

ОГЛЯДИ

УДК 577.152.311: 577.117.3

КАТАБОЛИЗМ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТЕНИЯХ

© 2013 г. А. А. Сиваш, Е. К. Золотарёва

*Институт ботаники им. Н.Г. Холодного
Национальной академии наук Украины
(Киев, Украина)*

Деструкция хлорофилла (Хл) массово происходит при старении листьев и созревании плодов. В функционирующем хлоропласте почти весь Хл связан с белками и в составе Хл-белковых комплексов обеспечивает фотосинтетическую трансформацию энергии света. Свободный Хл при освещении, как и фотохимически активные продукты его метаболизма, генерирует свободные радикалы, вызывающие дегенеративные повреждения тканей растения, поэтому уже на первых этапах катаболизма Хл фотохимически активные продукты расщепляются. При старении листьев деградация Хл начинается с разрушения хелата Хл и магния и образования феофитина при участии феофитиназы, тогда как при созревании плодов разрушение Хл катализируется хлорофиллазой (Хлаза, КФ 3.1.1.14), гидролизующей Хл с образованием водорастворимого хлорофиллида и фитола. Экспрессия генов Хлазы активируется этиленом и метил жасмонатом. Хлаза была открыта 100 лет назад, однако ее структура и физиологическая роль до настоящего времени полностью не определены. Недавно было показано, что Хлаза локализована не только в хлоропластах, но и в вакуолях, в которых накапливаются продукты катаболизма Хл и Хл-белковых комплексов для последующего использования в метаболизме в качестве источника азота.

Ключевые слова: *хлорофилл, фитол, хлорофиллаза, феофитин, феофитиназа, этилен, порфирин, хлоропласт*

К 100 летию открытия хлорофиллазы

*Памяти профессора
Елены Григорьевны Судьиной посвящается*

Фотосинтез – биологический механизм, запускающий глобальные потоки вещества и энергии в планетарном масштабе, осуществляется благодаря наличию в клетках живых фотосинтезирующих организмов специализированных пигментов и, в первую очередь, хлорофилла (Хл). Роль Хл состоит в поглощении квантов солнечной энергии и первичной её конвертации в электрическую форму, которая, в свою очередь, в серии последовательных редокс-

реакций преобразуется в форму богатых энергией соединений, использующихся в метаболизме.

Усредненный лист растения содержит около 70 миллионов фотосинтезирующих клеток, в каждой из которых имеется 5 миллиардов хлоропластов, содержащих приблизительно 600 миллионов молекул хлорофилла (Simpson, Knotzel, 1996). Ежегодно миллиарды тонн хлорофилла синтезируются *de novo* и распадаются при старении листьев в конце сезона вегетации растений.

Строение хлорофилла было определено Рихардом Вильштеттером, за что в 1915 году

Адрес для корреспонденции: Сиваш Александр Алексеевич, Институт ботаники им. Н.Г. Холодного НАН Украины, ул. Терещенковская, 2, Киев, 01004, Украина; e-mail: membrana@ukr.net

ему была присуждена Нобелевская премия. Другим достижением Вильштеттера было открытие в 1913 г. в соавторстве с Артуром Штолем (Willstatter, Stoll, 1913) первого из растительных ферментов – хлорофиллазы (Хлаза, хлорофилл:хлорофиллидгидролаза, КФ 3.1.1.14), катализирующей в растворах разложение хлорофилла на водорорастворимый хлорофиллид и нерастворимый в воде многоатомный спирт фитол. Тогда же впервые было высказано предположение, что катаболизм Хл в листе начинается с удаления фитольного остатка Хлазой (Willstatter, Stoll, 1913).

Хлаза широко распространена среди высших растений, обнаружена во мхах, папоротниках, бурых, красных и диатомовых водорослях и не только катализирует гидролиз хлорофилла, а также реакции этерификации и перэтерификации хлорофиллида в зависимости от условий реакции (Mayer, 1930; Berret, Jeffrey, 1964; Jeffrey, Hallegraeff, 1987). Особенно много Хлазы содержит диатомовая водоросль *Pheodactylum tricornerutum* (Barret, Jeffrey, 1964). Накопление хлорофиллида была продемонстрировано в стареющих плодах и листьях цитрусовых (Trebitch et al., 1993), в листьях *Melia*, и *Pisum*, а также в нежелтеющем мутанте *Festuca* (Matile et al., 1999). В естественных условиях и при исследовании разрушения Хл *in vitro* у различных видов было показано наличие дополнительных катаболических продуктов, которые могут быть синтезированы только из хлорофиллида (Trebitch et al., 1993; Matile et al., 1999).

В изолированных препаратах хлоропластов какой-либо заметной дефитилизации пигментов без солиubilизации мембран с помощью детергентов (Matile et al., 1997) или в присутствии высоких концентраций органических растворителей (Garcia, Galindo, 1991) не обнаруживается. Причем, в растворах с высоким содержанием органических растворителей активность Хлазы не подавляется. Даже при старении листьев, эта характерная особенность фермента сохраняется (Matile et al., 1997).

Многочисленные исследования Хлазной активности у большого числа различных растений не позволили выявить какой-либо зависимости между уровнем ферментативной активности и экологической приуроченностью данного растения (Mayer, 1930; Судына, 1958; Drazkiewicz, 1990). Отмечалась очень низкая активность Хлазы у вечнозеленых видов, на фоне колебания активности фермента в широких пределах у остальных растений (Судына,

1958). Было также сделано заключение, что одностольные, в общем, имеют более низкую активность, чем двустольные, хотя, например, активность Хлазы у пшеницы сравнительно высока (Holden, 1961).

Потеря Хл обычно используется в качестве критерия прогрессирующего старения зеленой ткани. Предполагалось, что Хлаза инициирует деградацию Хл, и повышение активности Хлазы должно коррелировать со старением листьев. Деградация Хл является катаболическим процессом, который массово происходит во время старения листьев и созревания плодов (Hörtensteiner, Kräutler, 2011), а также непрерывно на неком базальном уровне при естественном обороте пигмента (Goldschmidt, 2001), на который существенно влияют условия окружающей среды, например чрезмерное освещение и т. п.

У многих растений повышение активности Хлазы коррелирует с потерей Хл (Gong, Mattheis, 2003). В листьях шпината и петрушки снижение содержания Хл при пожелтении листьев сопровождается увеличением активности Хлазы (Yamauchi, Watada, 1991; Yamauchi et al., 1995). Тем не менее, Хлаза активна также в начинающихся стареть листьях, в зеленеющих тканях в периоды повышенного синтеза Хл. Эти наблюдения легли в основу предположения об участии фермента в биосинтезе Хл (Судына, 1958; Tanaka et al., 1982; Matile et al., 1996; Minguez-Mosquera et al., 1996). В листьях сахарной свеклы наблюдали флуктуацию активности Хлазы в течение вегетационного периода (Holden, 1963). В отличие от этого, уменьшение активности Хлазы при потере Хл отмечалось в листьях сои (Majumdar et al., 1991), фасоли (Fang et al., 1998), а при изучении арабидопсиса никакой корреляции между активностью Хлазы и содержанием ХЛ обнаружить не удалось (Todorov et al., 2003a).

Вклад работ Е.Г.Судыной в изучение хлорофиллазы

Большой вклад в изучение свойств и регуляции хлорофиллазы внесли работы Е.Г.Судыной (1929-1995) и её сотрудников (М.Г. Голод, К.П. Довбиш, Р.М. Фомишина, А.А. Сиваш, Т.Ю. Байдулова-Бабко, Е.Г. Бабенко и др.). В результате многолетних исследований было определено молекулярное строение хлорофиллазы, гетерогенность ее организации в мембранах, роль природы белков и порфиринов в формировании комплексов, содержащих Хл а (Фомишина та ін., 2009). Выяснено,

КАТАБОЛИЗМ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТЕНИЯХ

что молекула фермента состоит как минимум из четырех субъединиц, которые в диссоциированном состоянии имеют большую активность, чем олигомер (Судьина та ін., 1975). В экспериментах с нативными и модельными системами доказано, что функциональная активность зависит от микроокружения фермента и плотности упаковки его молекул. Чрезмерная плотность упаковки приводит к взаимному экранированию молекул Хлазы и формированию неактивных комплексов из-за белок-белкового взаимодействия (Судьина та ін., 1988).

Искусственное создание мицелл типа коацервантных капель позволило изучить влияние липидного окружения на активность Хлазы и сформулировать гипотезу о мембранной регуляции активности фермента. Суть концепции состоит в учете изменяющегося взаимодействия фермента со структурными компонентами мембран и субъединиц в молекуле, а также в осуществлении контакта с субстратом (Судьина та ін., 1988). Фермент представлен несколькими формами, отличающимися прочностью связывания с фотосинтетическими мембранами. Их удалось выделить, варьируя ионную силу извлекающего раствора и применяя детергенты (Судьина та ін., 1988). Были выявлены изменения соотношений фракций Хлазы в онтогенезе листьев (Судьина та ін., 1975).

Несмотря на то, что Хлаза широко изучалась, хорошо известны ее каталитические свойства *in vitro*, физиологические функции Хлазы остаются в значительной степени загадочными (Фомішина та ін., 2009; Matile et. al., 1999; Tsuchiya et. al., 2003; Hörtensteiner, Kräutler, 2011).

Деградация Хл как защитная реакция в стрессовых условиях

В нормальных условиях в хлоропластах в ходе фотосинтеза образуются активные формы кислорода (АФК), такие как молекулярный синглетный кислород, супероксидный анион-радикал и перекись водорода. Концентрация АФК резко возрастает в условиях физиологического стресса. Происхождение основных количеств АФК в растениях связано с работой фотосинтетической электрон-транспортной системы (Foyer et. al., 1994), включающей фотоактивные молекулы хлорофилла, возбуждающиеся и переходящие в свободно радикальное состояние при поглощении квантов света. В тилакоидных мембранах весь Хл связан с белками и находится в составе фотосистем и антенных

комплексов, организованных таким образом, что энергия возбужденной молекулы Хл в конечном счете используется для полезной работы. Механические повреждения тканей, заражение патогенами, другие стрессовые воздействия, активирующие хлоропластные протеазы, приводят к отделению Хл или продуктов его дегградации – хлорофиллида, феофитина от белковой матрицы. В такой ситуации Хл и фотохимически активные продукты его метаболизма должны быть быстро ликвидированы во избежание повреждения клеток вследствие фотодинамического действия фотоактивных молекул (Takamiya et al., 2000). Замедление деструкции хлорофилла в этом случае может увеличить количество образующихся АФК в такой степени, что мощность имеющихся антиоксидантных систем их детоксикации окажется недостаточной. Избыток токсичных свободных радикалов вызывает повреждение органелл и гибель клеток (Foyer et. al., 1994; Wojtaszek, 1997). Поэтому для выживания растению необходимо, чтобы уровень свободного Хл и продуктов его метаболизма жестко контролировался, а их удаление осуществлялось быстро и эффективно.

Первичные реакции и продукты катаболизма хлорофилла

Хотя биосинтез Хл, состоящий из 18 ферментативных стадий, хорошо изучен, ход процесса его деструкции оставался загадочным в течение длительного времени (Hendry et al., 1987; Brzezowski, Grimm, 2013). Первые сведения о продуктах катаболизма Хл появились только в начале 90-х годов прошлого века, когда был химически охарактеризован нефлуоресцирующий интермедиат, образующийся при разрушении Хл, и терминальный продукт дегградации Хл из ячменя (Kräutler et al., 1991). Это стимулировало поиски других продуктов катаболизма Хл, а также ферментов и генов, контролирующих этот процесс. Анализ катаболических преобразований Хл у мутантов с нарушениями в его дегградации позволил в основном выяснить, каким образом Хл разрушается при старении листа и созревании плодов (Kräutler and Hörtensteiner 2006; Hörtensteiner и Kräutler, 2011). Первая часть пути локализована в стареющих хлоропластах. Она состоит из серии реакций, общих для высших растений и приводящих к образованию основного флуоресцирующего катаболита хлорофилла (ФКХ) (Mühlecker et al., 1997) (рис. 1).

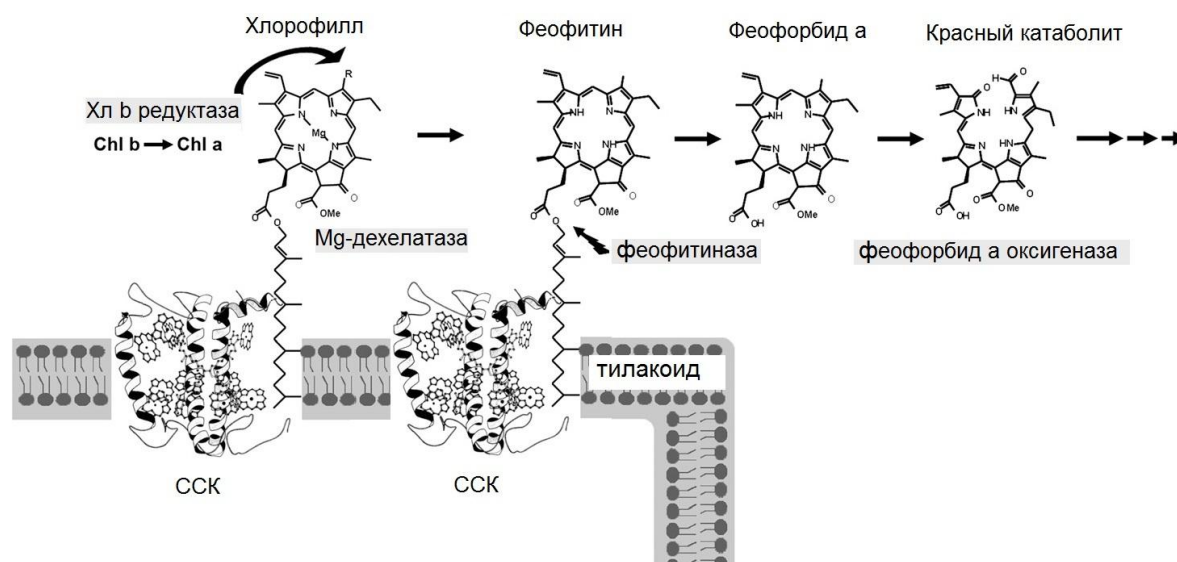


Рис. 1. Последовательность катаболических реакций и структура первичных катаболитов хлорофилла.

Mg^{2+} -дехелатаза катализирует удаление иона Mg из молекулы Хл с образованием феофитина; феофитиназа катализирует отщепление гидрофобного фитольного остатка, заякоренного в тилакоиде, с образованием феофорбида а; феофорбид оксидаза катализирует расщепление порфиринового кольца с образованием ККХ (красных катаболитов хлорофилла), которые далее неферментативно конвертируются в нефлуоресцирующие продукты и депонируются в вакуолях.

На первой стадии распада молекулы Хл центральный атом магния (Mg^{2+}) удаляется из молекулы с помощью термостабильных низкомолекулярных металл-хелатирующих соединений (Suzuki et al., 2005), молекулярная природа которых до сих пор неизвестна. Предполагается, что этот компонент представляет собой либо небольшой пептид или другую органическую молекулу, действующую как хелатирующий агент для двухвалентных катионов. Однако до сих пор неизвестно, функционируют ли эти Mg^{2+} -хелатирующие вещества сами по себе или являются кофакторами какого-то фермента (Mg^{2+} -дехелатазы). Продукт реакции дехелатирования – феофитин, подвергается гидролизу с образованием феофорбида и фитола при участии фермента феофитиназы (Schelbert et al., 2009), имеющего чрезвычайно высокую специфичность в отношении субстрата – феофитина. В течение долгого времени считалось, что дефитолизация осуществляется в реакции, катализируемой хлорофиллазой (Takamiya et al., 2000), но недавний анализ мутантов арабидопсиса, полученных двойным нокаутом соответствующих генов продемонстрировал, что деградация Хл при старении листьев не зависит от активности этого фермента (Schenk et al., 2007; Büchert et al., 2011). Вместо этого феофитиназа катализирует отщепление фитола от

феофитина (но не от Хл). Мутанты по гену феофитиназы не способны к деградации Хл и, как следствие, приобретают «вечно зеленый» фенотип (Schelbert et al., 2009). Разрушение макроцикла порфирина происходит путем расщепления двойной связи между С4 и С5 атомами феофорбида и присоединения кислорода. Эта ферредоксин-зависимая реакция катализируется интегральным мембранным ферментом феофорбид а оксигеназой (ФаО) – монооксигеназой типа Риске (Hörtensteiner, 2006). Феофорбид b действует как конкурентный ингибитор этого фермента. Это также объясняет, почему в продуктах ферментативной декомпозиции Хл нет катаболитов Хл b. Феофорбид а оксигеназа (ФаО) является ключевым ферментом катаболизма Хл, поскольку её активность определяет базовую структуру всех последующих катаболитов. Этот путь разрушения Хл в настоящее время часто называют "ФаО путём".

При расщеплении кольца феофорбида образуется нестабильный красный катаболит хлорофилла (ККХ) (рис. 2, 3), который быстро восстанавливается с образованием флуоресцирующего катаболита (ФКХ). Восстановление происходит по С20-С1 двойной связи ККХ и катализируется специальной редуктазой – хорошо растворимым стромальным белком. Было показано, что редуктаза красного катаболита

КАТАБОЛИЗМ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТЕНИЯХ

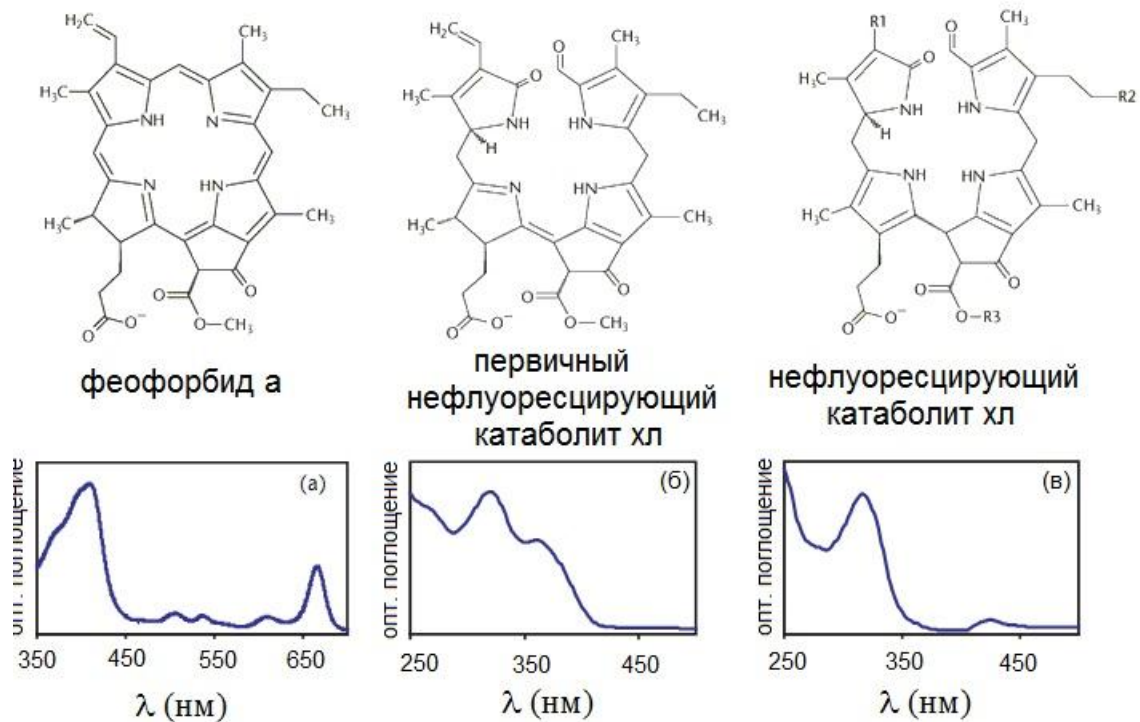


Рис. 2 Структура и спектры поглощения катаболитов хлорофилла: (а) феофорбида а; (б) первичного флуоресцирующего катаболита хлорофилла; (в) нефлуоресцирующего катаболита хлорофилла.

хлорофилла у *Arabidopsis* находится не только в пластидах, но и в митохондриях, и играет важную роль в защите растений от фотоокислительной клеточной смерти (Yao et al., 2004). Таким образом, этот белок действует, главным образом, как шаперон, связывающий фотоактивные тетрапирролы и направляющий их на последующие стадии деградации (Hörtensteiner, 2006).

На последующих этапах расщепления флуоресцирующие катаболиты модифицируются путем гидроксирования, глюкозилирования и/или малонируются и деметилируются по трем позициям: С3, С8² и С13². После неферментативной таутомеризации в кислой среде, нарушающей систему двойных связей, в вакуоли образуются нефлуоресцирующие катаболиты (НФК) (Christ et al., 2012; Brzezowski, Grimm, 2013).

Хотя в расшифровке механизмов катаболизма и выяснении природы продуктов катаболизма за последние полтора десятка лет достигнуты впечатляющие успехи, локализация и функции некоторых катаболических ферментов, а также организация АТФ-зависимого экспорта катаболитов хлорофилла из пластид в вакуоли требует дальнейшего экспериментального изучения.

Экспрессия генов, кодирующих ферменты катаболизма хлорофилла

Несмотря на то, что Хлаза известна уже 100 лет, кодирующие её гены (обозначение – *CLH*), были найдены у *Arabidopsis* лишь в 1999 г. Геном *Arabidopsis* содержит два гена, кодирующие, как предполагается, белки Хлазы. *AtCLH1* индуцируется во время атаки патогена и старении, тогда как изоформа 2 функционирует как конститутивный гидролизующий Хл фермент. *CLH* клонированы у нескольких видов растений *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, *Ginkgo biloba*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica olearacea*, *Chenopodium album*, *Citrus sinensis*, *Citrus unshiu*, *Piper betle* L. (Schenk et al., 2007; Hörtensteiner, 2006) Оказалось, что не все клонированные *CLH* содержат транзитный пептид, необходимый для встраивания синтезированного *de novo* фермента в хлоропласт (Tsuchiya et al., 1999; Takamiya et al., 2000). Это стало основанием для предположения, что *CaCLH* импортируется в вакуоль через эндоцитоплазматический ретикулум. Следовательно, в деградации Хл помимо феофорбид оксигеназы и редуктазы красных катаболитов Хл, активных в стареющих хлоропластах, принимают участие экстрапластидные *CLH* и неизвестные оксидазы, локализованные в вакуолях (Schenk et al., 2007).

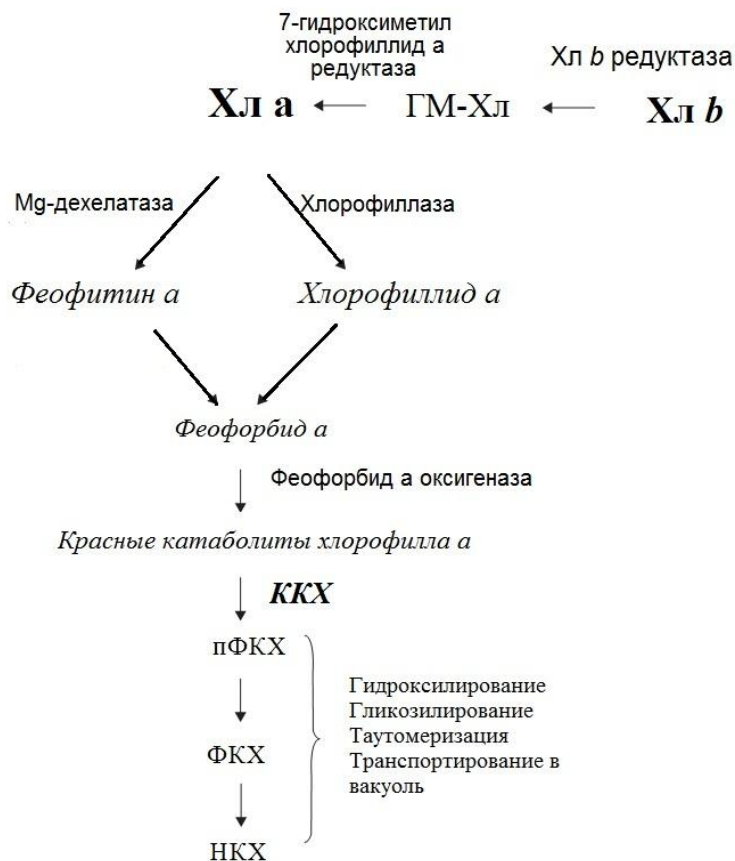


Рис. 3. Катаболизм хлорофилла при старении листа и созревании фруктов.

ГМ-Хл – 7-гидроксиметил хлорофиллид *a*; пФКХ первичный флуоресцирующий катаболит хлорофилла; ККХ – красные катаболиты хлорофилла; ФКХ – флуоресцирующий катаболит хлорофилла; НКХ – нефлуоресцирующий катаболит хлорофилла.

До недавнего времени казалось неоспоримым, что *CLH* необходимы для деградации Хл, вызванном старением листьев в естественных условиях. Однако благодаря последним исследованиям, становится очевидным, что роль *CLH* в процессах гидролитического расщепления Хл, скорее всего, весьма ограничена. В пользу гипотезы о неучастии Хлазы в процессах старения свидетельствуют следующие факты: 1) возрастание уровня *AtCLH1* не вызвало характерных для старения фенотипических изменений (Arkus et al., 2005; Kariola et al., 2009); 2) специфичность Хлазы, полученной путем экспрессии *CLH* из пшеницы, оказалась невысокой – она одинаково хорошо катализировала гидролиз сложноэфирной связи в Хл и расщепление гидрофобных нитрофениловых сложных эфиров (Arkus et al., 2005); 3) за исключением феофорбид оксигеназной реакции, другие процессы, направленные на окисление Хл, до настоящего времени не выявлены, также как не идентифицированы соответствующие

продукты его окислительной деградации (Hörteneister, 2006); 4) процесс старения листьев и связанная с ним деградация Хл не отличались у дикого типа и у мутантов арабидопсиса, полученных двойным нокаутом *AtCLH1* и *AtCLH2* (Schenk et al., 2007).

У гинго (*Ginkgo biloba*) наивысший уровень экспрессии Хлазы (*GbCLH*) был отмечен в зеленых листьях и значительно снижался при их пожелтении, что указывает на участие *GbCLH* в поддержании гомеостаза Хл (Tang et al., 2004). Хлаза *Piper betle* вовлечена как в процесс поддержания гомеостаза хлорофилльного пула, так и в деградацию пигмента при послеуборочном старении листьев (Gupta et al., 2012).

Анализ последовательностей *CLH* позволил выявить консервативный липазный мотив, содержащий сериновый остаток в активном центре (Tsuchiya et al., 1999). С помощью различных вариантов сайт-направленного мутаге-

КАТАБОЛИЗМ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТЕНИЯХ

неза *CaCLH* удалось показать, что остаток серина (S162) абсолютно необходим для проявления Хлазной активности. Кроме того, остатки Asp191 и His262 также имеют первостепенное значение для функционирования фермента. Последовательности разных Хлаз имеют низкую гомологию (31-42%), но несколько областей, в том числе липазный мотив, высоко консервативны. Доля гомологичных участков в последовательностях *CaCLH* и типичной липазы очень низка (10%), а в геноме цианобактерий не удалось обнаружить гомологичных последовательностей (Tsuchiya et al., 1999).

Транскрипционный и белковый анализы показали, что экспрессия феофорбид *a* оксигеназы активируется во время старения, в то время как редуктаза красного катаболита хлорофилла постоянно экспрессируется. При изучении мутантов *Arabidopsis*, дефектных по генам ФаО и редуктазы ККХ, установлено, что освещение их листьев вызывает некроз тканей (Hirashima et al., 2009). Гибель клеток у этих мутантов объяснили накоплением фотоативных катаболических продуктов ФаО ККХ редуктазы с последующим образованием АФК, в основном, синглетного кислорода.

Локализация ферментов катаболизма хлорофилла

Внутриклеточная локализация ферментов катаболизма Хл остается спорной. Особенно противоречивы сведения, полученные в исследованиях, касающихся локализации Хлазы. Неоднократно подтверждалось наличие Хлазной активности в субхлоропластных частицах и пигмент – белковых комплексах, приготовленных различными способами (Ardao, Vennesland, 1960; Tarasenko et al. 1986). Локализация Хлазы в мембранах хлоропластов *Gingko biloba* была подтверждена с помощью флуоресцентной визуализации (Okazawa et al., 2006). С другой стороны, Матиль с соавт. (Matile et al., 1997) показали, что очищенные внутренние мембраны оболочки хлоропластов капусты и ячменя имеют повышенную Хлазную активность, и, следовательно, этот фермент пространственно отделен от Хл фотосинтетических мембран. Согласно выдвинутой гипотезе взаимодействие между ферментом и субстратом осуществляется с помощью транспортных белков, переносящих молекулы хлорофилла из фотосинтетических мембран к предполагаемым сайтам деструкции во внутренней мембране оболочки. Однако лишь 6% от общей активности Хлазы было выявлено во внутренних мембранах, тогда как локализация 94% фермента этим методом

не могла быть установлена. Локализация фермента во внутренней оболочке хлоропластов, т.е. компартментная разделенность между энзимом и субстратом (Хл), сосредоточенным в мембранах тилакоидов, по крайней мере, у лимона и ячменя, может объяснить его структурную латентность (Brandis et al., 1996, Matile et al., 1997).

Применение метода конфокальной спектроскопии выявило совместную локализацию примерно 75% хлорофилла и Хлазы в фотосинтетических мембранах. Этот вывод согласуется с предположением, что Хлаза и её субстрат вступают в контакт, когда в фотосинтетической мембране освобождаются молекулы Хл (Narraz-Saad et al., 2007).

В ряде работ сообщалось, что растворимая Хлаза из листьев чая и диатомовой водоросли *P. tricornutum* находится в цитоплазме (Ogura, 1972; Terpstra, 1976; Moll, De Witt, 1979). По одним данным, у *Arabidopsis* изоформы Хлазы AtCLH1 и AtCLH2 локализованы в цитоплазме (Schenk et al., 2007), а по другим – в пластидах (Tsuchiya et al., 1999). При исследовании индуцированного этиленом разрушения Хл в зрелых зеленых плодах лимона методом иммунофлуоресценции показано, что Хлаза ассоциирована с хлорофиллом в пластидах клеток кожуры (Shemer et al., 2008; 2011).

Резюмируя имеющиеся данные, можно заключить, что начальные стадии деградации хлорофилла и их локализация различаются при старении листьев и дозревании плодов (рис. 3). При старении листьев первой реакцией деградации Хл является дехелатирование магния с образованием феофитина, катализируемое феофитиназой, тогда как при дозревании плодов разрушение Хл запускается при активации хлорофиллазы (Хлаза, хлорофилл:хлорофиллидгидролаза, КФ 3.1.1.14), катализирующей гидролиз Хл с образованием водорастворимого хлорофиллида и фитола.

Этилен-зависимая активация хлорофиллазы

Этилен – растительный гормон, участвующий в регуляции многих физиологических процессов, в т.ч. стрессовых реакций. Сигнальная роль этилена состоит в модуляции широкого спектра реакций, включая изменения экспрессии генов (Wang et al., 2002). Этилен значительно ускоряет созревание цитрусовых, которое у снятых с дерева плодов происходит очень медленно. При этом в зеленой кожуре фруктов индуцируется экспрессия генов Хлазы

и многократно ускоряется связанное с этим разрушение Хл (Jacob-Wilk et al., 1999; Shemer et al., 2008; Azoulay-Shemer et al., 2011). Похожие процессы происходят в бананах (Saltveit, 1999). Этилен нашел широкое коммерческое применение. Одним из первых примеров его использования было отбеливание сельдерея за счет ускоренной потери Хл.

В белковых экстрактах фруктов, обработанных этиленом, были обнаружены Хлазы, активность которых увеличивалась в 5 раз через 24 часа и в 12 раз через 72 часа после обработки (Trebish et al., 1993), причем методом иммуноблотинга не удалось обнаружить белка Хлазы в необработанных плодах.

Гиббереллины (GA_3) и цитокинины (N^6 -бензиладенин), замедляющие потерю Хл, противодействовали также этилен-индуцированному увеличению активности Хлаз (Trebish et al., 1993; Jacob-Wilk et al., 1999). Корреляция между экспрессией генов, кодирующих Хлазу, и скоростью разрушения Хл отмечена в обработанных этиленом плодах цитрусовых (Jacob-Wilk et al., 1999). Этилен-индуцированный рапад Хл в клетках кожуры лимона, обработанных этиленом, происходил с разной скоростью, не синхронно, как установлено с помощью методом конфокальной спектроскопии. В то время, как количество Хл в некоторых клетках резко падало уже после 24 ч обработки этиленом, в других клетках содержание Хл не изменялось. Было доказано, что этот эффект связан с появлением и накоплением Хлазы в тех или иных клетках под действием этилена (Shemer et al., 2008).

Другой регулятор роста растений – жасмонат и его производные способны оказывать влияние на процессы старения листьев и деградацию Хл. Так, метил жасмонат ускорял старение листьев дуба и вызывал разрушение Хл в листьях ячменя (Tsuchiya et al., 1999). Отмечено также, что разложение Хл в листьях арабидопсиса при обработке метилжасмонатом контролируется *AtCLH1* (Kariola et al., 2005).

Реутилизация азота

В хлоропластах депонировано до 75% клеточного азота (Hortensteiner, 2002), для первичной фиксации которого требуется, как известно, большое количество энергии. Выяснению вопроса, каким образом утилизируется этот важный биоген при разрушении фотосинтетического аппарата, посвящены многие работы последних лет (Hortensteiner and Feller, 2002; Hortensteiner and Kräutler, 2011). Один моль Хл

содержит четыре моля азота, а общая доля азота, связанного в Хл, составляет около 2% клеточного пула (Hortensteiner, 2006). В то же время в белках светособирающих пигмент-белковых комплексов содержится не менее 20% азотного запаса клетки. Хл необходим для стабилизации Хл-связывающих белков (Horn, Paulsen, 2004) и, как предполагается (Hortensteiner, 2006), отделение Хл индуцирует синтез специальных протеаз, участвующих в деградации ассоциированных с Хл полипептидов. В этом процессе важную роль играет фермент Хл *b* редуктаза, трансформирующая Хл *b* – функциональный и структурный компонент светособирающего комплекса в Хл *a*. Эта реакция является одним из первых этапов, ведущих к полному разрушению Хл и ассоциированных с ним белков (рис.1,3).

Протеазы в основном, отвечающие за деградацию Хл-связывающих белков, в основном не известны. Единственным исключением является белок D1 - компонент реакционного центра фотосистемы II, имеющий высокую скорость оборота не только в условиях фотоингибирования, но и при старении. Деградация D1 происходит в два этапа, вначале он расщепляется на два фрагмента, а затем происходит их полная утилизация. Было показано, что эти реакции катализируются представителями двух типов хлоропластных протеаз, DegP и FtsH (Adam, Clarke, 2002). Сведения о том, каким образом осуществляется протеолитическое расщепление светособирающего комплекса, весьма ограничены. Известно, что при высокой интенсивности света в его деградации участвуют протеазы серин/цистеинового типа и локализованная в хлоропластах глутамил эндопептидаза, расщепляющая N-концевой пептид одной из субъединиц светособирающего комплекса (Hortensteiner, 2006).

Таким образом, азот хлорофилла не экспортируется из стареющих листьев, а остается в клетках в виде линейных тетрапиррольных катаболитов, которые накапливаются в вакуоли. Деградация Хл и хлорофилл-связывающих апобелков взаимосвязаны.

ЛИТЕРАТУРА

- Судьїна О.Г. Утворення та накопичення хлорофілу в залежності від активності хлорофілази // Праці Одеськ. держ. ун-ту ім. Мечникова. – 1958. – Т. 148. – С. 169-180.
- Судьїна О.Г., Довбиш К.П., Фомішина Р.М., Донцова І.Г. Мембранна регуляція хлорофілазної актив-

КАТАБОЛИЗМ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТЕНИЯХ

- ності в листі тютюну // Укр. ботан. журн. – 1988. – Т.45, № 2. – С. 48-51.
- Фомішина Р.М., Сиваш О.О., Захарова Т.О., Золотарьова О.К. Роль хлорофілази в адаптації рослин до умов освітлення // Укр. ботан. журн. – 2009. – Т. 66, № 1. – С. 94-102.
- Судьїна О.Г., Довбиш К.П., Голод М.Г. Зміна стану і активності хлорофілази при порушенні структури хлоропластів // Укр. ботан. журн. – 1975. – Т. 32, № 3. – С. 330-334.
- Adam Z, Clarke AK. Cutting edge of chloroplast proteolysis // Trends Plant Sci. – 2002. – V. 7. – P. 451-456.
- Arkus K.A.J., Cahoon E.B., Jez J.M. Mechanistic analysis of wheat chlorophyllase // Arch. Biochem. Biophys. – 2005. – V. 438. – P.146-155.
- Ardao C., Vennesland B. Chlorophyllase activity of spinach chloroplast // Plant Physiol. – 1960. – V. 35. – P. 368-371.
- Azoulay-Shemer T., Harpaz-Saad, Cohen-Peer R., Mett A. Spicer V., Lovat N., Krokhin O., Brand A., Gidoni D., Standing K.G., Goldschmidt E.E., Eyal Y. Dual N- and C-terminal processing of citrus chlorophyllase precursor within the plastid membranes leads to the mature enzyme // Plant Cell Physiol. – 2011. – V. 5. – P.70-83.
- Barret J., Jeffrey S.W. Chlorophyllase and formation of an atypical chlorophyllide in marine algae // Plant Physiol. – 1964. – V. 39. – P. 44-47.
- Brandis A., Vainstein A., Goldschmidt E.E. Distribution of chlorophyllase among components of chloroplast membranes in *Citrus sinensis* organs // Plant Physiol Biochem. – 1996. – V. 34. – P. 49-54.
- Brzezowski P., Grimm B. Chlorophyll metabolism // Published Online: 15 APR 2013. DOI: 10.1002/9780470015902.a0020084.pub2
- Büchert A.M., Civello P.M., Martinez G.A. Chlorophyllase versus pheophytinase as candidates for chlorophyll dephytylation during senescence of broccoli // J. Plant Physiol. – 2011. – V. 168. – P. 337-343.
- Christ B., Schelbert S., Aubry S., Süßenbacher I., Müller T., Kräutler B., Hörtensteiner S. MES16, a member of the methyltransferase protein family, specifically demethylates fluorescent chlorophyll catabolites during chlorophyll breakdown in *Arabidopsis* // Plant Physiol. – 2012. – V. 158. – P. 628-641.
- Drazkiewicz M. Chlorophyllase: occurrence, functions, mechanism of action, effects of external and internal factors // Photosynthetica. – 1990. – V. 30. – P. 321-331.
- Fang Z., Bouwkamp J. C., Solomos T. Chlorophyllase activities and chlorophyll degradation during leaf senescence in non-yellowing mutant and wild type of *Phaseolus vulgaris* L. // J. Exp. Bot. – 1998. – V. 49. – P. 503-510.
- Foyer C.H., Lelandais M., Kunert K.J. Photooxidativestress in plants // Physiol. Plant. – 1994. – V. 92. – P. 696-717.
- Garcia A.L., Galindo L. Chlorophyllase in citrus leaves: localization and partial purification of the enzyme // Photosynthetica. – 1991. – V. 25. – P. 105-111.
- Goldschmidt E.E. Chlorophyll decomposition in senescing leaves and ripening fruits: functional and evolutionary perspectives // Acta Hort. – 2001. – V. 553. – P. 331-335.
- Gong Y., Mattheis J. P. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene on chlorophyll catabolism of broccoli florets // Plant Growth Regul. – 2003. – V.40. – P. 33-38.
- Gupta S., Gupta S. M., Sane A., P., Kumar N. Chlorophyllase in *Piper betle* L. has a role in chlorophyll homeostasis and senescence dependent chlorophyll breakdown // Mol Biol. Rep. – 2012. – V. 39. – P. 7133-7142.
- Harpaz-Saad S., Azoulay T., Arazi T., Ben-Yaakov E., Mett A., Shibolet Y. M., Hörtensteiner S., Gidoni D., Gal-On A., Goldschmidt E. E., Eyal Y. Chlorophyllase is a rate-limiting enzyme in chlorophyll catabolism and is posttranslationally regulated // Plant Cell. – 2007. – V. 19. – P. 1007-1022.
- Holden M. Purification and properties of chlorophyllase // Photochem. Photobiol. – 1963. – V. 2. – P.175-180.
- Hendry G.A.F., Houghton J.D., Brown S.B. The degradation of chlorophyll – a biological enigma // New Phytol. – 1987. – V. 107. – P. 255-302.
- Hirashima M., Tanaka R., Tanaka A. Light-independent cell death induced by accumulation of pheophorbide a in *Arabidopsis thaliana* // Plant Cell Physiol. – 2009. – V. 50. – P. 719-729.
- Holden M. The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase // Biochem. J. – 1961. – V. 78. – P. 359-364.
- Horn R., Paulsen H. Early steps in the assembly of light-harvesting chlorophyll *a/b* complex – Time-resolved fluorescence measurements // J. Biol. Chem. – 2004. – V. 279. – P. 44400-44406.
- Hörtensteiner S., Feller U. Nitrogen metabolism and remobilization during senescence // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 927-937.
- Hörtensteiner S. Chlorophyll degradation during senescence // Annu. Rev. Plant Biol. – 2006. – V. 57. – P. 55-77.

- Hörtensteiner S.* Stay-green regulates chlorophyll and chlorophyll-binding protein degradation during senescence // *Trends Plant Sci.* – 2009. – V.14. – P. 155-162.
- Hörtensteiner S., Krätzler B.* Chlorophyll breakdown in higher plants. // *Biochem. Biophys. Acta.* – 2011. – V. 1807. – P. 977-988.
- Jacob-Wilk D., Holland D., Goldschmidt E.E., Riov J., Eyal Y.* Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the Chlase1 gene from ethylene-treated Citrus fruit and its regulation during development // *Plant J.* – 1999. – V. 20. – P. 653-661.
- Jeffrey S.W., Hallegraeff G. M.* Chlorophyllase distribution in ten classes of phytoplankton: a problem for chlorophyll analysis // *Mar. Ecol. Prog. Ser.* – 1987. – V. 35. – P. 293-304.
- Kariola T., Brader G., Li J., Palva E.T.* Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defence pathways in plants // *Plant Cell.* – 2009. – V. 17. – P. 282-294.
- Krätzler B., Jaun B., Bortlik K.-H., Schellenberg M., Matile P.* On the enigma of chlorophyll degradation: the constitution of a secoporphyrinoid catabolite // *Angew.Chem.* – 1991. – V. 30. – P. 1315-1318.
- Majumdar S., Ghosh S., Glick B.R., Erwin B., Dumbroff T.* Activities of chlorophyllase, phosphoenolpyruvate carboxylase and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase in the primary leaves of soybean during senescence and drought // *Physiol. Plant.* – 1991. – V. 81. – P. 473-480.
- Marcos J.F., Gonzalez-Candelas L., Zacarias L.* Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs // *J. Exp. Bot.* – 2005. – V. 56. – P. 2183-2193.
- Matile P., Schellenberg M., Vicentini F.* Localization of chlorophyllase in the chloroplast envelope // *Planta.* – 1997. – V. 201. – P. 96-99.
- Matile P., Hörtensteiner S., Thomas H.* Chlorophyll degradation // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* – 1999. – V. 50. – P. 67-95.
- Mayer H.* Untersuchungen über die Chlorophyllase // *Planta.* – 1930. – V. 11. – P. 294-330.
- Mfñiguez-Mosquera M. I., Gandul-Rojas B., Gallardo-Guerrero L.* Measurement of chlorophyllase activity in olive fruit (*Olea europaea*) // *J. Biochem.* – 1994. – V. 116. – P. 263-268.
- Moll W.A.W., De Wit B.* Chlorophyllase activity in plastid membranes of bean leaves grown in darkness and in (intermittent) light // *Photosynthetica.* – 1979. V. 13. – P. 146-154.
- Mühlecker W., Ongania K.-H., Krätzler B., Matile P., Hörtensteiner S.* Tracking down chlorophyll breakdown in plants: elucidation of the constitution of a 'fluorescent' chlorophyll catabolite // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 1997. – V. 36. – P. 401-404.
- Ogura N.* Studies on chlorophyllase in tea leaves III. Properties of soluble and insoluble chlorophyllases // *Plant Cell Physiol.* – 1972. – V. 13. – P. 971-979.
- Okazawa A., Tango L., Itoh Y., Fukusaki E., Kobayashi A.* Characterization and subcellular localization of chlorophyllase from Ginkgo biloba // *Z. Naturforsch.* – 2006. – V. 61(1-2). – P.111-117.
- Saltveit M.E.* Effect of ethylene on quality of fresh fruits and vegetables // *Postharvest Biol.Technol.* – 1999. – V. 15. – P. 279-292.
- Schenk N., Schelbert S., Kanwischer M., Goldschmidt E.E., Dürmann P., Hürtensteiner S.* The chlorophyllases AtCLH1 and AtCLH2 are not essential for senescence-related chlorophyll breakdown in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.* – 2007. – V. 581. – P. 5517-5525.
- Shemer T. A., Harpaz-Saad S., Belausov E., Lovat N., Krokhin O., Spicer V., Standing G.K., Goldschmidt E. E., Eyal Y.* Citrus chlorophyllase dynamics at ethylene-induced fruit color-break: A study of Chlorophyllase expression, posttranslational processing kinetics, and *in situ* intracellular localization // *Plant Physiol.* – 2008. – V. 148. – P. 108-118.
- Simpson D., Knotzel J.* Light-harvesting complexes of plants and algae: introduction, survey and nomenclature // *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. Advances in Photosynthesis and Respiration / Eds. D.R. Ort, C.F. Yocum.* – Dordrecht: Springer, 1996. – V. 4. – P. 493-506.
- Suzuki T., Kunieda T., Murai F., Morioka S., Shioi Y.* Mg-dechelation activity in radish cotyledons with artificial and native substrates, Mg-chlorophyllin a and chlorophyllide a // *Plant Physiol. Biochem.* – 2005. – V. 43. – P. 459-464.
- Takamiya K., Tsuchiya T., Hiroyuki O.* Degradation pathway(s) of chlorophyll: What has gene cloning revealed? // *Trends Plant Sci.* – 2000. – V. 5. – P. 1360-1385.
- Tarasenko L.G., Khodasevich E.V., Orlovskaya K.I.* Location of chlorophyllase in chloroplast membranes // *Photobiochem Photobiophys.* – 1986. – V. 12. – P. 119-121.
- Terpstra W.* Chlorophyllase and lamellar structure in *Phaeodactylum triconutum*. Situation of chlorophyllase in pigment membranes // *Z. Pflanzenphysiol.* – 1976. – V. 80. – P.177-188.
- Trebithsh T., Goldschmidt E.E., Riov J.* Ethylene induces de novo synthesis of chlorophyllase, a chlorophyll

КАТАБОЛИЗМ ХЛОРОФИЛЛА В РАСТЕНИЯХ

- degrading enzyme, in Citrus fruit peel // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1993. – V. 90. – P. 9441-9445.
- Todorov D.T., Karanov E.N., Smith A.R., Hall M.A.* Chlorophyllase activity and Chlorophyll contents in wild and mutant plants of *Arabidopsis thaliana* // Biol. Plant. – 2003. – V. 46. – P. 125-127.
- Tsuchiya T., Ohta H., Okawa K., Iwamatsu A., Shimada H., Masuda T., Takamiya K.* Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – V. 96. – P. 15362-15367.
- Wang K.L., Li H., Ecker J.R.* Ethylene biosynthesis and signaling networks // Plant Cell. – 2002. – V.12. – P. S131-S151.
- Willstatter R., Stoll A.* Untersuchungen über Chlorophyll. Methoden und ergebnisse. – Berlin: Springer, 1913.
- Wojtaszek P.* Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection // Biochem. J. – 1997. – V. 322. – P. 681-692.
- Yamauchi N., Watada A.E.* Regulated chlorophyll degradation in spinachleaves during storage // J. Amer. Soc. Horticult Sci. – 1991. –V. 116. – P. 58-62.
- Yamauchi N., Watada A.E.* Pigment changes in parsley leaves during storage in controlled or ethylene containing atmosphere // J. Food Sci. – 1993. – V. 58. – P. 616-618.
- Yao N., Eisfelder B., Marvin J., Greenberg J.T.* The mitochondrion – An organelle commonly involved in programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* // Plant J. – 2004. – V. 40. – P. 596-610.

Поступила в редакцию
03.09.2013 г.

CHLOROPHYLL CATABOLISM IN PLANTS

O. O. Syvash, E. K. Zolotareva

*M.G. Kholodny Institute of Botany
of National Academy of Sciences of Ukraine
(Kyiv, Ukraine)*

Massive degradation of chlorophyll (Chl) takes place during leaf senescence and fruit ripening. In a functioning chloroplast, almost all Chls are in the protein-bound state, allowing the conversion of light energy into forms that support the metabolic processes in the plant. Free Chl under illumination as well as photochemically active products of its metabolism generates free radicals that cause degenerative damage to the tissues of the plant. A feature of Chl catabolism is that already in the first stages of this process photochemically active products are vanished. The first reaction of the chlorophyll breakdown in leaves during senescence is Mg^{2+} removal and pheophytin formation catalyzed by pheophytinase (Pheophytin Pheophorbide Hydrolase). The first stage of Chl degradation during fruit ripening, catalyzed by chlorophyllase (Chlase, chlorophyll-chlorophyllide-hydrolase, EC 3.1.1.14), is hydrolysis of Chl and formation of water-soluble chlorophyllide and hydrophobic phytol. Expression of members Chlase genes is regulated by methyl jasmonate and ethylene. Chlase – the first of the plant enzyme was discovered 100 years ago, but its structure and physiological role has not yet been fully determined. Recently it was shown that Chlase localized not only in chloroplasts, as previously believed, but also in vacuoles. The products of catabolism of Chl and Chl-protein complexes are transported into the vacuoles and used as a nitrogen source in the subsequent metabolic processes.

Key words: *chlorophyll, phytol, chlorophyllase, pheophytin, pheophytinase, ethylene, porphyrine, chloroplast*

КАТАБОЛІЗМ ХЛОРОФІЛУ В РОСЛИНАХ

О. О. Сиваш, О. К. Золотарьова

*Інститут ботаніки ім. Н.Г. Холодного
Національної академії наук України
(Київ, Україна)*

Розкладання хлорофілу (Хл) масово відбувається при старінні фотосинтезуючих тканин і дозріванні плодів. У функціонуючому хлоропласті майже весь Хл знаходиться у зв'язаному з білками стані, забезпечуючи конвертацію світлової енергії у форми, що підтримують метаболічні процеси в рослині. Вільний Хл при освітленні, як і хімічно активні продукти його метаболізму, генерує вільні радикали, що спричиняють дегенеративні пошкодження тканин рослини. Особливістю катаболізму Хл є те, що вже на перших етапах цього процесу фотохімічно активні продукти розщеплюються. При старінні листя першою реакцією деградації Хл є вилучення магнію з утворенням феофітину, що каталізується феофітиназою, тоді як при дозріванні плодів руйнування Хл каталізується хлорофілазою (Хлаза, КФ 3.1.1.14), що гідролізує Хл з утворенням водорозчинного хлорофіліду і фітолу. Експресія генів Хлази активується етиленом і метилжасмонатом, що пришвидшує дозрівання плодів у багатьох видів рослин. Хлаза була відкрита 100 років тому, проте її структура і фізіологічна роль дотепер повністю не визначені. Хлаза локалізована не тільки в хлоропластах, як вважалося раніше, а також і в вакуолях. Продукти катаболізму Хл і Хл-білкових комплексів надходять у вакуолі і використовуються в метаболізмі як джерело азоту.

Ключові слова: *хлорофіл, фітол, хлорофілаза, феофітин, феофітиназа, етилен, порфірин, хлоропласт*