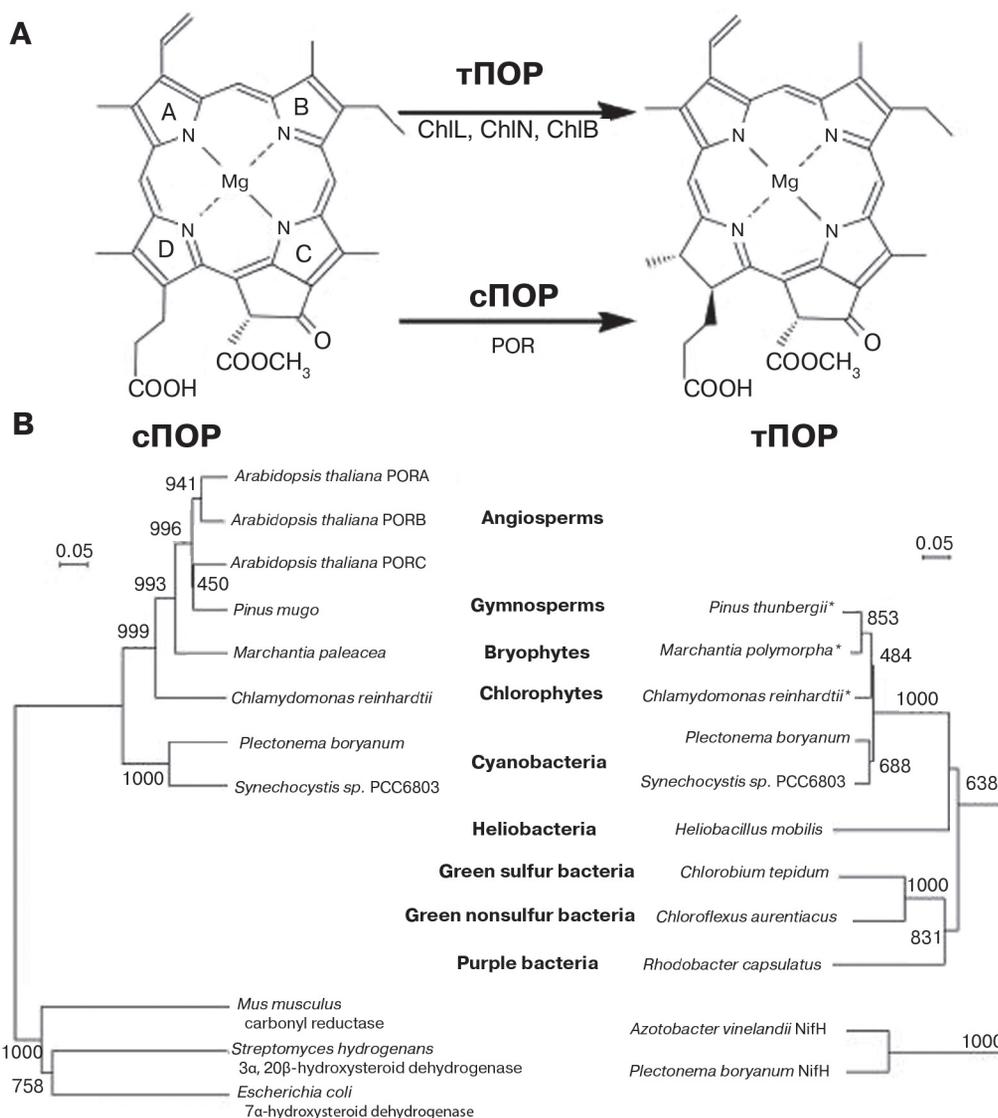


Рис. 4. Филогения тПОР и сПОР.

Представлена молекулярная филогения (В) ферментов, осуществляющих превращение ПХЛД в ХЛД (А) (по: Yamazaki et al., 2006)

ние нескольких часов, а затем снова поместить их в темноту, они продолжают синтезировать ХЛ на уровне 20–30 % нормы (Porov, Dilova, 1969; Adamson et al., 1985). Отвечая на вопрос, каким образом осуществляется этот синтез в отсутствие тПОР, Раскин и Шварц (Raskin, Schwartz, 2003) установили, что ингибирование аскорбатпероксидазы салициловой кислотой ведет к прекращению темновой синтеза ХЛ у ячменя. Они предположили, что в темноте превращение ПХЛД в ХЛД может осуществлять и сПОР, которая использует электроны, полученные от аскорбата. Метод низкотемпературной спектроскопии позволил показать, что каталитический механизм сПОР включает в себя две промежуточные стадии, не требующие света, которые могут быть связаны с изменением положения или конформации молекулы фермента (Heyes et al., 2003).

3.4 . Эволюционное происхождение ПОР

Первоначально полагали, что сПОР появилась в процессе эволюции только у покрытосеменных растений, однако, в 90-х годах XX века выяснилось, что геномы цианобактерий и водорослей также содержат ген, кодирующий этот фермент. У цианобактерии *Synechocystis sp.* PCC6803 он был обнаружен как ген, который при трансформации комплементирует мутацию, аналогичную мутации, блокирующей тПОР *R. capsulatus* (Suzuki, Bauer, 1995). Аминокислотная последовательность белка, кодируемого этим геном, оказалась сходной с аминокислотной последовательностью сПОР высших растений. Филогенетический анализ субъединиц сПОР и близких к ней ферментов семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз показал, что эволюционная история генов сПОР нача-

лась с цианобактерий (рис. 4), а эукариоты получили их в результате эндосимбиотического горизонтального переноса, случившегося до момента дивергенции фототрофных ядерных организмов (Yang, Chen, 2004; Fong, Archibald, 2008). Молекулярная филогения тПОР однозначно свидетельствует о происхождении кодирующих его генов от нитрогеназ бактерий (Xiong et al., 2000; Yamazaki et al., 2006).

4. АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ХЛОРОФИЛЛОВ У ОРГАНИЗМОВ, СИНТЕЗИРУЮЩИХ ХЛОРОФИЛЛ В ТЕМНОТЕ И НА СВЕТУ

Первичная оценка эффективности темного и светового биосинтеза ХЛ может быть дана путем измерения уровня этих пигментов в клетках дикого типа и бесхлорофильных мутантов, выращенных в темноте и на свету. При изучении влияния освещения на накопление ХЛ у нескольких видов сосны было установлено, что в темноте 14–22-х дневные проростки *Pinus taeda* (Griffiths, 1991), *P. thunbergii* (Shinohara et al., 1992) и *P. sylvestris* (Drumm-Herrel, Mohr, 1994) синтезируют 20–25 % светового уровня ХЛ.

У мутантов цианобактерий с неактивным комплексом тПОР на свету полностью восстанавливается уровень содержания ХЛ за счет активности сПОР. Скорость накопления ХЛ при фототрофном росте так же, как и в хемогетеротрофных условиях в темноте, у мутантов *P. boryanum* с дефектными генами *chlL*, *chlM* и *chlN* были сходны с таковыми у штаммов дикого типа (Fujita et al., 1998). Аналогичные результаты были получены на мутантах *Synechocystis sp.* по генам *chlL* и *chlN* (Wu, Verma, 1995); и это свидетельствует о том, что светонезависимый биосинтез ХЛ не является необходимым для цианобактерий на свету.

Многие yellow-мутанты хламидомонады (как ядерные, так и хлоропластные) при росте на свету накапливают меньше ХЛ, чем штаммы дикого типа. В зависимости от генотипа его содержания снижается до 35 % (мутант у-5) до 78–98 % (мутант у-1а) уровня дикого типа (Ford, Wang, 1980; Ford et al., 1981). Клетки мутанта рс-1 *S. reinhardtii*, у которого не функционирует сПОР (Ford et al., 1981; 1983; Li, Timko, 1996) в темноте содержат наполовину меньше ХЛ, чем штаммы дикого типа, выращенные в сходных условиях. Возможно, что отсутствие светозависимого фермента каким-то образом снижает уровень темного синтеза ХЛ, оказывая влияние либо на активность тПОР, либо на содержание ПХЛД. На свету этот мутант накапливает 36 % ХЛ дикого типа. По-видимому, такой уровень пигмента обеспечивается активностью тПОР. Способность мутанта рс-1 накапливать на свету втрое больше ХЛ, чем в темноте, позволяет предположить, что светонезависимая редукция ПХЛД может позитивно регулироваться светом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Еще в начале 90-х годов XX века считали, что темновой биосинтез ХЛ — результат биохимических модификаций сПОР. Сейчас очевидно, что темновое и светозависимое восстановление ПХЛД контролируются разными генами, кодирующими два разных по структуре и происхождению ферментных комплекса. Методами классической и молекулярной генетики и геномики при изучении фотосинтезирующих бактерий, зеленых водорослей и высших растений были найдены три гена, контролирующие светонезависимое превращение ПХЛД в ХЛД — *chlL*, *chlB* и *chlN* (*bhlL*, *bhlB* и *bchN* у бактерий, синтезирующих БХЛ). Эти гены кодируют субъединицы ферментного комплекса тПОР, сходные по структуре с субъединицами нитрогеназы NifHDK (Muraki et al., 2010). Они обнаружены только у организмов, синтезирующих ХЛ в темноте, и у представителей эукариот локализованы в геномах пластид (Armstrong, 1998; Nomata et al., 2005).

Подобно ДНК-фотолазе (Begly, 1994), сПОР — это «фотоэнзим», или фермент, которому для проявления каталитической активности необходим свет. Она относится к семейству дегидрогеназ/редуктаз короткоцепочечных спиртов и так же, как тПОР, имеет прокариотное происхождение.

Основываясь на филогенетическом анализе и характере распределения тПОР и сПОР среди фототрофных организмов, мы можем предположить, что присущая аноксигенным бактериям тПОР — более архаичная ферментная система, имеющая общее происхождение с нитрогеназой. В процессе эволюции сПОР, по-видимому, появилась вместе с оксигенной фототрофией в ответ на увеличение содержания O_2 в атмосфере, что компенсировало потерю активности чувствительной к кислороду тПОР (Schoefs, Franck, 2003; Fujita et al., 2006).

Какими причинами было обусловлено появление светозависимого аппарата биосинтеза ХЛ? Какова цена утраты комплекса тПОР покрытосеменными растениями? Исчерпывающие ответы на эти вопросы еще не получены. Биосинтез БХЛ у современных анаэробных бактерий ингибируется светом и кислородом (Shiba, Shimada, 1997). Такое ингибирование можно рассматривать как механизм предотвращения потенциальной опасности фотоокисления (Шальго, 2004). Молекулы порфиринов (к которым относятся БХЛ, ХЛ и их биосинтетические предшественники) — сильные фотосенсибилизаторы, на свету вызывающие образование синглетного кислорода. В аэробных условиях ингибирование тПОР светом и кислородом может снижать эффективность фотосинтеза и приводить к накоплению ПХЛД (Fujita, Bauer, 2000). Появление сПОР предотвращало этот процесс и обеспечивало эффективный оксигенный фотосинтез.

Установлено, что организмы, способные к светозависимому и светонезависимому синтезу ХЛ (БХЛ), вы-

бирают пути восстановления ПХЛД в зависимости от интенсивности освещения и содержания кислорода. Цианобактерия *P. borianum* на слабом свете (интенсивностью менее $10\text{--}25$ мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$) образует ХЛ только с помощью тПОР; при освещенности свыше 130 мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$ весь ХЛ синтезируется исключительно с помощью сПОР, а при средней интенсивности света ($25\text{--}130$ мкмоль квантов $\text{м}^{-2} \times \text{с}^{-1}$) функционируют оба фермента, и большая часть ХЛ образовывалась по светозависимому пути (Fujita et al., 1998). Мутант, лишенный сПОР, терял способность расти в аэробных условиях и при высокой интенсивности света. Его перенесение в анаэробные условия приводило к возобновлению роста и биосинтеза ХЛ (Yamazaki et al., 2006). Все эти данные свидетельствуют о том, что тПОР и сПОР компенсируют функции друг друга в зависимости от состояния окружающей среды, позволяя организмам выживать при изменении освещенности и содержания кислорода.

Для аэробных фотосинтетиков сПОР имеет несколько очевидных преимуществ перед тПОР:

- фермент нечувствителен к кислороду;
- как фотоэнзим, он лимитирует накопление фотосенсибилизатора ПХЛД, предотвращая процессы фотодеструкции;
- скорость восстановления ПХЛД с помощью сПОР значительно выше, чем в случае тПОР, что обеспечивает высокую продуктивность биосинтеза ХЛ.

По-видимому, эти преимущества стали причиной перехода покрытосеменных растений к светозависимому синтезу ХЛ в условиях кислородного фотосинтеза, что сопровождалось потерей генов, кодирующих тПОР. Для адаптации к разным условиям освещения некоторые растения, например арабидопсис, взамен утраченной тПОР обзавелись несколькими гомологичными генами сПОР (*PORA*, *PORB* и *PORC*), экспрессия которых по-разному зависит от света и наличия НАДФН (Kim, Apel, 2004).

Следует отметить, что свет и кислород оказывают критическое влияние на жизнь фотосинтезирующих организмов и, по-видимому, являются основными факторами эволюции фототрофов, которая шла в направлении адаптации к этим изменяющимся параметрам внешней среды. Более архаичный темновой биосинтез ХЛ сформировался в анаэробных условиях, а затем эволюция ХЛ-синтезирующих организмов шла по пути адаптации к увеличению интенсивности света (при переходе из воды на сушу) и содержания кислорода.

В то время как сПОР изучена довольно подробно (Беляева, 2009), современные знания о темновом биосинтезе ХЛ, так же, как и сведения о механизмах адаптации растительной клетки к свету крайне немногочисленны. В культурах штаммов хламидомонады, растущих на свету, мутации yellow спонтанно возникают с высокой частотой ($10^{-3}\text{--}10^{-4}$). По-видимому, в фототрофных условиях

потеря тПОР дает селективное преимущество, и наличие ядерных генов *yellow*, мутации по которым блокируют темновое восстановление ПХЛД, необходимо для регуляции активности тПОР. Вероятно, продукты этих генов участвуют в регуляции экспрессии хлоропластных генов, ответственных за биосинтез ХЛ на уровне образования и функционирования кодируемых ими белков (Sahoon, Timko, 2000). Биологическая природа и механизмы действия этих регуляторов крайне интересны, но пока неизвестны.

Темновой биосинтез ХЛ обеспечивается не только генами, контролирующими накопление и регуляцию тПОР. Помимо мутантов *yellow*, у хламидомонады описан иной тип мутантов по темновому биосинтезу ХЛ, которые накапливают в темноте протопорфирин IX — более ранний, чем ПХЛД, предшественник ХЛ и способные зеленеть в темноте (Wang et al., 1974; Чекунова, Квитко, 1986; Шалыго и др., 1990). Комплексное генетико-биохимическое исследование этих мутантов (*brc-1* и *lts3*) позволило найти специфичный для эукариот GATA1-транскрипционный фактор *LTS3*, необходимый для экспрессии в темноте генов, кодирующих фермент магний-хелатазу — более ранний, чем ПОР в цепи биосинтеза ХЛ (Чекунова, Савельева, 2010). Обнаружение этого фактора свидетельствует, что независимый от света биосинтез тетрапирролов в фотосинтезирующей клетке обеспечивается и путем регуляции на уровне транскрипции генов, кодирующих магний-хелатазу.

Наши представления о генетике более архаичного темнового синтеза ХЛ еще только формируются. Исследования в этой области позволят выяснить роль геномов ядра и хлоропластов в регуляции этого процесса, а также в обеспечении адаптации фототрофов к важнейшему для них фактору внешней среды — свету.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ: 09-04-01646а

Литература

1. Александрова Н. Н., Крэла Л. П., Тугаринов В. В., 1979. Генетическая детерминация признаков хлоропласта у хламидомонады. Сообщ. I. Создание множественно-маркированных линий // Исследования по генетике. Вып. 8. С. 139–149.
2. Беляева О. Б., 2009. Светозависимый биосинтез хлорофилла // Москва: Изд. «Бином. Лаборатория знаний»/ 232 с.
3. Беляева О. Б., Литвин Ф. Ф., 2007. Фотоактивные пигмент-ферментные комплексы предшественника хлорофилла в листьях растений // Усп. биол. химии. Т. 47. С. 189–232.
4. Красновский А. А., Кособуцкая Л. М., 1952. Спектральные исследования состояния хлорофилла при его образовании в растении и в коллоидных растворах вещества этиолированных листьев // ДАН СССР. Т. 85. С. 177–180.
5. Пиневиц А. В., Аверина С. Г., 2002. Кислородная фототрофия // СПб: Изд. СПбГУ. 236 с.

6. Чекунова Е. М., Квитко К. В., 1986. Генетическое изучение мутантов хламидомонады, накапливающих протопорфирин IX // Исследования по генетике. № 10. С. 104–112.
7. Чекунова Е. М., Савельева Н. В., 2010. Ген *LTS3* контролирует светонезависимый биосинтез хлорофилла у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Экологическая генетика. № 2. С. 35–44.
8. Шальго Н. В., 2004. Биосинтез хлорофилла и фотодинамические процессы в растениях // Минск: ИООО «Право и экономика». 156 с.
9. Шальго Н. В., Чекунова Е. М., Чунаев А. С., Аверина Н. Г., 1990. Анализ состава порфиринов в мутантах *Chlamydomonas reinhardtii* // Изв. АН БССР. Сер. Биол. наук. № 4. С. 53–57.
10. Шестаков С. В. Молекулярная генетика фотосинтеза // СОЖ. 1998. № 9. С. 22–27.
11. Adamson H., Griffiths T., Parker N., Sutherland M., 1985. Light independent accumulation of chlorophyll a and b and protochlorophyllide in green barley (*Hordeum vulgare*) // Plant Physiol. Vol. 64. P.345–352.
12. Apel K., Santel H. J., Redlinger T. E., Falk H., 1980. The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare*). Isolation and characterization of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase // Eur. J. Biochem. Vol. 111. P.251–258.
13. Armstrong G. A., 1998. Greening in the dark: light independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms // J. Photochem. Photobiol. Vol. 43. P.87–100.
14. Aronsson H., Sundqvist Ch., Dahlin C., 2003. POR hits the road: import and assembly of a plastid protein // Plant Mol. Biol. Vol. 51. P.1–7.
15. Batschauer A., Santel H. J., Apel K., 1982. The presence and synthesis of the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in barley leaves with a high-temperature-induced deficiency of plastid ribosomes // Planta. Vol. 154. P.459–464.
16. Beale S. I., 1999. Enzymes of chlorophyll biosynthesis // Photosynth. Res. Vol. 60. P.43–73.
17. Begley T. P., 1994. Photoenzymes: a novel class of biological catalysts // Acc. Chem. Res. Vol. 27. P.394–401.
18. Birve S. J., Selstam E., Johansson L. B. A., 1996. Secondary structure of NADH: protochlorophyllide oxidoreductase examined by circular dichroism and prediction methods // Biochemistry. Vol. 317. P.549–555.
19. Bogorad L., 1976. Chlorophyll biosynthesis // In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments / ed. Goodwin T. W. New York: Acad. Press. P.64–148.
20. Burke D. H., Alberti M., Hearst J. E., 1993. bchFNBH bacteriochlorophyll synthesis genes of *Rhodobacter capsulatus* and identification of the third subunit of light-independent protochlorophyllide reductase in bacteria and plants // J. Bacteriol. Vol. 175. P.2414–2422.
21. Cahoon A. B., Timko M. P., 2000. Yellow-in-the-dark mutants of *Chlamydomonas* lack the CHLL subunit of light-independent protochlorophyllide reductase // Plant Cell. Vol. 12. P.559–568.
22. Choquet Y., Rahire M., Girard-Bascou J., Erickson J., Rochaix J.-D., 1992. A chloroplast gene is required for light-independent accumulation of chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. EMBO. Vol. 11. No. 5. P.1697–1704.
23. Choudhary M., Kaplan S., 2000. DNA sequence analysis of the photosynthesis region of *Rhodobacter sphaeroides* 2. 4. 1 // Nucl. Acids Res. Vol. 28. P.862–867.
24. Dahlin C., Aronsson H., Wilks H. M., Lebedev N., Sundqvist C., M. P. Timko M. P., 1999. The role of protein surface charge in catalytic activity and chloroplast membrane association of the pea NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase (POR) as revealed by alanine mutagenesis // Plant Mol. Biol. Vol. 39. P.309–323.
25. Demko V., Pavlovic A., Valkova D., Slovakova L., Grimm B., Hudak J., 2009. A novel insight into the regulation of light-independent chlorophyll biosynthesis in *Larix decidua* and *Picea abies* seedlings // Planta. Vol. 230. P.165–176.
26. Drumm-Herrel H., Mohr H., 1994. Regulation by light of chlorophyll synthesis in the cotyledons of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings // Physiol. Plant. Vol. 91. P.300–306.
27. Fong A., Archibald J. M., 2008. Evolutionary dynamics of light-independent protochlorophyllide oxidoreductase genes in the secondary plastids of cryptophyte algae // Eukar. Cell. Vol. 7. P.550–553.
28. Ford C., Mitchell S., Wang W. Y., 1981. Protochlorophyllide photoconversion mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. Vol. 184. P.460–464.
29. Ford C., Mitchell S., Wang W. -Y., 1983. Characterization of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase in the y-7 and pc-1 y-7 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. Vol. 192. P.290–292.
30. Ford C., Wang W-Y., 1980a. Three new yellow loci in *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. Vol. 179. P.259–263.
31. Ford C., Wang W-Y., 1980b. Temperature sensitive yellow mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. Vol. 180. P.5–10.
32. Frick G., Su Q., Apel K., Armstrong G. A., 2003. An *Arabidopsis* porB porC double mutant lacking light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested // Plant J. Vol. 35 (2). P.141–53.
33. Fujita, Y., Bauer C. E., 2000. Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits. In vitro confirmation of nitrogen-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme // J. Biol. Chem. Vol. 275. P.23583–23588.
34. Fujita, Y., Matsumoto H., Takahashi Y., Matsubara H., 1993. Identification of a nifDK-like gene (ORF467) involved in the biosynthesis of chlorophyll in the cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell Physiol. Vol. 34. P.305–314.
35. Fujita, Y., Takagi H., Hase T., 1996. Identification of a chlB gene product essential for light-independent chlorophyll biosynthesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell Physiol. Vol. 37. P.313–323.

36. 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 cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell Physiol. Vol. 39. P. 177–185.
37. Fujita, Y., Takahashi Y., Chuganji M., Matsubara H., 1992. The nifH-like (frxC) gene is involved in the biosynthesis of chlorophyll in the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell Physiol. Vol. 33. P. 81–92.
38. Fujita Y., Takahashi, Y., Koschi., Ozeki H., Ohyama K., Matsubara H., 1989. Identification of a novel nifH-like (frxC) protein in chloroplasts of liverwort *Marchantia polymorpha* // Plant Mol. Biol. Vol. 13. P. 551–561.
39. Fujita, Y., Takahashi Y., Koschi T., Ozeki H., Ohyama K., Matsubara H., 1991. Cloning, nucleotide sequences and differential expression of the nifH and nifH-like (frxC) genes from the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell. Physiol. Vol. 32. P. 1093–1106.
40. Griffiths, W. T., 1991. Protochlorophyllide reduction // Chlorophylls / Ed. Scheer H. Boca Raton — CRC Press. P. 433–450.
41. Griffiths W. T., McHugh T., Blankenship R. E., 1996. The light intensity dependence of protochlorophyllide photoconversion and its significance to the catalytic mechanism of protochlorophyllide reductase // FEBS Lett. Vol. 398. P. 235–238.
42. Hearst J. E., Alberti R. F., Doolittle R. F., 1985. A putative nitrogenase reductase gene found in the nucleotide sequences from photosynthetic gene cluster of *R. capsulatus* // Cell. Vol. 40. P. 219–220.
43. Heyes D. J., Ruban A. V., Hunter C. N., 2003. Protophlorophyllide oxidoreductase: “dark” reactions of a light-driven enzyme // Biochemistry. Vol. 42. P. 523–538.
44. Holtorf H., Reinbothe S., Reinbothe R., Bereza B., Apel K., 1995. Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 92. P. 3254–3258.
45. Huang C., Liu X-Q., 1992. Nucleotide sequence of the frxC, petB and trnL genes in the chloroplast genome of *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Mol. Biol. Vol. 18. P. 985–988.
46. Kim C., Apel K., 2004. Substrate-dependent and organ-specific chloroplast protein import in planta // Plant Cell. Vol. 16. P. 88–98.
47. Laudi G., Manzini M. L., 1975. Chlorophyll content and plastid ultrastructure in leaflets of *Metasequoia glyptostroboides* // Protoplasma. Vol. 84. P. 185–190.
48. Lebedev N., Timko M., 1998. Protochlorophyllide photoreduction // Photosynth. Res. Vol. 58. P. 5–23.
49. Li J., Goldschmidt-Clermont M., Timko M. P., 1993. Chloroplast encoded chlB is required for light-independent protochlorophyllide reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell. Vol. 5. P. 1817–1829.
50. Li J., Timko M. P., 1996. The pc-1 phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* results from a deletion mutation in the nuclear gene for NADPH protochlorophyllide oxidoreductase // Plant. Mol. Biol. Vol. 30. P. 15–37.
51. Lindholm J., Gustafsson P., 1991. Homologues of the green algal gidA and the liverwort frxC gene are present on the chloroplast genomes of conifers // Plant Mol. Biol. Vol. 17. P. 787–798.
52. McCoy S. R., Kuehl J. V., Boore J. L. Raubeson L. A., 2008. The complete plastid genome sequence of *Welwitschia mirabilis*: an unusually compact plastome with accelerated divergence rates // Evol Biol. Vol. 8. P. 130.
53. Mariani P., De Carli M. E., Rascio N., Baldan B., Casadoro G., Gennari G., Bodner M., Larcher W., 1990. Synthesis of chlorophyll and photobiosynthetic competence in etiolated and greening seedlings of *Larix decidua* as compared with *Picea abies* // J. Plant Physiol. Vol. 137. P. 5–14.
54. Marrison J. L., Schunmann P. H. D., Oughan H. J., Leech R. M., 1996. Subcellular visualization of gene transcripts encoding key proteins of the chlorophyll accumulation process in developing chloroplasts // Plant Physiol. Vol. 110. P. 1089–1096.
55. Masuda T., Takamiya K-I., 2005. Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms // Photosynth. Res. Vol. 81. P. 1–29.
56. Muraki N., Nomata J., Ebata K., Mizoguchi T., Shiba T., Tamiaki H., Kurisu G., Fujita Y., 2010. X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase // Nature Vol. 465. P. 110–114.
57. Nomata J., Mizoguchi T., Tamiaki H., Fujita Y., 2006. A second nitrogenase-like enzyme for bacteriochlorophyll biosynthesis: reconstitution of chlorophyllide a reductase with purified X-protein (BchX) and YZ-protein (BchY-BchZ) from *Rhodobacter capsulatus* // J. Biol. Chem. Vol. 281. P. 15021–15028.
58. Nomata J., Swem L. R., Bauer C. E., Fujita Y., 2005. Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus* // Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1708. P. 229–235.
59. Ogura Y., Takemura M., Oda K., Yamatu K., Ohta E., Fukazawa H., Ohyama K., 1992. Cloning and nucleotide sequence of a frxC-ORF469 gene cluster of *Synechocystis* PCC6803 conservation with liverwort chloroplast frxC-ORF465 and nif operon // Biosci. Biotech. Biochem. Vol. 56. P. 788–793.
60. Ohyama K., Fukazawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Shiki Y., et al., 1986. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* // Nature. Vol. 322. P. 572–574.
61. Oliver R. P., Griffiths W. T., 1980. Identification of the polypeptides of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase // Biochem. J. Vol. 191. P. 277–280.

62. Oosawa N., Masuda T., Awai K., Fusada N., Shimada H., Ohta H., Takamiya K., 2000. Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana* // FEBS Lett. Vol. 474. P. 133–136.
63. Ou K., Adamson H., 1995. Chlorophyll accumulation in cotyledons, hypocotyls and primary needles of *Pinus pinaster* seedlings in light and dark // Physiol. Plant. Vol. 93. P. 719–724.
64. Popov K., Dilova S., 1969. On the dark synthesis and stabilization of chlorophyll // In: Progress in Photosynthesis Research / ed. Metzner H. Inst. Union Biol. Sci., Tubingen Vol. 2. P. 606–609.
65. Raskin V. I., Schwartz A., 2003. Experimental approach to elucidating the mechanism of light-independent chlorophyll biosynthesis in green barley // Plant Physiol. Vol. 133. P. 25–28.
66. Raymond J., Siefert J. L., Staples Ch. R., Blankenship R. E., 2004. The natural history of nitrogen fixation // Mol. Biol. Evol. Vol. 21. P. 541–554.
67. Reinbothe S., Pollmann S., Springer A., James R. J., Tichtinsky G., Reinbothe C., 2005. A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR) A // Planta. Vol. 42. P. 1–12.
68. Reinbothe S., Quigley F., Gray J., Schemenewitz A., Reinbothe C., 2004. Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase A into the chloroplast of barley // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 97. P. 9795–9800.
69. Reinbothe S., Reinbothe C., 1996. The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis // Eur. J. Biochem. Vol. 237. P. 323–343.
70. Reinbothe S., Runge S., Reinbothe C., van Cleve B., Apel K., 1995. Substrate-dependent transport of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase into isolated plastids // Plant Cell. Vol. 7. P. 161–172.
71. Richard M., Tremblay C., Bellemare G., 1994. Chloroplastic genomes of *Ginkgo biloba* and *Chlamydomonas moewusii* contain a chlB gene encoding one subunit of a light-independent protochlorophyllide reductase // Curr. Genet. Vol. 26. P. 159–156.
72. Roitgrund C., Mets L. J., 1990. Localization of two novel chloroplast genome functions: trans-splicing of RNA and protochlorophyllide reduction // Curr. Genet. Vol. 17. P. 147–153.
73. Rubio L. M., Ludden P. W., 2005. Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle // J. Bacteriol. Vol. 187. P. 405–414.
74. Sager R., 1955. Inheritance in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Genetics. Vol. 40. P. 476–489.
75. Schemenewitz A., Pollmann S., Reinbothe C., Reinbothe S., 2007. A substrate-independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 104. P. 8538–8543.
76. Schoefs B., Franck F., 2003. Protochlorophyllide reduction: mechanisms and evolution // Photochem. Photobiol. Vol. 78. P. 543–557.
77. Schulz R., Steinmuller K., Klaas M., Forreiter C., Rasmussen S., Hiller C., Apel K., 1989. Nucleotide sequence of cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (POR) of barley (*Hordeum vulgare* L.) and its expression in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet. Vol. 217. P. 355–361.
78. Shiba, T. and Shimada K., 1997. Photosynthetic aspects of aerobic photosynthetic bacteria // Handbook of Photosynthesis / Ed. M. Pessarakli, Marcel Dekker, New York. P. 505–512.
79. Skinner J. S., Timko M. P., 1999. Differential expression of genes encoding the light-dependent and light-independent enzymes for protochlorophyllide reduction during development in loblolly pine // Plant Mol. Biol. Vol. 39. P. 577–592.
80. Shinohara K., Murakami A., Fujita Y., 1992. Biochemical characteristics of thylakoid membranes in chloroplasts of dark-grown pine cotyledons // Plant Physiol. Vol. 98. P. 39–43.
81. Smith J. H. C., Benitez A., 1953. The protochlorophyll-chlorophyll transformation: the nature of protochlorophyll in leaves // Carnegie Inst. Year Book. Washington, DC. 52, P. 151–153.
82. Smith, J. H. C., French C. S., 1958. Quantum yield for the protochlorophyll conversion // Carnegie Inst. Year Book. Washington. Vol. 57. P. 290–293.
83. Suzuki, J. Y., Bauer C. E., 1992. Light-independent chlorophyll biosynthesis: involvement of the chloroplast gene chlL (*irxC*) // Plant Cell. Vol. 4. P. 929–940.
84. Suzuki, J. Y., Bauer C. E., 1995. A procaryotic origin for light-dependent chlorophyll biosynthesis of plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol. 92. P. 3749–3753.
85. Takio S., Satoh T., 1995. Expression patterns of chloroplast genes involved in light-independent chlorophyll synthesis in liverwort cells // In: Photosynthesis: from Light to Biosphere / ed. Mathi P. Dordrecht. Kluwer Acad. Publ. Vol. III. P. 941–944.
86. Yamamoto H., Kurumiya S., Ohashi., Fujita Y., 2009. Oxygen sensitivity of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana* // Plant Cell Physiol. Vol. 50. P. 1663–1673.
87. 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. Vol. 142. P. 911–922.
88. Yang J., Chen Q., 2004. Origin and evolution of the light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) genes // Plant Biol. Vol. 6. P. 537–544.
89. Xiong J., Fischer W. M., Inoue K., Nakahara M., Bauer C. E., 2000. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis // Science. Vol. 289. P. 1724–1730.

90. Wang W. -Y., Wang W. L., Boynton J. E., Gillham N. E. 1974. Genetic control of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas*. Analysis of mutants at two loci mediating the conversion of protoporphyrin-IX to magnesium-protoporphyrin // *J. Cell Biol.* Vol. 63. P.806–823.
91. von Wettstein D., Gouth S., Kannangara C. G., 1995. Chlorophyll biosynthesis // *Plant Cell.* Vol. 7. P.1039–1057.
92. Wu Q., Vermaas W. F., 1995. Light-dependent chlorophyll a biosynthesis upon chlL deletion in wild type and Photosystem I-less strains of the cyanobacterium *Synechocystis* sp PCC 6803 // *Plant Mol. Biol.* Vol. 29. P.933–945.
93. Zsebo K. M., Hearst J. E., 1984. Genetic physical mapping of a photosynthetic gene cluster from *R. capsulate* // *Cell.* Vol. 37. P.937–947.

**THE GENETICS OF CHLOROPHYLL BIOSYNTHESIS:
LIGHT-INDEPENDENT AND LIGHT-DEPENDENT PATHWAYS**

Chekunova E. M.

✿ **SUMMARY:** The review summarizes contemporary genetical, molecular biological and biochemical data on the two protochlorophyllide oxidoreductases (POR), enzymes responsible of light-dependent (LPOR) and dark-operative (DPOR) protochlorophyllide reduction. Evolutionary aspects of origin and functioning of these enzymes are also discussed. The main focus of this review will be the genetics of archaic dark chlorophyll biosynthesis.

✿ **KEY WORDS:** chlorophyll biosynthesis; protochlorophyllide reduction.

✿ Информация об авторах:

Чекунова Елена Михайловна — СПбГУ, старший научный сотрудник. Университетская набережная 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия. E-mail: elena_chekunova@mail.ru.

Chekunova Elena Mikhaylovna — senior research fellow. The State University of Saint-Petersburg. Universitetskaya nab., 7/9, St.-Petersburg, Russia. 199034. E-mail: elena_chekunova@mail.ru.