

STRESZCZENIE

Rubisco jest enzymem występującym u organizmów fotosyntetyzujących katalizującym pierwszy etap procesu akumulacji biomasy: przyłączenie dwutlenku węgla do cukru – rybulozo-1,5-bisfosforanu. Skomplikowana, multimeryczna budowa i obecność wielu labilnych elementów strukturalnych w tym białku, powodują że nie jest ono w stanie samodzielnie uzyskać swojej natywnej struktury czwartorzędowej i wymaga do tego celu ściśle zorganizowanego działania szeregu czynników pomocniczych. Wyspecjalizowane białka chaperonowe uczestniczą kolejno w fałdowaniu podjednostek holoenzymu, pośredniczą w ich stopniowej oligomeryzacji, a w niektórych przypadkach dodatkowo kierują do komórkowego miejsca przeznaczenia, takiego jak karboksosomy, czy pyrenoid. Oprócz pełnienia swojej kanonicznej funkcji polegającej na pośredniczeniu w składaniu Rubisco, chaperony te zaangażowane są w dodatkowe procesy, takie jak kontrola jakości procesu biosyntezy czy regulacja fizjologii organelli i kompartmentów komórkowych.

WPROWADZENIE

Fotosynteza ze względu na rodzaj utylizowanej energii, dzieli się na tzw. „fazę jasną” oraz „fazę ciemną”. W pierwszej z nich światło słoneczne absorbowane przez fotosystemy powoduje wzbudzenie elektronów, które następnie przekazywane są przez szereg białkowych oraz niebiałkowych czynników na finalny akceptor – NADP, prowadząc do jego redukcji do NADPH⁺. Transportowi elektronów towarzyszy transfer protonów do wnętrza lumen tylakoidu, prowadząc do wytworzenia tzw. siły protonomotorycznej. Ta z kolei przekształcana jest w energię chemiczną pod postacią ATP przez chloroplastową syntazę ATP. Zarówno NADPH⁺, jak i ATP, stanowią potencjał redukcyjny, wykorzystywany w procesach anabolicznych zachodzących w „fazie ciemnej” zwanej inaczej cyklem Calvina. Niedobór elektronów, będący efektem ich aktywacji i opuszczenia centrów fotosyntetycznych, rekompensowany jest częściowo przez elektrony pochodzące z rozkładu wody. Proces ten, katalizowany jest przez centrum rozkładające wodę, będące peryferyjną podjednostką fotosystemu II. Prowadzi on również do uwolnienia protonów, przyczyniając się do akumulacji siły protonomotorycznej, jak i wytworzenia tlenu. W „fazie ciemnej” fotosyntezy cząsteczka dwutlenku węgla wbudowywana jest w cukrowy akceptor, prowadząc do powstania związków organicznych, wykorzystywanych następnie w procesach anabolicznych i katabolicznych. Akceptor zużyty w trakcie procesu zostaje odtworzony z wykorzystaniem energii związków potencjału redukcyjnego [1]. Pierwszą reakcją „fazy ciemnej” przeprowadza karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu (Rubisco) [2]. Enzym ten katalizuje enolizację cukru – rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP) przez niewielki gazowy substrat – CO₂ lub O₂ (Ryc. 1A). Produkt tej reakcji jest nietrwały i samoczynnie ulega dalszej degradacji, do dwóch cząsteczek kwasu 3-fosfoglicerynowego w przypadku enolizacji za pomocą CO₂ lub do cząsteczki kwasu 3-fosfoglicerynowego i cząsteczki fosfoglikolanu w przypadku enolizacji przy udziale O₂. Jedynie pierwszy z tych produktów – kwas 3-fosfoglicerynowy jest użyteczny metabolicznie dla komórki, podczas gdy drugi jest toksyczny i musi być utylizowany w procesie fotooddychania [3]. Reakcja karboksylacji RuBP jest jedynym ilościowo znaczącym procesem w przyrodzie umożliwiającym generację cząsteczek organicznych z materii nieorganicznej. Poprawienie właściwości Rubisco mające na celu zwiększenie szybkości katalizowanej reakcji karboksylacji, jak i zmniejszenie powinowactwa do tlenu, są więc jednym z głównych nurtów prac nad tym białkiem.

Pierwsze prymitywne organizmy fotosyntetyczne przeprowadzały swoje procesy życiowe w okresie, kiedy atmosfera uboga była w tlen, a bogata w dwutlenek węgla. Wykształcenie centrum rozkładającego wodę doprowadziło do gwałtownego przyrostu biomasy, a co za tym idzie wzrostu tlenu w atmosferze do poziomu obecnego w procesie zwanym „katastrofą tlenową”, zapoczątkowanym 2 miliardy lat temu. Rubisco wytwarzająca do tej pory jedynie produk-

mgr Małgorzata Rydzy^{#✉},

mgr Michał Tracz[#],

dr Piotr Kolesiński,

prof. dr hab. Andrzej Szczepaniak

Wydział Biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wrocław

https://doi.org/10.18388/pb.2021_397

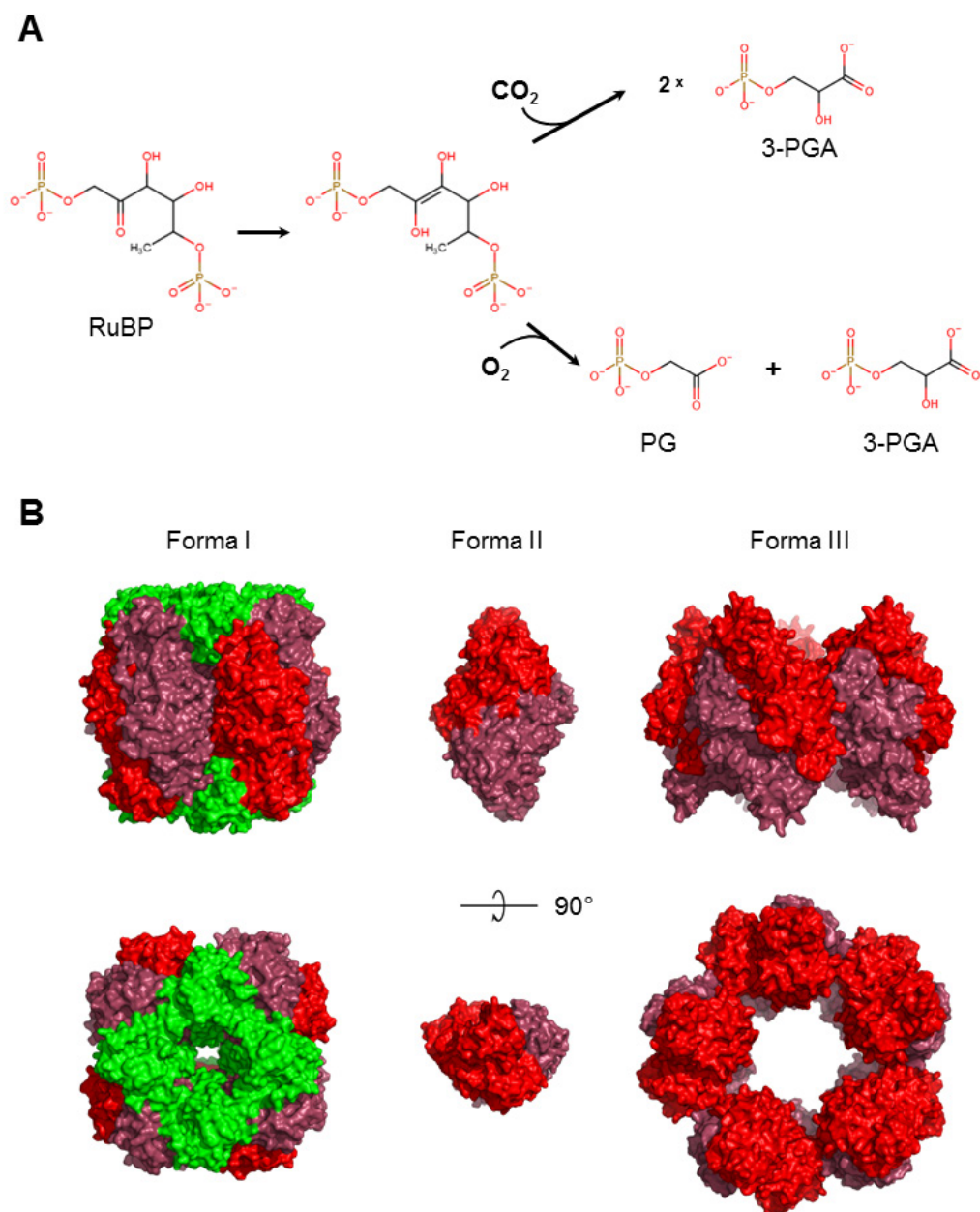
✉ autor korespondujący: malgorzata.rydzy@uwr.edu.pl

[#]Autorzy w równym stopniu przyczynili się do powstania manuskryptu i dzielą pierwsze autorstwo.

Słowa kluczowe: Rubisco, fotosynteza, białka chaperonowe

Wykaz skrótów: Rubisco – karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu; ATP-adenozyno-5'-trifosforan; RuBP – rybulozo-1,5-bisfosforan; karboksylaza PEP – karboksylaza fosfoenolopirogronianu.

Praca powstała w wyniku realizacji projektu badawczego o nr 2019/33/N/NZ3/01168 finansowanego ze środków Narodowego Centrum Nauki.



Rycina 1. Funkcja i struktura Rubisco. (A) Schemat reakcji katalizowanej przez Rubisco. Rybulozo-1,5-bisfosforan (RuBP) ulega izomeryzacji do swojej formy enediolowej. Ta z kolei ulega reakcji z gazowym dwutlenkiem węgla lub tlenem. Nietrwały intermedial, który nie został zaprezentowany na schemacie hydrolyzowany jest następnie do dwóch cząsteczek kwasu 3-fosfoglicerynowego (3-PGA) w przypadku enolizacji dwutlenkiem węgla lub do pojedynczej cząsteczki 3-PGA i cząsteczki fosfoglikolanu (PG) w przypadku enolizacji z udziałem O_2 . Jedynie pierwszy z tych produktów jest użyteczny metabolicznie, podczas gdy drugi jako toksyczny musi ulec utylizacji. (B) Schematyczna prezentacja budowy form Rubisco występujących w przyrodzie. Duże podjednostki (RbcL) zostały zaprezentowane odcieniami czerwieni, podczas gdy małe (RbcS) zostały przedstawione na zielono. Do wygenerowania ryciny użyto programu PyMol (Schrödinger) i struktur zdeponowanych w bazie PDB pod kodami: 5rub (Schneider i in. 1990), 8ruc (Andersson i in. 1996) i 1geh (Kitano i in. 2001).

ty karboksylacji RuBP musiała ewoluować w celu zmniejszenia podatności substratu na oksigenację [4]. Zmiany w lokalnej substrukturze centrum aktywnego pociągnęły za sobą zwiększenie poziomu komplikacji budowy całego enzymu. Wymusiły też ko-ewolucję czynników wymaganych do jego biosyntezy, umiejscowienia w odpowiednim środowisku komórkowym, a także utrzymania jego sprawności katalitycznej. Pojawienie się atmosfery tlenowej pociągnęło za sobą również wytworzenie mechanizmów zagęszczania dwutlenku węgla w pobliżu Rubisco, takich jak karboksosomy występujące u sinic [5], czy pyrenoid spotykany w chloroplastach jednokomórkowych alg oraz niektórych

mszaków [6]. Rośliny C_4 takie jak kukurydza, czy trzcina cukrowa wykształciły biochemiczny, tzn. bazujący na reakcjach chemicznych, a nie wyspecjalizowanych strukturach, mechanizm zagęszczania dwutlenku węgla. W przeciwieństwie do roślin C_3 , gdzie atmosferyczny CO_2 wbudowywany w biomasę jest wyłącznie w cyklu Calvina, u roślin C_4 proces ten przebiega dwuetapowo. W komórkach mezofilu liściowego CO_2 jest asymilowany przez karboksylazę PEP w wyniku czego powstaje szczawiooctan redukowany następnie do jabłczanu. Ten trafia do pochwy okołowiązkowej, a następnie CO_2 zostaje uwolniony z jabłczanu i włączony do cyklu Calvina. Fakt, że komórki mezofilu nieustannie pom-

pują CO₂ do komórek pochwy okołowiązkowej w postaci jabłczanu, powoduje że zawsze jest tam wysoki stosunek stężenia CO₂ w stosunku do O₂, a to minimalizuje fotooddychanie. Szlak C₄ jest wykorzystywany u ok. 3% roślin naczyniowych, z czego najpopularniejsze to trzcina cukrowa czy kukurydza. Rośliny C₄ obficie występują na obszarach, które są gorące, rzadziej i mniej obficie na chłodnych obszarach. Pozostałe rośliny, które nie wykształciły opisanych adaptacji do zminimalizowania fotooddychania nazywamy wspomnianymi wyżej roślinami C₃. Obok roślin C₃ i C₄ należy wymienić rośliny wykorzystujące szlak CAM. Zamiast rozdzielania reakcji zależnych od światła od cyklu Calvina w przestrzeni, rośliny CAM rozdzielają te procesy w czasie. Nocą rośliny CAM otwierają aparaty szparkowe, pozwalając na dyfuzję CO₂ do wnętrza liści. CO₂ jest asymilowany do szczawiooctanu przez karboksylazę PEP, a następnie przekształca się do jabłczanu lub innego kwasu organicznego. Kwas ten jest przechowywany wewnątrz wakuoli do następnego dnia. W świetle dziennym, rośliny CAM nie otwierają aparatów szparkowych, ale nadal mogą przeprowadzać fotosyntezę, a to dlatego, że kwasy organiczne są transportowane z wakuoli i uwalniają CO₂, który wchodzi w cykl Calvina. Takie kontrolowane uwalnianie utrzymuje wysokie stężenie CO₂ wokół Rubisco, minimalizując fotooddychanie. Do tej grupy roślin należą głównie sukulentki, ale też ananas czy niektóre epifity [7]. W niniejszej pracy przeglądowej skupiliśmy się na białkach zaangażowanych w szeroko pojęty proces biosyntezy Rubisco, umożliwiających fałdowanie jej podjednostek polipeptydowych, składanie ich w aktywny biokatalizator, a następnie pośredniczące w umiejscowieniu go w komórkowym miejscu przeznaczenia. Czytelników zainteresowanych poszerzeniem wiedzy dotyczącej innych białek oddziałujących z Rubisco – aktywaz usuwających jej naturalne inhibitory [8] oraz kompleksów rozfałdowujących i degradujących ten biokatalizator [9] – chcielibyśmy odesłać do znakomych, anglojęzycznych prac przeglądowych zacytowanych w tej sekcji.

BUDOWA RUBISCO

Na chwilę obecną ze względu na różnice w strukturze trzecio- i czwartorzędowej sklasyfikowano cztery formy Rubisco. Najbardziej rozpowszechniona w przyrodzie jest forma I występująca u roślin, alg oraz cyjanobakterii. Ten typ enzymu oraz oddziałujące z nim czynniki pomocnicze będą również głównym obiektem niniejszej pracy przeglądowej. Fotosyntezujące bakterie beztlenowe oraz jednokomórkowe algi należące do grupy brudnic wytwarzają znacznie prostszy typ II białka, podczas gdy niektóre archebakterie posiadają III formę enzymu (Ryc. 1B). W przypadku ostatniej grupy organizmów reakcja karboksylacji RuBP nie służy generowaniu biomasy, a raczej detoksykacji tego cukru, będącego produktem ubocznym metabolizmu kwasów nukleinowych [10]. Ostatnia, czwarta kategoria enzymów to tak zwane białka Rubisco-podobne (ang. *Rubisco-like protein* – RLP), które mimo podobieństw strukturalnych, wykazują odrębną swoistość substratową i biorą udział w metabolizmie związków siarkowych [11].

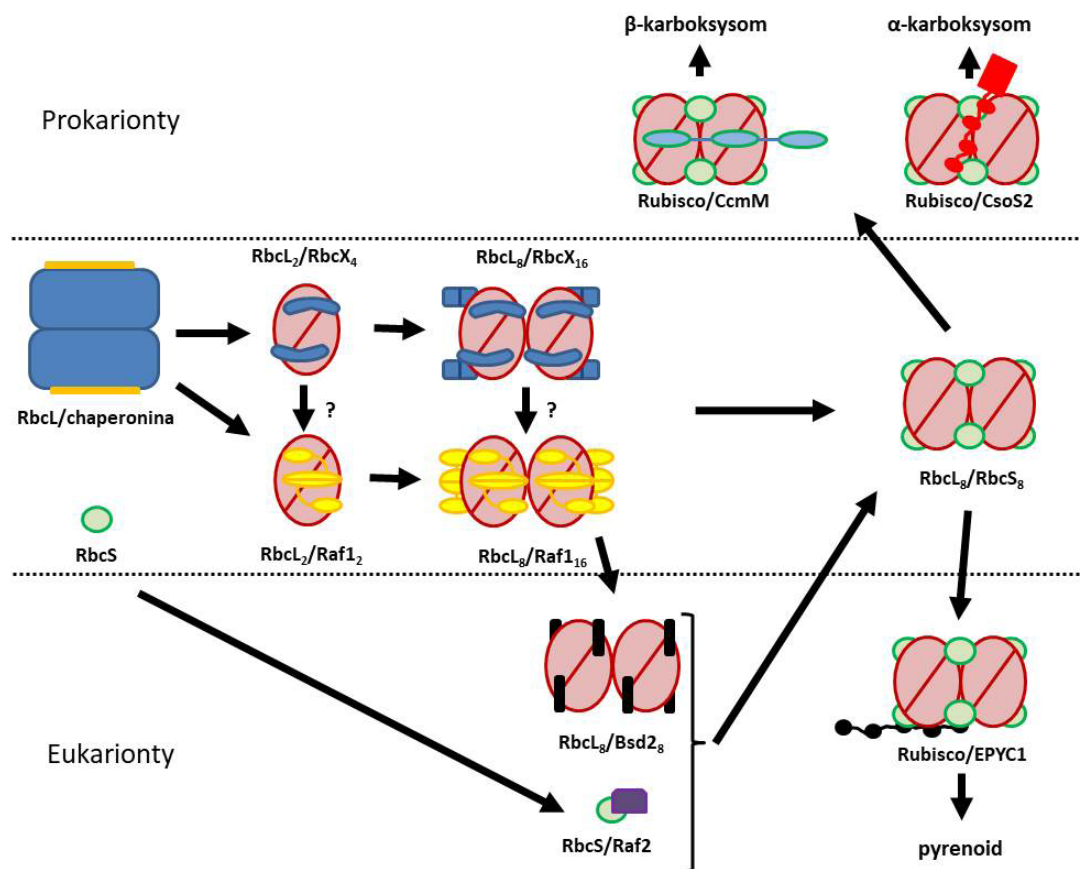
Za wyjątkiem RLP, niezależnie od typu enzymu, Rubisco pochodzące z różnych organizmów posiadają wspólny model centrum aktywnego. Podstawową jednostką funk-

cjonalną enzymu jest dimer dużych podjednostek (RbcL lub CbbL; o masie cząsteczkowej ok. 55 kDa) usytuowanych antyrównolegle względem siebie. Dwa symetryczne miejsca wiązania substratu znajdują się na pograniczu N-końcowej domeny pierwszej z podjednostek oraz C-końcowej domeny podjednostki drugiej. Z RuBP bezpośrednio oddziałują tzw. pętla 60-tek (od numeracji wchodzących w jej skład reszt aminokwasowych) oraz pętla 6 (od numeracji kolejnych pętli w strukturze RbcL). Oba te elementy strukturalne są dodatkowo przejściowo „przykrywane” przez labilny C-koniec dużej podjednostki. Enolizacja substratu zachodzi jedynie jeśli centrum aktywne znajduje się w stanie otwartym, tzn. nie oddziałującym z C-końcem RbcL. Symulacje *in silico* sugerują, że destabilizacja oddziaływania wspomnianego C-końca z pozostałymi elementami strukturalnymi miejsca aktywnego zwiększa prawdopodobieństwo karboksylacji w stosunku do oksygenacji substratu [12]. Forma I enzymu złożona jest z czterech wcześniej wspomnianych dimerów dużych podjednostek rozmieszczonych wokół centralnej osi enzymu. Z taką oktameryczną strukturą dodatkowo oddziałuje osiem małych podjednostek (RbcS lub CbbS; o masie cząsteczkowej ok. 12–15 kDa) umiejscowionych pomiędzy dimerami RbcL w ich apikalnych fragmentach. Mimo, że małe podjednostki nie tworzą znaczących kontaktów z miejscem aktywnym i nie biorą bezpośredniego udziału w reakcji, ich funkcja wydaje się być kluczowa ze względu na stabilizację struktury całego holoenzymu [13]. Oktameryczny rdzeń sinicowego Rubisco pochodzącego z *Synechococcus elongatus* PCC6301 pozbawiony małych podjednostek katalizuje reakcję karboksylacji substratu z szybkością odpowiadającą jedynie kilku procentom tej obserwowanej dla natywnego enzymu [14].

Stosunkowo duża ilość elementów labilnych wymaganych do zajęcia katalizy oraz ogólny stopień złożoności enzymu skorelowane są ze stopniem komplikacji procesu jego składania w funkcjonalny biokatalizator. Proces ten jest wielostopniowy i wymaga uczestnictwa ściśle wyspecjalizowanych czynników pomocniczych zaliczanych do klasy tzw. chaperonów składania.

BIAŁKA CHAPERONOWE W PROCESIE BIOSYNTETYZU BATERYJNEJ RUBISCO

Ogólnie przyjęte jest, że informacja o strukturze II- i III-rzędowej białka zakodowana jest w jego strukturze I-rzędowej, tj. sekwencji aminokwasowej. Proces formowania przez polipeptyd natywnej struktury rzadko zachodzi jednak samoczynnie. Ze względu na wysokie stężenie makromolekuł w cytozolu i świetle organelli komórkowych, sięgające kilkuset mg/ml, łańcuchy polipeptydowe powstające na rybosomie oddziałują ze sobą niespecyficznie tworząc niefunkcjonalne formy pośrednie fałdowania wykazujące dużą tendencję do agregacji. Aby łańcuch peptydowy uzyskał poprawną, trójwymiarową strukturę często musi on być wspomagany przez szereg czynników nazwanych białkami opiekuńczymi lub chaperonowymi. Fałdowany peptyd przechodzi przez ściśle uporządkowaną sekwencję oddziaływań z kolejnymi grupami białek opiekuńczych, rozpoczynając od tych zasocjowanych z rybosomem, np. czynnik TF (ang. *trigger factor* – czynnik uwalniający), poprzez wolne czynniki oddziałujące z fragmentami bogatymi



Rycina 2. Przebieg biosyntezy Rubisco. Schemat obejmuje procesy zachodzące od momentu uzyskania przez przedstawione białka struktury III-rzędowej do formowania kompleksu lokalizującego Rubisco w komórkowym miejscu przeznaczenia – karboksysomie lub pyrenoidzie. W środkowej części ryciny zobrazowano mechanizmy wspólne dla prokariotycznych i eukariotycznych organizmów fotosyntezujących. W górnej i dolnej części rysunku przedstawione zostały procesy charakterystyczne odpowiednio dla prokariota i eukariota.

w aminokwasy hydrofobowe (DnaK/DnaJ), chroniącymi je przed niespecyficzną agregacją, po chaperoniny (np. GroEL/GroES). Ostatnia grupa białek równocześnie zapewnia odizolowane środowisko do fałdowania, jak i aktywnie zmienia strukturę wiązanego substratu [15]. W przypadku białek zawierających więcej niż jeden łańcuch polipeptydowy do zapewnienia odpowiedniej oligomeryzacji może być wymagana dodatkowa grupa białek opiekuńczych, zwana chaperonami składania.

W przeciwieństwie do małej podjednostki Rubisco, która ulega samoczynnemu, spontanicznemu fałdowaniu, duża podjednostka jest obligatorem substratu białek chaperonowych (Ryc. 2). Heterologiczna ekspresja sinicowego Rubisco w komórkach *E. coli* wykazała, że w fałdowanie dużej podjednostki zaangażowane są klasyczne chaperony z rodziny DnaJ/DnaK/GrpE [16]. Jak dotychczas nie zostały jednak zidentyfikowane żadne wyspecjalizowane, sinicowe czynniki z tych rodzin oddziałujące wyłącznie ze wspomnianym polipeptydem. Finalna faza fałdowania sinicowej RbcL zachodzi we wnętrzu chaperoniny [17]. Białko to składa się z siedmiu dużych podjednostek GroEL, tworzących strukturę o kształcie i funkcji klatki oraz siedmiu małych podjednostek GroES, formujących heptameryczną pokrywę na rdzeń utworzony z GroEL [18]. Chaperoniny nie są białkami o wysokiej specyficzności substratowej, ale są w stanie fałdować jedynie substraty mieszczące się w hepta-

merycznej klatce, tzn. takie których masa cząsteczkowa nie przekracza ok. 60 kDa [19]. Podstawą oddziaływania GroEL z niepoprawnie sfałdowanymi peptydami jest rozpoznawanie ich hydrofobowych fragmentów przez apikalną subdomenę tej podjednostki chaperoniny. Wiązanie substratu pociąga za sobą kolejno przyłączenie ATP, zmiany w konformacji dużych podjednostek GroEL, powodujące ich opłaszczenie wokół fałdowanego białka, a następnie przyłączenie pokrywki zbudowanej z GroES. Ostatni z etapów składania kompleksu chaperonina/substrat prowadzi do sekwencyjnej hydrolizy ATP związanego do kolejnych jednostek GroEL do ADP. Wolna hydroliza ATP reguluje ilość czasu spędzonego przez substrat we wnętrzu chaperoniny, pozwalając mu na ukończenie procesu fałdowania, ale również zmienia biofizyczne właściwości jej wnętrza. Hydrofobowe powierzchnie oddziałujące z polipeptydem ulegają rotacji, a eksponowane w jej wyniku polarne elementy strukturalne wymuszają reorganizację wiązanego substratu. Hydroliza ostatniej cząsteczki ATP powoduje rozluźnienie struktury chaperoniny i uwolnienie substratu, który osiąga swoją strukturę natywną lub w przypadku niecałkowitego przebiegu procesu fałdowania i obecności na jego powierzchni skupisk aminokwasów hydrofobowych, asocjuje z kolejną cząsteczką GroEL i wkracza w kolejny cykl fałdowania [20].

Ze względu na silnie hydrofobową powierzchnię kontaktu między monomerami RbcL wchodzącymi w skład dime-

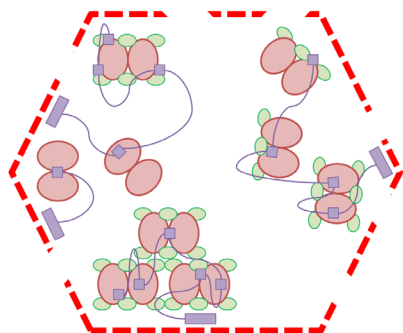
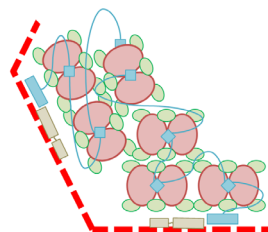
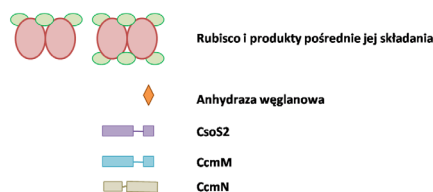
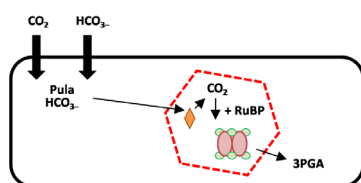
ru, a także obecność labilnych elementów strukturalnych, tj. pętla 60-tek czy C-końcowy peptyd, nawet po fałdowaniu białko to rozpoznawane jest jako substrat dla chaperoniny. Dimeryzacja tego polipeptydu uwarunkowana jest głównie przez oddziaływania hydrofobowe, a wzajemna orientacja monomerów kierowana jest wyłącznie za pomocą dwóch symetrycznie rozmieszczonych mostków solnych. Bez udziału czynników trzecich powierzchnie styku monomerów RbcL wykazują tendencję do nieswoistej agregacji i precypitacji niefunkcjonalnych form pośrednich procesu biosyntezy [21]. Do wejścia na szlak oligomeryzacji i osiągnięcia poprawnej struktury IV-rzędowej RbcL wymaga pomocy niewielkiego chaperonu składania – RbcX. Białko to jest dimerem, którego struktura IV-rzędowa przypomina bumerang, a masa jego pojedynczego monomeru wynosi 12–15 kDa. Centralnie usytuowana kieszeń tego czynnika oddziałuje z aromatycznymi aminokwasami C-końcowego peptydu RbcL. Interakcja ta może zachodzić nawet w sytuacji, gdy RbcL fałdowany jest we wnętrzu chaperoniny, a sam labilny C-końcowy peptyd wystaje poza jej wnętrze [22]. Kompleks RbcL/RbcX₂ ze względu na swoją wielkość przekraczającą pojemność wewnętrznej komory chaperoniny nie wchodzi w ponowny szlak fałdowania. Po opuszczeniu GroEL przez dużą podjednostkę Rubisco związany do niej RbcX formuje dodatkowo sieć słabych oddziaływań z pętlą 6 wiązanego monomeru RbcL. Taka orientacja RbcX ekspozuje jego wierzchołkowy region, który tworzy szereg polarnych kontaktów z przeciwległym monomerem RbcL, zapewniając dodatkowy punkt odniesienia, wymagany dla poprawnej dimeryzacji RbcL [21]. W warunkach *in vitro* dalsze etapy składania Rubisco, tzn. tworzenie oktamerycznego rdzenia z dimerów RbcL oraz przyłączanie małych podjednostek, zachodzą samoczynnie [23]. Doniesienia literaturowe sugerują jednak, że funkcja RbcX może być zastąpiona i rozszerzona przez inny czynnik – Raf1 (ang. *Rubisco accumulation factor 1* – czynnik akumulacji Rubisco), [24,25]. Podobnie jak RbcX białko to jest dimerem, ale ani jego struktura III-rzędowa ani swoistość do określonych regionów na powierzchni RbcL nie korelują z właściwościami poprzednio omawianego białka chaperonowego. N-końcowa, α -helikalna domena Raf1 oddziałuje z regionem RbcL, do którego w dalszych etapach biosyntezy przyłączane są małe podjednostki. C-końcowa domena tego białka bogata w struktury β odpowiada za jego dimeryzację, ale również za szereg dodatkowych funkcjonalnych oddziaływań z RbcL. Struktura kompleksu Raf1/RbcL sugeruje, że ten czynnik opiekuńczy przez oddziaływanie z równikową płaszczyzną dużych podjednostek Rubisco może równocześnie promować dimeryzację RbcL, jak i składanie dimerów RbcL₂ w oktamer. Ponadto kwasowe reszty aminokwasowe z konserwatywnego C-końca Raf1 – oddziałują z tzw. pętlą 60-tek RbcL, stabilizując ten element strukturalny.

Nie jest do końca jasne, czy Raf1 jest w stanie funkcjonalnie zastąpić RbcX *in vivo*. Jedyna udana delecja *rbcX* w sinicy została dokonana dla *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [26]. Wraz ze swoim blisko spokrewnionym szczepem *Synechococcus* PCC 6301 [27] są one jedynymi sinicami, u których synteza Rubisco wydaje się być przynajmniej częściowo niezależna od chaperonów składania. Zgodnie z przewidywaniami, mutacja ta nie wpłynęła ani na akumulację Rubisco w tym organizmie ani na jego wzrost. Delecja *raf1*

została dokonana jak dotąd w dwóch modelowych sinicach – wcześniej wspomnianej *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [28] oraz *Synechocystis* sp. PCC 6803 [29]. O ile mutacja ta nie miała wpływu na wzrost i akumulację Rubisco w ostatnim z tych organizmów, to negatywnie wpływała na te procesy w przypadku pierwszego z nich. Dokładniejsze badania wykazały jednak, że przyczyna zaburzeń fizjologicznych wywołanych tą mutacją nie była powiązana z biosyntezą Rubisco, a raczej z kontrolą jakości tego procesu i dalszym kierowaniem tego enzymu do karboksosomów.

FUNKCJA SINICOWYCH CHAPERONÓW RUBISCO W BIOGENEZIE KARBOKSYDOMÓW

Ponieważ dwutlenek węgla jest łatwo rozpuszczalny w kwasach tłuszczowych, wykazuje on tendencję do dysocjacji przez błony. W związku z tym część organizmów fotosyntetyzujących wykształciła szereg mechanizmów polegających na przekształcaniu CO₂ do jonu węglanowego, który w przeciwieństwie do swojego odpowiednika nie dyfunduje przez dwuwarstwę lipidową. HCO₃⁻ jest następnie ponownie przekształcany do gazowego dwutlenku węgla przez anhidrazę węglanową [30]. Przeprowadzenie ostatniego z procesów w odizolowanej przestrzeni w pobliżu Rubisco umożliwia lokalne zagęszczenie tego substratu i w efekcie zwiększenie preferencji do katalizowania przez nią karboksylacji w stosunku do oksygenacji. Sinice na drodze ewolucji wykształciły karboksosomy – nieoblonione struktury subkomórkowe, zapewniające odizolowane środowisko dla Rubisco i anhidrazy węglanowej. Karboksosomy dzieli się na klasy α i β , spośród których druga została lepiej poznana i scharakteryzowana. α -karboksosomy wyewoluowały w α -proteobakteriach, a następnie na drodze transferu genetycznego, zostały przeniesione do morskich α -cyjanobakterii. Ten typ mikrokompartentu zawiera formę 1A Rubisco. β -karboksosomy występują u β -cyjanobakterii i na drodze analogii zawierają podtyp 1B Rubisco [5,31]. Niezależnie od typu karboksosomy charakteryzują się podobną budową. Wnętrze karboksosomów, zawierające gęsto upakowane Rubisco oraz anhidrazę węglanową, otoczone jest białkową otoczką przypominającą strukturą kapsyd bakteriofaga. Ikosaedryczny kształt nadawany im jest przez wzajemnie uzupełniające się heksameryczne oraz pentameryczne pierścienie formowane przez białka należące do rodzin CsoS w przypadku formy α [32] oraz Ccm [33] w przypadku formy β karboksosomu. Proces syntezy karboksosomu, tzn. kondensacji Rubisco oraz otaczania skumulowanego ładunku białkową powłoką, różni się w zależności od typu mikrokompartentu (Ryc. 3). Jednakże w obu przypadkach za kontrolę jakości Rubisco oraz łączenie go z białkową otoczką odpowiadają wyspecjalizowane czynniki. W przypadku formy α proces składania powłoki mikrokompartentu i jego rdzenia zawierającego Rubisco zachodzą symultanicznie [34]. Głównym czynnikiem odpowiedzialnym za synchronizację tych procesów jest CsoS2. Polipeptyd ten zalicza się do grupy białek pozbawionych struktury III-rzędowej. C-końcowy motyw CsoS2 asocjuje z częściowo zsyntezowaną ścianą karboksosomu. N-końcowe powtórzenia odpowiadają za oddziaływanie z Rubisco, sieciując ten enzym zarówno z powłoką quasi-organellem, jak i z innymi jego cząsteczkami. Poszczególne człony złożone z częściowo uformowanej ściany karboksy-

A **α -karboksosom** **β -karboksosom****B**

Rycina 3. Rola Rubisco w biogenezie i funkcjonowaniu sinicowych karboksosomów. (A) Różnice w biogenezie α - i β -karboksosomów. Biogeneza karboksosomów jest ściśle powiązana ze składaniem Rubisco, enzym stanowi swoiste rusztowanie dla białek otoczki zewnętrznej tych kompartmentów. Powstawanie α -karboksosomów odbywa się równoległe do składania holoenzymu i możliwe jest oddziaływanie białek strukturalnych tego typu karboksosomu już z wczesnymi produktami pośrednimi składania. Konsekwencją jest bardziej rozdzielony przestrzennie wzorek formowania się kompartmentu. W przypadku β -karboksosomów białka otoczki zewnętrznej są ograniczone do oddziaływania wyłącznie z kompletnie poskładanym holoenzymem ($RbcL_8RbcS_8$). Skutkuje to skupionym i etapowym procesem biogenezy. (B) Uproszczony schemat mechanizmu zagęszczania dwutlenku węgla opartego na karboksosomie. Miejscowe zagęszczenie dwutlenku węgla w karboksosomie na skutek selektywnej bariery jaką stanowi ten kompartment pozwala sinicom na korzystanie z bardziej efektywnych katalitycznie, względem CO_2 , wersji Rubisco.

somu oraz zasocjowanego Rubisco są w stanie formować dojrzałą superstrukturę. Poszczególne fragmenty CsoS2 oddziałują z fragmentami powierzchni Rubisco usytuowanymi zarówno na RbcL, jak i RbcS. Ponieważ interakcje te mają wyłącznie słaby charakter wiązań jonowych (K_D pojedynczych oddziaływań w skali 1 mM), mocne oddziaływanie (K_D ok. 100 nM) może mieć miejsce jedynie z dojrzałym holoenzymem, a nie intermediatami pośrednimi jego biosyntezy. Zapobiega to pakowaniu niefunkcyjnych form enzymu do wnętrza kompartmentu [35]. W przeciwieństwie do α -karboksosomów ich odpowiedniki z rodziny β syntezowane są sekwencyjnie [36]. Rdzeń struktury zawierający Rubisco formowany jest w pierwszej kolejności, a następnie rekrutowana jest do niego białkowa powłoka. W obu procesach uczestniczy białko CcmM. Jego krótsza forma, o masie cząsteczkowej ok. 35 kDa, zbudowana jest z trzykrotnie powtórzonej domeny przypominającej strukturalnie RbcS. Wbrew wstępnym przewidywaniom wynikającym z tego podobieństwa, motyw ten nie oddziałuje jednak z Rubisco na zasadzie konkurencji z małą podjednostką. Miejsce jego wiązania z holoenzymem znajduje się w płaszczynie równnikowej dużych podjednostek i pokrywa się z miejscem oddziaływania z poprzednio opisanym czynnikiem – Raf1. Wiązanie się pojedynczych domen CcmM do odrębnych cząsteczek Rubisco powoduje ich sieciowanie i wyodrębnienie z cytozolu na zasadzie separacji faz ciekłych. Za inicjację tworzenia ikosaedrycznej otoczki odpo-

wiada wyspecjalizowana, dłuższa (o masie cząsteczkowej 58 kDa) forma CcmM, która oprócz trzech domen RbcS-podobnych zawiera również N-końcową domenę podobną do anhydrazy węglanowej. Wspomniany dodatkowy element strukturalny oddziałuje z CcmN – białkiem odpowiedzialnym za rekrutację zsiecjanego Rubisco do heksamerycznych ścian karboksosomu [37,38]. Mechanizmem warunkującym „kontrolę jakości” Rubisco w przypadku biosyntezy β -karboksosomów jest konkurencja między Raf1 a CcmM o miejsce wiązania się na RbcL. Raf1 wykazuje powinowactwo do dimeru RbcL, oktamerycznego rdzenia enzymu – $RbcL_8$ oraz późnych intermediatów pośrednich biosyntezy zawierających niepełną liczbę małych podjednostek (np. $RbcL_8RbcS_4$). Jego dysocjacja od Rubisco, wymagana do wiązania się CcmM, następuje dopiero w wyniku całkowitego obsadzenia rdzenia $RbcL_8$ ośmioma małymi podjednostkami [28].

BIOSYNTETA EUKARIOTYCZNEJ RUBISCO

Fotosyntetyczne organizmy eukariotyczne przeprowadzają proces akumulacji dwutlenku węgla w wyspecjalizowanym organellum – chloroplastcie. Eukariotyczna Rubisco w stosunku do swoich prokariotycznych odpowiedników jest enzymem bardziej wybiórczym w stosunku do dwutlenku węgla, ale wolniej przeprowadzającym reakcję karboksylacji [39]. Ewolucja enzymu pociągnęła za sobą ko-

-ewolucję wyspecjalizowanych czynników uczestniczących w jego biosyntezie, ale również wprowadziła szereg zmian w tym procesie.

Synteza podjednostek eukariotycznej Rubisco jest rozdzielona przestrzennie. Podczas, gdy RbcL kodowana jest przez gen chloroplastowy rodzina genów *rbcS* lokalizuje się jądrowo [40]. Łańcuch polipeptydowy RbcS syntezowany jest wobec tego w formie rozfałdowanej w cytozolu, a następnie zostaje przeniesiony przez kompleks Tic/Toc do stromy chloroplastu [41]. Po przekroczeniu błony chloroplastu odcinana jest jego sekwencja sygnałowa, a dojrzałe białko jest prawdopodobnie wiązane przez eukariotyczny czynnik Raf2. Strukturą Raf2 przypomina dehydratazę karbinolaminypteryny, ale nie zawiera reszt kluczowych do katalizy reakcji przeprowadzanej przez ten enzym [42]. Nie do końca jest jednak jasna jego rola w procesie biosyntezy Rubisco. Mutant kukurydzy pozbawiony genu *raf2* wykazywał ograniczoną akumulację Rubisco [43]. Analogiczna mutacja w *Arabidopsis thaliana* prowadziła do zmniejszonej produkcji RbcS [44]. Ponieważ zademonstrowano oddziaływanie tego czynnika zarówno z dużą, jak i małą podjednostką Rubisco, możliwym jest, że uczestniczy on w procesie przyłączania RbcS do oktamerycznego rdzenia RbcL₈, który w przeciwieństwie do swojego odpowiednika u fotosyntezyujących prokariotów może nie zachodzić spontanicznie [45]. Rozdział przestrzenny syntezy RbcL i RbcS pociąga za sobą potrzebę synchronizacji tych procesów w celu zapewnienia stechiometrycznych ilości tych czynników podczas formowania holoenzymu. Zarówno w tytoniu, jak i *Chlamydomonas* pozbawionych genu *rbcS* obserwowano zaburzenia w produkcji dużej podjednostki [46,47]. Sam mechanizm, będący podstawą tego zjawiska, uzależniający translację RbcL od stanu składania Rubisco został niedawno opisany i zostanie omówiony w dalszej części tej sekcji.

Duża podjednostka Rubisco syntezowana w stromie chloroplastu podlega szeregom procesów analogicznych do tych zachodzących w cytozolu sinic. Sugeruje się, że uwolniony z rybosomu RbcL może oddziaływać z chloroplastowymi chaperonami HSP70B/CDJs/CGE1 [48], które są homologami odpowiednio DnaK, DnaJ i czynnika wymiany nukleotydów współpracującego z tym tandemem – GrpE. Ponieważ jednak nie ma bezpośrednich dowodów *in vivo* na takie oddziaływanie, możliwym jest również, że po translacji RbcL, polipeptyd ten może być bezpośrednio wyłapywany przez chloroplastową chaperoninę z pominięciem czynników pośrednich. Badania przeprowadzone na *Chlamydomonas* sugerują, że synteza enzymu może być regulowana na dość wczesnym etapie przez częściowo sfałdowany łańcuch RbcL. W przypadku zaburzenia dalszego procesu jego składania, tzn. dimeryzacji, jego N-końcowa domena strukturalnie przypominająca ferredoksynę wiąże własne mRNA hamując tym samym proces elongacji translacji [49,50].

Ogólny schemat procesu fałdowania RbcL wewnątrz chloroplastowej chaperoniny Cpn przypomina analogiczny mechanizm zachodzący z udziałem prokariotycznego białka GroEL. Sama budowa chaperoniny jest jednak znacznie bardziej skomplikowana. W celu zapewnienia optymalnego środowiska fałdowania szerokiej puli substratów o zróż-

nicowanej swoistości do apikalnego rejonu chaperoniny, zarówno jej duża (Cpn60) jak i małe podjednostki (Cpn10, Cpn20, Cpn23) występują w kilku formach [51]. Pokazano, że podjednostka Cpn60 α wykazuje najwyższe powinowactwo do RbcL [52], ale samodzielnie nie jest w stanie tworzyć heptamerycznych oligomerów w przeciwieństwie do podjednostki Cpn60 β [53]. Niedawno wykazano również, że funkcjonalną chloroplastową formą chaperoniny jest heterooligomer Cpn60 $\alpha\beta$ 1 β 2 oddziałujący z, również heterooligomerycznym, kompleksem Cpn10/Cpn20/Cpn23. Ogólna struktura i rozmiar tego kompleksu przypominają właściwościami GroEL/GroES, ale potencjalnie asymetryczne rozmieszczenie powierzchniowego potencjału elektrostatycznego zapewnia elastyczność adaptacyjną w stosunku do różnych substratów [54].

W 2017 roku opublikowano wyniki udanego eksperymentu produkcji roślinnej Rubisco w komórkach *E. coli*. Do skutecznego zajścia procesu, oprócz białek strukturalnych – RbcLi RbcS, wymagany był udział chloroplastowej chaperoniny oraz czterech chaperonów składania – RbcX, Raf1, Raf2 oraz Bsd2 (ang. *Bundle sheath defective* – czynnik wiązki przewodzącej). O ile Raf1, Raf2 i Bsd2 wydają się być niezbędne w tym procesie, RbcX jako jedyny był pomijalny, przynajmniej w warunkach *in vitro* [45]. W przeciwieństwie do sinic, gdzie gen *rbcX* obecny jest tylko w jednej kopii, zlokalizowanej zwykle w operonie między genami *rbcL* i *rbcS*, rośliny wyższe często zawierają dwie lub więcej wersji tego genu [55]. Mimo, że roślinne i sinicowe RbcX dzielą między sobą jedynie ok. 20% podobieństwa sekwencji aminokwasowej, wykazują bardzo zbliżoną strukturę III- i IV-rzędowa oraz powinowactwo do C-końcowego fragmentu RbcL [56,57]. Pomimo, że roślinne geny *rbcX* ulegają transkrypcji, która często zależna jest od zmiany czynników środowiskowych [55], nie ma bezpośredniego dowodu na uczestnictwo produktów ich translacji w procesie biosyntezy roślinnej Rubisco *in vivo*. Białka te nigdy nie zostały zidentyfikowane jako element roślinnego proteomu. Geny je kodujące nie zostały również wskazane jako niezbędne w procesie akumulacji Rubisco w bibliotece mutantów fotosyntetycznych kukurydzy [58].

Prokariotyczne i eukariotyczne białka Raf1 wydają się pełnić zbliżoną funkcję w procesie biosyntezy Rubisco. Pomimo dużych podobieństw strukturalnych do sinicowego odpowiednika, roślinny Raf1 nie posiada w obrębie swojego C-końca substruktury odpowiedzialnej za oddziaływanie z pętlą 60-tek RbcL [24]. Motyw ten został zastąpiony funkcjonalnie przez unikalne dla roślin białko Bsd2, które zostanie omówione w kolejnym akapicie. Ostatnie badania wskazują, że u *Chlamydomonas* Raf1 może uczestniczyć w mechanizmie kontroli jakości składania holoenzymu, jakkolwiek w innym celu niż jego sinicowy odpowiednik. Pod nieobecność RbcS kompleks RbcL₈/Raf1 oddziałuje bezpośrednio lub pośrednio z 5'-końcowym fragmentem mRNA *rbcL*, który nie ulega translacji. Interakcja ta zapobiega inicjacji translacji *rbcL*, umożliwiając synchronizację ilości RbcL i RbcS wchodzących w skład dojrzałych enzymów [59]. Podobnie jak *rbcX*, roślinny *raf1* może występować w kilku wersjach [60]. Przyczyna takiej redundancji jest jak dotąd nieznana.

Ostatnim z czynników niezbędnych do biosyntezy eukariotycznej Rubisco jest Bsd2. Białko to ma masę cząsteczkową 8–10 kDa i jest monomerem o wydłużonej strukturze zawierającym motyw palca cynkowego. Zostało ono zidentyfikowane w kukurydzy pod koniec lat 90-tych XX wieku jako czynnik odpowiedzialny za poprawną morfologię chloroplastów wiązki przewodzącej roślin C_4 [61]. Początkowe ustalenia sugerowały, że białko to oddziałuje na wczesnym etapie potranslacyjnym z częściowo rozfałdowanym łańcuchem RbcL [62], jednakże ostatnie badania wskazują na jego odmienną funkcję i mechanizm działania. Osiem kopii Bsd2 wiąże się do oktameru RbcL na ostatnim etapie biosyntezy Rubisco. Pojedyncza cząsteczka tego białka chaperonowego łączy dwa monomery RbcL w dimerze RbcL₂, oddziałując równocześnie z N-końcową domeną pierwszej cząsteczki dużej podjednostki Rubisco i C-końcową domeną cząsteczki przeciwległej, w sposób podobny do interakcji między RbcL a RbcX. Elementy strukturalne Bsd2 tworzą kontakty zarówno z pętlą 60-tek jak i pętlą 6 RbcL utrzymując centrum aktywne w formie otwartej i zapobiegając łączeniu się substratu do momentu zakończenia procesu biosyntezy [45]. Oprócz pełnienia funkcji w składaniu Rubisco Bsd2 wydaje się odpowiadać za utrzymanie holoenzymu w formie aktywnej [63]. Reaktywne formy tlenu będące efektem ubocznym jasnej fazy fotosyntezy prowadzą do szeregu zdarzeń rozpoczynających się od oksydacji Rubisco, a kończących na proteolitycznej degradacji tego enzymu. W obecności niskocząsteczkowego reduktora, tj. glutation lub NADPH, Bsd2 wykazuje zdolność do redukcji swoich mostków disiarczkowych. Zakumulowany w ten sposób potencjał redukcyjny może być użyty do odwrócenia skutków oksydacji Rubisco, prowadząc do reaktywacji jej zdolności katalitycznych. O ile rola Bsd2 u roślin C_3 wydaje się być ograniczona do syntezy Rubisco [64], u roślin C_4 białko to wydaje się pełnić dodatkową funkcję w regulacji funkcji chloroplastu. W linii kukurydzy pozbawionej genu *bsd2* chloroplasty mezofilu, które w przeciwieństwie do analogicznych organelli w wiązce przewodzącej nie kumulują Rubisco, wykazywały niższą zdolność do podziału i zaburzoną morfologię błon tylakoidowych [65].

Wśród eukariotycznych organizmów fotosyntezujących algi i należące do mszaków glewki posiadają w chloroplastach wyspecjalizowaną strukturę – pyrenoid. Dotychczasowa wiedza o tym kompartmentcie komórkowym oparta jest wyłącznie na badaniach przeprowadzonych z użyciem *Chlamydomonas* i wymaga poszerzenia na inne organizmy, które pomimo posiadania tej struktury nie mają homologów białek odpowiedzialnych za jej formowanie i funkcjonowanie u tej algi [6]. Podobnie jak sinicowe karboksosomy, pyrenoid nie stanowi osobnego organellum, a jedynie wydzieloną przestrzeń w obrębie stromy. Jego funkcja jest również zbliżona do sinicowych kompartmentów, jako że służy on lokalnemu zagęszczaniu dwutlenku węgla w pobliżu Rubisco. Pyrenoid otoczony jest luźną powłoką zbudowaną z warstw skrobii i poprzątkany jest tubulami będącymi odnogami błon tylakoidowych. Podejrzewa się, że tubule odpowiadają za transport metabolitów, takich jak np. RuBP czy kwas 3-fosfoglicerynowy [66], a także stanowią środowisko reakcji dla anhidrazy węglanowej CAH3 [67]. W efekcie dehydratacji HCO₃⁻ przeprowadzanej przez ten en-

zym w lumen tylakoidu powstały CO₂ dyfunduje przez błonę do wnętrza fazy wodnej pyrenoidu. Otoczka zbudowana ze skrobii nie wydaje się być niezbędna do utrzymania morfologii kompartmentu, ale stanowi barierę zapobiegającą ucieczce dwutlenku węgla i biorącą udział w jego zagęszczaniu [68]. Wnętrze pyrenoidu wypełnione jest głównie przez Rubisco oraz czynnik EPYC1. Białko to, podobnie jak sinicowe CsoS2, nie posiada struktury III-rzędowej, a jedynie pięciokrotnie powtórzony motyw strukturalny [69,70]. Motyw ten oddziałuje z helisami zlokalizowanymi w RbcS przez szereg kontaktów o naturze elektrostatycznej i hydrofobowej. Oddziaływanie z kolejnymi cząsteczkami Rubisco umożliwia ich sieciowanie i oddzielenie tak powstałego superkompleksu od stromy chloroplastu na zasadzie separacji faz ciekłych. Co ciekawe motyw wiążący Rubisco występujący w EPYC1 jest również obecny w transbłonowym białku RBMP1/2 występującym w pyrenoidowych tubulach, jak i SAGA1/2 zlokalizowanym w powłokach zbudowanych ze skrobii [71]. Umożliwia on więc nie tylko sieciowanie holoenzymu, ale też zakotwiczenie go do strukturalnych elementów kompartmentu.

WNIOSKI I PRZYSZŁE PERSPEKTYWY

Od momentu rozwoju technik biologii molekularnej i inżynierii genetycznej w latach 90-tych XX wieku, oczywistym kierunkiem badań nad Rubisco wydaje się poprawienie jego parametrów kinetycznych tj. szybkość katalizacji reakcji karboksylacji i swoistość substratowa. Popularnym trendem eksperymentów stały się próby uzyskania zwiększonej wydajności generacji biomasy przez rośliny użyteczne w rolnictwie. Usiłowano do tego dojść przez mutacje kluczowych reszt aminokwasowych bazujące na enzymach pochodzących z odległych kładów takich jak sinice czy czerwone algi, wykazujących poprawione parametry w stosunku do enzymów z roślin wyższych, jak i przenoszenie całych genów, kodujących takie enzymy do genomu potencjalnie użytecznego gospodarza [72–74]. Badania te zakończyły się fiaskiem. Enzymy izolowane ze swojego naturalnego kontekstu nie fałdowały i nie składały się poprawnie w aktywny katalizator. Ponadto, metoda szybkiego testowania mutantów roślinnej Rubisco do niedawna była niedostępna ze względu na nieznaną rolę czynników wymaganych do zajścia jego biosyntezy w heterologicznym systemie ekspresyjnym. W związku z tym każdorazowy eksperyment testujący użyteczność nowego wariantu genetycznego Rubisco wiązał się z czasochłonną koniecznością generacji zmutowanych linii roślinnych. Stosunkowo niedawno opracowana została metoda testowania losowo generowanych mutantów sinicowej Rubisco pod kątem poprawionych właściwości kinetycznych. Wykazała ona równocześnie, że zakres podatności enzymu na zmiany ewolucyjnie jest limitowany przez kompatybilność chaperonów składania [75]. W związku z powyższym, pewien zestaw mutacji, wliczając również te, które mogłyby podnieść sprawność katalityczną holoenzymu, będzie zapobiegał jego poprawnemu formowaniu w naturalnym kontekście fizjologicznym. Mimo, że w warunkach *in vitro* czynniki pochodzące z różnych organizmów są w stanie kompensować się funkcjonalnie, podobna zależność nie musi zachodzić w warunkach fizjologicznych. Przykładowo wykazano, że Raf1 z tytoniu nie jest w stanie kompensować syntezy Rubisco z *Arabidopsis* i *vice versa*, ale

już transformacja tytoniu zestawem genów *rbcL*, *rbcS* i *raf1* z *Arabidopsis* jest wystarczająca do wydajnej produkcji Rubisco rzodkiewnika w tym organizmie [76]. Większość chaperonów składania Rubisco wydaje się pełnić dodatkowe funkcje. Zarówno sinicowy RbcX, jak i Raf1, pośredniczą w biosyntezie karboksosomów [28,77], jakkolwiek rola pierwszego z czynników w tym procesie nie została jak dotąd wyjaśniona. U *Chlamydomonas* Raf1 odpowiada za regulację stechiometrii podjednostek holoenzymu [59], a Bsd2 u roślin C_4 wydaje się pośredniczyć w poprawnym dojrzewaniu chloroplastów mezofilu [65]. Zrozumienie mechanizmów działania białek uczestniczących w szeroko pojmowanym procesie biosyntezy Rubisco przyczyniło się do znacznego postępu w pracach nad procesami usprawnienia produkcji roślinnej biomasy. Nadekspresja niektórych czynników w roślinach transgenicznym skutkowałą zwiększeniem wydajności fotosyntezy [63,78], a opracowanie metody ekspresji eukariotycznego Rubisco w *E. coli* umożliwiło wstępną selekcję mutantów tytoniowego Rubisco o poprawionych parametrach kinetycznych [79]. W ostatnich latach podjęto też pierwsze udane próby implementacji struktur służących do koncentracji dwutlenku węgla – karboksosomów [80] i pyrenoidu [81] – do chloroplastów roślin wyższych. Dalsze badania są jednak niezbędne w celu optymalizacji działania tych potencjalnie korzystnych mechanizmów w obcym dla nich kontekście komórkowym.

PIŚMIENNICTWO

- Flügge U-I, Westhoff P, Leister D (2016) Recent advances in understanding photosynthesis. *F1000Res* 5: (F1000 Faculty Rev): 2890
- Andersson I (2008) Catalysis and regulation in Rubisco. *J Exp Bot* 59: 1555–1568
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie AR (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends Plant Sci* 15: 330–336
- Sánchez-Baracaldo P, Bianchini G, Wilson JD, Knoll AH (2021) Cyanobacteria and biogeochemical cycles through Earth history. *Trends Microbiol* S0966-842X(21): 00131-1
- Badger MR, Hanson D, Price GD (2002) Evolution and diversity of CO₂ concentrating mechanisms in cyanobacteria. *F Plant Biol* 29: 161–173
- Barrett J, Girr P, Mackinder LC (2021) Pyrenoids: CO₂-fixing phase separated liquid organelles. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1868(5): 118949
- Dersch LM, Beckers V, Wittmann C (2016) Green pathways: metabolic network analysis of plant systems. *Met Eng* 34: 1–24
- Bhat JY, Thieulin-Pardo G, Hartl FU, Hayer-Hartl M (2017) Rubisco activases: AAA+ chaperones adapted to enzyme repair. *Front Mol Biosci* 4: 20
- Mueller-Cajar O (2017) The diverse AAA+ machines that repair inhibited Rubisco active sites. *Fron Mol Biosci* 4: 31
- Alonso H, Blayney MJ, Beck JL, Whitney SM (2009) Substrate-induced assembly of Methanococcus burtonii-ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase dimers into decamers. *J Biol Chem* 284: 33876–33882
- Tabita FR, Satagopan S, Hanson TE, Kreeel NE, Scott SS (2008) Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. *J Exp Bot* 59: 1515–1524
- Burisch C, Wildner G, Schlitter J (2007) Bioinformatic tools uncover the C-terminal strand of Rubisco's large subunit as hot-spot for specificity-enhancing mutations. *FEBS Lett* 581: 741–748
- Spreitzer RJ (2003) Role of the small subunit in ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Arch Biochem Biophys* 414: 141–149
- Gutteridge S (1991) The relative catalytic specificities of the large subunit core of *Synechococcus* ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase. *J Biol Chem* 266: 7359–7362
- Dobson CM, Karplus M (1999) The fundamentals of protein folding: bringing together theory and experiment. *Curr Opin Struct Biol* 9: 92–101
- Checa SK, Viale AM (1997) The 70-kDa Heat-shock protein/DnaK chaperone system is required for the productive folding of ribulose-bisphosphate carboxylase subunits in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 248: 848–855
- Goloubinoff P, Christeller JT, Gatenby AA, Lorimer GH (1989) Reconstitution of active dimeric ribulose bisphosphate carboxylase from an unfolded state depends on two chaperonin proteins and Mg-ATP. *Nature* 342: 884–889
- Saibil HR, Fenton WA, Clare DK, Horwich AL (2013) Structure and allostery of the chaperonin GroEL. *J Mol Biol* 425: 1476–1487
- Kerner MJ, Naylor DJ, Ishihama Y, Maier T, Chang H-C, Stines AP, Georgopoulos C, Frishman D, Hayer-Hartl M, Mann M, et al. (2005) Proteome-wide analysis of chaperonin-dependent protein folding in *Escherichia coli*. *Cell* 122: 209–220
- Gupta AJ, Halder S, Milićević G, Hartl FU, Hayer-Hartl M (2014) Active cage mechanism of chaperonin-assisted protein folding demonstrated at single-molecule level. *J Mol Biol* 426: 2739–2754
- Bracher A, Starling-Windhof A, Hartl FU, Hayer-Hartl M (2011) Crystal structure of a chaperone-bound assembly intermediate of form I Rubisco. *Nat Struct Mol Biol* 18: 875–880
- Saschenbrecker S, Bracher A, Rao KV, Rao BV, Hartl FU, Hayer-Hartl M (2007) Structure and function of RbcX, an assembly chaperone for hexadecameric Rubisco. *Cell* 129: 1189–1200
- Liu C, Young AL, Starling-Windhof A, Bracher A, Saschenbrecker S, Rao BV, Rao KV, Berninghausen O, Mielke T, Hartl FU, et al. (2010) Coupled chaperone action in folding and assembly of hexadecameric Rubisco. *Nature* 463: 197–202
- Xia L-Y, Jiang Y-L, Kong W-W, Sun H, Li W-F, Chen Y, Zhou C-Z (2020) Molecular basis for the assembly of RuBisCO assisted by the chaperone Raf1. *Nature Plants* 6: 708–717
- Hauser T, Bhat JY, Milićević G, Wendler P, Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2015) Structure and mechanism of the Rubisco-assembly chaperone Raf1. *Nat Struct Mol Biol* 22: 720–728
- Emlyn-Jones D, Woodger FJ, Price GD, Whitney SM (2006) RbcX can function as a Rubisco chaperonin, but is non-essential in *Synechococcus* PCC7942. *Plant Cell Physiol* 47: 1630–1640
- Goloubinoff P, Gatenby AA, Lorimer GH (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose bisphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature* 337: 44–47
- Huang F, Kong W-W, Sun Y, Chen T, Dykes GF, Jiang Y-L, Liu L-N (2020) Rubisco accumulation factor 1 (Raf1) plays essential roles in mediating Rubisco assembly and carboxysome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 117: 17418–17428
- Kolesinski P, Rydzy M, Szczepaniak A (2017) Is RAF1 protein from *Synechocystis* sp. PCC 6803 really needed in the cyanobacterial Rubisco assembly process? *Photosynth Res* 132: 135–148
- Gutknecht J, Bisson M, Tosteson F (1977) Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes. Effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers. *J Gen Physiol* 69: 779
- Rae BD, Long BM, Badger MR, Price GD (2013) Functions, compositions, and evolution of the two types of carboxysomes: polyhedral microcompartments that facilitate CO₂ fixation in cyanobacteria and some proteobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 77: 357–379
- Cai F, Heinhorst S, Shively JM, Cannon GC (2008) Transcript analysis of the *Halothiobacillus neapolitanus* *cso* operon. *Arch Microbiol* 189: 141–150
- Price G, Howitt S, Harrison K, Badger M (1993) Analysis of a genomic DNA region from the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC7942 involved in carboxysome assembly and function. *J Bacteriol* 175: 2871–2879

34. Iancu CV, Morris DM, Dou Z, Heinhorst S, Cannon GC, Jensen GJ (2010) Organization, structure, and assembly of α -carboxysomes determined by electron cryotomography of intact cells. *J Mol Biol* 396: 105–117
35. Oltrogge LM, Chaijarasphong T, Chen AW, Bolin ER, Marqusee S, Savage DF (2020) Multivalent interactions between CsoS2 and Rubisco mediate α -carboxysome formation. *Nat Struct Mol Biol* 27: 281–287
36. Cameron JC, Wilson SC, Bernstein SL, Kerfeld CA (2013) Biogenesis of a bacterial organelle: the carboxysome assembly pathway. *Cell* 155: 1131–1140
37. Ryan P, Forrester TJ, Wroblewski C, Kenney TM, Kitova EN, Klassen JS, Kimber MS (2019) The small RbcS-like domains of the β -carboxysome structural protein CcmM bind RubisCO at a site distinct from that binding the RbcS subunit. *J Biol Chem* 294: 2593–5195
38. Wang H, Yan X, Aigner H, Bracher A, Nguyen ND, Hee WY, Long B, Price GD, Hartl F, Hayer-Hartl M (2019) Rubisco condensate formation by CcmM in β -carboxysome biogenesis. *Nature* 566: 131–135
39. Whitney SM, Houtz RL, Alonso H (2011) Advancing our understanding and capacity to engineer nature's CO₂-sequestering enzyme, Rubisco. *Plant Physiol* 155: 27–35
40. Börner T (2017) The discovery of plastid-to-nucleus retrograde signaling—a personal perspective. *Protoplasma* 254: 1845–1855
41. Jarvis P (2008) Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol* 179: 257–285.
42. Wheatley NM, Sundberg CD, Gidaniyan SD, Cascio D, Yeates TO (2014) Structure and identification of a pterin dehydratase-like protein as a ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO) assembly factor in the α -carboxysome. *J Biol Chem* 289: 7973–7981
43. Feiz L, Williams-Carrier R, Belcher S, Montano M, Barkan A, Stern DB (2014) A protein with an inactive pterin-4 α -carbinolamine dehydratase domain is required for Rubisco biogenesis in plants. *Plant J* 80: 862–869
44. Fristedt R, Hu C, Wheatley N, Roy LM, Wachter RM, Savage L, Harbinson J, Kramer DM, Merchant SS, Yeates T, et al. (2018) RAF 2 is a RuBis CO assembly factor in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 94: 146–156
45. Aigner H, Wilson R, Bracher A, Calisse L, Bhat J, Hartl F, Hayer-Hartl M (2017) Plant RuBisCO assembly in *E. coli* with five chloroplast chaperones including BSD2. *Science* 358: 1272–1278
46. Khrebtkova I, Spreitzer RJ (1996) Elimination of the *Chlamydomonas* gene family that encodes the small subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *Proc Natl Acad Sci* 93: 13689–13693
47. Rodermel S, Haley J, Jiang C-Z, Tsai C-H, Bogorad L (1996) A mechanism for intergenomic integration: abundance of ribulose bisphosphate carboxylase small-subunit protein influences the translation of the large-subunit mRNA. *Proc Natl Acad Sci* 93: 3881–3885
48. Willmund F, Dorn KV, Schulz-Raffelt M, Schroda M (2008) The chloroplast DnaJ homolog CDJ1 of *Chlamydomonas reinhardtii* is part of a multichaperone complex containing HSP70B, CGE1, and HSP90C. *Plant Physiol* 148: 2070–2082
49. Cohen I, Knopf JA, Irihimovitch V, Shapira M (2005) A proposed mechanism for the inhibitory effects of oxidative stress on Rubisco assembly and its subunit expression. *Plant Physiol* 137: 738–746
50. Yosef I, Irihimovitch V, Knopf JA, Cohen I, Orr-Dahan I, Nahum E, Keasar C, Shapira M (2004) RNA binding activity of the ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 279: 10148–10156
51. Gruber AV, Nisemblat S, Azem A, Weiss C (2013) The complexity of chloroplast chaperonins. *Trends Plant Sci* 18: 688–694
52. Zhang S, Zhou H, Yu F, Gao F, He J, Liu C (2016) Functional partition of Cpn60 α and Cpn60 β subunits in substrate recognition and cooperation with co-chaperonins. *Mol Plant* 9: 1210–1213.
53. Bai C, Guo P, Zhao Q, Lv Z, Zhang S, Gao F, Gao L, Wang Y, Tian Z, Wang J, et al. (2015) Protomer roles in chloroplast chaperonin assembly and function. *Mol Plant* 8: 1478–1492
54. Zhao Q, Zhang X, Sommer F, Ta N, Wang N, Schroda M, Cong Y, Liu C (2019) Hetero-oligomeric CPN60 resembles highly symmetric group-I chaperonin structure revealed by Cryo-EM. *Plant J* 98: 798–812
55. Kolesinski P, Piechota J, Szczepaniak A (2011) Initial characteristics of RbcX proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 77: 447–459
56. Kolesinski P, Golik P, Grudnik P, Piechota J, Markiewicz M, Tarnawski M, Dubin G, Szczepaniak A (2013) Insights into eukaryotic Rubisco assembly—crystal structures of RbcX chaperones from *Arabidopsis thaliana*. *Biochim Biophys Acta* 1830: 2899–2906
57. Bracher A, Hauser T, Liu C, Hartl FU, Hayer-Hartl M (2015) Structural analysis of the Rubisco-assembly chaperone RbcX-II from *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* 10: e0135448
58. Belcher S, Williams-Carrier R, Stiffler N, Barkan A (2015) Large-scale genetic analysis of chloroplast biogenesis in maize. *Biochim Biophys Acta* 1847: 1004–1016
59. Wietrzynski W, Traverso E, Wollman F-A, Wostrickoff K (2021) The state of oligomerization of Rubisco controls the rate of synthesis of the Rubisco large subunit in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* Vol 33, Iss 5, 1706–1727
60. Feiz L, Williams-Carrier R, Wostrickoff K, Belcher S, Barkan A, Stern DB (2012) Ribulose-1, 5-bis-phosphate carboxylase/oxygenase accumulation factor1 is required for holoenzyme assembly in maize. *Plant Cell* 24: 3435–3446
61. Roth R, Hall LN, Brutnell TP, Langdale JA (1996) bundle sheath defective2, a mutation that disrupts the coordinated development of bundle sheath and mesophyll cells in the maize leaf. *Plant Cell* 8: 915–927
62. Doron L, Segal N, Gibori H, Shapira M (2014) The BSD 2 ortholog in *Chlamydomonas reinhardtii* is a polysome-associated chaperone that co-migrates on sucrose gradients with the rbcL transcript encoding the Rubisco large subunit. *Plant J* 80: 345–355
63. Busch FA, Tominaga J, Muroya M, Shirakami N, Takahashi S, Yamori W, Kitaoka T, Milward SE, Nishimura K, Matsunami E, et al. (2020) Overexpression of BUNDLE SHEATH DEFECTIVE 2 improves the efficiency of photosynthesis and growth in *Arabidopsis*. *Plant J* 102: 129–137
64. Conlan B, Birch R, Kelso C, Holland S, De Souza AP, Long SP, Beck JL, Whitney SM (2019) BSD2 is a Rubisco-specific assembly chaperone, forms intermediary hetero-oligomeric complexes, and is nonlimiting to growth in tobacco. *Plant Cell Environ* 42: 1287–1301
65. Li H, Bai M, Jiang X, Shen R, Wang H, Wang H, Wu H (2020) Cytological evidence of BSD2 functioning in both chloroplast division and dimorphic chloroplast formation in maize leaves. *BMC Plant Biol* 20: 1–8
66. Kücken A, Sommer F, Yaneva-Roder L, Mackinder LC, Höhne M, Geimer S, Jonikas MC, Schroda M, Stitt M, Nikoloski Z, et al. (2018) Effects of microcompartmentation on flux distribution and metabolic pools in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Elife* 7: e37960
67. Sinetova MA, Kupriyanova EV, Markelova AG, Allakhverdiev SI, Pronina NA (2012) Identification and functional role of the carbonic anhydrase Cah3 in thylakoid membranes of pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1817: 1248–1255
68. Toyokawa C, Yamano T, Fukuzawa H (2020) Pyrenoid starch sheath is required for LCIB localization and the CO₂-concentrating mechanism in green algae. *Plant Physiol* 182: 1883–1893
69. He S, Chou H-T, Matthies D, Wunder T, Meyer MT, Atkinson N, Martinez-Sanchez A, Jeffrey PD, Port SA, Patena W, et al. (2020) The structural basis of Rubisco phase separation in the pyrenoid. *Nature Plants* 6: 1480–1490
70. Mackinder LC, Meyer MT, Mettler-Altmann T, Chen VK, Mitchell MC, Caspari O, Rosenzweig ESF, Pallesen L, Reeves G, Itakura A, et al. (2016) A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proc Natl Acad Sci* 113: 5958–5963
71. Meyer MT, Itakura AK, Patena W, Wang L, He S, Emrich-Mills T, Lau CS, Yates G, Mackinder LC, Jonikas MC (2020) Assembly of the algal CO₂-fixing organelle, the pyrenoid, is guided by a Rubisco-binding motif. *Sci Adv* 6: eabd2408
72. Whitney SM, von Caemmerer S, Hudson GS, Andrews TJ (1999) Directed mutation of the Rubisco large subunit of tobacco influences photorespiration and growth. *Plant Physiol* 121: 579–588
73. Satagopan S, Spreitzer RJ (2004) Substitutions at the Asp-473 latch residue of *Chlamydomonas* ribulosebisphosphate carboxylase/oxygenase

- cause decreases in carboxylation efficiency and CO₂/O₂ specificity. *J Biol Chem* 279: 14240–14244
74. Whitney SM, Baldet P, Hudson GS, Andrews TJ (2001) Form I Rubiscos from non-green algae are expressed abundantly but not assembled in tobacco chloroplasts. *Plant J* 26: 535–547
75. Durão P, Aigner H, Nagy P, Mueller-Cajar O, Hartl FU, Hayer-Hartl M (2015) Opposing effects of folding and assembly chaperones on evolvability of Rubisco. *Nat Chem Biol* 11: 148–155
76. Whitney SM, Birch R, Kelso C, Beck JL, Kapralov MV (2015) Improving recombinant Rubisco biogenesis, plant photosynthesis and growth by coexpressing its ancillary RAF1 chaperone. *Proc Natl Acad Sci* 112: 3564–3569
77. Huang F, Vasieva O, Sun Y, Faulkner M, Dykes GF, Zhao Z, Liu L-N (2019) Roles of RbcX in carboxysome biosynthesis in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Plant Physiol* 179: 184–194
78. Salesse-Smith CE, Sharwood RE, Busch FA, Kromdijk J, Bardal V, Stern DB (2018) Overexpression of Rubisco subunits with RAF1 increases Rubisco content in maize. *Nature Plants* 4: 802–810
79. Lin MT, Stone WD, Chaudhari V, Hanson MR (2020) Small subunits can determine enzyme kinetics of tobacco Rubisco expressed in *Escherichia coli*. *Nature Plants* 6: 1289–1299
80. Lin MT, Occhialini A, Andralojc PJ, Parry MA, Hanson MR (2014) A faster Rubisco with potential to increase photosynthesis in crops. *Nature* 513: 547–550
81. Atkinson N, Mao Y, Chan KX, McCormick AJ (2020) Condensation of Rubisco into a proto-pyrenoid in higher plant chloroplasts. *Nat Commun* 11: 1–9

Chaperone proteins involved in Rubisco biosynthesis

Małgorzata Rydzy^{#✉}, Michał Tracz[#], Piotr Kolesiński, Andrzej Szczepaniak

Faculty of Biotechnology, University of Wrocław

[#]The authors contributed equally to the preparation of the manuscript and share the first authorship.

✉Corresponding author: malgorzata.rydzy@uwr.edu.pl

Key words: Rubisco, photosynthesis, chaperone proteins

SUMMARY

Rubisco is an enzyme found in photosynthetic organisms, which catalyse the first step of biomass accumulation: the carbon dioxide incorporation to ribulose-1,5-bisphosphate. Because of Rubisco's complicated, multimeric structure and a presence of many labile structural elements the enzyme cannot assemble to its native quaternary structure by itself. This is why the folding and assembly process of Rubisco requires the strictly organized operation of a number of auxiliary factors. Chaperone proteins take part in folding of holoenzyme subunits, subsequently they mediate in subunit oligomerisation, and in some cases chaperone proteins direct subunits to their cellular destination such as the carboxysomes or the pyrenoid. In addition to their canonical function of mediating Rubisco assembly, these chaperones are involved in additional processes such as quality control of the biosynthetic process, and regulation of organelle physiology and cellular compartments.

