

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»

На правах рукописи

Чекунова Елена Михайловна

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ РАННИХ ЭТАПОВ БИОСИНТЕЗА
ХЛОРОФИЛЛА У ЗЕЛеной ВОДОРОСЛИ
CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

Специальность: 03.02.07 – генетика

Диссертация на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант
академик РАН, д.б.н.,
профессор, С.Г. Инге-Вечтомов

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	7
Основная часть.....	18
1. Обзор литературы. Генетика метаболизма хлорофиллов.....	18
1.1. Природные тетрапирролы и их производные.....	19
1.2. Хлорофиллы.....	20
1.2.1. Исторический очерк.....	21
1.2.2. Формы хлорофиллов.....	23
1.3. Генетика биосинтеза хлорофиллов. Достижения и проблемы.....	27
1.3.1. Ферменты биосинтеза хлорофилла. Генетические исследования.....	32
1.3.1.1. Синтез АЛК.....	32
1.3.1.2. Синтез протопорфирина IX из АЛК.....	36
1.3.1.3. Магниева ветвь биосинтеза тетрапирролов. Ранние этапы образования хлорофиллов.....	41
1.3.1.4. Заключительные стадии биосинтеза хлорофиллов.....	47
1.4. Превращения протохлорофиллида: темновой и светозависимый пути...	51
1.4.1. Протохлорофиллид в цепи биосинтеза хлорофиллов.....	52
1.4.2. Биосинтез хлорофиллов в темноте. Генетические исследования.....	54
1.4.3. Светозависимый биосинтез хлорофиллида.....	64
1.4.4. Эффективность биосинтеза хлорофиллов в темноте и на свету.....	70
1.4.5. Проблемы и перспективы изучения темнового биосинтеза ХЛ.....	71
1.5. Катаболизм хлорофиллов.....	74
1.5.1. Образование окрашенных катаболитов хлорофиллов.....	76
1.5.2. Образование неокрашенных катаболитов.....	77
1.6. Эволюционные аспекты метаболизма хлорофиллов.....	79
1.7. Генетические аспекты световой и метаболической регуляции биосинтеза хлорофиллов.....	84
1.7.1. Регуляторные механизмы биосинтеза хлорофилла.....	85

1.7.2. Свет - регулятор экспрессии генов, кодирующих белки фотосинтеза.....	87
1.7.3. Регуляция светом. Посттрансляционный уровень.....	95
1.7.4. Белки ELIP регулируют уровень синтеза хлорофиллов.....	96
1.7.5. Координация экспрессии генов ядра и хлоропласта в процессе биосинтеза хлорофиллов.....	97
1.7.6. Этапы биосинтеза, существенные для механизмов регуляции.....	106
1.7.7. Механизмы обратного ингибирования синтеза хлорофилла.....	111
1.7.8. Заключение.....	114
2. Материалы и методы.....	118
2.1. Генетический материал.....	118
2.2. Условия культивирования штаммов хламидомонады.....	118
2.3. Тестирование признака – парализованные жгутики.....	118
2.4. Гибридологический анализ мейотического потомства.....	120
2.5. Определение типа спаривания.....	122
2.6. Определение размеров клеток.....	122
2.7. Мутагены и методы мутагенеза.....	122
2.8. Метод спектрофотометрии.....	123
2.9. Определение качественного и количественного состава порфиринов...	124
2.10. Определение АЛК-синтетазной активности.....	125
2.11. Определение содержания протогема в клетках <i>C. reinhardtii</i>	126
2.12. Определение активности магний-хелатазы.....	127
2.13. Выделение и анализ нуклеиновых кислот из <i>C. reinhardtii</i>	128
2.14. Вестерн-блот анализ.....	129
2.15. Трансформация клеток методом «стеклянных шариков».....	130
2.16. Время генерации культур.....	131
2.17. Получение автолизина.....	131
2.18. Статистическая обработка данных.....	131
2.19. Компьютерные программы и базы данных.....	132

3. Экспериментальные исследования.....	133
3.1. Генетико-биохимические исследования хлорофильных мутантов хламидомонады, накапливающих порфирины	133
3.1.1. Первичная характеристика мутантов.....	134
3.1.1.1. Мутанты хламидомонады, использованные в работе.....	134
3.1.1.2. Спектрофотометрия мутантов.....	135
3.1.2. Гибридологический анализ хлорофильных оранжевых мутантов....	137
3.1.2.1. Оптимизация условий проведения скрещиваний.....	137
3.1.2.2. Анализ комплементации мутаций у ХОМ <i>C. reinhardtii</i>	140
3.1.2.3. Изучение рекомбинации мутантных аллелей в группе ХОМ...	145
3.1.2.4. Тетрадный анализ мутантов по генам <i>CHL1</i> и <i>LTS3</i> <i>C.</i> <i>reinhardtii</i>	147
3.1.2.5. Использование анеуплоидии для картирования мутаций.....	149
3.1.3. Биохимические исследования ХОМ <i>C. reinhardtii</i>	155
3.1.3.1. Анализ пигментного состава клеток ХОМ <i>C. reinhardtii</i>	156
3.1.3.2. Активности ферментов биосинтеза хлорофилла у ХОМ <i>C.</i> <i>reinhardtii</i>	160
3.1.3.3. Белковые компоненты фермента магний-хелатазы у мутантов <i>C. reinhardtii</i> по генам <i>CHL1</i> и <i>LTS3</i>	161
3.1.4. Обсуждение результатов.....	162
3.1.5. Выводы.....	173
3.2. Идентификация гена <i>CHLH</i> <i>C. reinhardtii</i> , кодирующего большую субъединицу магний-хелатазы	175
3.2.1. Клонирование гена <i>CHLH</i> . Выбор стратегии и результаты.....	177
3.2.2. Идентификация мутантных аллелей: <i>chl1</i> и <i>brs-1</i> гена <i>CHLH</i>	182
3.2.3. Вестерн-блот анализ белков магний хелатазы <i>C. reinhardtii</i>	185
3.2.4. Геномная комплементация мутантного фенотипа.....	186
3.2.5. Экспрессия гена <i>CHLH</i> хламидомонады. Регуляция светом.....	186
3.2.6. Структурно-функциональные характеристики гена <i>CHLH</i>	188
3.2.6.1. Компьютерный анализ гена <i>CHLH</i>	188
3.2.6.2. Сравнительный анализ белка <i>CHLH</i> <i>C. reinhardtii</i>	189

3.2.7. Обсуждение результатов.....	193
3.2.8. Выводы.....	198
3.3. Идентификация гена <i>LTS3</i> зеленой водоросли <i>C.reinhardtii</i>	199
3.3.1. Введение.....	199
3.3.2. Пигментный состав клеток хламидомонады, мутантных по гену <i>LTS3</i>	201
3.3.3. Активность ферментов биосинтеза хлорофилла.....	203
3.3.4. Зеленение мутантов: <i>y-7</i> , <i>brc-1</i> и <i>lts3</i>	204
3.3.5. Экспрессия генов ферментов биосинтез хлорофиллов.....	205
3.3.6. Картирование гена <i>LTS3</i>	207
3.3.7. Позиционное клонирование гена <i>LTS3</i>	208
3.3.8. Структура гена <i>LTS3</i> и кодируемого им белка.....	212
3.3.9. Мутантные аллели гена <i>LTS3</i>	215
3.3.10. Экспрессия гена <i>LTS3</i>	216
3.3.11. Филогения гена <i>LTS3</i>	218
3.3.12. Поиски GATA-мотивов в промоторных областях генов <i>C. reinhardtii</i> , кодирующих ферменты биосинтеза хлорофиллов.....	220
3.3.13. Обсуждение результатов.....	222
3.3.14. Выводы.....	232
3.4. Супрессия мутаций в гене <i>LTS3</i> <i>C. reinhardtii</i>	235
3.4. 1. Получение ревертанта <i>Brc-8</i> и характеристика его фенотипа.....	236
3.4.2. Гибридологический анализ ревертанта <i>Brc-8</i>	238
3.4.3. Тетрадный анализ мутации <i>sup3</i>	239
3.4.4. Анализ доминантности/рецессивности супрессорного эффекта мутации <i>sup3</i>	241
3.4.5. Получение инсерционного мутанта <i>T8-3</i>	243
3.4.6.Фенотип инсерционного мутанта <i>T8-3</i>	244
3.4.7. Гибридологический анализ штамма <i>T8-3</i>	245
3.4.8. Поиски гена <i>SUP-1</i> , в геноме трансформанта <i>T8-3</i>	248
3.4.9. Экспрессия гена <i>LTS3</i> в клетках инсерционного мутанта <i>T8-3</i>	252

3.4.10. Активность магний-хелатазы в клетках штаммов Вгс-8 и Т8-3.....	253
3.4.11. Обсуждение результатов.....	254
3.4.14. Выводы.....	259
3.5. Изучение генетической регуляции биосинтеза хлорофиллов на модели мутантов <i>C. reinhardtii</i> по гену <i>CHLH</i>	260
3.5.1. Получение и описание коричневых мутантов хламидомонады.....	261
3.5.2. Гибридологический анализ коричневых мутантов хламидомонады.....	262
3.5.3. Влияние мутации <i>mod-u-25</i> на синтез АЛК.....	264
3.5.4. Фенотипический эффект мутации <i>mod-u-25</i>	267
3.5.5. Влияние <i>mod-u-25</i> на экспрессию генов <i>HSP70A</i> и <i>CabII</i>	269
3.5.6. Обсуждение результатов.....	272
3.5.7. Выводы.....	277
Заключение.....	279
Основные выводы.....	292
ЛИТЕРАТУРА.....	293
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	336

ВВЕДЕНИЕ

*Porphyryns red as a summer's rose
With feathered caps and silken hose...
But ALA is the risen sun
That tells of a new-born day of begun...
Cloud Remington, 1967*

Актуальность темы и объект исследования. Хлорофиллы (ХЛ) – уникальные природные тетрапирролы, играющие ключевую роль не только в жизни фотосинтезирующих организмов, но и всей биосферы. Их биосинтез связан с морфогенезом растительной клетки и реакциями фотосинтеза – запасанием и передачей энергии света. Важнейшая фундаментальная проблема современной биологической науки состоит в изучении природы процессов биосинтеза ХЛ, механизмов его генетической и биохимической регуляции и закономерностей изменений, которые они претерпели в ходе эволюции и при адаптации к различным источникам и формам освещения. Темой настоящего исследования стали молекулярно-генетические механизмы, обеспечивающие регуляцию процессов хлорофиллообразования. Основное внимание уделено практически не исследованной области - генетике темновых процессов ранних этапов биосинтеза хлорофилла.

Объект изучения - зеленая одноклеточная эукариотическая водоросль хламидомонада *Chlamydomonas (C) reinhardtii* (рисунок 1). Этот микроорганизм, интенсивно используемый в экспериментальных исследованиях генетического контроля процессов фотосинтеза, является модельным биологическим объектом, совмещающим в себе особенности генетических систем про- и эукариот [Rochaix, 1995; Harris, 1989]. *C. reinhardtii* относят к зелёным водорослям (*Chlorophyta*) порядка *Volvoxales* семейства *Chlamydomonaceae*. Она способна к трём типам питания: фототрофному, миксотрофному и гетеротрофному. В отличие от высших

растений, формирование фотосинтетических мембран хлоропласта и синтез хлорофилла в клетках хламидомонады происходит не только на свету, но и в темноте, - за счёт утилизации источников углерода из питательной среды. Успешное использование *C. reinhardtii* в качестве модельного объекта генетических исследований обусловлено такими особенностями ее биологии, как наличие полового размножения, короткий гаплофазный жизненный цикл и простота культивирования. Для *C. reinhardtii* разработаны методы молекулярно-генетического, геномного и протеомного анализов. Клетка этой водоросли имеет три полуавтономных генома: ядерный, включающий 17 групп сцепления, хлоропластный и митохондриальный. Все они секвенированы и доступны для анализа. Существует несколько кДНК и геномных библиотек *C. reinhardtii*, включая библиотеку ВАС-клонов.

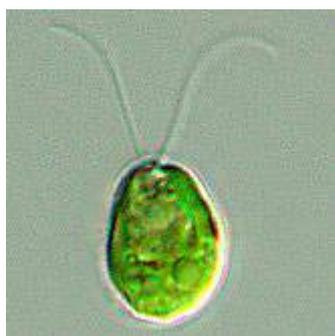


Рисунок 1. Клетка *C. reinhardtii* (1000^x).

На кафедре генетики и селекции биолого-почвенного факультета СПбГУ была создана уникальная генетическая коллекция пигментных мутантов хламидомонады [Столбова, 1971], которая положила начало исследованиям генетического контроля метаболизма пигментов хлоропласта – хлорофиллов и каротиноидов.

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Биосинтез хлорофиллов у растений и водорослей происходит в хлоропласте (рисунок 2). Большинство белков, вовлеченных в этот процесс, кодируются ядром, синтезируются в цитоплазме, и транспортируются в хлоропласт. Для оптимизации взаимодействий хлоропласта и ядра при реализации функций фотосинтеза клетка осуществляет координированный контроль экспрессии ядерных генов в ответ на метаболические сигналы хлоропласта (активные формы кислорода, сахара, интермедиаты синтеза хлорофилла, редокс-активные молекулы) и факторы внешней среды. Молекулы хлорофиллов (ХЛ) относятся к

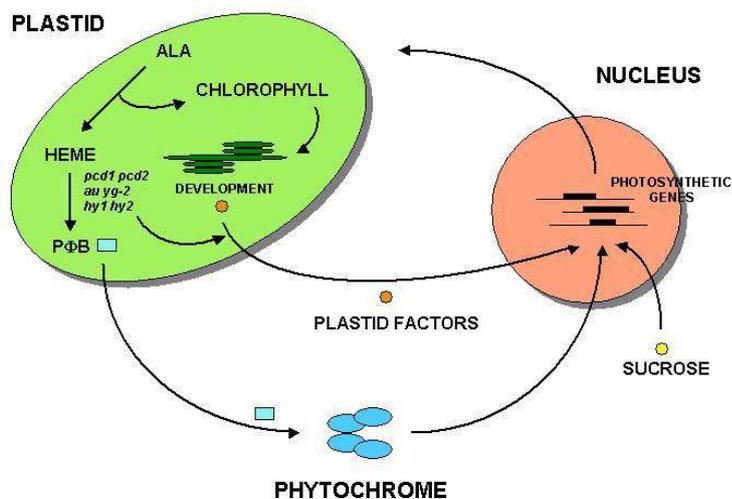


Рисунок 2. Биосинтез тетрапирролов в растительной клетке и пути его регуляции (www.southampton.ac.uk, Matthew Terry). ALA – АЛК; РФВ – порфибилиноген.

классу природных тетрапирролов, общий путь биосинтеза которых включает следующие основные шаги: (1) синтез 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК); (2) образование из АЛК уропорфириногена III (УроIII); (3) синтез протопорфина IX (ПП) из УроIII; (4) превращение ПП в протохлорофиллид (ПХЛД); (5) формирование хлорофилла из ПХЛД. У всех биологических объектов - от древнейших микроорганизмов до человека - биосинтез тетрапирролов начинается с образования 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК). В фотосинтезирующей клетке молекулы АЛК не только служат предшественником хлорофилла, но и являются регуляторами роста растений и задействованы в синтезе аминокислоты пролина. Первый циклический тетрапиррол уропорфириноген III дает начало двум биосинтетическим ветвям, одна из которых завершается формированием сирогема и корриноидов, а вторая - протопорфина IX (ПП), который, в свою очередь, является общим предшественником двух путей биосинтеза. Встраивание катиона железа Fe^{2+} в молекулу ПП ведет к образованию протогема, гема и ряда нелинейных тетрапирролов, включая фитохромобилин. Специфические реакции формирования хлорофилла - «магниевая ветвь» тетрапиррольного биосинтеза.

Они начинаются со встраивания ионов Mg^{2+} в структуру протопорфирина IX и завершаются образованием молекул пигмента. Их можно разделить на два блока:

(I) Ранние этапы биосинтеза – это реакции, последовательно осуществляемые тремя ферментами: магний-хелатаза (МХ), Mg-ПП-метилтрансфераза и Mg-ПП-монометиловый эфир циклаза, приводящие к формированию протохлорофиллида (ПХЛД) из протопорфирина IX. Они не требуют света и проходят одинаково у всех фотосинтезирующих организмов, как про- так и эукариот. Первый специфический фермент биосинтеза ХЛ – магний-хелатаза (МХ) обеспечивает превращение ПП в магний-протопорфирин IX (Mg-ПП), и представляет собой комплекс, состоящий из трех субъединиц: CHLI, CHLD и CHLH, кодируемых генами: *CHLI*, *CHLD* и *CHLH*, соответственно. Помимо выполнения ферментативных функций, большая CHLH субъединица МХ задействована в регуляторных процессах – передаче сигналов от хлоропласта к ядру и в путях гормонального и редокс-контроля [Юрина и др., 2012; Masuda, 2008]. Метилирование Mg-ПП и формирование циклопентанонового кольца завершаются последовательным образованием протохлорофиллида. Гены, кодирующие субъединицы магний-хелатазы, впервые были идентифицированы в геноме бактерии *Rhodobacter capsulatus* [Bollivar et al., 1994]. У высших растений их ортологи: ген *CHLI* и ген *CHLH* (*olive*), были найдены при изучении бесхлорофильных мутантов арабидопсиса Ch42 [Koncz et al., 1990] и львиного зева *Antirrhinum majus* [Hadson et al., 1993], соответственно. *Важная роль белка CHLH в функционировании и регуляции системы биосинтеза ХЛ делала в высшей степени актуальной задачу идентификации кодирующего его гена у зеленых водорослей, к которым относится C. reinhardtii.*

(II) Завершающие этапы биосинтеза – конверсия протохлорофиллида (ПХЛД) до хлорофилла, осуществляются по-разному у высших растений и эволюционно более древних фотосинтетиков: голосеменных, мхов, лишайников, водорослей, эубактерий. У покрытосеменных растений этот процесс возможен

только на свету, а у остальных классов фотосинтезирующих организмов он осуществляется как на свету, так и в темноте.

Несмотря на хорошую изученность ферментативного аппарата биосинтеза ХЛ [Миронов, 1998; Beale, 1999; Шестаков, 1998], ряд вопросов в генетике этого процесса остаются открытыми до сих пор. Практически не исследованы механизмы регуляции его темновых реакций. До недавнего времени полагали, что способность растений и фототрофных микроорганизмов синтезировать ХЛ на свету и в темноте зависит только от наличия двух ферментных систем, обеспечивающих превращение ПХЛД в хлорофиллид (рисунок 3). Светозависимый катализ осуществляет кодируемая ядром НАДФН: ПХЛД-оксидоредуктаза (сПОР). Темновую реакцию катализирует ферментный комплекс тПОР, субъединицы которого кодируют 3 гена хлоропласта: *chlB*, *chlN* и *chlL*, ведущие свое происхождение от нитрогеназ эубактерий [Armstrong, 1998; Чекунова, 2010]. В процессе эволюции высшие растения утратили тПОР, а более древние фотосинтетики, к числу которых принадлежит одноклеточная зеленая водоросль *C. reinhardtii*, сохранили способность синтезировать ХЛ в темноте, используя в качестве источника углерода ацетат натрия. Реакции заключительной стадии биосинтеза ХЛ в последние двадцать лет интенсивно исследуются [Беляева, 2010]. При этом, генетическая регуляция ранних светонезависимых этапов биосинтеза ХЛ оставалась до последнего времени неизвестной.

У зеленых водорослей *Chlamydomonas*, *Chlorella* и *Scenedesmus* были изолированы и изучены десятки мутантов с нарушениями темновой конверсии протохлорофиллида – неспособные зеленеть в темноте [Александрова, 1979; Квитко, 1983; Timko, 1998]. Все они относятся к одному фенотипическому классу, называемому «*yellow*». В темноте их клетки, подобно этиолированным проросткам покрытосеменных растений, не синтезируют хлорофилл, накапливают ПХЛД, и, благодаря присутствию каротиноидов, формируют колонии желтого цвета, зеленеющие на свету. Исследования *yellow*-мутантов хламидомонады позволили обнаружить 3 хлоропластных (кодирующих тПОР) и

более десятка ядерных генов, контролирующих этот процесс [Li and Timko, 1996; Zhang, 2007]. Среди штаммов, неспособных синтезировать хлорофилл в темноте, помимо *yellow*-форм, были найдены мутанты *C. reinhardtii*, накапливающие

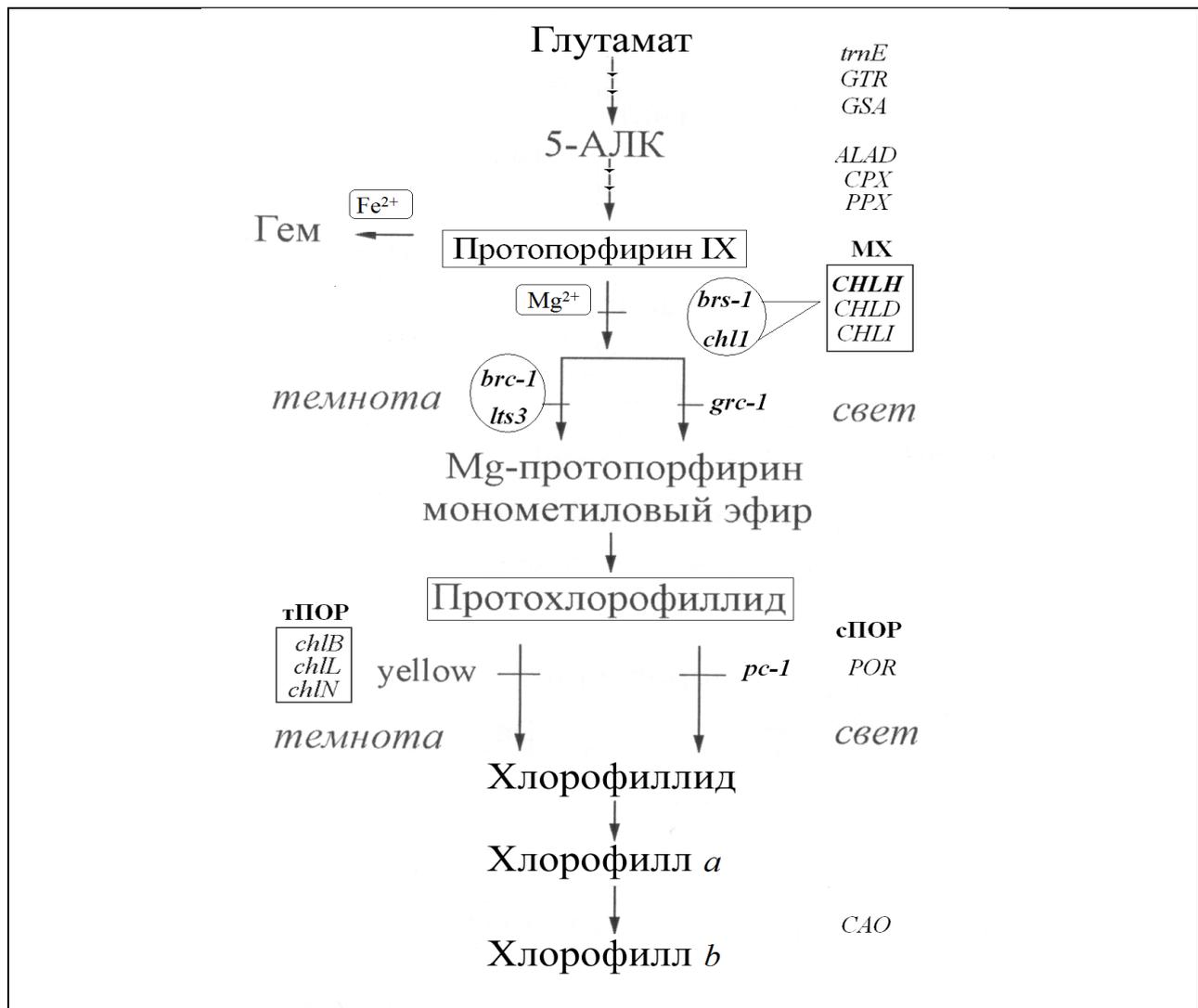


Рисунок 3. Генетический контроль биосинтеза хлорофиллов у *C. reinhardtii*.

На схеме строчными буквами даны мутации, блокирующие его отдельные этапы; заглавными - гены ферментов: *GTR* – Glu-тРНК-редуктазы; *GSA* – глутамат-полуальдегидаминотрансферазы; *ALAD* – АЛК-дегидратазы; *CPX* – копропорфириноген III оксидазы; *PPX* – протопорфириноген IX оксидазы; субъединиц магний-хелатазы (MX): *CHLH*, *CHLD*, *CHLI*; *POR* – светозависимой НАДФ: ПХЛД-оксидоредуктазы (сПОР); субъединиц темновой ПОР: *chlB*, *chlL*, *chlN*; *CAO* – хлорофилл a/хлорофиллид a-оксидоредуктазы. Ген *trnE* кодирует глутаминовую тРНК. В овалах - мутации, затрагивающие ранние этапы биосинтеза.

протопорфирины, - более ранние, чем ПХЛД, его коричневые предшественники [Столбова, 1971; Wang et al. 1974]. Такой фенотип позволял предполагать, что продукты генов, нарушенных мутациями, необходимы для функционирования ранних этапов биосинтеза молекул хлорофилла. К моменту начала работы у *C. reinhardtii* были идентифицированы все гены, контролирующие как ферментативный синтез протопорфирина IX из глутамата, так и превращение протохлорофиллида в хлорофиллид (рисунок 3). Генетическая детерминация раннего специфического этапа биосинтеза - конверсии протопорфирина IX до протохлорофиллида - оставалась не изученной. Для ответа на вопросы, - каким образом осуществляется генетический контроль ранних этапов путей биосинтеза ХЛ, и какова регуляторная роль генов, задействованных в этом контроле? - предстояло идентифицировать до сих пор неизвестные гены хламидомонады, вовлеченных в светонезависимый синтез хлорофилла, на этапах, предшествующих формированию протохлорофиллида.

Целью работы стало выяснение молекулярно-генетических механизмов, контролирующие ранние этапы биосинтеза хлорофилла у одноклеточной зеленой водоросли *C. reinhardtii*. Требовалось осуществить поиск и идентификацию генов, обеспечивающих превращение протопорфирина IX в ПХЛД, и выяснить их роль в функционировании аппарата биосинтеза хлорофилла, решив следующие **задачи**: (1) осуществить генетико-биохимические исследования мутантов зеленой водоросли *C. reinhardtii* с нарушениями темнового биосинтеза Хл на этапах, предшествующих формированию ПХЛД, для поиска генов, контролирующих мутантный признак; (2) исследовать обнаруженные гены *C. reinhardtii*, и идентифицировать кодируемые ими факторы, обеспечивающие ранние этапы темнового биосинтеза Хл; (3) изучить супрессию мутантных признаков для поиска альтернативных путей темнового синтеза хлорофилла у *C. reinhardtii*; (4) исследовать механизмы регуляции ранних этапов темнового синтеза хлорофилла в клетках *C. reinhardtii*.

Методы исследования. Прекрасным объектом генетического и биохимического анализа метаболических путей формирования хлорофилла являются мутанты высших растений и водорослей, неспособные синтезировать этот пигмент [Granick 1948; Suzuki et al., 1997; Tanaka, 2007].

Предметом представленных исследований стали пигментные мутанты зеленой водоросли *C. reinhardtii* (рисунок 4) с блоком ранних этапов синтеза ХЛ, клетки которых накапливали более ранний, чем ПХЛД предшественник хлорофилла – протопорфирин IX – субстрат фермента магний-хелатазы. Для решения поставленных задач в работе использованы методы генетики, биохимии и молекулярной биологии. Классический генетический анализ (тетрадный анализ, рекомбинационный и комплементационный тесты) незаменим для изучения наследования генов интереса и определения аллельности изучаемых мутаций.

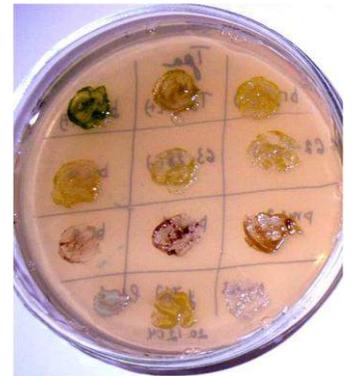


Рисунок 4. Пигментные мутанты *C. reinhardtii*. Культуры растут в темноте на среде ТАР.

Биохимические и биофизические методы позволяют определять пигментный состав и активности ферментов биосинтеза хлорофилла – магний-хелатазы и комплекса, синтезирующего АЛК (5-аминолевулиновую кислоту) у изучаемых штаммов хламидомонады (мутантов, ревертантов, трансформантов). Клонирование генов интереса и изучение их экспрессии осуществлялось методами молекулярной биологии (ПЦР-амплификация, генетическая трансформация, Вестерн- и Нозерн-блот анализы) и методами биоинформатики.

Научная новизна. В работе получены фундаментальные знания о генетических механизмах регуляции темновых процессов биосинтеза ХЛ у зеленой водоросли *C. reinhardtii*. Исследованы ядерные гены *CHLH* и *LTS3* *C. reinhardtii*, мутации в которых нарушают биосинтез ХЛ и ведут к накоплению клетками водоросли его интермедиата - протопорфирина IX (ПП). Установлено, что продукты этих генов необходимы для функционирования фермента магний-хелатазы (МХ), конвертирующего ПП в Mg-ПП. Мутации *brs-1* и *chl1* в гене

CHLH останавливают синтез ХЛ в условиях роста в темноте и на свету. У мутантов по гену *LTS3* блокирован только темновой синтез ХЛ, но сохраняется способность зеленеть на свету. Впервые у зеленых водорослей осуществлено клонирование гена *CHLH* *C. reinhardtii*, кодирующего большую (Н) субъединицу магний-хелатазы. Исследованы его структура и функции. Описан новый регуляторный ген *LTS3* *C. reinhardtii*, кодирующий фактор активации транскрипции генов МХ в темноте. Молекулярно-генетические исследования мутантов по гену *LTS3* позволили установить, что кодируемый им белок – первый, обнаруженный у водорослей фактор транскрипции семейства GATA, непосредственно регулирующий экспрессию генов биосинтеза ХЛ. Изучение супрессии мутаций в гене *LTS3* привело к обнаружению двух новых ядерных генов: *SUP3* и *SUP-I*. Ген *SUP3* кодирует фактор негативной регуляции активности магний-хелатазы, а продукт гена *SUP-I* активирует транскрипцию гена *LTS3* и необходим для процесса зеленения – индуцированного светом синтеза хлорофилла. Обнаружен новый хлоропластный ген хламидомонады *Mod-u-25*, продукт которого регулирует уровень содержания ПП в клетке.

Теоретическая и практическая значимость. В работе впервые установлено, что темновой биосинтез хлорофилла у зеленой водоросли *C. reinhardtii* регулируется на уровне транскрипции – путем активации генов, кодирующих ферменты: магний-хелатазу (МХ) и АЛК-синтезирующий комплекс. Найдены ядерные гены *LTS3* и *SUP-I*, кодирующие факторы транскрипционной активации МХ в темноте. Клонирован ген *CHLH* большой субъединицы МХ *C. reinhardtii*. Описан хлоропластный ген *Mod-u-25*. Он кодирует регуляторный фактор, обеспечивающий низкий уровень содержания фотосенсибилизатора протопорфирина IX (ПП) в клетке путем подавления активности ферментов синтеза АЛК. Разработан экспресс-метод оценки продуктивности по ПП штаммов *C. reinhardtii*. На основе мутантов по гену *CHLH* с нарушенной регуляцией получены штаммы-продуценты ПП, два из которых защищены авторскими свидетельствами (№ 1369275, и № 1759231) и могут быть использованы для

микробиологического синтеза фотосенсибилизатора протопорфирина IX, необходимого для диагностики и фотодинамической терапии рака и при создании альтернативных источников энергии.

Положения, выносимые на защиту:

– Помимо темновой ПХЛД-оксидоредуктазы (тПОР), у зеленой водоросли *C. reinhardtii* биосинтез ХЛ в темноте обеспечивается путем транскрипционной регуляции генов магний-хелатазы (МХ) – фермента, конвертирующего ПП в Mg-ПП в цепи биосинтеза хлорофилла.

– Ген *CHLH* *C. reinhardtii* кодирует большую (Н) субъединицу магний-хелатазы, а мутации *brs-1* и *chl1* в этом гене останавливают синтез ХЛ в условиях роста в темноте и на свету.

– Ген *LTS3* *C. reinhardtii* кодирует фактор активации транскрипции генов МХ в темноте. Это первый, обнаруженный у водорослей фактор транскрипции семейства GATA, регулирующий экспрессию генов биосинтеза хлорофилла.

– Ядерный ген *SUP3* *C. reinhardtii* кодирует фактор негативной регуляции активности магний-хелатазы, а продукт гена *SUP-1* активирует транскрипцию гена *LTS3* и необходим для процесса зеленения – индуцированного светом синтеза хлорофилла.

– Продукт обнаруженного в работе хлоропластного гена *Mod-u-25* подавляет активность ферментов синтеза АЛК, препятствуя накоплению фотосенсибилизатора ПП в клетке.

Достоверность и апробация результатов. Основные результаты работы представлены в более чем 50 публикациях, 20 из которых - в рецензируемых журналах и изданиях, рекомендованных ВАК; двух авторских свидетельствах. Результаты работы были доложены на целом ряде международных научных конференций: девяти международных конференциях по клеточной и молекулярной биологии хламидомонады (*International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas*) с 1994 по 2014 годы; на X и XV Конгрессах по фотосинтезу (*International Congress on Photosynthesis*, 1995, 2010), на третьем

съезде сообщества EMBO (*European Molecular Biology Organization*, 2011). Материалы диссертации были представлены на следующих отечественных конференциях: международная школа-конференция «Генетика микроорганизмов и биотехнология» (Москва, 2006); съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (Москва, 2009); на Пущинских чтениях по фотосинтезу (Пущино, 2009); всероссийской конференции «Фотохимия хлорофилла в модельных и природных системах» (Пущино, 2012); международной конференции «Роль организации и экспрессии генетического материала в наследственной и ненаследственной изменчивости» (Санкт-Петербург, 2009), Пятом международном конгрессе «БИОТЕХНОЛОГИЯ: состояние и перспективы развития» (Москва, 2009).

Структура работы и личное участие автора в получении результатов.

Диссертация изложена на 336 страницах и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы (1), материалы и методы (2), экспериментальная часть (3.1 - 3.5), заключение, выводы и список цитируемой литературы (390 наименований, из которых 50 – на русском языке). Работа содержит 76 рисунков и 49 таблиц. Все результаты данной работы получены лично автором. Генетический анализ мутантов *C. reinhardtii* был проведен на кафедре генетики и селекции биолого-почвенного факультета СПбГУ. Данные по анализу пигментов и активности ферментов биосинтеза хлорофиллов представленные в диссертации, явились результатом плодотворного сотрудничества автора с сотрудниками лаборатории Биофизики и биохимии фотосинтетического аппарата института Фотобиологии АН Республики Беларусь (д.б.н.: Н.В. Шалыго, Н.Г. Аверина и Е.Б. Яронская). Часть молекулярно-генетических экспериментов была осуществлена на базе лабораторий Германии: у проф. Бека (*Ch. Beck, Fraiburg University*) и проф. Гримма (*B. Grimm, IPK, Gatersleben*) при поддержке европейских фондов: DFG, DAAD и EMBO (1997 – 2002 гг.). В 2009 – 2011 гг. исследования автора были поддержаны грантом РФФИ: 09-04-01646-а.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

ГЕНЕТИКА МЕТАБОЛИЗМА ХЛОРОФИЛЛОВ

«Зеленый лист, или, вернее, микроскопическое зеленое зерно хлорофилла является фокусом, точкой в мировом пространстве, в которую с одного конца притекает энергия солнца, а с другого берут начало все проявления жизни на земле. Растение — посредник между небом и землей. Оно истинный Прометей, похитивший огонь с неба.

Похищенный им луч солнца горит и в мерцающей лучине, и в ослепительной искре электричества. Луч солнца приводит в движение и чудовищный маховик гигантской паровой машины, и кисть художника, и перо поэта».

Тимирязев К.А.

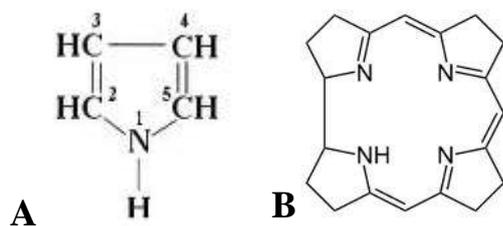
«Можно считать установленным, что на протяжении всей активной жизни хлоропласта или, по крайней мере, основной ее части - от начала его возникновения из пропластиды и до онтогенетического угасания - происходят постоянное разрушение и биосинтез новых молекул хлорофилла - обновление пигмента»

Шлык А.А.

Хлорофиллы (ХЛ) – уникальные природные тетрапирролы, играющие ключевую роль не только в жизни фотосинтезирующих организмов, но и всей биосферы. Их биосинтез связан с морфогенезом растительной клетки и реакциями фотосинтеза – запасанием и передачей энергии света. Для изучения метаболизма ХЛ широко используются пигментные мутанты растений (арабидопсиса, табака, ячменя) и фотосинтезирующих микроорганизмов. Применение методов генетического анализа, геной инженерии, геномики, протеомики и биоинформатики позволило не только идентифицировать гены, контролирующие задействованные в этих процессах ферменты, но и установить механизмы их регуляции. В настоящем разделе отражено современное состояние генетических исследований метаболизма хлорофиллов.

1.1. Природные тетрапирролы и их производные

Тетрапирролы - большая группа физиологически активных природных соединений, участвующих в таких фундаментальных биологических процессах, как фотосинтез, дыхание, сульфит- и нитрит-редукция, метаногенез и другие [Быховский, 1997]. В основе их химического строения лежит порфин – двенадцатичленный ароматический макроцикл, состоящий из четырех пиррольных колец (рисунк1.1), связанных моноуглеродными мостиками. У



А **В**
Рисунок 1.1. Молекулы
пятичленного гетероцикла
пиррола (А) и порфина (В).

фотосинтезирующих организмов обнаружено два типа функционально и структурно различных тетрапирролов: порфирины - циклические тетрапирролы и билины – тетрапирролы с открытой цепью. Чистый порфирин в природе не встречается, но его производные (гемы, хлорофиллы, фактор F430) – распространены повсеместно (рис. 1.2). Большинство биологически-активных тетрапирролов представляют собой металлокомплексы с железом (в гемах и сирогемах), магнием (хлорофиллы) и никелем (в факторе F430).

Линейные безметалльные билины (фикобилины и фитохромобилин) также играют важную роль в жизни фотосинтезирующей клетки. Фикоцианин и фикоэритрин – основные светособирающие пигменты фотосинтетических мембран цианобактерий и красных водорослей. Фитохромобилин формирует хромофорную часть фитохромов - фоторецепторов красного света, осуществляющих регуляцию фотоморфогенеза растений (Beale, 1994). В фотосинтезирующих организмах обнаружены и другие классы тетрапиррольных соединений – сирогемы, входящие в состав нитрат- и сульфат- редуктаз, и коррины, к которым относится витамин В12 [Бриттон, 1986].

Крупным достижением в изучении природных тетрапирролов явилось установление общего пути их биосинтеза (рисунок 1.2). У всех биологических объектов (от древнейших микроорганизмов до человека) он начинается с

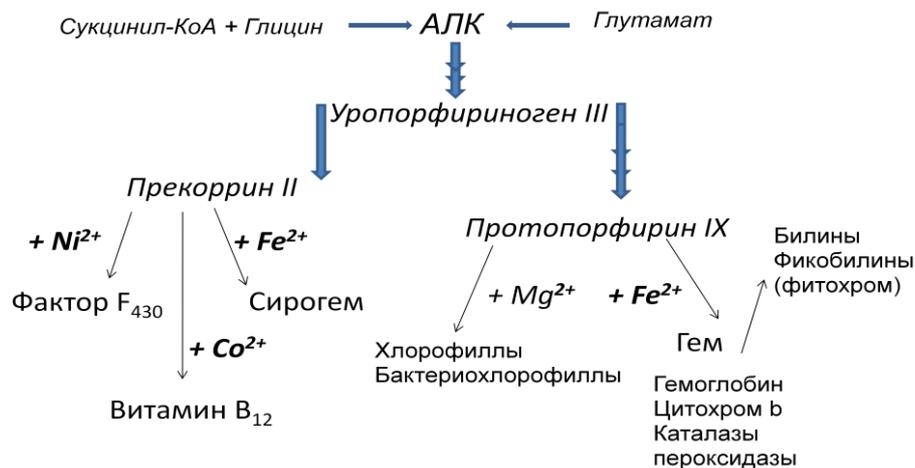


Рисунок 1.2. Схема биосинтеза природных тетрапирролов

образования 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) и проходит через две общие стадии – биосинтез монопиррола порфобилиногена (ПБГ) и первого циклического тетрапиррола уропорфириногена III (УРО III). Последний дает начало двум биосинтетическим ветвям, одна из которых завершается формированием сирогема и корриноидов, а вторая - протопорфирина IX (ПП), который, в свою очередь, является общим предшественником двух путей биосинтеза. Включение катиона железа Fe^{2+} в молекулу ПП ведет к образованию протогема, гема и ряда нелинейных тетрапирролов, включая фитохромобилин. Магниева ветвь биосинтеза начинается со встраивания ионов Mg^{2+} в структуру ПП и заканчивается формированием молекул хлорофиллов.

1.2. Хлорофиллы

Хлорофиллы (ХЛ) – это природные макроциклические пигменты, участвующие в процессах фотосинтеза. Они относятся к металлопорфиринам и принадлежат к магниевой ветви метаболических превращений протопорфирина IX. Включение магния представляет лишь первое звено в длинной последовательности сложных реакций, завершающихся синтезом молекул ХЛ.

Растительный и бактериальный фотосинтез, в котором эти соединения участвуют в качестве фотосенсибилизаторов, служит основным поставщиком органического материала, используемого гетеротрофами, в том числе животными и человеком [Beale, 1991; 1994]. Хлорофиллы в составе комплексов с белками и липидами локализованы во внутриклеточных органеллах - хлоропластах или хроматофорах. В клетках растений существуют два типа таких пигмент-белковых-липидных комплексов (ПБЛК), обслуживающие разные фотосистемы. ПБЛК I содержит длинноволновые формы хлорофилла *a*. Он имеется у всех фототрофов, включая древнейшие формы. ПБЛК II – сравнительно молодая система, появившаяся в процессе эволюции лишь у цианобактерий, содержит коротковолновые формы хлорофилла *a* [Пиневиц, Аверина, 2002].

1.2.1. Исторический очерк

Открытие хлорофиллов связано с именами двух французских химиков: Пельтье (*фр.*: *P. Pelletier*) и Каванту (*фр.*: *J. Caventou*), опубликовавшими в 1817 году работу под названием «Заметки о зеленой материи листьев». Эта «материя» была получена в результате простого эксперимента: залив свежие листья спиртом, авторы обнаружили, что зеленая окраска перешла в спирт, а листья остались бесцветными. Вещество, окрасившее спирт, было названо хлорофиллом (от др.-греч.: *χλωροξ* - зеленый и *φυλλον* - лист). Оптические свойства ХЛ изучал Климент Аркадьевич Тимирязев. Используя светофильтры, он показал, что они преимущественно поглощает свет красной области спектра, существенный для фотосинтеза. В своем труде «Спектральный анализ хлорофилла», вышедшем в 1871 году, К.А. Тимирязев для описания свойств ХЛ впервые применил спектрофотометрию - метод, который до сих пор остается важнейшим для определения качественного и количественного состава растительных пигментов. Еще один, ставший классическим, метод изучения пигментов – адсорбционная хроматография (от др.-греч.: *χρῶμα* — цвет), – был создан выдающимся русским ботаником с «говорящей» фамилией Цвет (Цвет, 1946). Михаил Семенович

разделял пигменты, используя адсорбенты: раствор смеси веществ, которые желают разделить, пропускают через стеклянную трубку, заполненную субстратом, различно их адсорбирующим. Для многих пигментов, в частности для хлорофилла, наилучшей адсорбирующей средой оказались тальк и сахароза. Из спиртовой вытяжки зеленых листьев таким путем М.С. Цвету удалось получить несколько пигментов: сине-зеленое вещество, находящееся в значительно большем количестве, он назвал *хлорофиллином альфа*, желто-зеленое соединение – *хлорофиллином бэта*, а добавочные желтые полосы на хроматограмме давали каротиноиды. Хотя, фактически, М.С. Цвет получил чистый хлорофилл, пальма первенства в установлении химического состава этой молекулы принадлежит немецким ученым Р.М. Вильштеттеру (нем.: *Richard Martin Willstätter*) и А. Штолю (нем.: *Artur Stoll*). Им удалось выделить кристаллический хлорофилл и определить его основные компоненты, показав, что пигмент является комплексом, содержащим магний. Результаты этих работ в 1913 году были опубликованы в фундаментальном труде «Исследования хлорофилла» [Willstätter, 1913], а в 1915 году за исследования хлорофилла и других пигментов Вильштеттеру была присуждена Нобелевская премия по химии. Ему удалось определить элементарный состав хлорофилла *a* – $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ и хлорофилла *b* – $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$, а окончательную структуру ХЛ в опытах с последовательным разрушением молекулы пигмента установил Ханс Фишер (нем.: *Hans Fischer*) в 1940 году. Через 20 лет коллективом американских ученых, возглавляемым известным химиком-органиком Робертом Бернсом Вудвортом (англ.: *Robert Burns Woodward*), был получен искусственный хлорофилл. С тех пор структура, свойства и метаболизм хлорофиллов активно изучаются (Быховский, 1985; Beale, 1999; Grimm, 2006).

1.2.2. Формы хлорофиллов

В основе строения хлорофиллов две составляющие: Mg-порфириновый скелет с различными заместителями и «хвост» - дитерпеновый спирт фитол, придающий молекуле способность встраиваться в липидный слой биологических мембран (рисунок 1.3). Из высших растений, водорослей и фотосинтезирующих бактерий выделено и охарактеризовано свыше 50 различных форм ХЛ. Основными пигментами растений и зеленых водорослей являются ХЛа и ХЛв. Их молекулы представляют собой дигидропорфириновый (хлориновый) цикл (формула I, рисунок 1.4), содержащий в качестве эфирных групп (Y) остаток фитола. Хлорофиллы группы с - с₁, с₂ и с₃ (формула II, рис. 2.3) в отличие от других форм содержат негидрированный порфириновый макроцикл и остаток неэтерифицированной акриловой кислоты. У морских водорослей они в составе белковых комплексов функционируют как светособирающие антенны. У бурых водорослей, диатомовых водорослей и динофлагеллят вместо ХЛв функционирует ХЛс, а у багрянок - ХЛd (табл. 1.1). Пятый тип хлорофиллов, названный ХЛf, был недавно обнаружен в цианобактериях, обитающих на скалах западного побережья Австралии [Chen et al., 2010]. Хлорофилл f поглощает более длинноволновый свет, чем его четыре «брата-близнеца» - в красной и

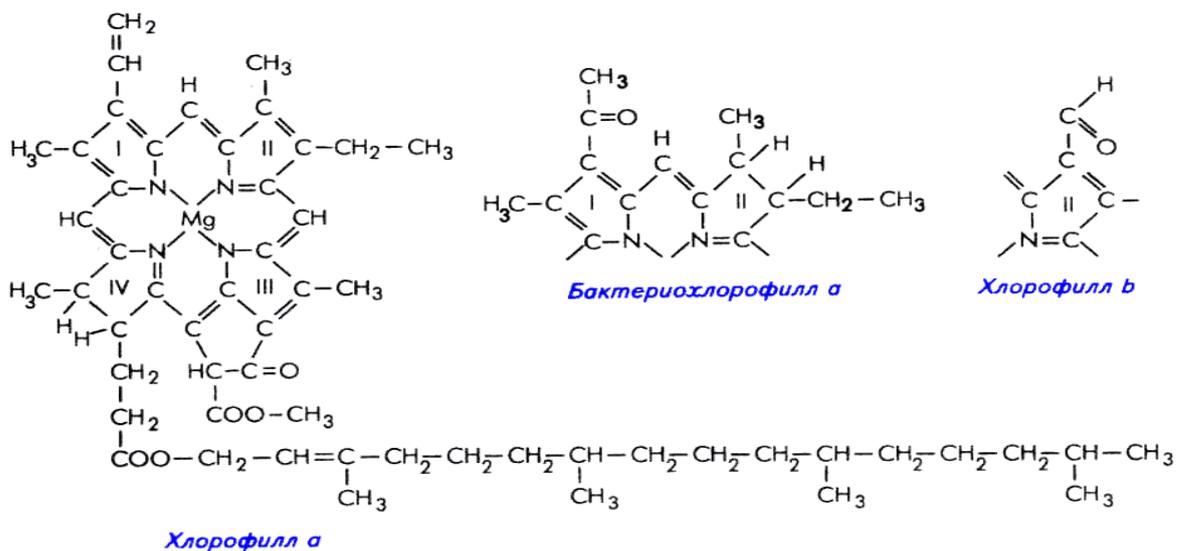
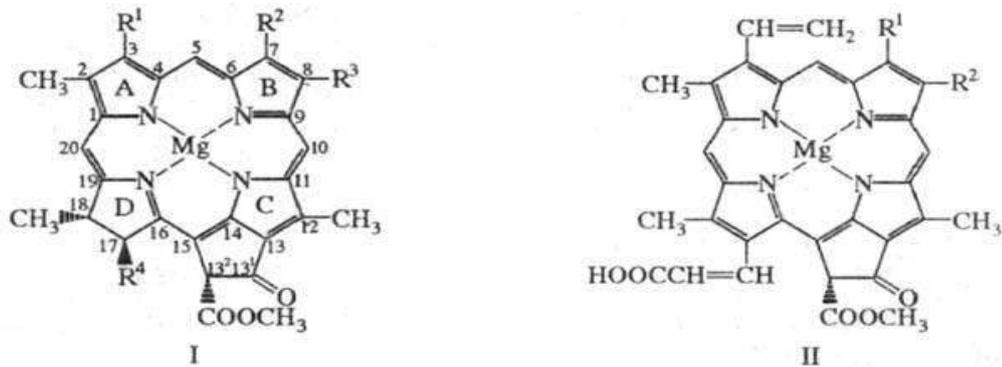


Рисунок 1.3. Структурные формулы хлорофиллов

инфракрасной областях спектра (706 нм), и позволяет расширить спектральный диапазон, усваиваемый фотосинтезирующими организмами (рисунок 1.5).



ХЛа: $R^1 = \text{CH} - \text{CH}_2$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})\text{Y}$

ХЛб: $R^1 = \text{CH} = \text{CH}_2$, $R^2 = \text{CHO}$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 =$

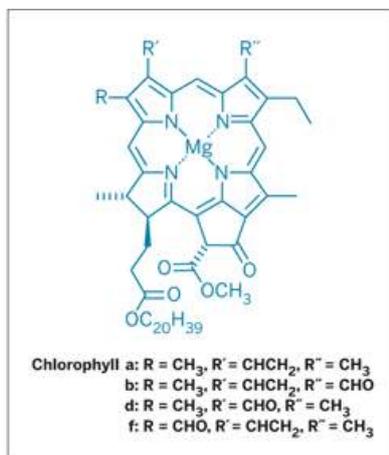
ХЛд: $R^1 = \text{CHO}$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 =$

ХЛс₁: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{C}_2\text{H}_5$

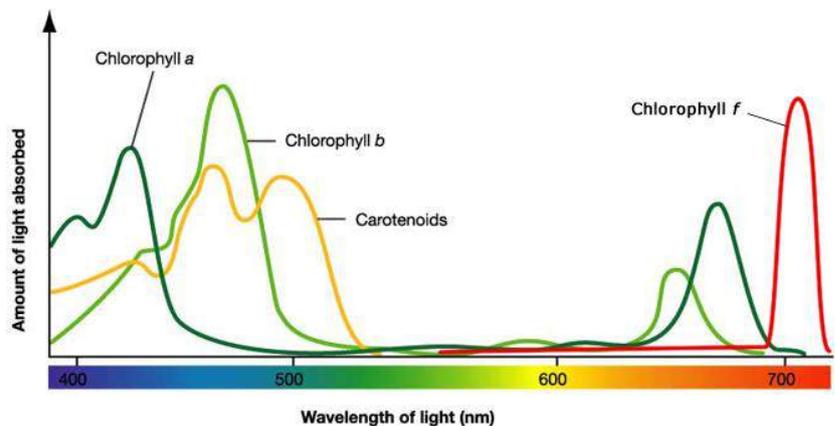
ХЛс₂: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{CH} = \text{CH}_2$

ХЛс₃: $R^1 = \text{COOCH}_3$, $R^2 = \text{CH} = \text{CH}_2$

Рисунок 1.4. Структурные формулы хлорофиллов: ХЛа, ХЛб, ХЛд (I), и ХЛс₁-с₃(II)



А

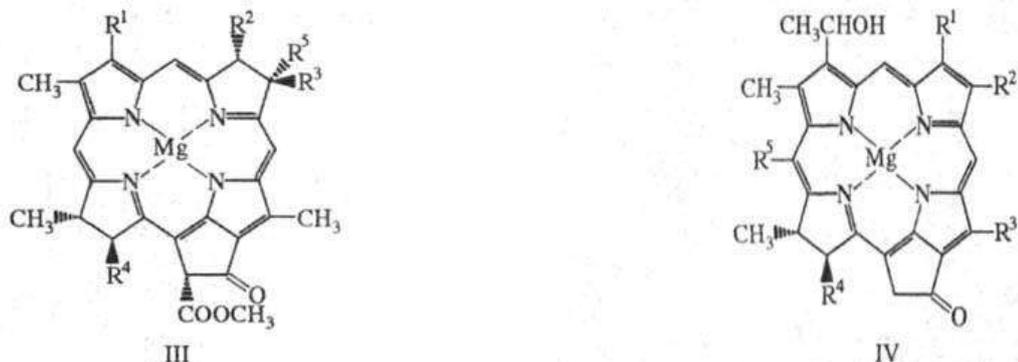


Б

Рисунок 1.5. Сравнительные характеристики структуры (А) и спектра поглощения (Б) хлорофилла *f* (по: Chen et al., 2010)

Эубактерии, осуществляющие бескислородный фотосинтез (пурпурные и зеленые бактерии, гелиобактерии) содержат особые ХЛ, называемые бактериохлорофиллами (БХЛ). Они имеют восстановленную двойную связь во

втором (В) кольце макроцикла и различаются природой и порядком чередования боковых заместителей. Идентифицировано 6 основных видов бактериохлорофиллов: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* и *g*. Бактериохлорофиллы *a*, *b* и *c* существуют в нескольких модификациях, так как радикал R^4 может быть фитолом, фарнезолом, геранил-гераниолом или другим многоатомным спиртом. В основе БХЛ *a*, *b* и *g* лежит тетрагидропорфириновый макроцикл (рисунок 1.6, ф-ла III), для бактериохлорофиллов *c*, *d* и *e*, первоначально называемых хлоробиум-хлорофиллами, характерно наличие дигидропорфиринового макроцикла, гидроксипропиловой группы в положении 3 и различных алкильных (от C_1 до C_5) заместителей в положении 8; эфирные группы (Y) – представляют собой остатки 2,6-фитадиенола (рисунок 1.6, ф-ла IV).



- БХЛ *a*: $R^1 = \text{COCH}_3$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$, $R^5 = \text{H}$
 БХЛ *b*: $R^1 = \text{COCH}_3$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 + R^5 = (= \text{CHCH}_3)$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$
 БХЛ *g*: $R^1 = \text{CH} = \text{CH}_2$, $R^2 = \text{CH}_3$, $R^3 + R^5 = (= \text{CHCH}_3)$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$
 БХЛ *c*: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^3 = \text{CH}_3$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$, $R^5 = \text{CH}_3$
 БХЛ *d*: $R^1 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{C}_2\text{H}_5\text{-C}_5\text{H}_{11}$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$, $R^5 = \text{H}$
 БХЛ *e*: $R^1 = \text{CHO}$, $R^2 = \text{C}_2\text{H}_5\text{-C}_5\text{H}_{11}$, $R^3 = \text{C}_2\text{H}_5$, $R^4 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{Y}$, $R^5 = \text{CH}_3$

Рисунок 1.6. Структура бактериохлорофиллов (БХЛ). Из пурпурных бактерий выделены БХЛа и *b*, из зеленых бактерий - БХЛс, *d* и *e*, из серных бактерий - БХЛс, *d* и *e*; обнаружены также фотосинтезирующие бактерии, содержащие БХЛг

Все пурпурные бактерии содержат какую-либо одну форму бактериохлорофилла: *a* или *b*. Небольшие различия в химическом строении приводят к существенным изменениям в спектральных свойствах этих пигментов. Пурпурные бактерии, содержащие бактериохлорофилл *a*, могут поглощать свет с

длиной волны до 900 нм. У видов, имеющих бактериохлорофилл *b*, максимум поглощения в красной части спектра сдвинут в длинноволновую область более чем на 100 нм. Дальше бактериохлорофилла *b* не поглощает ни один из известных фотосинтетических пигментов (рисунок 1.7; таблица 1.1). Основными пигментами зеленых бактерий являются бактериохлорофиллы *c*, *d* или *e*, незначительно различающиеся между собой по спектрам поглощения (таблица 1.1). Кроме них в клетках всех зеленых бактерий в небольшом количестве содержится бактериохлорофилл *a*. Наличие этих бактериохлорофиллов позволяет зеленым бактериям использовать свет с длиной волны до 840 нм. Необычный бактериохлорофилл *g* с максимумом поглощения 790 нм обнаружен у облигатно анаэробных фотосинтезирующих бактерий *Heliobacterium chlorum* и *Heliobacillus mobilis*, выделенных в группу гелиобактерий [Пиневиц, Аверина, 2002].

Таблица 1.1. Светопоглощение. Характеристики хлорофиллов и бактериохлорофиллов

Пигмент		*Химическая природа радикала R ⁴	Природный источник	Максимум поглощения в клетке (нм)
Хлорофилл	<i>a</i>	Фитол	Все аэробные организмы	680-685
	<i>b</i>	фитол	Зеленые водоросли и растения	650-660
	<i>c1-c3</i>	фитол	Бурые, диатомовые водоросли, динофлаггелляты	ок. 640
	<i>d</i>	фитол	Багрянки, цианобактерии	710
	<i>f</i>	фитол	Цианобактерии	706-720
Бактериохлорофилл	<i>a</i>	фитол или ГГ	Пурпурные бактерии	830-890
	<i>b</i>	фитол или ГГ	Пурпурные бактерии	1020-1030
	<i>c</i>	фитол, фарнезол и др.	Зеленые и бурые бактерии	750-760
	<i>d</i>	фарнезол	Зеленые и бурые бактерии	720-740
	<i>e</i>	-	Зеленые и бурые бактерии	710-720
	<i>g</i>	-	Гелиобактерии	770-790

*Фитол — C₂₀H₃₉OH; фарнезол — C₁₅H₂₅OH; геранил-гераниол — C₂₀H₃₃OH.

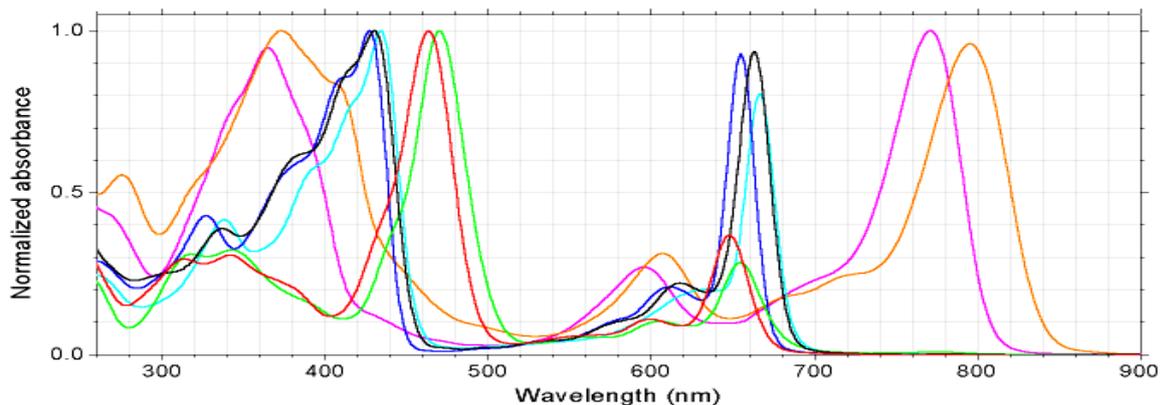


Рисунок 1.7. Спектры поглощения хлорофиллов и бактериохлорофиллов. ХЛ a – черный, ХЛ b – красный, БХЛ a – малиновый, БХЛ b – оранжевый, БХЛ c – цвет морской волны, БХЛ d – синий, БХЛ e – зеленый (по: Frigaard, et al., 1996)

1.3. Генетика биосинтеза хлорофиллов. Достижения и проблемы

Начало генетике пигментов растений было положено опытами Грегора Менделя по изучению характера наследования факторов, определяющих желтую окраску семян и проростков гороха [Mendel, 1885]. Этот «менделевский» ген удалось найти только спустя 140 лет - им оказался ген *Sgr* (*stay green*), кодирующий один из белков, необходимых для деградации хлорофилла [Armstead et al., 2007].

В середине 20 века важной вехой в исследованиях биосинтеза хлоропластных пигментов стали работы Самуэля Граника (*Sam Granik*), который обнаружил, что бесхлорофильные мутанты хлореллы накапливали протопорфирин IX (ПП) – биосинтетический предшественник гема [Granick, 1950]. Так было установлено, что гем и ХЛ имеют общий путь биосинтеза. Генетический контроль синтеза гема у *E. coli* изучал Сесерман (*A Săsarman*) [Săsarman et al., 1968]. В его лаборатории были найдены гены, мутации в которых приводили к дыхательной недостаточности, и показано, что эти гены контролируют ферменты пути биосинтеза гема, начиная от универсального предшественника всех тетрапирролов - 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) до ПП - последнего общего интермедиата в биосинтезе ХЛ и гема (рисунок .1.8).

Мутантные штаммы *E. Coli* с дефектами отдельных шагов биосинтеза тетрапирролов в дальнейшем послужили основой для поиска гомологичных генов у других видов.

Событием в генетике биосинтеза ХЛ стало обнаружение в геноме пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus* фотосинтетического генного кластера (ФГК) - участка хромосомы размером около 45 тпн, содержащего близко-сцепленные гены структурных белков аппарата фотосинтеза и всех ферментов биосинтеза каротиноидов и бактериохлорофилла *a* [Zsebo and Hearst, 1984]. Секвенирование ФГК и эксперименты по направленной инактивации открытых рамок считывания (ОРС) с последующей проверкой мутантного фенотипа позволили впервые получить нуклеотидные последовательности генов, контролирующих специфические реакции синтеза ХЛ. В дальнейшем, ортологи этих генов были найдены у растений и водорослей.

Для клонирования генов высших растений, кодирующих все 16 ферментов биосинтеза ХЛ (рисунок 1.8; таблица 1.2) потребовалось около 20 лет. В 1989 году была опубликована нуклеотидная последовательность гена *POR* ячменя [Schulz et al., 1989], а через 17 лет удалось прочесть последний в этом ряду ген арабидопсиса *DVR*, кодирующий фермент, превращающий дивинильные формы ХЛа в моновинильные [Nagata et al., 2005].

Несмотря на хорошую изученность ферментативного аппарата биосинтеза хлорофилла [Миронов, 1998; Beale, 1999; Шестаков, 1998], ряд вопросов в генетике этого процесса остаются открытыми до сих пор. Некоторые этапы биосинтеза (рисунок 1.8, реакции: 8, 9 и 12) у водорослей и растений требуют наличия кислорода. Вместе с тем, многие бактерии синтезируют бактериохлорофилл в отсутствие O_2 . Такие анаэробные ферменты и кодирующие их гены найдены далеко не во всех известных случаях. Мало исследованы и механизмы формирования ХЛ в темноте. Хотя у покрытосеменных растений образование этого пигмента – светозависимый процесс, большинство фотосинтезирующих организмов (в том числе голосеменные, мхи, водоросли и

фототрофные бактерии) способны зеленеть и в темноте. Они содержат альтернативные фотоэнзимы сПОР (POR, реакция 14, рисунок 1.8) ферментный комплекс тПОР (DPOR), кодируемый у эукариот хлоропластными генами, который ведет превращение протохлорофиллида (ПХЛД) в хлорофиллид (ХЛД) в темноте. При этом, у водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* известны мутанты по ядерным генам (*yellow1-10* и *lts3*) с нарушениями независимого от света синтеза ХЛ [Timko, 1998; Шалыго и др., 1990]. Идентификация этих генов открывает возможности исследования еще неизвестных факторов, необходимых для темновых реакций биосинтеза ХЛ. В настоящее время активно ведется и поиск генетических детерминантов, обеспечивающих регуляцию метаболизма пигментов и связанных с ним процессов биогенеза хлоропластов [Masuda and Fujita, 2008]. Значительный вклад в решение этой проблемы внесли исследования мутантов с нарушенной регуляцией хлорофиллообразования таких модельных объектов генетики фотосинтеза, как арабидопсис (*Arabidopsis thalianum*), зеленая водоросль хламидомонада (*Chlamydomonas reinhardtii*) и бактерии *Rhodobacter capsulatus* и *Synechocystis sp. PCC*. С накоплением экспериментальных данных становится все более очевидным, что ферменты и интермедиаты метаболизма ХЛ являются участниками регуляторных процессов, обеспечивающих системный контроль, - сложный аппарат факторов и сигналов, необходимых для оптимальной работы генетических механизмов растительной клетки в изменяющихся условиях ее существования.

H_2

I

Рисунок 1.8. Схема биосинтеза хлорофилла. Номерами обозначены ферменты, перечисленные в таблице 1.2

Таблица 1.2. Генетический контроль ферментов биосинтеза хлорофилла

№	Фермент	Гены			Обозначение фермента
		<i>A.thaliana</i>	<i>бактерии</i>	<i>Chlamy</i>	
1	Глутамил-тРНК ^{GLU} -синтетаза	<i>GTS</i>	<i>gltX</i>	<i>Gts</i>	GluRS, EC 6.1.1.17
2	Глутамил-тРНК ^{GLU} -редуктаза	<i>HEMA1</i> <i>HEMA2</i> <i>HEMA3</i>	<i>HemA</i>	<i>Gtr</i>	GluTR, EC 1.2.1.70
3	Глутамат-1-полуальдегид-аминотрансфераза	<i>GSA1</i> <i>GSA2</i>	<i>HemL</i>	<i>Gsa</i>	GSA-AT, EC 5.4.3.8
4	АЛК-дегидратаза	<i>ALAD1</i> <i>ALAD2</i>	<i>HemB</i>	<i>Alad</i>	PBGS, EC 4.2.1.24
5	Порфобилиногендеаминаза	<i>PBGD</i>	<i>HemC</i>	<i>Pbgd</i>	PBGD, EC 4.1.3.8
6	Уропорфириноген III-синтетаза	<i>UROS</i>	<i>HemD</i>	<i>Uros</i>	UROS, EC 4.2.1.75
7	Уропорфириноген-декарбоксилаза	<i>UROD1</i> <i>UROD2</i>	<i>HemE</i>	<i>Urod1</i> <i>Urod2</i> <i>Urod3</i>	UROD, EC 4.1.1.37
8*	Копропорфириноген-оксидаза	<i>CPO1</i> <i>CPO2</i>	<i>HemF</i> <i>HemN</i>	<i>Cpx1</i>	CPOX, EC 1.3. 3.3
9*	Протопорфириногеноксидаза	<i>PPO1</i> <i>PPO2</i>	<i>HemG</i> <i>HemY</i>	<i>Ppx</i> (<i>Ppo</i>)	PPOX, EC 1.3.3.4
10	Мг-хелатаза H субъединица	<i>CHLH</i>	<i>BchH</i>	<i>ChlH</i>	EC 6.6.1.1
	Мг-хелатаза D субъединица	<i>CHLD</i>	<i>BchD</i>	<i>ChlD</i>	
	Мг-хелатаза I субъединица	<i>CHL11</i> <i>CHL12</i>	<i>BchI</i>	<i>Chl11</i> <i>Chl12</i> <i>Chl13</i>	
11	Мг-протопорфирин IX-метилтрансфераза	<i>CHLM</i>	<i>BchM</i>	<i>ChlM</i>	Mg-PPMT, EC 2.1.1.11
12*	Мг-протопорфирин IX-монометилловый эфир циклаза	<i>CRD1</i> (<i>CHL27</i>)	<i>AcsF</i> <i>BchE</i>	<i>Cth1</i> <i>Crd1</i>	Mg-PPME, EC 1.14.13.81
13	Дивинил-редуктаза	<i>DVR</i>	<i>BchJ</i>	<i>Dvr</i>	DVR, EC 1.3.1.75
14	Светозависимая НАДФ-протохлорофиллид-оксидоредуктаза (сПОР)	<i>PORA</i> <i>PORB</i> <i>PORC</i>	<i>BchY</i> <i>BchZ</i>	<i>Lpor</i>	POR, EC1.3.1.33.
17	Темновая протохлорофиллид-оксидоредуктаза (тПОР)		<i>BchL</i> <i>BchB</i> <i>BchN</i>	<i>ChlL</i> , <i>ChlB</i> <i>ChlN</i>	dPOR
15	Хлорофилл-синтетаза	<i>CHLG</i>	<i>BchG</i>		CHLS, EC 2.5.1.62
16	Хлорофиллид <i>a</i> -оксигеназа	<i>CAO</i>		<i>CaO</i>	CAO, EC 1.13.12.14

В таблице номера ферментов соответствуют таковым на рисунке 1.8

* ферментативные реакции, проходящие в **аэробных** и анаэробных условиях.

Chlamy – зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii*

1.3.1. Ферменты биосинтеза хлорофиллов. Генетические исследования

Применение генетических методов позволило не только найти гены, кодирующие ферменты метаболизма природных тетрапирролов: ХЛ и гема (таблица 1.2), но и охарактеризовать их структурные свойства [Beale, 1999; Masuda and Fujita, 2008]. У фотосинтезирующих эукариот биосинтезы хлорофиллов и каротиноидов идут в хлоропласте. Подавляющее большинство ферментов, участвующих в этих процессах, кодируются ядерными генами, синтезируются в цитоплазме как предшественники, имеющие в N-концевой части хлоропластные транзитные пептиды, и транспортируются в хлоропласт. В пути биосинтеза молекул хлорофиллов можно выделить 3 этапа:

1. синтез 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) - первого специфического предшественника всех тетрапирролов;
2. превращение АЛК в протопорфирин IX (ПП) – последний общий предшественник гема и хлорофиллов;
3. специфические реакции синтеза хлорофиллов.

Последовательно рассмотрим каждый из них.

1.3.1.1. Синтез АЛК

Известны два способа образования АЛК, которые носят названия C_4 и C_5 пути. Все эукариоты, не имеющие хлоропластов, и α -протеобактерии (включая фототрофные бактерии рода *Rhodobacter*) используют C_4 – путь (путь Шемина), который состоит в конденсации глицина и сукцинил-КоА ферментом АЛК-синтетазой (ALAS) [Astner et. al., 2005]. В клетках нефотосинтезирующих эукариот АЛК образуется в митохондриях и служит для биосинтеза гема и цитохромов. Формирование АЛК у содержащих хлорофилл эукариот и всех прокариот (за исключением α -протеобактерий) идет по C_5 -пути из 5-углеродного предшественника – глутаминовой кислоты. Он включает три энзиматические реакции, в которых участвуют 4 функционально-активные молекулы, локализованные в строме пластид: 3 фермента и глутаминовая транспортная РНК

- тРНК^{GLU}. Оба пути биосинтеза АЛК (C₄ и C₅) функционируют у зеленых водорослей: сценедесмуса (*Scenedesmus obliquus*) и эвглены (*Euglena gracilis*) [Klein and Senger, 1978; Foley et al., 1982].

Генетический контроль синтеза АЛК (C₅-путь)

На первом этапе C₅-биосинтеза фермент глутамил-тРНК синтаза (*glutamyl-tRNA synthase - GluRS*) присоединяет глутаминовую тРНК с антикодоном UUC, к глутамату (реакция 1, рисунок 1.8). Затем следует редукция глутамил-тРНК^{Glu} в глутамат-1-полуальдегид с освобождением тРНК^{Glu} ферментом глутамил-тРНК редуктазой (*glutamyl-tRNA reductase - GluTR*) в присутствии NADPH и Mg²⁺ (реакция 2, рисунок 1.8). Далее, аминотрансфераза (*glutamate-1-semialdehyde aminotransferase - GSA-AT*) с кофактором пиридоксальфосфатом осуществляют транс-аминирование глутамат-1-полуальдегида за счет переноса C₄ аминогруппы в положение C₅ с образованием АЛК (реакция 3, рисунок 1.8).

Ферменты C₅-пути оказались настолько сходными для всех, изученных к настоящему времени видов растений, водорослей и бактерий, что реакционные компоненты из разных биологических источников, объединенные *in vitro*, способны синтезировать АЛК [Timko, 1998].

Глутаминовая тРНК, активируя глутамат, запускает процесс биосинтеза тетрапирролов [Huang et al., 1984; Schon et al., 1986; Schneegurt, Beale, 1988]. Критическая роль этой молекулы в синтезе ХЛ была показана при изучении бесхлорофильного оранжевого мутанта эвглены, у которого причиной отсутствия пигмента оказалась точковая мутация, приведшая к замене (C-56-U) в Т-петле тРНК^{GLU} [Stange-Thomann et al., 1994]. Гены, кодирующие эту транспортную РНК, у всех фотосинтезирующих эукариот консервативны и локализованы в хлоропластной ДНК (хлДНК). Поиски тРНК, специфичных для синтеза тетрапирролов, к настоящему времени не увенчались успехом, и представление о

том, что одни и те же молекулы участвуют в образовании АЛК и синтезе белков [Kumar, et al., 1996], остается актуальным. Исключением из этого правила стала бактерия *Acidithiobacillus ferrooxidans*, у которой один из трех генов tRNA^{GLU} кодирует молекулу, не имеющую сродства к ферменту GluTR [Levicán et al., 2005]. В хлДНК хламидомонады обнаружено два гена tРНК^{GLU} с разными 5'-фланкирующими последовательностями, но функциональных различий между кодируемыми ими молекулами найти не удалось [O'Neill et al., 1990; Khrebtukova and Spreitzer, 1994]. В хлоропласте tРНК^{GLU} узнается тремя белками: GluRS, GluTR и фактором элонгации EF-Tu, и, по-видимому, служит предметом конкурирования синтезов белков и тетрапирролов, координируя тем самым, оба этих процесса при формировании пигмент-белковых комплексов фотосинтетических мембран. В 2005 году было установлено ее участие в регуляции транскрипции генов хлоропласта [Hanaoka et al., 2005], которую ведут две РНК-полимеразы: NEP (*nuclear encoding RNA polymerase*) и PEP (*plastid encoding RNA polymerase*), кодируемые, соответственно, геномами ядра и хлоропласта. В процессе индуцируемого светом синтеза хлоропластных мембран tРНК^{GLU}, связываясь с NEP, ингибирует ее активность, и, тем самым, осуществляет переключение на PEP, которая преимущественно транскрибирует «фотосинтетические гены» - гены, продукты которых необходимы для фотосинтеза.

Фермент глутамил-tРНК-синтетаза (GluRS) не является специфичным для синтеза тетрапирролов и, как и остальные аминоксил-tРНК-синтетазы, участвует в синтезе белков.

GluTR - первый фермент биосинтеза тетрапирролов. История клонирования генов, кодирующих глутамил-tРНК-редуктазу (GluTR), началась в 1989 году с экспериментов по трансформации мутанта *hemA E.coli*, ауксотрофного по АЛК, геномной библиотекой *E.coli*. В результате были получены прототрофные трансформанты, у которых фрагмент ДНК, встраивание

которого вело к компенсации эффекта мутации *hemA* - восстановлению синтеза АЛК, содержал ген, кодирующий GluTR. Он получил название *HemA* [Li et al., 1989]. Этим методом геномной комплементации - по способности компенсировать мутантный фенотип штамма *E.coli hemA* [Pontoppidan and Kannangara, 1994], гены, гомологичные *HemA*, были найдены у целого ряда растений (арабидопсиса, ячменя, огурцов и др.). GluTR - ключевой фермент в регуляции биосинтеза ХЛ. Его активность ингибируется гемом и протохлорофиллидом через регуляторные белки [Srivastava et al., 2005]. Экспрессию генов, кодирующих GluTR у растений и водорослей, контролируют: свет, растительные гормоны и циркадные ритмы [McCormac et al., 2001].

Фермент глутамат-1-полуальдегидаминотрансфераза (GSA-AT). Впервые GSA-AT был выделен из стромы хлоропластов ячменя [Grimm et al., 1989]. Вслед за установлением первичной структуры, по последовательности аминокислот этого белка были сконструированы праймеры для ПЦР-амплификации фрагмента кДНК кодирующего его гена, который послужил зондом для скрининга библиотеки кДНК. Итогом работы стало получение полной нуклеотидной последовательности гена *GSAT* [Grimm, 1990], которую использовали далее для поиска генов, кодирующих этот фермент у *E.coli* и цианобактерии *Synechococcus PCC 6311* [Grimm et al., 1991].

К ауксотрофности по АЛК у *E.coli* приводят мутации в двух генах: уже упомянутом *HemA*, кодирующем GluTR [Säsärman et al., 1968], и *HemL*, который первоначально носил название *PopC* [Wulff, 1967]. Эксперименты по геномной комплементации мутанта *popC* показали, что дефектный у него ген *HemL* кодирует фермент GSA-AT [Paag et al., 1991]. В дальнейшем, его ортологи были изолированы у многих объектов [Timko, 1998].

Белок GluTR представляет собой V-образный димер, и его пространственная структура предполагает способность к образованию стабильного комплекса с молекулой GSA-AT (рис. 1.9). Модель их совместного

функционирования [Moser et al., 2001; Lüer et al., 2005] подтверждают результаты экспериментов *in vitro* - рекомбинантные белки обоих ферментов хламидомонады образуют физический и функциональный комплекс [Nogaj and Beale, 2005].

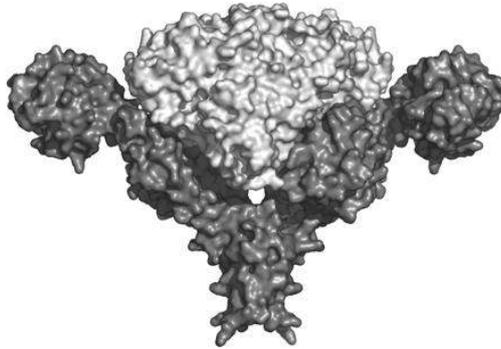


Рисунок. 1.9. Комплекс ферментов: глутамил-тРНК-редуктаза (GluTR) - темно-серый цвет и глутамат-1-полуальдегидаминотрансфераза (GSA-AT) - светло-серый цвет. Модель создана на основе рентгеноструктурного анализа белков: GluTR из *M. kandleri* и GSA-AM из *Synechococcus* (по: Lüer et al., 2005).

1.3.1.2. Синтез протопорфирина IX из АЛК

При конденсации восьми молекул АЛК образуется первый порфирин порфобилиноген, который затем, в четыре энзиматических шага, превращается в протопорфирин IX (ПП). Все имеющиеся данные указывают на абсолютную универсальность этих биосинтетических реакций как у про- так и у эукариот [Beale, 1999; Timko, 1998]. На этом этапе порфирины становятся гидрофобными и фотореактивными, что делает их опасными для растительной клетки. ПП и его производные – сильные фотосенсибилизаторы, - соединения, способные под действием света генерировать активные формы кислорода (АФК): синглетный кислород и (или) перекисные радикалы. Они окисляют липиды, приводя к разрушению клеточных мембран [op den Camp et al., 2003].

От АЛК к уропорфириногену III. Порфобилиноген синтетаза (5-АЛК дегидрогеназа, ALAD; реакция 4, рисунок 1.8) из двух молекул АЛК формирует пиррольное кольцо порфобилиногена в присутствии двухвалентных металлов. У растений и водорослей фермент активируют ионы магния (Mg^{2+}), а у

животных и цианобактерий – ионы цинка (Zn^{2+}). Порфириноген-дезаминаза (PBGD; реакция 5, рисунок 1.8) ведет полимеризацию 4-х молекул порфобилиногена с образованием линейного тетрапиррола гидроксиметилбилана, - субстрата для уропорфириноген III синтетазы (UROS; реакция 6, рисунок 1.8), продуктом которой является макроцикл уропорфириноген III (URO III) - химическая основа всех порфиринов.

Ферменты: ALAD, PBGD и UROS локализованы в строме хлоропласта и имеют слабое сродство с мембранами. Первые работы по клонированию кодирующих их генов были выполнены на мутантах *E.coli* K12, неспособных синтезировать гем. Эти мутанты отбирали по признаку дыхательной недостаточности (гем входит в состав цитохромов), с последующей проверкой ауксотрофности по АЛК и промежуточным субстратам биосинтеза гема [Alefounder et al., 1988]. Гены *E.coli*: *hemB*, *hemC*, *HemD*, кодирующие вышеперечисленные ферменты, были найдены в результате экспериментов по трансдукции таких мутантов, образующих мелкие колонии, фрагментами ДНК из геномной библиотеки, и оценке уровня соответствующей ферментативной активности у трансдуктантов, формирующих колонии нормального размера. Вскоре гены, контролирующие PBGD, были клонированы и у содержащих хлорофилл организмов: эвглены [Sharif et al., 1989], шпината [Schaumburg et al., 1992], гороха [Witty et al., 2003] и арабидопсиса [Lim et al., 1994]. У хламидомонады был идентифицирован только ген *Alad* порфобилиноген-синтетазы [Matters and Beale, 1995]. Гены, контролирующие UROS, клонированы у цианобактерии *Anacyistis nidulans* [Jones et al., 1994] и ряда нефотосинтезирующих организмов. В ядерных геномах хламидомонады и арабидопсиса обнаружены их ортологи.

Путь от уропорфириногена III к протопорфирину IX. Превращения URO III происходят двумя путями: за счет его последовательного метилирования или декарбоксилирования. В ходе метилирования синтезируются фактор F430 и

корриноиды (производные витамина B_{12}). Вторым путем ведет к образованию гема и хлорофиллов, при этом, молекулы протопорфирина IX (ПП) образуются из УРО III в результате трех ферментативных реакций. Первый фермент этого пути - уропорфириноген III-декарбоксилаза (UROD) конвертирует УРО III в копропорфириноген III (реакция 7, рисунок 1.8). Затем копропорфириноген III-оксидаза (CPOX) осуществляет последовательное декарбоксилирование двух остатков пропионовой кислоты боковых цепей колец I и II (при C_3 , а затем при C_8) до винильных групп [Cavaleiro et al., 1974] с образованием протопорфириногена IX (ППГ) (реакция 8, рисунок 1.8). Третий фермент - протопорфириногеноксидаза (PPOX) окисляет этот последний бесцветный предшественник хлорофилла до красного пигмента протопорфирина IX (реакция 9, рисунок 1.8) При наличии молекулярного кислорода это окисление может происходить химически, без участия фермента.

UROD из клеток млекопитающих является предметом активного изучения медицинской генетики. Нарушения его функциональной активности в результате мутаций в гене *Urod* обуславливают развитие тяжелых заболеваний - порфирий, наследуемых по аутосомно-доминантному типу [Badminton and Elder, 2005; Brancaloni et al., 2007]. Наряду с бесхлорофилльными организмами, у которых UROD кодирует ген *hemE*, аналогичные гены были клонированы и секвенированы у *Synechococcus PCC7942* [Kiel et al., 1992], табака и ячменя [Mock et al., 1995].

Следующий фермент - CPOX у большинства фотосинтезирующих эукариот и аэробных прокариот активен только в присутствии кислорода. Способность некоторых анаэробных бактерий синтезировать гем и хлорофилл, указывало на существование иных механизмов образования протопорфириногена IX. Без кислорода эту реакцию могут осуществлять экстракты анаэробной пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* и клеток дрожжей - в присутствии АТФ, окисленных форм пуриновых нуклеотидов и метионина [Tait, 1972; Poulson and Polglase, 1974]. Изучение механизма окислительного декарбоксилирования у *E. coli* и *S. Typhimurium* позволило установить, что аэробную и анаэробную

реакции катализируют различные ферменты, кодируемые негомологичными генами *hemF* и *hemN*, соответственно [Xu and Elliott, 1993; 1994]. В геноме арабидопсиса имеется последовательность, гомологичная бактериальному гену *hemN* анаэробного фермента, но не получено доказательств ее функциональной активности. У хламидомонады найден только ген *Cpx1* аэробного фермента, гомологичный *hemF* [Hill and Merchant, 1995]. Гены, кодирующие UROD и CPOX, клонированы и секвенированы у ряда растений, включая сою (Madsen et al., 1993) и табак [Kruse et al., 1995].

Два изоэнзима протопорфириногенаксидазы (хлоропластный и митохондриальный) первоначально были найдены в листьях ячменя [Jacobs and Jacobs, 1987], а гены, кодирующие этот фермент, впервые были клонированы у бактерий: *E. coli* [Saserman et al., 1993] и *Bacillus subtilis* [Hansson and Hederstedt, 1994]. Их назвали *hemG* и *hemY*, соответственно. Это разные гены, контролирующие две ферментные системы. Впервые у растений нуклеотидная последовательность гена *PPOX*, кодирующего протопорфириногенаксидазу, была обнаружена после секвенирования клона из библиотеки кДНК арабидопсиса, который компенсировал эффект мутации ауксотрофности *hemG* по гему у *E. coli* [Narita et al., 1996]. Тем же методом геномной комплементации были найдены 2 гена табака *Nicotiana tabacum*: *PPOX1* и *PPOX2*. Кодируемые ими ферменты оказались локализованы в разных клеточных компартментах – в хлоропласте и митохондриях, соответственно [Lermontova et al., 1997]. Для поиска гомологов этого гена у хламидомонады была использована иная стратегия, - когда мутанты по интересующему гену получают как штаммы, устойчивые к ингибиторам кодируемого им фермента. PPOX является мишенью для фототоксичных гербицидов габакулина и ацифлюорфена, относящихся к группе дифениловых эфиров. При блокировании фермента гербицидами в растительной клетке накапливается его субстрат – протопорфириноген IX, который, окисляясь химически, превращается в фотосенсибилизатор протопорфирин IX. Был получен устойчивый к ацифлюорфену мутант Rs3, у которого доминантная мутация в

ядерном гене нарушала взаимодействие фермента с гербицидом. Фрагмент геномной ДНК размером 10 тпн, содержащий ген устойчивости *Rs3*, был клонирован и секвенирован [Randolph-Anderson et al., 1998]. *Rs3* оказался геном *PPX*, кодирующим PPOX хламидомонады, точковая мутация G→A в котором обуславливает устойчивость к ацифлюорфену в результате замены V-389-M в аминокислотной последовательности белка.

Протопорфирин IX (ПП) - последний общий предшественник гема и хлорофилла, становится субстратом для двух хелатаз, встраивающих в его молекулу ионы железа (Fe^{2+}) или магния (Mg^{2+}). Несмотря на сходные функции и один и тот же субстрат - ПП, Mg-хелатаза и Fe-хелатаза - разные по структуре и свойствам ферменты. В условиях *in vitro*, включение Fe^{2+} происходит самопроизвольно и не требует энергии АТФ. Fe-хелатаза представляет собой полипептид длиной от 308 (у *Bacillus subtilis*) до 466 (у арабидопсиса) аминокислотных остатков, кодируемый геном *HemH*. У фотосинтетиков фермент локализован в пластидах и в митохондриях, но основной синтез гема происходит в пластидах [Masuda et al., 2003]. Напротив, встраивание ионов Mg^{2+} в порфириновое ядро является сложной АТФ-зависимой реакцией и осуществляется только в хлоропласте [Walker and Willows, 1997].

1.3.1.3. Магниева ветвь биосинтеза тетрапирролов. Ранние этапы образования хлорофиллов

К ранним этапам биосинтеза ХЛ относят реакции, ведущие к формированию протохлорофиллида (ПХЛД) из протопорфирина IX (ПП). Они проходят одинаково у всех фотосинтезирующих организмов.

*Магний-хелатаза – ключевой фермент биосинтеза ХЛ. Встраивание Mg^{2+} в молекулы ПП с образованием магний-протопорфирина IX (реакция 10, рисунок 1.8) ведет фермент магний-хелатаза (МХ). Это гетеромультимерный комплекс, состоящий из трех субъединиц: I, D и H, кодируемых, соответственно, генами: *CHLI*, *CHLD* и *CHLH*. Энзиматическая реакция начинается*

сформирования Mg^{2+} - и АТФ-зависимого комплекса субъединиц I и D, который взаимодействует с субъединицей H, связывающей ПП (рисунок 1.10).

Белки CHL1 и CHLD имеют в своем составе N-концевые Mg-АТФ-связывающие модули AAA+ (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*), при объединении формирующие три димерных структуры, конформация которых

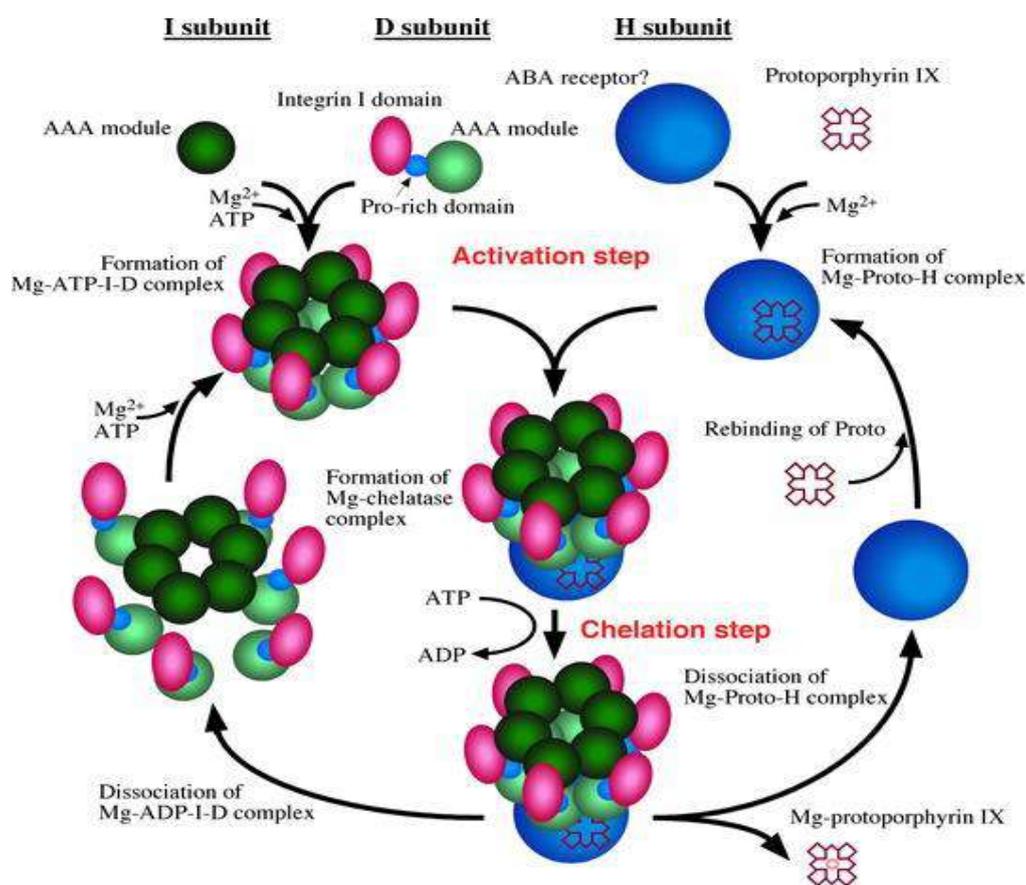


Рисунок. 1.10. Модель каталитического цикла магний-хелатазы. Работа фермента делится на две фазы. В первой фазе (активации) происходит Mg^{2+} и АТФ-зависимое формирование кольцевых структур из 6-ти субъединиц D, куда через домен интегрин I, как в каркас, встраиваются 6 субъединиц I, образуя АТФ-I-D комплекс. Субъединица H связывается с протопорфирином IX в присутствии магния, образуя Mg-ПП-CHLH комплекс. Во второй фазе происходит сборка фермента - связывание комплексов АТФ-I-D и Mg-ПП-CHLH через домен интегрин I субъединиц D. После встраивания ионов магния в молекулу ПП комплекс становится субстратом для фермента Mg-ПП-метилтрансферазы. Далее, он диссоциирует. После ухода Mg-ПП и при наличии субстрата, субъединицы вступают в новый цикл активации (по: Masuda, 2008)

зависит от присутствия АТФ или АДФ. Молекула D-белка также содержит пролин-богатый участок и C-концевой домен интегрин I. Через этот домен происходит взаимодействие субъединиц I и D с образованием комплекса АТФ-I-D [Lundqvist, 2010]. Субъединица H формирует комплекс с субстратом, связывая протопорфирин IX своими концевыми участками. В отсутствие ПП белок подвергается деградации [Sirijovski et al., 2008]. Встраивание ионов Mg^{2+} в молекулу протопорфирина IX зависит не только от наличия АТФ, но и от целостности мембран хлоропластов - функциональный комплекс МХ ассоциирован с мембранами через регуляторный белок GUN4 [Adhikari, 2011]. Этот фермент проявляет значительное сходство с белками, вовлеченными в биосинтез двух других классов металлопорфиринов: корриноидов и фактора F_{430} . Все три субъединицы магний-хелатазы ортологичны белкам Ni-хелатазы [Beale, 1999]. Помимо выполнения ферментативных функций МХ участвует в распределении молекул ПП по двум биосинтетическим «ветвям». При снижении ее активности, незадействованный ферментом ПП становится субстратом для биосинтеза гема, который, накапливаясь в избытке, репрессирует активность GluTR – первого фермента пути биосинтеза порфиринов. Так на метаболическом уровне происходит регулирование количества молекул ХЛ, синтезируемых в клетке.

Первые данные о генах, кодирующих магний-хелатазу, появились в связи с обнаружением фотосинтетического генного кластера (ФГК) в геномах бактерий *Rhodobacter capsulatus* и *Rhodobacter sphaeroides*. Маррс (B.L.Marrs) с соавторами [Yen and Marrs, 1976; Marrs, 1981] установили, что район хромосомы *Rhodobacter capsulatus* размером 46 кб содержит если не все, то основные гены, контролирующие магниевую ветвь биосинтеза бактериохлорофилла и каротиноидов. ФГК включает около 30 открытых рамок считывания (ОРС), которые были клонированы в составе плазмид и использованы для сайт-специфического инсерционного мутагенеза. Блокирование трех ОРС приводило к появлению мутантов, накапливающих протопорфирин IX [Bollivar et al., 1994].

Эти три гена получили названия *bchD*, *bchH* и *bchI*, а кодируемые ими белки - BchD, BchH и BchI оказались субъединицами магний-хелатазы, поскольку в экспериментах *in vitro* демонстрировали ферментативную активность в присутствии АТФ и ионов магния [Gibson et al., 1995]. Гены, контролирующие субъединицы магний-хелатазы высших растений, были найдены при изучении бесхлорофильных инсерционных мутантов. У Т-ДНК-мутанта арабидопсиса Ch42 (cs), инактивированным оказался ортолог генамалой (I) субъединицы *bchI* *Rhodobacter* [Koncz et al., 1990], а у мутанта *Antirrhinum majus* (львиный зев), полученного в результате Tam3-транспозонного мутагенеза, блокированный вставкой ген *olive* кодировал белок CHLH большой (H) субъединицы магний-хелатазы [Hadson et al., 1993].

Бесхлорофильные оранжевые мутанты зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* были получены в 70-х годах прошлого века [Столбова, 1971; Wang et al., 1974]. Энди Ванг описал неаллельные мутанты: *brc-1* и *brs-1*, накапливающие ПП в темноте [Wang et al., 1974]. Один из них – *brs-1* был светочувствителен, а *brc-1* – зеленел на свету. На основании таких фенотипов автор выдвинул предположение о существовании двух различных реакций встраивания Mg^{2+} в молекулу ПП, одна из которых происходит на свету, а другая - в темноте. При этом мутация *brc-1*, возможно, блокирует только темновую реакцию, в то время как *brs-1* нарушает оба – световой и темновой пути синтеза ХЛ. Генетические исследования оранжевых мутантов, подобных *brc-1* и *brs-1*, из Петергофской генетической коллекции [Столбова, 1971; Квитко и др., 1983], позволили идентифицировать 2 гена: *CHLH* и *LTS3*, мутации в которых ведут к накоплению ПП клетками хламидомонады [Чекунова и Квитко, 1986; Шалыго и др., 1990]. Мутации в гене *CHLH* вызывали гибель клеток при освещении и оказались аллельными *brs-1*, а мутации в гене *LTS3* были аллельны *brc-1* и приводили к способности мутантных клеток зеленеть на свету. Дальнейшие генетико-биохимические исследования показали, что ген *CHLH* кодирует большую субъединицу CHLH магний-хелатазы. К 2001 году его удалось клонировать и

установить молекулярную природу мутаций *chl1* и *brs-1*, - они оказались вставками (+1) в экзонах 9 и 10 гена *CHLH*. В результате, вместо белка размером 1399 аминокислот образовывались укороченные полипептиды длиной 479 и 721 аминокислот [Chekunova et al., 2001]. Фактор, кодируемый геном *LTS3*, оказался регулятором транскрипции генов, кодирующих магний-хелатазу, - в темноте он активирует их экспрессию [Чекунова и Савельева, 2010]. Если гены, кодирующие субъединицы CHLH и CHLD магний-хелатазы у арабидопсиса и хламидомонады уникальны (представлены в геноме в виде одной копии), то малую субъединицу CHLI у них, соответственно, кодируют два и три гена: *CHLI(1-2)* и *CHLI(1-3)*, по-видимому, появившиеся в результате дупликации [Archelinov et al., 2007]. Субъединица CHLH, а также субстрат и продукт ее функционирования – ПП и Mg-ПП, задействованы в пути передачи сигналов из хлоропласта в ядро, по-видимому, за счет взаимодействия со связывающим порфирины белком GUN4 [Sobotka et al., 2008]. Неспособность к образованию таких комплексов у большинства известных мутантов по гену *CHLH* арабидопсиса и хламидомонады: *sch* (P-642-L), *gun5* (A-990-L) и *brs-1*, ведет к блокированию этого сигнального пути [Masuda and Fujita, 2008]. Фитогормон абсцизовая кислота (АБК) подавляет метаболизм фотосинтезирующей клетки и играет ключевую роль в адаптации растений к неблагоприятным условиям среды. Поиски рецепторов АБК у арабидопсиса привели к выделению белка, названного АВАР (*abscisic acid receptor*), который оказался молекулой CHLH [Shen et al., 2006]. Эффекта связывания АБК с Н-субъединицей магний-хелатазы ячменя не было установлено [Müller and Hansson, 2009], и участие этого белка в гормональной регуляции еще предстоит выяснить. Малая субъединица CHLI магний-хелатазы оказалась способной связываться с тиоредоксинами, участвующими в редокс-регуляции белков хлоропласта [Ikegami et al., 2007]. Недавно появились данные о взаимодействии CHLH и сигма фактора SigE, связывание которых у *Synechocystis* ведет к ингибированию транскрипции SigE-зависимых генов [Osanaï et al., 2009]. По-видимому, CHLH – ключевой компонент в пути биосинтеза хлорофиллов.

Помимо выполнения ферментативных функций – встраивания Mg^{2+} в молекулу ПП, он участвует в передаче сигналов от хлоропласта к ядру, задействован в транскрипционной регуляции, и является звеном в путях гормонального и редокс-контроля.

Биосинтез протохлорофиллида. Метилирование остатка пропионовой кислоты в положении 6 макроцикла Mg-протопорфирина IX, ведет к образованию его монометилового эфира. Реакцию осуществляет фермент S-аденозил-L-метионин:Mg-протопорфирин IX-метилтрансфераза (Mg-PPMT), используя S-аденозил-L-метионин (SAM), как донор метильных групп (реакция 11, рис.1.8). Циклизация Mg-протопорфирина IX монометилового эфира (Mg-ППМЭ) с образованием дивинил-протохлорофиллида - трехступенчатая реакция, которую ведет Mg-протопорфирин IX-монометиловый эфир окислительная циклаза (Mg-PPME) (реакция 12, рисунок 1.8).

Ген, кодирующий Mg-PPMT, впервые был найден в геноме *R. capsulatus* при инсерционном анализе ФГК, и получил название *bchM*. Продукт этого гена в экстрактах *E.coli* был способен метилировать Mg-ПП [Gibson et al., 1995]. Его ортолог - *chlM* вскоре обнаружили у *Synechocystis PCC 6803* методом функциональной комплементации мутанта *bchM R. capsulatus* [Smith et al., 1996]. Гены, кодирующие MgPPMT высших растений, удалось клонировать сравнительно недавно. В геноме арабидопсиса этот ген – *CHLM* был найден как гомолог гена *chlM Synechocystis sp.*, - мутант по этому гену, инактивированному вставкой (Т-ДНК), накапливал Mg-ПП и белок CHLN, и демонстрировал высокий уровень репрессии ядерных генов, участвующих в фотосинтезе [Pontier et al., 2007]. Сниженный уровень экспрессии генов коровых белков обеих фотосистем и светособирающего комплекса установлен и для бесхлорофильных мутантов хламидомонады по гену *CHLM*, которые в темноте накапливали субстрат фермента - Mg-ПП и гибли на свету [Meinecke et al., 2010]. Также как и магний-хелатаза, фермент MgPPMT в клетке имеет “двойную” локализацию: в оболочке

хлоропласта и в мембранах тилакоидов в соотношении, близком к 1:30 [Block et al., 2002; Nakayama et al., 1998]. Имеются данные, свидетельствующие о тесном физическом взаимодействии субъединицы CHLN магний-хелатазы и метилтрансферазы [Alawady et al., 2005]. Эксперименты по определению трехмерной структуры CHLN показали, что N- и C-концевые участки этой молекулы необходимы для связывания ПП, а продукт каталитической реакции - Mg-ПП подвергается метилированию, оставаясь связанным с CHLN [Sirijovski et al., 2008].

Фермент Mg-PPME у растений и водорослей активен только в присутствии кислорода и при сохранении целостности хлоропластных мембран. У фототрофных бактерий его кодирует ген анаэробного фермента *bchE* [Yang and Bauer, 1990]. При мутационном анализе ФГК пурпурной бактерии *Rubrivivax gelatinosus* был получен мутант *acsF*, который накапливал Mg-ППМЭ в условиях аэробного роста, а при анаэробном выращивании не отличался от дикого типа по уровню хлорофиллов [Pinta et al., 2002]. Напротив, мутации в гене *bchE* приводили к такому фенотипу только в анаэробных условиях или при низком содержании O₂. Двойной мутант *acsF/bchE* накапливал Mg-ППМЭ при всех условиях, демонстрируя, что за аэробную и анаэробную циклизацию Mg-ППМЭ отвечают разные гены. Нуклеотидные последовательности этих двух генов оказались различны, также как и характер их экспрессии: транскрипция гена *acsF* была чувствительной к кислороду, а *bchE* - не зависела от O₂ [Ouchane et al., 2004]. Так были получены генетические доказательства существования двух биосинтетических путей циклизации Mg-ППМЭ: аэробного и анаэробного. Ортологи «анаэробного» гена *bchE* не найдены у зеленых водорослей и высших растений. Нуклеотидные последовательности, гомологичные гену *AcsF* обнаружены у множества организмов - пурпурных бактерий, цианобактерий (за исключением строгого анаэроба *Chlorobium tepidum*), зеленых водорослей и высших растений. В геноме хламидомонады найдено два ортолога гена *AcsF*: *Crd1* и *Cth1* [Moseley et al., 2000], а у арабидопсиса только один - *CHL27* [Tottey et

al., 2003]. Первичная структура продукта гена *AcsF* позволяет отнести фермент к классу металлосодержащих монооксигеназ, к которым относятся также аэробные копропорфириноген-оксидаза (*HemF*) и рибонуклеотид-редуктаза (*NrdB*) *E. coli*.

У большинства фотосинтетиков хлорофилл *a* (бактериохлорофилл) представляет собой гетерогенную смесь моно- и дивинильных форм молекул, финальная композиция которых зависит от вида, условий роста и стадии развития организма [Rebeiz et al., 1994]. Конверсию 3,8-дивинил-тетрапирролов до моновинильных форм (реакция 13, рис. 1.8) осуществляет продукт гена *DVR* - 3,8-дивинил протохлорофиллид *a*-8-винилредуктаза [Nagata et al., 2005].

1.3.1.4. Заключительные стадии биосинтеза хлорофиллов

Поздние этапы биосинтеза ХЛ включают восстановление протохлорофиллида (ПХЛД) до хлорофиллида (ХЛД), и этерификацию его фитолом с образованием хлорофиллов (ХЛ).

Превращение ПХЛД в ХЛД катализируют две различные ПХЛД-оксидоредуктазы: светозависимая сПОР (Masuda and Takamiya, 2004) и светонезависимая тПОР [Armstrong, 1998]. Оба фермента функционируют у голосеменных, мхов, лишайников, водорослей и зубактерий, обуславливая способность зеленеть как в темноте, так и на свету. Эволюционно более молодые покрытосеменные растения утратили тПОР, и при росте в темноте они формируют этиолированные ростки (желтые, накапливающие ПХЛД). Свет активизирует сПОР, запуская тем самым процесс зеленения - синтез хлорофиллида и далее хлорофиллов. Хотя оба фермента выполняют одну функцию – редукцию двойной связи в IV пиррольном кольце макроцикла, они различаются как структурно, так и по механизму действия.

Фотоконверсия протохлорофиллида в хлорофиллид. Ген, кодирующий сПОР, - фотоэнзим НАДФН: ПХЛД-оксидоредуктазу (реакция 14, рисунок 1.8), впервые был клонирован у ячменя [Schulz et al., 1989]. Авторам удалось выделить

фермент из листьев растений в количестве, достаточном для создания антител, которые использовали для изоляции гена *POR* из кДНК экспрессирующей библиотеки методом иммунодетекции. Позднее, этот ген был найден по гомологии у различных растений: пшеницы, овса, гороха, арабидопсиса, сосны, и др. [Reinbothe and Reinbothe, 1996]. История его клонирования у хламидомонады связана с желтыми в темноте, зеленеющими на свету мутантами класса *yellow*. Фенотип такого температуро-чувствительного мутанта *y-1-4*, неспособного зеленеть на свету при рестриктивной температуре, оказался результатом одной мутации *pc-1*, приводящей к сдвигу рамки считывания в ядерном гене *POR1*, кодирующем сПОР [Li and Timko, 1996]. Несколько паралогов этого гена: *PorA*, *PorB*, *PorC* найдено в геномах *Arabidopsis thaliana* [Oosawa et al., 2000], ячменя [Holtorf and Apel, 1996] и некоторых голосеменных [Skinner and Timko, 1999], а в геномах цианобактерий и хламидомонады – только один ген *POR*.

В 1959 году С. Граник обнаружил, что добавление экзогенной АЛК к этиолированным проросткам высших растений, растущим в темноте, вызывает накопление предшественников хлорофилла (от ПП до ПХЛД) [Granick, 1959]. Вскоре было установлено, что механизм, в норме препятствующий накоплению этих фототоксичных интермедиатов, состоит в обратном ингибировании синтеза АЛК протохлорофиллидом [Timko, 1998]. В 2001 году был обнаружен компонент этой «регуляторной петли», негативный регулятор биосинтеза порфиринов белок FLU, который через взаимодействие с ферментом GluTR ингибирует синтез АЛК [Meskauskiene et al., 2001]. Мутанты арабидопсиса с нарушенной регуляцией биосинтеза ХЛ накапливали в темноте избыточное количество ПХЛД и имели повышенную активность синтезирующих АЛК ферментов. Они были названы *flu* (*fluorescent*), из-за ярко-красной флюоресценции ПХЛД при облучении этиолированных проростков синим светом ($\lambda_{400-450\text{нм}}$), и несли аллельные мутации в ядерном гене *FLU*. Для его изоляции использовали стратегию позиционного клонирования и установили, что этот ген кодирует связывающий (binding) белок размером 316 аминокислот [Meskauskiene and Apel, 2002]. Спустя три года, два

белка, гомологичных FLU, были найдены и у хламидомонады. Эти FLP (*Flu-Like Protein*) белки протяженностью 373 и 386 аминокислот – результат альтернативного сплайсинга транскриптов ядерного гена *FLP* [Falciatore et al., 2005]. Иммунодетекция показала, что они локализованы в мембранах хлоропласта и способны специфически связывать фермент GluTR, ингибируя синтез АЛК. Экспрессия гена *FLP* позитивно регулируется светом, а в условиях темнового роста – интермедиатами биосинтеза хлорофилла: ПП, Mg-ПП и ПХЛД. Недавно было установлено, что у описанного еще в 1974 году [Nielsen, 1974] мутанта ячменя *tigrina-d*, накапливающего ПХЛД в темноте, заблокированный мутацией ген является ортологом гена *FLU* арабидопсиса [Lee et al., 2003].

Светонезависимый биосинтез хлорофиллида. Обнаружено три гена, необходимых для редукции ПХЛД в темноте (реакция 17, рисунок 1.8). У *Rh. capsulatus* они были обозначены как *bchB*, *bchL* и *bchN*, а их ортологи, позднее найденные в геномах хлоропластов эукариот, получили названия: *chlB*, *chlL* и *chlN*. Эти гены кодируют три субъединицы фермента тПОР (*B,L,N*), аминокислотные последовательности которых сходны с субъединицами фермента нитрогеназы – NifK, NifH, NifD, соответственно [Armstrong, 1998].

Недавно у *Rh. capsulatus* был найден еще один, подобный нитрогеназам фермент, участвующий в биосинтезе бактериохлорофилла – хлорофиллид «а» редуктаза COR (*chlorophyllide oxydoreductase*). Три гена: *BchX*, *BchY*, *BchZ* из фотосинтетического генного кластера бактерии кодируют соответствующие субъединицы этого фермента [Nomata et al., 2006].

Превращение ПХЛД в ХЛД – важнейший этап биосинтеза хлорофилла, который требует более детального рассмотрения. Генетические аспекты исследований ферментов, обеспечивающих этот процесс, подробнее будут изложены в подразделе 1.4.

Хлорофилл «а». Последний этап формирования молекулы хлорофилла - это этерификация фитолом - присоединение фитольного «хвоста» к остатку пропионовой кислоты в позиции C17. Фермент, осуществляющий эту реакцию (15,

рисунок 1.8), был выделен из *R. capsulatus* и назван бактериохлорофилл-синтетазой [Bollivar et al., 1994]. Найден был и ген *BchG*, кодирующий этот фермент. Впоследствии, в геномах хламидомонады и высших растений были обнаружены его ортологи – *ChlG* [Garcia-Gil et al., 2003]. Фитол – мононенасыщенный спирт ($C_{20}H_{39}OH$) - синтезируется из геранилгеранил-дифосфата (ГГ-ДФ), который подвергается редукции ферментом геранилгеранил-редуктазой с образованием фитил-дифосфата (фитил-ДФ). Он кодируется генами: *bchP/chlP* (у бактерий и эукариот, соответственно) и участвует, также, в биосинтезе каротиноидов. Хлорофилл синтетаза в качестве субстрата может использовать оба изопрена: фитил-ДФ и ГГ-ДФ.

На тилакоидных мембранах хлоропластов световая энергия адсорбируется пигмент-белковыми светособирающими комплексами (ССК) двух фотосистем. Типичный апопротеин ССКII связывает 17 молекул пигментов, из которых 3 – каротиноиды (ксантофилы) и 14 молекул хлорофиллов (8 – ХЛа и 6 – ХЛb). Хлорофилл *b* (ХЛb) - дополнительный пигмент растений, водорослей и прохлорофит, доля которого составляет 15-50% от общего содержания хлорофиллов.

Хлорофилл «b». В процессе биосинтеза хлорофилла *b* происходит последовательное двухступенчатое окисление метильной группы в положении 7 макроцикла до формильной. Реакцию катализирует фермент хлорофиллид/хлорофилл оксигеназа (CAO) в присутствии кислорода. Субстратом для него может служить как хлорофиллид «a» так и ХЛа.

Мутанты без ХЛb были впервые получены на арабидопсисе в 1963 году [Hirono and Redei, 1963]. Позднее, они были найдены у многих других высших растений, включая ячмень, кукурузу и рис. Генетический анализ десяти подобных мутантов ячменя показал, что утрате ХЛb ведут мутации из одной группы комплементации, свидетельствуя, что синтез ХЛb контролируется одним генетическим локусом [Simpson et al., 1985]. Первый мутант хламидомонады без

ХЛ b был описан в 1976 году [Ладыгин, 1976], а после получения коллекция таких мутантов удалось установить, что отсутствие ХЛ b обусловлено рецессивными мутациями в ядерном гене *Cbn1* [Мирная и др., 1990]. Этот ген, позднее получивший название *CAO* (*chlorophyll «a» oxygease*) (реакция 16, рис.1.8), был клонирован с помощью инсерционных мутантов без ХЛ b хламидомонады [Tanaka et al., 1998]. В дальнейшем, его нуклеотидную последовательность использовали для поиска гомологичных генов в геномных и кДНК библиотеках арабидопсиса и других высших растений.

Синтез хлорофилла b в растительной клетке регулируется на уровне транскрипции гена *CAO* и посттрансляционно. Молекула фермента *CAO* включает три домена: А, В и С, при этом, каталитическую функцию выполняет домен С. Трансгенные растения, экспрессирующие белок *CAO* без N-концевого А-домена накапливали ХЛ b и гибли от обесцвечивания на свету [Yamasato et al., 2008]. Авторы предположили, что А-домен участвует в контроле биосинтеза ХЛ и необходим для защиты от фотодеструкции.

1.4. Превращения протохлорофиллида: темновой и светозависимый пути

Фототрофные бактерии и пластиды водорослей и растений содержат тетрапиррольные пигменты – бактериохлорофиллы (БХЛ) и хлорофиллы (ХЛ), обеспечивающие процессы фотосинтеза [Шестаков, 1998]. Аноксигенные бактерии синтезируют их в темноте, цианобактерии - на свету и в темноте, а покрытосеменные растения – только на свету. Способность к светонезависимому и (или) светозависимому образованию ХЛ или БХЛ обеспечивается ферментами, катализирующими превращение протохлорофиллида (ПХЛД) в хлорофиллид (ХЛД). В эволюции сформировалось два пути осуществления этой реакции. Один из них обеспечивается ферментом тПОР - независимой от света, или темновой протохлорофиллид-оксидоредуктазой. В свою очередь, светозависимое образование ХЛД осуществляет НАДФН: протохлорофиллид оксидоредуктаза

СПОР. Ниже представлены результаты генетических, молекулярно-биологических и биохимических исследований этих двух ПХЛД-оксидоредуктаз. Обсуждаются эволюционные аспекты их происхождения и функционирования. Основное внимание уделено генетике наиболее древнего темнового биосинтеза ХЛ.

I.4.1. Протохлорофиллид в цепи биосинтеза хлорофиллов

Протохлорофиллид (ПХЛД) – последний общий биосинтетический предшественник ХЛ и БХЛ, двух структурно родственных пигментов, которые различаются, в частности, природой боковых цепей при атомах углерода тетрапиррольного макроцикла (рисунок 1.11). Они поглощают свет и участвуют в разделении зарядов поперек энергосопрягающих биомембран, что является основой аноксигенной фототрофии у бактерий, синтезирующих БХЛ, и оксигенной фототрофии у цианобактерий, прохлорофитов, водорослей и высших растений. *In vivo*, ХЛ и БХЛ – это хромофоры пигмент-белковых комплексов светособирающих антенн и реакционных центров, расположенных на фотосинтетических мембранах [Пиневиц, Аверина, 2002].

Биосинтез тетрапирролов у фототрофных организмов осуществляется через цепочку биохимических реакций, катализируемых как растворимыми, так и мембраносвязанными ферментами. Путь превращения тетрапиррольного макроцикла протопорфирина IX (ПП), последнего общего биосинтетического предшественника ХЛ и гема, в Mg-протопорфирин IX и далее через ряд предшественников, в ХЛ или БХЛ, известный как магниевая ветвь биосинтеза тетрапирролов, характерен для всех фототрофных организмов [Reinbothe, Reinbothe, 1996]. Мишенью световой регуляции этого пути служит ПХЛД (рисунок 1.12). В клетке пигмент существует в двух формах: дивинил-ПХЛД и моновинил-ПХЛД, соотношение которых варьирует у разных организмов и зависит от внешних условий и стадии онтогенеза. Биологическая целесообразность гетерогенности этих молекул до сих пор не ясна [Беляева, 2009].

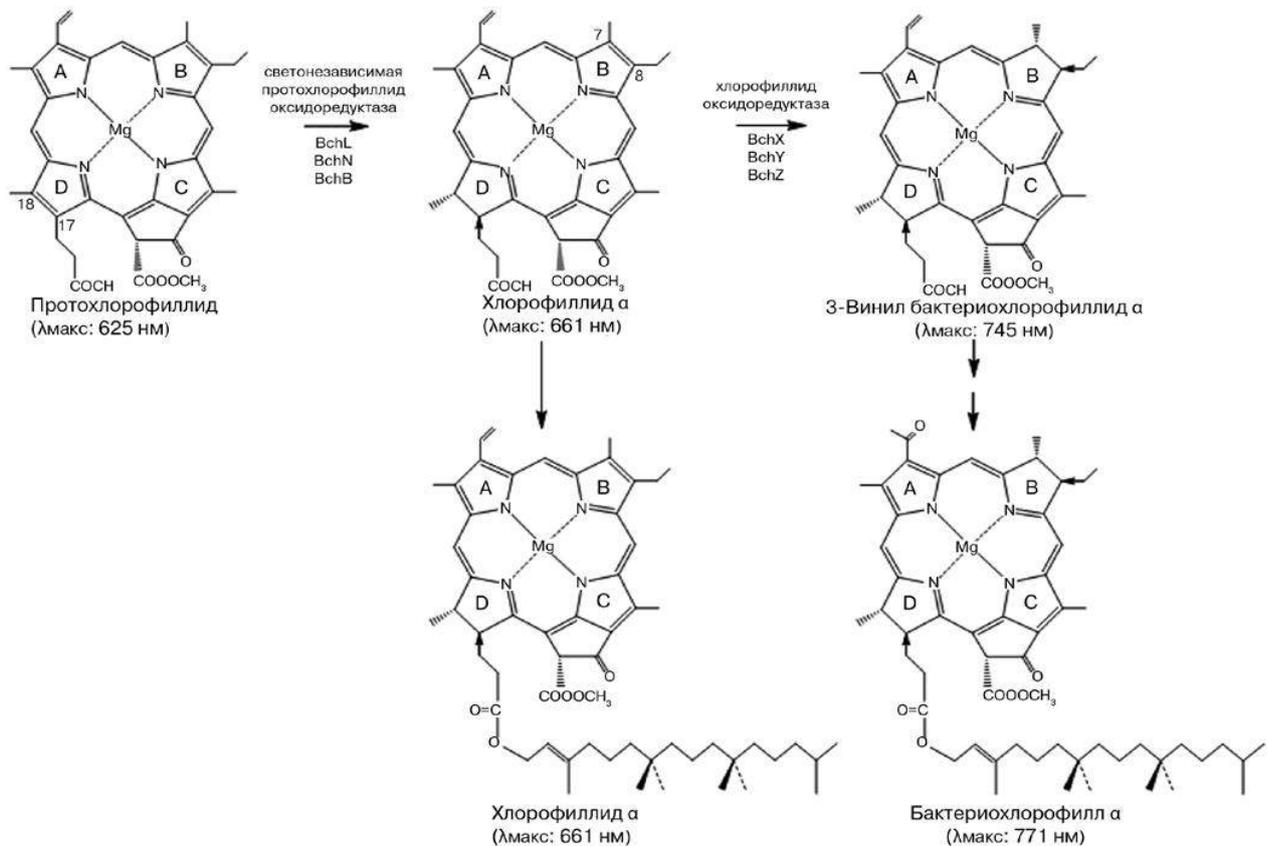


Рисунок 1.11. Синтез хлорофилла и бактериохлорофилла из протохлорофиллида (ПХЛД). У анаэробной бактерии *R. Capsulatus* циклический тетрапиррол ПХЛД превращается в ХЛД ферментом тПОР в результате восстановления двойной связи в положении С17–С18 в кольце D макроцикла, состоящем из трех субъединиц: BchLNB. Далее комплекс ХЛД-оксидоредуктазы BchXYZ, восстанавливает двойную связь в кольце В (С7–С8) с образованием бактериохлорофиллида, из которого синтезируется БХЛ а. Из ХЛДа у окислительных фотосинтетиков после присоединения фитола образуется ХЛа. В скобках указаны максимумы в спектрах поглощения пигментов

ПХЛД – субстрат реакции, которая заключается в восстановлении двойной связи в четвертом кольце молекулы в положении С₁₇–С₁₈ (рисунок. 1.11). Эта реакция может проходить в темноте и на свету. Светозависимое восстановление ПХЛД свойственно окислительным фототрофам. Темновой и светозависимый биосинтез ХЛ сосуществуют у многих организмов, в том числе цианобактерий, водорослей и голосеменных растений. Покрытосеменные растения не образуют

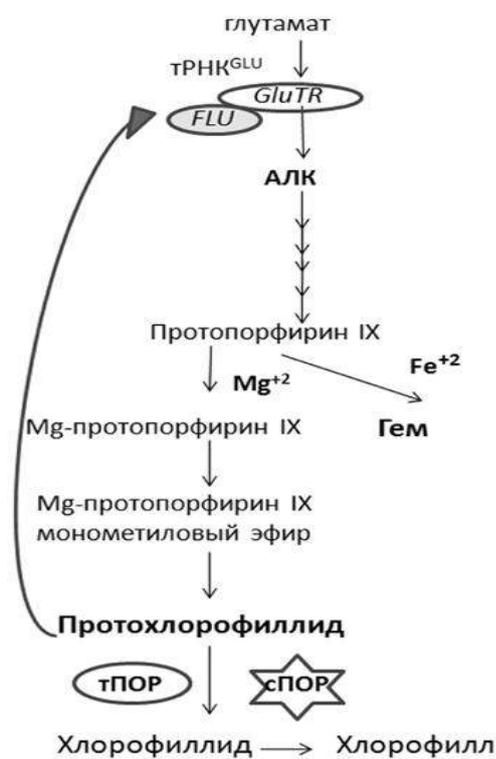


Рисунок 1.12. Схема регуляции биосинтеза ХЛ. Пигмент образуется из глутамата через серию ферментативных реакций (стрелки). АЛК - 5-аминолевулиновая кислота. Фигурная стрелка - механизм регуляции: протохлорофиллид через белок FLU репрессирует фермент GluTR-глутамат-тРНК-редуктазу.

(Wettstein et al., 1995). Первичные иголки секвойи (*Metasequoia glyptostroboides*) и вторичные иголки европейской пинии (*Pinus pinea*) сохранили способность зеленеть в темноте [Laudi and Manzini, 1975; Ou, Adamson, 1995], тогда как проростки некоторых видов лиственниц, например *Larix decidua*, ее практически утратили [Mariani et al., 1990].

1.4.2. Биосинтез хлорофиллов в темноте. Генетические исследования

Доказательства существования двух путей восстановления ПХЛД: **желтые в темноте (*yellow*) мутанты зеленых водорослей.** Предположение о наличии нескольких механизмов, обеспечивающих восстановление ПХЛД в

ХЛ в темноте. Эта способность утеряна и у некоторых голосеменных (листопадное дерево *Ginkgo biloba*, тропическая лиана *Gnetum ula* и растущая в пустынях *Welwitschia mirabilis*), а также у папоротника *Psilotum nudum*, зеленой водоросли *Euglena gracilis* и красной водоросли *Cyanidium caldarum*. Большинство аноксигенных фототрофов, включая пурпурные и зеленые бактерии, образуют БХЛ только в темноте [Armstrong, 1998]. У организмов, синтезирующих ХЛ в темноте, качественные и количественные характеристики этого процесса сильно варьируют в зависимости от стадии развития и внешних условий. Активный темновой биосинтез ХЛ, характерный для взрослых голосеменных растений, значительно снижен у их проростков

процессе биосинтеза ХЛ, было высказано еще в начале 50-х годов XX века при изучении зеленых водорослей. Классический генетический анализ выявил обширный класс так называемых желтых (*yellow*) мутантов с нарушенным темновым синтезом ХЛ, которые имели желтую окраску при выращивании в темноте, но на свету зеленели подобно этиолированным проросткам высших растений. Их пигментация в темноте обусловлена отсутствием ХЛ, накоплением ПХЛД и наличием желтых каротиноидов. Мутанты *yellow* были получены у ряда зеленых водорослей, включая *Chlorella*, *Scenedesmus* [Bogorad, 1976] и *Chlamydomonas reinhardtii*. В ядерном геноме последней найдено 8 локусов, мутации в которых вызывают появление фенотипа *yellow* [Sager, 1955; Ford and Wang, 1980; 1980a; Zhang, 2007]. Сейчас известно, что кодируемые этими генами белки не входят в состав ферментного комплекса тПОР. Эксперименты, в которых было показано, что способность мутантов *yellow* хламидомонады зеленеть на свету может быть блокирована ядерной мутацией *pc-1*, послужили поводом говорить о сосуществовании двух генетически различных (темнового и светозависимого) путей восстановления ПХЛД.

Светонезависимое восстановление ПХЛД у аноксигенных фототрофных бактерий обеспечивается продуктами генов *bchB*, *bchL* и *bchN*. Основные сведения о генетическом контроле темнового биосинтеза ХЛД из ПХЛД были получены при анализе пигментных мутантов бактерий рода *Rhodobacter*. Эти несерные пурпурные бактерии способны к аноксигенному фотосинтезу и независимо от света образуют БХЛа. Мутанты факультативных фототрофов *R. sphaeroides* и *R. capsulatus* с разными дефектами фотосинтеза и биосинтеза пигментов стали предметом генетического анализа, в результате которого был выявлен участок хромосомы протяженностью в 46 тпн, названный «фотосинтетическим генным кластером». Он состоит более чем из 40 генов, отвечающих за фотосинтетические функции [Zsebo and Hearst, 1984], и содержит

всю генетическую информацию, необходимую для синтеза БХЛ из протопорфирина IX (рисунок 1.13А).



Рисунок 1.13А. Структура фотосинтетического генного кластера *R. sphaeroides* 2.4 (по: Choundhary and Kaplan, 2000). *bch* - гены биосинтеза бактериохлорофилла. Стрелки указывают направление транскрипции генов

Среди индуцированных пигментных мутантов *R. capsulatus* были и бесхлорофильные штаммы, накапливающие ПХЛД. Их молекулярно-генетический анализ позволил найти три гена – *bchB*, *bchL* и *bchN*, мутации в которых блокируют темновое восстановление ПХЛД [Burke et al., 1993], и предположить, что кодируемые ими полипептиды являются субъединицами фермента, получившего название темновой - не зависящей от света, оксидоредуктазы (тПОР). При этом выяснилось, что ген *bchL* кодирует белок, гомологичный субъединице NifH нитрогеназы бактерий [Hearst et al., 1985].

Хлоропластный ген *frxC* - поиски функций. Одну из проблем изучения темнового биосинтеза ХЛ удалось решить путем сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей пластидных геномов печеночника *Marchantia polymorpha* и двух представителей покрытосеменных растений: табака *Nicotiana tabacum* и риса *Oryza sativa*. Большинство из них были сходными, но ОРС,

первоначально названную *frxC* (благодаря структурному сходству продукта этого гена с ферредоксином бактерий), удалось найти только в пластидном геноме *M. Polymorpha* [Ohyama et al., 1986]. Ее нуклеотидная последовательность оказалась гомологичной гену *R. capsulatus*, кодирующему NifH – γ -субъединицу нитрогеназы [Fujita et al., 1989]. Присутствие гена *frxC* в пластидном геноме печеночника казалось парадоксом, поскольку ядерные организмы не способны фиксировать молекулярный азот. В дальнейшем, когда ортологи гена *frxC* были обнаружены в пластидных геномах зеленеющих в темноте растений – сосен и зеленой водоросли *C. reinhardtii*, появились предположения, что продукты этих генов вовлечены не в процесс фиксации азота, а необходимы для восстановления ПХЛД в темноте [Lindholm and Gustafsson, 1991; Huang and Liu, 1992].

Некоторые пластидные геномы содержат гены, кодирующие ПОР. Существенную роль в изучении генетического контроля темнового биосинтеза ХЛ сыграли мутанты *yellow* хламидомонады. Помимо ядерных мутаций, у этой водоросли была описана хлоропластная мутация, приводящая к фенотипу *yellow* [Александрова, 1979]. В дальнейшем подобные мутанты получали в результате инсерционного мутагенеза [Roitgrund and Mets, 1990]. Ортологи одного из таких делетированных хлоропластных генов *gidA* хламидомонады (сокр. англ.: *nogreen-in-the-dark*) вскоре были найдены в пластидных геномах нескольких видов сосны, где они оказались сцепленными с геном *frxC* [Lindholm and Gustafsson, 1991]. Сходное взаимное расположение этих генов (рисунок 1.13Б) было установлено в пластидном геноме *M. polymorpha* и на хромосоме цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803 [Ogura et al., 1992].

Прямое участие генов *frxC* (*chlL*) и *gidA* (*chlN*) в темновом биосинтезе ХЛ удалось показать при анализе фенотипов инсерционных мутантов *C. reinhardtii* [Suzuki and Bauer, 1992; Choquet et al., 1992] и азотфиксирующей цианобактерии *Plectonema boryanum* – *Lyngbya* sp. PCC7419 [Fujita et al., 1992; 1993]. Более того, как и в случае с гомологией продукта гена *chlL* и полипептида NifH было

установлено, что белок, кодируемый геном *chlN*, имеет высокую степень сходства с белками NifD и NifK, являющимися α - и β -субъединицами MoFe-белка нитрогеназы бактерий [Fujita et al., 1993].

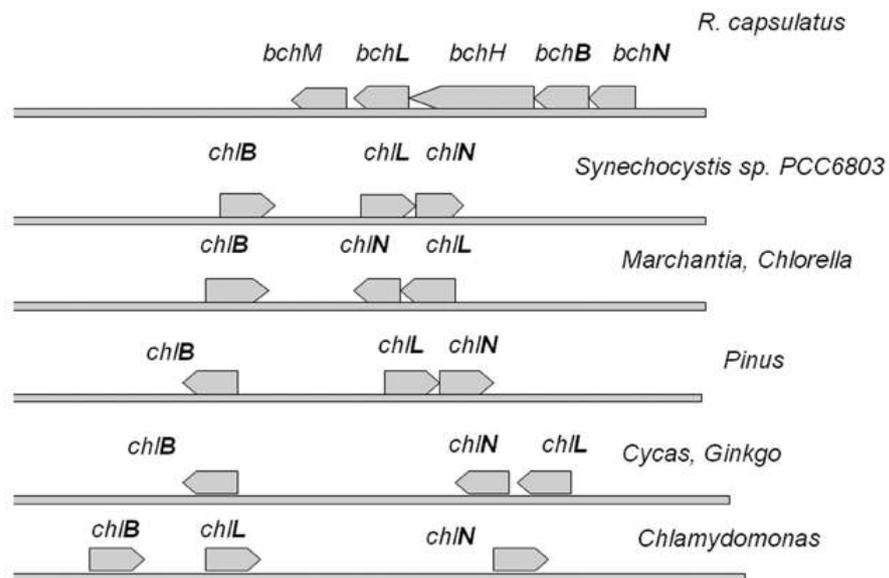


Рисунок 1.13Б. Структурное расположение генов, кодирующих тПОР.

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

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

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

Способность зеленеть в темноте коррелирует с наличием генов chlB, chlL и chlN в хлоропластных геномах. Коль скоро было установлено, что хлоропластные гены: *chlB*, *chlL* и *chlN* контролируют темновое восстановление ПХЛД, возник вопрос, - коррелирует ли наличие этих генов со способностью образовывать ХЛ в темноте? ДНК-ДНК гибридизация, основанные на ПЦР методы идентификации определенных участков ДНК и прямое сравнение нуклеотидных последовательностей хлоропластных геномов – все эти методы были использованы для поисков генов *chlB*, *chlL* и *chlN* у различных фотосинтезирующих организмов. В геномах всех изученных к настоящему времени покрытосеменных растений их не обнаружено. В то же время они найдены в хлоропластной ДНК голосеменных растений, за исключением представителей семейства гнетофитов – гнетума (*Gnetum gnemon*) и вельвичии удивительной (*Welwitschia mirabilis*), не зеленеющих в темноте, папоротникообразных (кроме усатых папоротников) и водорослей. Не оказалось этих генов у *E. gracilis* и бурой водоросли *Odontella sinensis*, которые не синтезируют ХЛ в темноте [Armstrong, 1998]. Таким образом, выяснилось, что для темнового синтеза ХЛД из ПХЛД необходимо наличие в хлоропластных геномах генов *chlB*, *chlL* и *chlN*. Исключением из этого правила является гинкго двулопастный (*Ginlgo biloba*) - реликтовый представитель голосеменных, проростки и листья которого не способны зеленеть в темноте, несмотря на наличие всех трех генов [Richard et al., 1994; Mc Coy et al., 2008]. Объяснения этому феномену до сих пор не найдено.

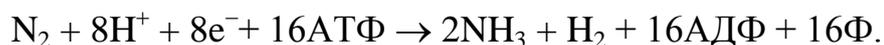
Регуляция синтеза тПОР. Данные о регуляции экспрессии генов, кодирующих субъединицы тПОР, пока очень фрагментарны и сильно различаются в зависимости от таксономической принадлежности изучаемого организма. Транскрипция гена *chlL* у цианобактерии *P. boranyum* имеет место только при подавлении нитрогеназной активности [Fujita et al., 1991]. Этот факт позволил заключить, что связанный азот и (или) молекулярный кислород, которые ингибируют фиксацию азота – необходимые предпосылки экспрессии этого гена у цианобактерий.

Транскрипты хлоропластных генов *chlB*, *chlL* и *chlN* хламидомонады одинаково присутствуют в клетках дикого типа и мутантов *yellow*, растущих и на свету и в темноте, хотя уровень их накопления при освещении оказывается в 2-4 раза выше. Белки ChlN и ChlB также выявляются в сходных количествах в клетках дикого типа и мутантов *yellow*, растущих и на свету и в темноте, а белок ChlL - только у дикого типа в темноте. Ядерные мутанты *yellow* не содержат белка ChlL за исключением мутанта *y-7*, который синтезирует иммунореактивный полипептид меньшего размера [Cahoon and Timko, 2000]. На основе этих результатов был сделан вывод, что у *C. reinhardtii* синтез белка ChlL негативно регулируется светом, а ядерные гены *yellow* контролируют его образование или накопление.

В клетках мха печеночника *Marchantia paleacea*, которые одинаково хорошо зеленеют в темноте и при освещении, содержание мРНК генов *chlB*, *chlL* и *chlN* не зависит от света [Takio and Satoh, 1995]. Изучение регуляции темнового биосинтеза ХЛ у зеленых в темноте проростков ели *Piceaabies* и лиственницы *L. decidua*, способных накапливать ХЛ в темноте только на ранних стадиях онтогенеза, показало, что у обоих видов гены, кодирующие тПОР, экспрессируются конститутивно. Различия были найдены на уровне белков, – пожелтение проростков лиственницы оказалось обусловленным снижением уровня содержания белка CHLB [Demko et al., 2009].

тПОР сходны с нитрогеназами бактерий. Структура тПОР консервативна. Она сохранялась в течение миллиардов лет эволюции. Идентичность аминокислотной последовательности белков BchL, BchV и BchN у *R. capsulatus* с тПОР цианобактерий, зеленых водорослей, папоротникообразных и голосеменных растений составляет 30–60%. При этом они имеют значительное сходство с субъединицами нитрогеназы эубактерий NifHDK [Fujita and Bauer, 2000].

Нитрогеназа – это чувствительный к кислороду ферментный комплекс, встречающийся только у прокариот, который восстанавливает молекулярный азот с использованием АТФ и донора электронов:



Голофермент состоит из двух компонентов: Fe-белка и MoFe-белка (рисунок 1.14). Fe-белок – это электрон-донорный гомодимер массой около 64 kDa, кодируемый геном *nifH*. Он имеет два Mg-АТФ-связывающих сайта и содержит чувствительный к кислороду [Fe₄S₄]-кластер, лигандированный четырьмя остатками цистеина, - по два от каждого мономера. MoFe-белок - гетеротетрамер массой около 230 kDa, состоящий из субъединиц NifD и NifK. Каждая пара субъединиц содержит P-кластер [Fe₈S₈] и Fe-Mo кофактор [Fe₇MoS₉]. Донором электронов служит восстановленный ферредоксин - маленький растворимый

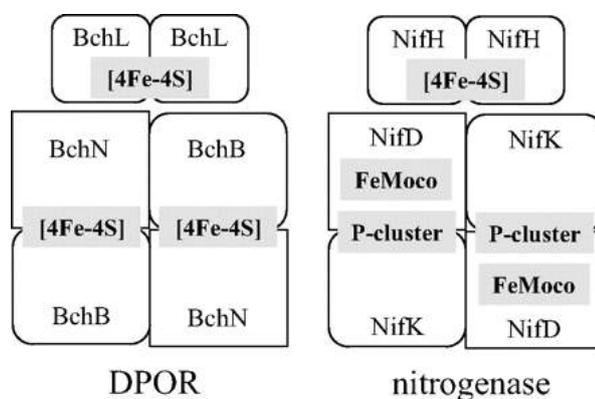


Рисунок 1.14. Структурное сходство нитрогеназы и тПОР (DPOR) (Схематические модели ферментов даны по: Bröcker et al., 2008)

белок (11 кДа), содержащий кластер [2Fe-2S] как простетическую группу. Вслед за гидролизом молекул Mg-АТФ, Fe-белок переносит электроны от ферредоксина через Р-кластеры к Мо-содержащим редокс-центрам тетрамера NifD_2K_2 , а тот, в свою очередь, трижды отдает пару электронов молекуле субстрата, восстанавливая ее до двух молекул аммиака [Rubio and Ludden, 2005]. При обилии полученных в течение последних 50 лет генетических и молекулярно-генетических данных о темновом восстановлении ПХЛД, исследования биохимии этого процесса начались сравнительно недавно.

Из клеток *R. capsulatus* удалось изолировать тПОР, и ее активность была изучена *in vitro*. Экстракты субъединиц тПОР получали в результате сверхэкспрессии генов *bchL* и *bchN-B*, введенных в геном *R. capsulatus* с помощью сконструированных плазмид (Nomata et al., 2005). Авторы установили, что фермент состоит из двух компонентов: L-белка и NB-белка, и для его активности необходимы АТФ и донор электронов. Данные хроматографии свидетельствовали, что первый из них существует как гомодимер $(bchL)_2$, а второй - как гетеротетрамер $(bchN)_2(bchB)_2$ с молекулярной массой 67 kDa и 200 kDa, соответственно. Молекулярная масса белков: L, N, и B, рассчитанная по аминокислотной последовательности продуктов кодирующих их генов, составляет 36, 48 и 57 kDa, соответственно. Основываясь на сходстве тПОР с нитрогеназами (рисунок 1.14), авторы предположили, что L-белок функционирует как АТФ-зависимый донор электронов для NB-белка, который содержит каталитический сайт для редукции ПХЛДа. Действительно, в соответствии с недавно установленной кристаллической структурой тПОР *R.capsulatus*, каждая каталитическая единица BchN-BchB содержит один ПХЛД и один $[\text{Fe}_4\text{S}_4]$ кластер, лигандированный остатком аспартата и тремя цистеинами остатками (Muraki et al., 2010). В присутствии АТФ L-белок $(BchL)_2$ передает 2 электрона от ферредоксина на NB-белок $(BchN-BchB)_2$, который содержит каталитический сайт для восстановления ПХЛД. Пространственная структура NB кластера и ПХЛД оказались соответственно идентичными Р-кластеру и кофактору Fe-Мо в МоFe-

белке нитрогеназы (рисунок 1.14). Сходство пространственных структур обоих ферментов свидетельствует, что субъединицы ChlL, ChlB и ChlN оказались функционально сходными с субъединицами нитрогеназы бактерий NifH, NifK и NifD.

Подобно нитрогеназам, тПОР цианобактерий чувствительна к кислороду. В опытах *in vitro* O₂ ингибировал активность белков ChlL и ChlN-ChlB в течение 5 и 30 минут, соответственно [Yamamoto et al., 2009]. По-видимому, кислородные фототрофы научились защищать тПОР от воздействия O₂, и природу соответствующих регуляторных механизмов еще предстоит выяснить.

В клетках пурпурной бактерии *R. capsulatus* найден еще один фермент, похожий на нитрогеназу – это хлорофиллид-оксидоредуктаза (ХОР), кодируемая генами *bchXYZ* (рисунок 1.11), которая превращает ХЛДа в БХЛа [Nomata, 2006]. Аминокислотная последовательность полипептида BchX сходна с таковой субъединицы NifH нитрогеназы и имеет 32% идентичности с продуктом гена *bchL*. Более того, BchY и BchZ – две другие субъединицы ХОР – гомологичны белкам BchN/ChlN и BchB/ChlB, соответственно. Структурное и функциональное сходство ферментных комплексов тПОР (BchL,N,B) и ХОР (BchX,Y,Z) у *R. capsulatus* дает основания говорить об общности их происхождения. Вероятно, они появились в результате дупликации и дивергенции предковых генов, кодирующих менее специфичные по отношению к субстрату ферменты, способные восстанавливать ПХЛД [Raymond et al., 2004].

1.4.3. Светозависимый биосинтез хлорофиллида

Проростки высших растений, выращенные в темноте, окрашены в желтый цвет и морфологически отличаются от зеленых, растущих на свету. Их хлоропласты не содержат тилакоидов и хлорофилла, биосинтез которого остановлен на стадии образования ПХЛД, и представляют собой этиопласты с проламеллярным телом и отходящими от него протилакоидами, на которых аккумулируются стабильные комплексы сПОР (рисунок 1.15А).

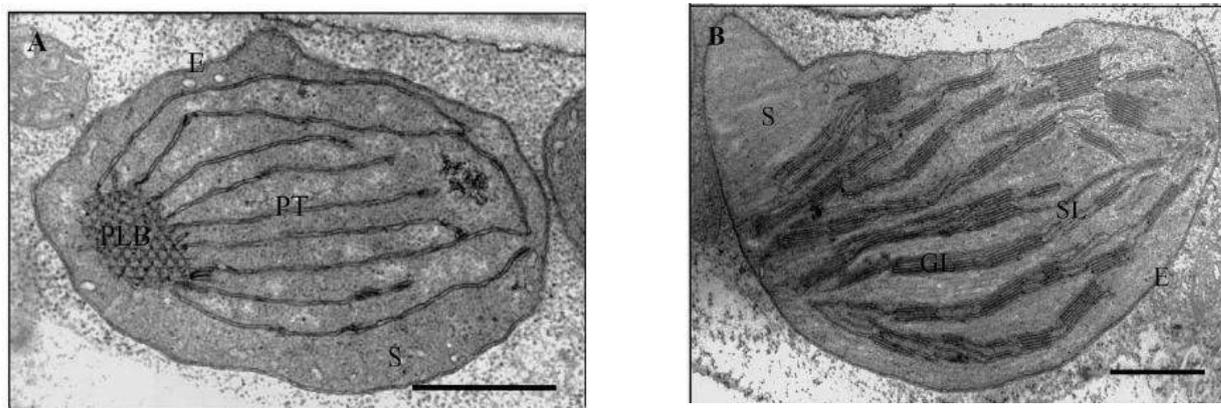


Рисунок 1.15. Электронные микрофотографии пластид из листьев гороха.

Пластиды имеют двухслойную оболочку (E), окружающую строму (S) (по: Aronsson et al., 2003). **1.15А.** Этиопласт из проростков, выращенных в темноте. Внутренние мембраны этиопластов состоят из проламеллярного тела (PLB) с отростками протилакоидов (PT). **1.15В.** Хлоропласт зеленого листа. Внутренняя мембрана представляет собой хорошо разветвленную систему тилакоидов, состоящих из ламелл гран (LG) и ламелл стромы (LS). Линейка – 1 μm

В клетках таких этиолированных проростков свет запускает процесс зеленения: ПХЛД превращается в ХЛД и далее в ХЛ; затем ПОР перемещается в протилакоиды [Ryberg and Dehesh, 1986], и происходит дифференциация этиопластов в хлоропласты, когда проламеллярные тела и протилакоиды трансформируются в тилакоиды с развитой ламеллярной системой (рис. 1.15В). Стартовым механизмом этих структурно-функциональных изменений служит рецепция света сПОР. К настоящему времени он подробно описан [Lebedev and Timko, 1998; Беляева, 2009], и здесь мы остановимся лишь на кратком изложении истории открытия сПОР и генетических аспектах его исследований.

Генетический контроль фотопревращения ПХЛД. Впервые о выделении из этиопластов пигмент-белкового комплекса, в отсутствие которого не происходит восстановление ПХЛД, сообщили А.А. Красновский [Красновский, 1952], и Смит с Бенитезом [Smith and Benitez, 1953], которые назвали его «протохлорофиллид-голохромом». Установление корреляции между уменьшением содержания ПХЛД и увеличением содержания ХЛД при освещении

этиолированных листьев в условиях низких температур [Smith and Trench, 1958] давали основания предполагать, что голохромный белок является фотозависимой редуктазой. Эта гипотеза получила подтверждение в конце 70-х годов, когда сПОР молекулярной массой 36 kDa была выделена из проростков ячменя [ApeI et al., 1980], а затем других растений. Ген *Por* ячменя, который кодирует сПОР, был клонирован первым среди генов, контролирующих биосинтез ХЛ у растений [Schulz et al., 1989]. Авторам удалось выделить сПОР в количестве, достаточном для создания антител, которые были использованы для поисков гена этого фермента в библиотеке кДНК. В дальнейшем этот ген был идентифицирован у разных растений: пшеницы, овса, гороха, арабидопсиса и сосны, а также у хламидомонады и цианобактерии *Synechocystis* sp. [Reinbothe, Reinbothe, 1996].

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

Несколько генов, кодирующих изоформы белка ПОР (*PORA*, *PORB*, *PORC*) имеются у *A. thaliana* [Oosawa et al., 2000], ячменя [Holtorf et al., 1995], и некоторых видов голосеменных растений [Skinner, 1999], тогда как в геноме цианобактерий и хламидомонады [Li and Timko, 1996] он мономорфен. У всех изученных растений гены *POR* по-разному регулируются светом. Он ингибирует экспрессию *PORA* - ген активно транскрибируется только в этиолированных

проростках, и активирует экспрессию генов *PORB* и *PORC* при переносе растений из темноты на свет [Frick et al., 2003]. Роль различных изоформ сПОР и кодирующих их генов в превращении ПХЛД в ХЛД, в биогенезе тилакоидов, в формировании комплекса сПОР, защите от фотоокисления и в процессе зеленения в настоящее время усиленно изучается [Литвин и Беляева, 2007; Беляева, 2009; Masuda and Takamiya, 2005].

Молекулярная структура белка сПОР. Продукт первого из клонированных генов *Por1* ячменя – это белок из 388 аминокислотных остатков с хлоропластным транзитным пептидом размером 74 ак [Schulz et al., 1989]. В дальнейшем, гены, кодирующие сПОР, были изолированы из организмов, относящихся к разным таксономическим группам, от цианобактерий до высших растений [Schoefs and Franck, 2003]. Первичная структура кодируемых ими белков характеризуется высоким содержанием аминокислот с основными свойствами и большим количеством гидрофобных аминокислотных остатков. Молекулы всех, известных к настоящему времени, сПОР содержат 4 консервативных остатка цистеина (у гороха - в позициях 119, 170, 280 и 307), один из которых может быть вовлечен в связывание с ПХЛД (рисунок 1.16). Вторичная структура сПОР установлена на основе спектров кругового дихроизма мономерного белка - его молекула состоит из 8–9 α -спиралей (33%), 7 β -цепей (19%), 20% поворотов и 28% случайных петель [Birve et al., 1996]. Показано, что молекула сПОР присоединяется к мембране двухсторонними сегментами, содержащими остатки триптофана, локализованного около С-конца, или гидрофобными петлями. Сравнение структуры сПОР со структурой других НАДФ-зависимых белков позволило отнести этот фермент к семейству алкогольдегидрогеназ [Beale, 1999]. Ферменты этого семейства катализируют НАДФ(Н)-зависимые реакции, включающие перенос гидрид-иона и протона. Определение кристаллической структуры некоторых из представителей семейства позволило создать гомологическую модель функционирования сПОР.

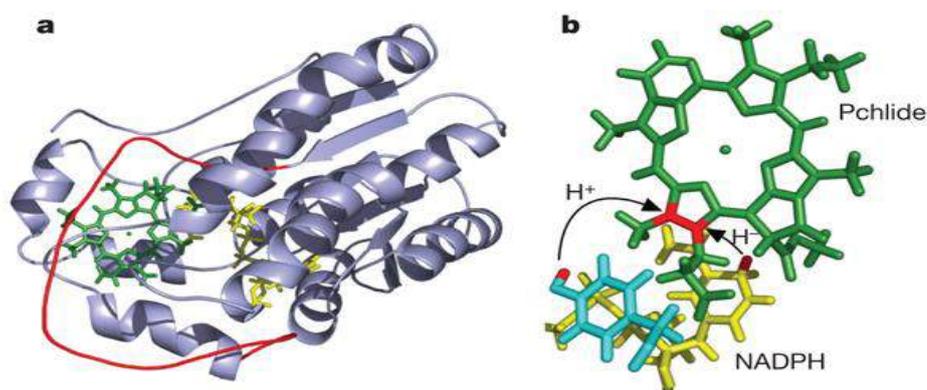


Рисунок 1.16. Трехмерная модель структуры комплекса сПОР-ПХЛД-НАДФН *Synechocystis* (по: Sytina et al., 2008). **1.16a.** В молекуле сПОР центральный β -слой, состоящий из 7-ми β -тяжей, окружен девятью α -спиралями. Уникальная для сПОР внешняя петля из 33 аминокислотных остатков (красный цвет), по-видимому, вовлечена в связывание с протохлорофиллидом (зеленый цвет). **1.16b.** Модель каталитической реакции. Реакция фотохимической гидрогенизации полуизолированной двойной связи C17–C18 в кольце D молекулы ПХЛД происходит за счет протона от Tyr189 и водорода от НАДФН

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

Транскрипты ядерных генов, кодирующих сПОР, обычно накапливаются в цитозоле около поверхности пластид [Marrison et al., 1996], где и происходит их трансляция на 80S рибосомах [Batschauer et al., 1982]. Молекулы пре-сПОР, содержащие хлоропластные транзитные пептиды, транспортируются в хлоропласты. В это время они взаимодействуют с белками РТС (сокр. англ.: *protochlorophyllide-dependent translocation complex*), которые являются компонентами Тос/Тис-транслоконов - комплексов, которые расположены по обе

стороны оболочки хлоропласта и обеспечивают импорт белков из цитоплазмы [Reinbothe et al., 2004; 2005]. Существование ПХЛД-зависимых транслоконов [Schemenewitz et al., 2007] подтвердило обсуждаемую с 1995 г. гипотезу об участии ПХЛД в регуляции транспорта белков в хлоропласт [Reinbothe et al., 1995]. Установлено, что для ассоциации сПОР с тилакоидами в качестве кофактора необходим НАДФ [Dahlin et al., 1999]. Возможная роль в этом процессе вторичной структуры сПОР активно обсуждается [Беляева, Литвин, 2007; Aronsson et al., 2003].

Если этиолированные проростки покрытосеменных растений осветить в течение нескольких часов, а затем снова поместить их в темноту, они продолжают синтезировать ХЛ на уровне 20–30% нормы [Popov and Dilova, 1969; Adamson et al., 1985]. Отвечая на вопрос, каким образом осуществляется этот синтез в отсутствие тПОР, Раскин и Шварц [Raskin and Schwartz, 2003] установили, что ингибирование аскорбат-пероксидазы салициловой кислотой ведет к прекращению темнового синтеза ХЛ у ячменя. Они предположили, что в темноте превращение ПХЛД в ХЛД может осуществлять и сПОР, которая использует электроны, полученные от аскорбата. Методом низкотемпературной спектроскопии показали, что каталитический механизм сПОР включает две промежуточные стадии, не требующие света, которые могут быть связаны с изменением положения или конформации молекулы фермента [Heyes et al., 2003].

Происхождение и эволюция ПОР. Первоначально полагали, что сПОР появилась в процессе эволюции только у покрытосеменных растений, однако, в 90-х годах XX века выяснилось, что геномы цианобактерий и водорослей также содержат гены этого фермента (рисунок 1.17). У цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC6803 он был обнаружен как ген, который, будучи трансформирован, комплементирует мутацию, подобную той, что блокирует тПОР у *R. cupsulatus* [Suzuki and Bauer, 1995]. Аминокислотная последовательность белка, кодируемого этим геном, оказалась сходной с аминокислотной

последовательностью сПОР высших растений. Филогения субъединиц сПОР и близких к ней ферментов семейства короткоцепочечных дегидрогеназ/редуктаз свидетельствовала, что эволюционная история генов сПОР началась с цианобактерий (рисунок 1.17), а эукариоты получили их в результате эндосимбиотического горизонтального переноса, случившегося до момента дивергенции фототрофных ядерных организмов [Yang and Chen, 2004; Fong and Archibald, 2008]. Молекулярная филогения тПОР однозначно свидетельствует

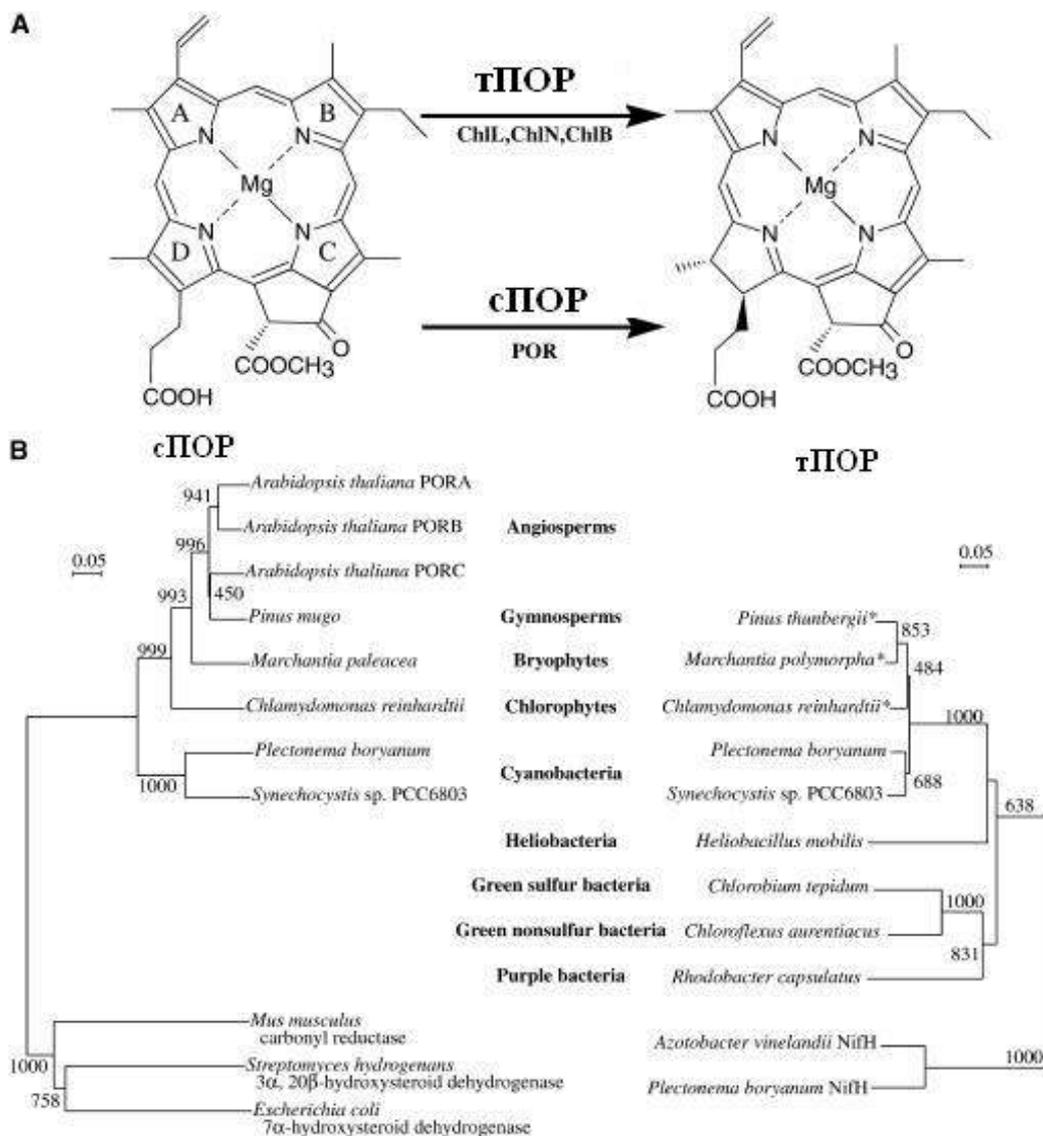


Рисунок 1.17. Молекулярная филогения тПОР и сПОР (по: Yamazaki et al., 2006)

о происхождении кодирующих его генов от нитрогеназ бактерий [Xiong et al., 2000; Yamazaki et al., 2006].

1.4.4. Эффективность биосинтеза хлорофиллов в темноте и на свету

Первичная оценка эффективности темнового и светового биосинтеза ХЛ может быть дана путем измерения уровня этих пигментов в клетках дикого типа и бесхлорофильных мутантов, выращенных в темноте и на свету. При изучении влияния освещения на накопление ХЛ у нескольких видов сосны было установлено, что в темноте 14–22-х дневные проростки *Pinus (P.) taeda* [Griffiths, 1991], *P. thunbergii* [Shinohara et al., 1992] и *P. sylvestris* [Drumm-Herrel and Mohr, 1994] синтезируют 20–25% светового уровня ХЛ. У мутантов цианобактерий с неактивным комплексом тПОР на свету полностью восстанавливается уровень содержания ХЛ за счет активности сПОР. У мутантов *P. boryanum* с дефектными генами *chlL*, *chlM* и *chlN* скорости накопления ХЛ при фототрофном росте так же, как и в хемогетеротрофных условиях в темноте, были сходны с таковыми у штаммов дикого типа [Fujita et al., 1998]. Аналогичные результаты были получены на мутантах *Synechocystis* sp. по генам *chlL* и *chlN* [Wu and Verma, 1995]; свидетельствуя, что светонезависимый биосинтез ХЛ не является необходимым для световых культур цианобактерий.

Многие *yellow*-мутанты хламидомонады (как ядерные, так и хлоропластные) при росте на свету накапливают меньше ХЛ, чем штаммы дикого типа. В зависимости от генотипа его содержания снижается до 35% (мутант у-5) и 78–98% (мутант у-1а) от уровня дикого типа [Ford and Wang, 1980; Ford et al., 1981]. Клетки мутанта *ps-1 C. reinhardtii*, у которого не функционирует сПОР, в темноте содержат наполовину меньше ХЛ, чем штаммы дикого типа, выращенные в сходных условиях [Ford et al., 1981; 1983; Li and Timko, 1996]. Возможно, что отсутствие светозависимого фермента каким-то образом снижает уровень темнового синтеза ХЛ, оказывая влияние либо на активность тПОР, либо на содержание ПХЛД. На свету этот мутант накапливает 36% ХЛ дикого типа.

По-видимому, такой уровень пигмента обеспечивается активностью тПОР. Способность мутанта *ps-1* накапливать на свету втрое больше ХЛ, чем в темноте, позволяет предположить, что светонезависимая редукция ПХЛД может позитивно регулироваться светом.

1.4.5. Проблемы и перспективы изучения темновго синтеза хлорофилла

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

Подобно ДНК-фотолазе [Begly, 1994], сПОР – это фотоэнзим, или фермент, которому для проявления каталитической активности необходим свет. Она относится к семейству дегидрогеназ/редуктаз короткоцепочечных спиртов и так же, как тПОР, имеет прокариотное происхождение. Основываясь на филогенетическом анализе и характере распределения тПОР и сПОР среди фототрофных организмов, можно предположить, что присущая аноксигенным бактериям тПОР – более архаичная ферментная система, имеющая общее происхождение с нитрогеназой. В процессе эволюции сПОР, по-видимому, появилась вместе с оксигенной фототрофией в ответ на увеличение содержания O_2 в атмосфере, что компенсировало потерю активности чувствительной к кислороду тПОР [Schoefs and Franck, 2003; Fujita et al., 2006].

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

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

Для аэробных фотосинтетиков сПОР имеет несколько очевидных преимуществ перед тПОР:

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

По-видимому, эти преимущества стали причиной перехода покрытосеменных растений к светозависимому синтезу ХЛ в условиях кислородного фотосинтеза, что сопровождалось потерей генов, кодирующих тПОР. Для адаптации к разным условиям освещения некоторые растения, например арабидопсис, взамен утраченной тПОР обзавелись несколькими гомологичными генами сПОР (*PORA*, *PORB* и *PORC*), экспрессия которых по-разному зависит от света и наличия НАДФ(Н) [Kim and Apel, 2004]. Следует отметить, что свет и кислород оказывают критическое влияние на жизнь фотосинтезирующих организмов и, по-видимому, являются основными факторами эволюции фототрофов, которая шла в направлении адаптации к этим изменяющимся параметрам внешней среды. Более архаичный темновой биосинтез ХЛ сформировался в анаэробных условиях, а затем эволюция ХЛ-синтезирующих организмов шла по пути адаптации к увеличению интенсивности света (при переходе из воды на сушу) и содержания кислорода.

В то время как сПОР изучена довольно подробно [Беляева, 2009], современные знания о темновом биосинтезе ХЛ, так же, как и сведения о механизмах адаптации растительной клетки к свету крайне немногочисленны. В культурах штаммов хламидомонады, растущих на свету, мутации *yellow* спонтанно возникают с высокой частотой (10^{-3} – 10^{-4}). По-видимому, в фототрофных условиях потеря тПОР дает селективное преимущество, и наличие ядерных генов *yellow*, мутации по которым блокируют темновое восстановление ПХЛД, необходимо для регуляции активности тПОР [Cahoon and Timko, 2000].

Биологическая природа и механизмы действия этих регуляторов крайне интересны, но пока неизвестны.

Темновой биосинтез ХЛ обеспечивается не только генами, контролирующими накопление и регуляцию тПОР. Помимо мутантов *yellow*, у хламидомонады описан иной тип бесхлорофилльных зеленеющих на свету мутантов по темновому биосинтезу ХЛ, которые накапливают в темноте протопорфирин IX – более ранний, чем ПХЛД, предшественник ХЛ [Wang et al., 1974; Чекунова и Квитко, 1986; Шалыго и др., 1990]. Комплексное генетико-биохимическое исследование этих мутантов *Vrc-1* и *Lts3* позволило найти специфичный для эукариот транскрипционный фактор *LTS3* семейства *ZnF_GATA*, необходимый для экспрессии в темноте генов, кодирующих магний-хелатазу – фермент, функционирующий на более раннем, чем ПОР этапе биосинтеза ХЛ [Чекунова, и Савельева, 2010]. Обнаружение этого фактора свидетельствует, что независимый от света биосинтез тетрапирролов в фотосинтезирующей клетке обеспечивается и путем транскрипционной регуляции генов, кодирующих магний-хелатазу.

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

1.5. Катаболизм хлорофиллов

Деградацию хлорофиллов можно наблюдать как потерю зеленой окраски (пожелтение) в разные периоды жизни растений: во время старения, созревания плодов и/или при гибели листьев в результате внешних повреждений, включая экстремальные температуры и воздействия патогенов. Быстрое разрушение свободных хлорофиллов – адаптивное свойство, которое предотвращает

фотодинамические повреждения, способствуя выживанию клетки в условиях освещения. Ежегодно на земле деградации подвергается около 1,2 млрд. тонн хлорофиллов [Hendry et al., 1987]. Механизмы этого процесса до середины 80-х годов 20 столетия оставались малоизвестными [Matile et al., 1996]. Решающую роль в их изучении сыграли мутанты с нарушенным катаболизмом пигмента. Их исследования привели к обнаружению ферментов деградации хлорофиллов (рисунок 1.18) и кодирующих их генов [Hörtensteiner, 1999; 2006].

Хлорофиллы разрушаются до водорастворимых бесцветных форм, которые накапливаются в вакуолях. Продукты их распада были установлены методами хроматографии при сравнительных исследованиях пигментного состава желтеющих в темноте (в процессе старения) нормальных растений и мутантов, сохраняющих в этих условиях зеленую окраску. Среди множества продуктов деградации ^{14}C -меченных хлорофиллов были обнаружены три формы, которые накапливались в листьях мутантов: фитолы, красные водорастворимые тетрапирролы и бесцветные катаболиты хлорофилла, представленные двумя группами - флуоресцирующие и нефлуоресцирующие [Matile et al., 1996].

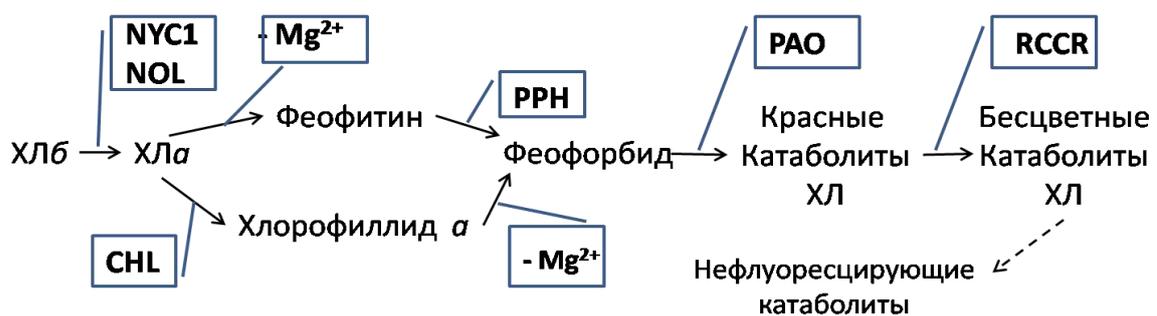


Рисунок 1.18. Пути деградации молекул хлорофиллов (ХЛ). В рамочках указаны ферменты: хлорофиллаза (CHL), магний-дехелатаза ($-\text{Mg}^{2+}$), феофитиназа (PPH), феофорбид а-оксигеназа (PAO), редуктаза красных катаболитов ХЛ (RCCR), хлорофилл б-дегидрогеназа/редуктаза (NYC1), и хлорофилл б-редуктаза (NOL)

1.5.1. Образование окрашенных катаболитов хлорофиллов

Деградация хлорофиллов (ХЛ) начинается с потери «фитольного хвоста» и центрального атома магния, в результате чего образуются светло-зеленые пигменты феофорбиды. Мутанты с нарушениями этих реакций не имеют собственного фенотипа, и стратегия поиска мутантных генов, как правило, строится на анализе первичной структуры молекулы кодируемого ими фермента. На ее основе создают праймеры для амплификации фрагментов гена интереса, которые далее используют в качестве зондов для поиска кДНК и геномной ДНК этих генов в соответствующих библиотеках.

Хлорофиллаза — один из первых ферментов, выделенных из растений [Willstatter and Stoll, 1913], - осуществляет гидролиз ХЛ с образованием хлорофиллида «а» и фитола (рисунок 1.18). К концу 20 века этот белок был изучен методами биохимии. Информация о его первичной структуре дала возможность осуществить поиск кодирующего его гена, — в 1999 году были опубликованы результаты клонирования генов хлорофиллазы арабидопсиса (*AtCLH1*) и лимона (*CHLASE1*) [Tsuchiya et al., 1999; Jakob-Wilk et al., 1999]. Вскоре была найдена еще одна хлорофиллаза арабидопсиса - *CLH2*, и показано, что мутанты, лишенные обоих ферментов, способны к деградации хлорофилла [Schen et al., 2007]. Эти данные заставили вновь начать поиск фермента хлоропласта, необходимого для катаболизма ХЛ во время старения листьев. Такой белок – феофитиназа (*Pheophytinase*, *PPH*), был найден благодаря методам биоинформатики и обратной генетики [Schelbert et al., 2009]. Зная функции фермента, авторы нашли в протеоме арабидопсиса 462 α/β -гидролаз, из которых 30 имели хлоропластную локализацию. Экспрессия генов трех из этих белков активировалась в период старения, а среди инсерционных (Т-ДНК) мутантов по этим трем генам только один имел мутантный (*staygreen*) фенотип. Фермент, который кодирует этот разрушенный вставкой ген - *PPH*, оказался способным

отщеплять фитол от молекул феофитина (хлорофиллов, не содержащих магния), но не хлорофилла.

В результате изъятия магния из порфиринового кольца ферментом магний-дехелатаза образуется феофорбид «а». К настоящему времени этот фермент не выделен, хотя накоплены данные об его активности и локализации [Suzuki et al., 2005]. Обнаружение феофитиназы позволило предположить, что деградация ХЛ начинается с потери ионов магния, а образующийся при этом феофитин теряет фитол, превращаясь в феофорбид, под действием фермента РРН (рисунок 1.19).

1.5.2. Образование неокрашенных катаболитов

Потеря зеленой окраски листьев в процессе деградации ХЛ связана с кислород-зависимым «раскрытием» порфиринового кольца ПХЛД и его последующей редукцией ферментами: феофорбид а оксигеназой (pheophorbide A oxygenase – PAO) и редуктазой красных катаболитов хлорофилла (red chlorophyll catabolite reductase – RCCR). Мутанты, с нарушениями катаболизма ХЛ на этапах образования неокрашенных форм, как правило, сохраняют зеленую окраску в условиях, где растения дикого типа теряют хлорофилл, и называются *sgr* (*staygreen* - остающиеся зелеными). Фенотип такого мутанта риса *Glutinous japonica* оказался обусловлен рецессивной мутацией в гене, соответственно названном *SGR* [Cha et al., 2002]. Вскоре были найдены его ортологи: у овсяницы луговой *Festuca pratensis* (*Senescence-induced-deficiency*), арабидопсиса – (*Nonyellowing*), у томатов (*Greenfresh*) и перцев (*Chlorophyll retainer*) [Armstead et al., 2006; Ren et al., 2007; Barry et al., 2008]. Ген, затронутый мутацией *sgr* у гороха, был идентифицирован как менделевский ген зеленой окраски семян [Armstead et al., 2007; Sato et al., 2007]. Для поиска гена *SGR* риса была использована стратегия позиционного клонирования [Jiang et al., 2007] и показано, что белок *SGR* не является ферментом PAO, а регулирует катаболизм ХЛ, вызывая разрушение хлорофилл-связывающих белковых комплексов ПБЛК 2 [Aubry et al., 2008].

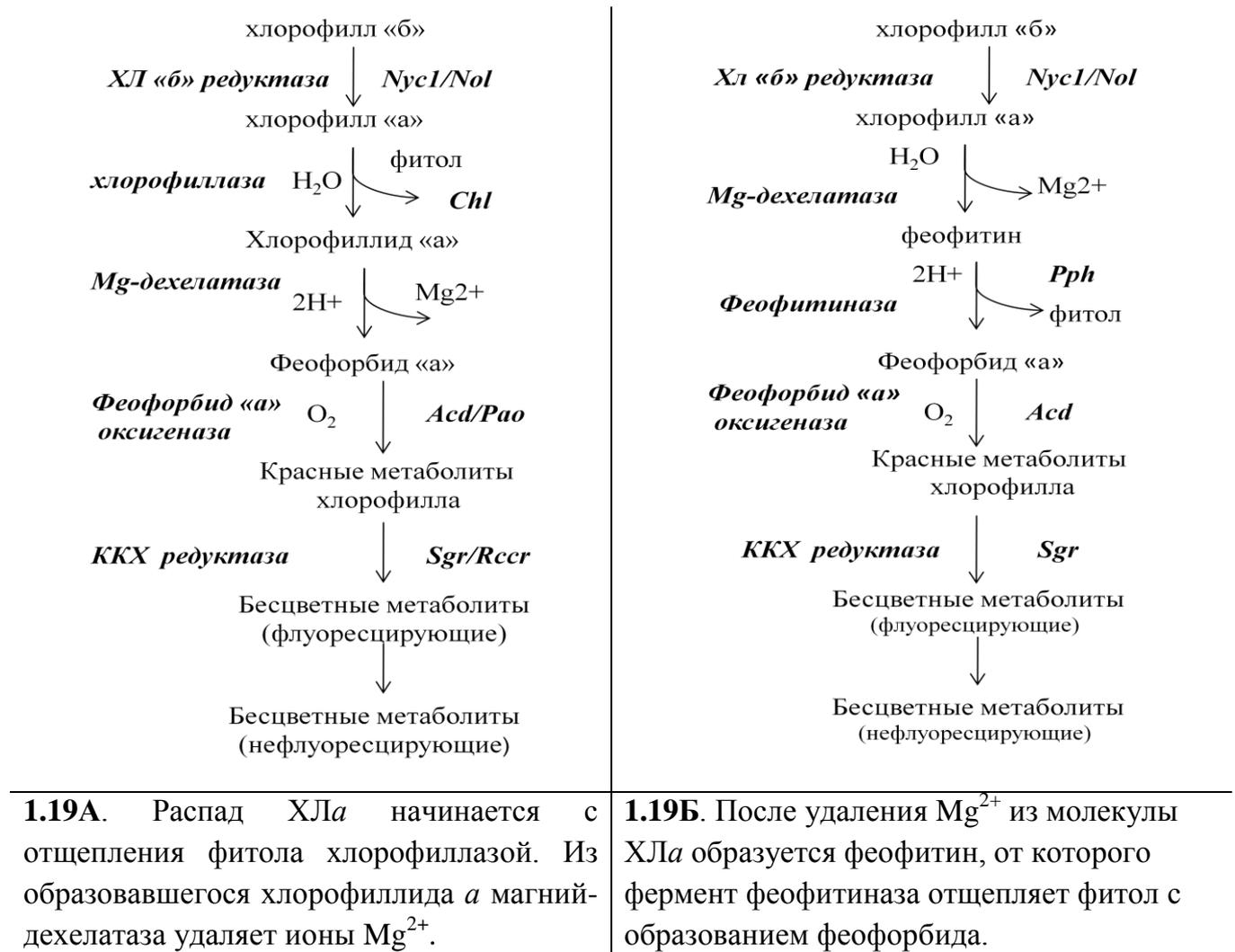


Рисунок 1.19. Две возможные схемы катаболизма ХЛ (А и Б). Полуужирным курсивом даны ферменты (слева) и кодирующие их гены (справа). ККХ редуктаза – редуктаза красных катаболитов ХЛ

Феофорбид *a* оксидаза – Fe-зависимая монооксигеназа, наиболее активная в период старения листьев, была обнаружена при изучении мутантов: *acd1* (*accelerated cell death*) арабидопсиса и *lls1* (*lethal leaf spot*) кукурузы [Gray et al., 1997; Pružinská et al., 2003]. В условиях вызванного темнотой старения их листья сохраняли зеленую окраску, а на свету покрывались некротическими пятнами из-за накопления фотохимически-активного феофорбида *a*. Исследования фенотипически сходных мутантов *acd2-2* и *acd2-9* арабидопсиса, полученных путем химического и Т-ДНК-инсерционного мутагенеза в 90-е годы 20 века, показали, что они несут нарушения в гене *RCCR*, кодирующем редуктазу красных

катаболитов хлорофилла [Pruzinská et al., 2007].

Обнаружение еще одного типа мутантов риса, сохраняющих зеленую окраску при помещении в темноту: *nuc1* и *nol1-3*, их картирование и поиск генов, затронутых мутациями, привели авторов к заключению, что гены: *Nic1* (*non-yellowcoloring*) и *Nol* (*Nuc1-like*) кодируют локализованную в пластидах короткоцепочечную ХЛb-дегидрогеназу/редуктазу и ХЛb-редуктазу, соответственно. Оба фермента взаимодействуют *in vivo* и, по-видимому, обеспечивают конверсию ХЛb в 7-гидроксиметил-ХЛa [Kusaba et al., 2009].

Исследования процессов деградации ХЛ, начавшиеся в конце 20 столетия, активизировались в последнее десятилетие в связи с появлением новых молекулярно-генетических методов и подходов. За это время была установлена генетическая детерминация большинства ферментов путей их катаболизма. В ближайшем будущем предстоит выяснение механизмов регуляции этих ферментов в разные периоды жизненного цикла растений и их роли в адаптации растений к экстремальным внешним условиям (световым, температурным) и защите от патогенов. Фундаментальные исследования в этой области имеют и очевидные прикладные аспекты - они открывают возможности путем генетических манипуляций замедлять или ускорять созревание плодов и сохранять зеленую окраску листьев во время длительного хранения растений.

1.6. Эволюционные аспекты метаболизма хлорофиллов

Эволюция генов, контролирующих ферменты метаболизма хлорофиллов, по-видимому, шла по пути приспособления к изменяющимся условиям внешней среды и решения «внутренних проблем», главной из которых стала защита от фотодинамического действия свободных порфиринов. В соответствии с теорией Беркнера и Маршалла [Berkner and Marshall, 1965], не утратившей своей актуальности по сей день, формы существования биоты и ее эволюция определяются состоянием атмосферы (рисунок 1.20).

По данным палеонтологии зарождение жизни (рисунок 1.20, точка 1) произошло около 4,0 млрд. лет назад в археозое, и первыми обитателями Земли были анаэробные гетеротрофы, которые существовали в условиях бескислородной восстановительной атмосферы под слоем воды 10-50 м, защищавшем протоорганизмы от губительного действия жесткого ультрафиолетового излучения [Иорданский, 2001]. Около 3,4-3,2 млрд. лет назад некоторые из них приобрели способность к фотосинтезу (рисунок 1.20, точка 2). Для утилизации световой энергии древние фототрофы использовали родопсин (сохранившийся у современных галофитов) и более эффективные тетрапирролы бактериохлорофиллы — при хлорофильном фотосинтезе на один поглощенный квант через мембрану переносится не один ион H^+ , как при родопсиновом фотосинтезе, а два [Скулачев, 1997]. Для фототрофных бактерий характерен аноксигенный фотосинтез — простой биохимический процесс, осуществляемый при помощи одной фотосистемы I. Донором электрона при таком фотосинтезе обычно служит сероводород, а продуктами выделения - сера или сульфат. Филогенетический анализ магниевой ветви биосинтеза тетрапирролов позволил установить, что наиболее древние фототрофы — это пурпурные бактерии [Xiong and Bauer, 2002]. «Изобретателями» кислородного фотосинтеза стали цианобактерии, которые 2,6 млрд. лет назад научились использовать в качестве доноров электронов воду (рисунок 1.20, точка 3). Фотохимическое разложение воды в процессе их жизнедеятельности сопровождалось выделением кислорода [Battistuzzi, 2004], и наиболее эффективным средством нейтрализации токсичного молекулярного кислорода стало кислородное дыхание. Интересно, что центральный блок системы аэробного дыхания — цепь переноса электронов сформировалась у цианобактерий (и у ряда других, в т.ч. пурпурных бактерий) на основе электронно-транспортной цепи фотосинтеза. Сначала, по-видимому, осуществлялось простое "сжигание" органики с единственной целью обезвредить кислород. Лишь в дальнейшем была открыта возможность синтезировать АТФ в этом процессе. С увеличением концентрации абиогенного кислорода в атмосфере

до так называемой «точки Пастера», когда его содержание достигло 1% от современного уровня, у биоты появилась возможность использовать в энергетических целях аэробную диссимиляцию (дыхание), которое в 14 раз эффективнее анаэробного брожения.

В истории Земли известны два периода резкого повышения концентрации O_2 в атмосфере. Первая «кислородная катастрофа» (точка Постера), произошла примерно 2,4-2,2 млрд. лет назад благодаря оксигенному фотосинтезу цианобактерий. К этому времени абиогенный кислород сформировал озоновый слой, защищающий Землю от солнечного ультрафиолета, что позволило обитателям планеты расширить пространство своего обитания – подняться в верхние слои океана. В этот период возникают гены, кодирующие ферменты, активные только в присутствии кислорода: *HemF*, *HemG*, *AcsF* (рисунок 1.20, выделены зеленым цветом). Второй «кислородный взрыв», случившийся около 800-542 млн. лет назад, по-видимому, вызвал «позднекембрийский взрыв формообразования» [Berkner and Marshall, 1965; Frei, 2009].

Эукариоты появились на планете 1,5 - 1.2 млрд. лет назад (рисунок 1.20, точка 4) в результате вторичного эндосимбиоза с цианобактериями. Наиболее вероятными предками пластид считают азотфиксирующие цианобактерии: *Nostoc sp. PCC7120* и *Anabaena variabilis* [Deusch et al., 2008]. Преобразование хлорофилл-содержащих бактерий в хлоропласты сопровождалось переносом большинства генов, контролирующих реакции фотосинтеза и биосинтез тетрапирролов в ядро [Bock and Timmis, 2008]. При этом произошла утрата двух «аэробных» ферментов цианобактерий – bchE и COR, кодируемых генами: *bchE* и *bchX,Y,Z*, соответственно (рисунок 1.20, выделены розовым цветом). К приобретениям этого времени можно отнести появление «аэробных» ферментов биосинтеза ХЛb – дополнительного светособирающего пигмента.

заняли лидирующее положение в глобальной флоре (рисунок 1.20, точка 6). Их хлоропластные геномы утратили гены *chlL, B, N*, кодирующие тПОР (темновую ПХЛД-оксидоредуктазу), – последнего в ряду ферментов, ведущих свое происхождение от анаэробных нитрогеназ цианобактерий, но приобрели способность к старению – деградации хлорофиллов и преобразованию хлоропластов в этиопласт, называемых в этих случаях герантопластом. Полагают, что эволюция генов катаболизма ХЛ началась с появлением эукариот– кодируемые ими ферменты были необходимы для обеспечения перехода от фото- к гетеротрофным условиям жизни [Thomas et al., 2009].

Увеличение содержания кислорода в атмосфере вынуждало фотосинтезирующие организмы искать защитные механизмы метаболической и сигнальной регуляции, позволяющие предотвратить накопление в их клетках свободных фотореактивных молекул порфиринов. В хлоропластах хлорофиллы оказались связаны с белками и каротиноидами, а на метаболическом уровне эту защитную функцию стал выполнять механизм обратного ингибирования первого предшественника тетрапирролов – АЛК конечными продуктами светонезависимого биосинтеза – ПХЛД и гемом.

Реализация генетических процессов, контролирующих биосинтез основных пигментов фотосинтеза – хлорофилла, находится под системным контролем целого ряда факторов (свет, кислород, содержание сахаров и т.д.), определяющих физиологическое состояние хлоропластов – органелл, в которых осуществляется фотосинтез. Исследования мутантов с нарушенной регуляцией показало, что физиологический статус хлоропласта регулирует экспрессию «фотосинтетических» генов, кодируемых ядерным геномом, через систему сигналов, одним из основных атрибутов которой, помимо белков, являются тетрапирролы – интермедиаты биосинтеза хлорофилла, и молекулы тРНК. Изучению процессов генетической регуляции биосинтеза хлорофиллов посвящена следующая глава.

1.7. Генетические аспекты световой и метаболической регуляции биосинтеза хлорофиллов

С накоплением фактических знаний о генетике биосинтеза хлорофиллов (ХЛ) становится все более очевидным, что синтез пигментов неразрывно связан с процессами биогенеза хлоропластов и фотосинтеза. Регуляция метаболизма хлорофиллов включает несколько уровней контроля, позволяющих в процессе роста и развития растений поддерживать оптимальный уровень синтеза тетрапирролов и связанных с ними белков в ответ на воздействия внешних факторов (свет, кислород и др.) и внутриклеточных сигналов. В реализации генетических программ адаптации фотосинтезирующей клетки к этим системным факторам участвуют разнообразные белки: факторы транскрипции, протеинкиназы, убиквитин-лигазы; молекулы тРНК и тетрапирролы: протопорфирины, протохлорофиллиды, гемы. Современные сведения о генетической детерминации процессов световой, ретроградной и метаболической регуляции биосинтеза ХЛ и биогенеза хлоропластов у фотосинтезирующих эукариот представлены ниже.

Согласно симбиотической теории, хлоропласты в клетках фотосинтезирующих эукариот сформировались в результате превращения цианобактерий в эндосимбионтов первичных эукариот. В ходе эволюции произошла потеря их генетической автономности в результате передачи части генов в геномы “ядра”, и пластиды современных растений содержат компоненты, закодированные как в ядерной, так и в хлоропластной ДНК. Процессы формирования и функционирования структур хлоропласта фотосинтезирующей клетки строго зависят от координированной экспрессии геномов ядра и пластид в ответ на воздействие как факторов внешней среды (свет, питание и др.) так и внутриклеточных сигналов. Эта координация обеспечивается двойной системой генетической регуляции: белки, кодируемые ядром, регулируют экспрессию генов хлоропласта, а сигналы, генерируемые хлоропластом, влияют на экспрессию генов ядра [Шестаков, 1998].

1.7.1. Регуляторные механизмы биосинтеза хлорофилла

Синтез тетрапирролов у растений и водорослей происходит в пластидах, откуда они транспортируются к месту своей локализации: хлорофиллы (ХЛ) остаются в хлоропластах, гемы и сирогемы работают во всех клеточных компартментах, а фитохромы – в цитоплазме и ядре. Метаболизм фотосинтезирующей клетки зависит от функциональной активности пигментов: ХЛ и каротиноидов, биосинтез которых необходимо регулировать для обеспечения в первую очередь следующих процессов:

1. Утилизация световой энергии. *Свет - основной регулятор метаболизма тетрапирролов.* Он играет ключевую роль в жизни покрытосеменных растений, которые образуют хлорофилл только на свету, - в процессе биосинтеза конверсию протохлорофиллида (ПХЛД) в хлорофиллид (ХЛД) осуществляет фотофермент сПОР – ПХЛД-оксидоредуктаза [Беляева и Литвин, 2007]. Темновой синтез хлорофилла существует у водорослей, мхов и голосеменных благодаря наличию светонезависимого ферментативного комплекса - тПОР, альтернативного сПОР [Armstrong G.A., 1998]. При этом, *регуляторное влияние света на морфогенез растений и хлорофиллообразование связывают в первую очередь с фоторецепторами фитохромами* [Кулаева, 2001];

2. Поддержание оптимального соотношения гема и хлорофиллов. Эти тетрапирролы, имеющие общий путь биосинтеза (рисунок 1.21), необходимы растениям в различных количествах в зависимости от внешних условий и локализации. ХЛ содержатся только в фотосинтезирующих тканях листьев и стеблей, тогда как гем необходим любой клетке растения, включая корни. С другой стороны, фотосинтезирующей клетке требуется в сотни раз больше ХЛ, чем молекул других тетрапирролов, и эта потребность изменяется под воздействием внешней среды. *Важным регуляторным узлом, обеспечивающим баланс синтезов ХЛ и гема, является этап ферментативного включения ионов металлов (Mg^{2+} или Fe^{2+}) в молекулу их предшественника – протопорфирина IX.*



3. Защита от свободных порфиринов. Все окрашенные предшественники ХЛ в свободном состоянии фототоксичны, и при освещении генерируют молекулы синглетного кислорода, разрушающие клеточные мембраны [Красновский, 2001]. *Механизмы, препятствующие накоплению порфиринов в клетке при освещении, абсолютно необходимы для ее выживания;*

4. Координация биосинтезов белков и пигментов. В хлоропластах ХЛ связаны с белками и каротиноидами, образуя пигмент-белково-липидные комплексы. Для их сборки и функционирования необходимо поддерживать

количественные соотношения молекул ХЛ и связывающих их белков [Tanaka and Tanaka, 2007]. К концу 80-х годов 20 века стало понятным, что в регуляции процессов хлорофиллообразования важную роль играют механизмы, определяющие активность ферментов синтеза 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) – первого специфического продукта в биосинтезе тетрапирролов [Beale, 1990]. Изучение пигментных мутантов позволило выяснить, что эта регуляция осуществляется порфириновыми интермедиатами – гемом и ПХЛД, путем обратного ингибирования синтеза АЛК (рисунок 1.21).

1.7.2. Свет - регулятор экспрессии генов, кодирующих белки фотосинтеза

Проростки высших растений, выращенные в темноте, - желтые (рисунок 1.22А), и морфологически отличаются от зеленых, растущих на свету: они имеют длинный гипокотиль (подсемядольное колено) и короткий неразвитый эпикотиль (часть стебля между семядолями и первыми листьями). Их хлоропласты (называемые этиопластами) не содержат фотосинтетических мембран и хлорофилла, биосинтез которого остановлен на стадии образования ПХЛД [Кулаева, 2001].

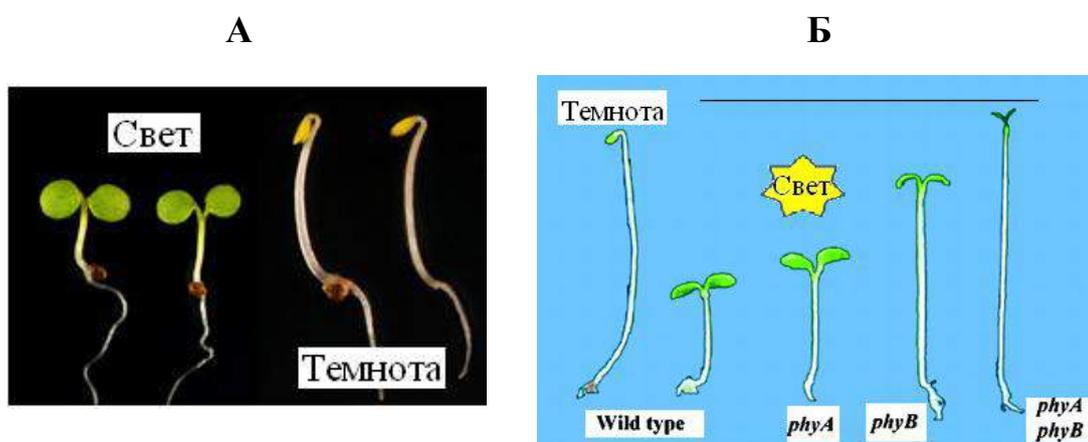


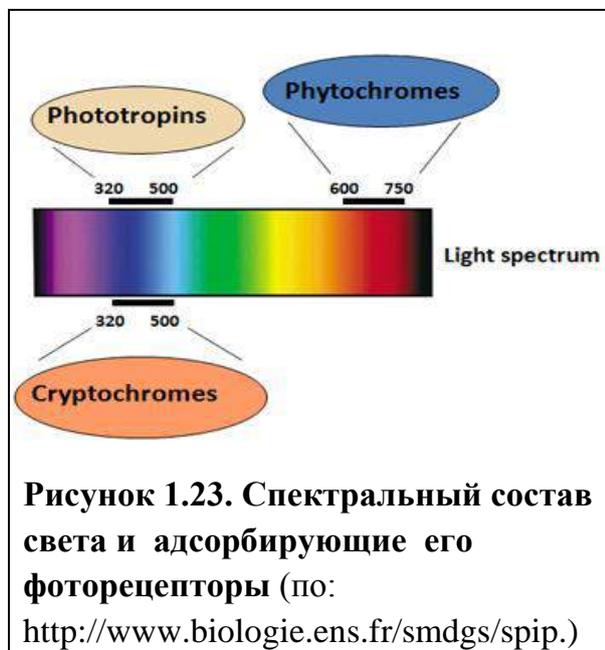
Рисунок 1.22. Проростки арабидопсиса, выращенные на свету и в темноте (А) (<http://montelab.org/index>). (Б) Фотоморфогенез у проростков дикого типа и мутантов РНУА и РНУВ с нарушенными функциями фитохромов (по: Morelli and Ruberti, 2000)

После освещения, в клетках таких этиолированных проростков происходит активация экспрессии светозависимых генов, в результате чего одновременно запускается два процесса: зеленение (фотовосстановление ХЛД из ПХЛДа и дальнейший синтез ХЛ), и фотоморфогенез хлоропластов (формирование тилакоидных мембран из этиопластов). Характерными фенотипическими признаками фотоморфогенеза являются: укорочение гипокотилия, активный рост стебля и зеленая окраска листьев (рисунок 1.22Б). Подавляющее большинство мутантов высших растений с нарушениями фоторегуляции отбирали как мутанты по зеленению – зеленые в темноте, или по способности после освещения формировать удлиненные или укороченные (по сравнению с проростками дикого типа) гипокотили [Vou-Torrent et. al., 2008].

Свет как фактор транскрипционной регуляции. В реализации наследственной информации, определяющей развитие растений, свет играет важнейшую роль. Массовый анализ профилей экспрессии (*microarray analysis*) более чем 6000 генов арабидопсиса показал, что около 30% из них регулируются светом путем активации или репрессии их транскрипции [Ma et al., 2001]. Изучение влияния света на экспрессию целого ряда генов, кодирующих белки, необходимые для фотосинтеза (БФ), позволило обнаружить значительное число факторов транскрипции (ФТ), существенных для фотоморфогенеза [Vou-Torrent et al., 2008; Casal and Yanovsky, 2005]. Регуляцию активности генов БФ осуществляют ФТ, имеющие ДНК-связывающие домены различных типов (таблица 1.3), включая спираль-петля-спираль bHLH (*base helix-loop-helix*), цинковые пальцы (Zn_F) и «лейциновые молнии» - bZIP (*basic leucine-zipper*), которые прямо или опосредованно взаимодействуют с цис-действующими элементами промоторов светозависимых генов. Эти последовательности, названные *LRE* (англ.: *light responsible elements*), содержат G-боксы (CACGTG), GATA-элементы и GT1 (GGTTAA)-мотивы [Chattopadhyay et. al., 1998]. Светочувствительными элементами промоторов генов, по-видимому, являются не

индивидуальные *LRE*-последовательности, а комбинации цис-регуляторных элементов, а их активность – результат взаимодействия между ними, ФТ и ко-факторами [Галкин с соавт., 2004]. Большинство ФТ, участвующих в световой регуляции транскрипции, связываются с G-боксами [Цыганкова, 2004]. Недавно были обнаружены ФТ GATA2 и GATA21 арабидопсиса, регулирующие экспрессию генов, существенных для биосинтеза хлорофилла, через промоторные элементы GATA [Luo et al., 2010; Vi, 2005].

Первое звено в системе передачи светового сигнала – это фоторецепторы (рисунок 1.23), избирательно адсорбирующие различные участки солнечного



спектра: красный - фитохромы (их пять у высших растений – от PHYA до PHYE), криптохромы и фототропины - синий и УФ-А свет [Chen et al., 2004]. У водорослей также обнаружены дополнительные фоторецепторы: белки BLUF, ауреохромы и родопсины [Hegemann, 2008]. Фитохромная система регуляции экспрессии светозависимых генов растений изучена наиболее подробно [Синещеков, 2005; Josse et al., 2008]. Фитохромы - это

светорегулируемые протеин-киназы, передающие световой сигнал через фосфорилирование связанных с ними белков. Такие белки – регуляторы биосинтеза ХЛ, взаимодействующие с фотоактивными формами фитохромов А и В (PHYA и PHYB), получили название PIF1-7 (*phytochrome-interaction factor*) (рис.1.24) [Ni et al., 1998; 1999]. Они оказались факторами транскрипции семейства bHLH [Castillon et al., 2007], способными связываться с G-боксами (CACGTG), в промоторах светорегулируемых ядерных генов растений [Menkens et al., 1995].

Мутанты арабидопсиса по гену *PIF3* демонстрировали ослабление световой

индукции транскрипции генов БФ и накапливали протохлорофиллид в темноте [Ni et al., 1998; Monte et al., 2004; Stepherson et al., 2008]. Их изучение показало, что в отсутствие света фактор PIF3 связан с ядерной ДНК. При освещении, фотоактивированные фитохромы (Pfr), мигрируют из цитоплазмы в ядро и связываются с PIF3, индуцируя быстрое фосфорилирование ТФ и, далее, их

Таблица 1.3. Факторы регуляции процессов биосинтеза хлорофилла у арабидопсиса*

Мутации	Гены	Продукты гена	Регуляторные функции	Ссылки
<i>gun5</i>	<i>CHLH</i>	Mg-хелатаза субъединица H	передача ретроградного сигнала	Mochizuki, et al., 2001
<i>gun4</i>	<i>GUN4</i>	Mg-ПП-связывающий белок	световая регуляция экспрессии CHLH	Larkin et al., 2003
<i>hy1/ulf3/gun2</i>	<i>HY1</i>	Гем-оксигеназа	ретроингибирование синтеза АЛК гемом	Muramoto et al., 1999
<i>hy2/gun3</i>	<i>HY2</i>	Фитохромобилин-синтетаза	ретроингибирование синтеза АЛК гемом	Kohchi et al., 2001
<i>gun1</i>	<i>GUN1</i>	Белок хлоропласта (пентатрикопептид)	(-) РТ, АВИ4-опосредованная	Koussevitzky et al., 2007
<i>flu</i>	<i>FLU</i>	GluTR-связывающий белок	репрессия ПХЛД-ом синтеза АЛК	Meskauskiene et al., 2001
<i>laf6</i>	<i>ABC1</i>	ABC1-белок	транспорт ПП из хлоропласта в цитозол	Moller et al., 2001
<i>pif1</i>	* <i>PIF1</i>	**ФТ <i>bHLH</i> -типа	(-) РТ <i>POR</i> , гем-оксидазы, Fe-хелатазы	Moon et al., 2008
<i>pif3, 5-7</i>	* <i>PIF3</i> , * <i>PIF5</i> , * <i>PIF7</i>	ФТ <i>bHLH</i> -типа	(-) РТ	Monte et al., 2004; Castillon et al., 2007
<i>fhy3/far1</i>	<i>FHY3</i> / <i>Far1</i>	ФТ	PhyA (+) ФТ	Lin and Wang, 2004
	<i>GNC</i>	ФТ семейства GATA (Zn_F)	(+) РТ фотоморфогенеза	Bi et al., 2005
	<i>GATA2</i>	ФТ семейства GATA (Zn_F)	(+) РТ фотоморфогенеза	Lui et al., 2010
<i>hy5</i>	* <i>HY5</i>	ФТ (<i>bZip</i>)	(+) РТ фотоморфогенеза	Oyama et al., 1997
<i>lzf1</i>	* <i>LZF1</i>	ФТ (zinc finger protein 1)	(+) РТ	Chang et al., 2008
<i>abi5</i>	* <i>ABI5</i>	ФТ <i>bZIP</i> - типа	зеленение	
<i>abi4</i>	* <i>ABI4</i>	ФТ <i>AP-2</i> - типа	(-) ретроградный контроль	Koussevitzky et al., 2007
Продолжение таблицы 1.3.				

1	2	3	4	5
<i>sco1</i> <i>sco2</i>	* <i>SCO1</i> ; <i>SCO2</i>	пластидный фактор элонгации G	фотоморфогенез проростков	Albrecht et al., 2006
<i>elip1</i>	<i>ELIP</i>	хлорофилл <i>a/b</i> - связывающие белки	контроль уровня синтеза хлорофиллов	Tzvetkova- Chevolleau et al., 2007
<i>cao</i>	<i>CAO</i>	ХЛа-оксигеназа	транспорт белков ССК в хлоропласт	Reinbothe et al., 2006
<i>pks1-4</i>	<i>PKS</i>	протеин-киназы	Деактивация фото- активных фитохромов	Lariguet et al., 2006
<i>cop1</i>	<i>COP1</i>	убиквитин-лигаза E3	протеолиз ФТ: Pif1-7, HY5, SCO2	Seo et al., 2004
Мутации	Гены	Продукты гена	Регуляторные функции	Ссылки
<i>spa1-4</i>	<i>Spa1-4</i>	репрессоры фотоморфогенеза	SPA-COP1 протеолиз	Laubinger et al., 2004
<i>clp</i>	<i>CLP</i>	хлоропластная протеаза	ХЛb-зависимый контроль уровня CAO	Yamasato et al., 2008
<i>por</i>	<i>POR</i>	протохлорофиллид оксидоредуктаза	(+) регуляция <i>HEMA</i> и <i>LHCB</i> экспрессии	McCornac, 2002
<i>exe1</i> <i>exe2</i>	<i>EXE1</i> <i>EXE2</i>	белки хлоропласта активаторы ¹ O ₂ индуцированного апоптоза	¹ O ₂ индуцируемая передача ретроградного сигнала	Wagner et al., 2004
<i>atab</i>	<i>ATAB2</i>	РНК-связывающий белок	индукция транскрипции в хлоропласте	Barneche et al., 2006
<i>csk</i>	<i>CSK</i>	Протеин-киназы	транскрипция в хлоропласте	Puthiyaveetil et al., 2008

* У растений обнаружено множество белковых факторов, необходимых для световой и метаболической регуляции клеточных процессов. В таблице представлены только те гены, продукты которых оказывают существенное влияние на биосинтез хлорофиллов и связанных с ним процессов биогенеза хлоропластов.

Обозначения: ФТ – фактор транскрипции, РТ – регулятор транскрипции

**(+)
РТ – позитивный регулятор транскрипции, (-)
РТ – негативный РТ.

деградацию через убиквитин-протеасомную систему [Shen et al., 2007]. Красный свет индуцирует дефосфорилирование фитохромов, которое осуществляют фосфатазы PAPP2C (*phytochrome-associated protein phosphatase type 2C*). Они связываются с РНУА и РНУВ в ядре, тем самым, регулируя активность белка PIF3 [Castillon et al., 2007]. Механизм индуцируемой светом протеолитической деградации был описан и для белков: PIF1, PIF5 и PIF7 [Huq et al., 2004].

Фактор транскрипции PIF1 в биосинтезе хлоропластных пигментов играет

особую роль, поскольку он непосредственно участвует в регуляции синтеза протохлорофиллида (ПХЛД) и каротиноидов [Toledo-Ortiz et al., 2010]. Мутант арабидопсиса по гену *PIF1* имел фенотип, сходный с *flu*-мутантами арабидопсиса, которые будут описаны ниже, – проростки накапливали в темноте избыточное количество ПХЛД и при переносе на свет погибали от фотообесцвечивания [Moon et al., 2008]. PIF1, связываясь в темноте с G-боксами в промоторах генов ферментов биосинтеза хлорофилла (POR, гем-оксигеназу и Fe-хелатазу) и каротиноидов (фитоин-синтетазу), подавляет их экспрессию [Toledo-Ortiz et al., 2010; Whitelam et al., 1993]. Подобно PIF1, фактор PIF3 подавляет транскрипцию гена *HEMA1* глутамил-тРНК-синтетазы и гена *GUN4*, кодирующего белок-регулятор активности магний-хелатазы [Stepherson et al., 2008].

Блокирование генов, контролирующих механизмы фитохромной регуляции, ведет к появлению мутантов, формирующих удлиненные гипокотили под действием длинноволнового красного света. Изучение целого ряда таких мутантов арабидопсиса: *fhy1*, *fhy3* (*far-red elongated hypocotil*), *fhl* (*phy1-like*), *far1* (*far-red impaired response 1*) позволило выяснить, что функции белка FHY1 и его гомолога FHL состоят в транспортировке фотоактивированных фитохромов из цитоплазмы в ядро [Shen et al., 2009]. Фитохром А (PHYA) регулирует активность этих белков через физическое взаимодействие и (или) обратимое фосфорилирование, индуцированное красным светом [Pfeiffer et al., 2009]. PHY3 и FAR1 оказались факторами позитивной регуляции транскрипции генов: *FHY1* и *FHL1* [Lin et al., 2008].

Синий свет активирует фоторецепторы криптохромы (CRY1, CRY2) и фототропины (PHOTO1, PHOTO2). Криптохромы – белки с хромофорами флавиновой природы, эволюционно связанные с ДНК-фотолиазами [Lin et al., 2003]. В цепи передачи светового сигнала от криптохромов задействован фактор транскрипции HY5 – позитивный регулятор экспрессии генов БФ. Он был обнаружен в результате исследований мутанта *hy5* (*long hypocotil*) арабидопсиса по фотоморфогенезу, проростки которого сохраняли удлиненные гипокотили на

свету [Ouyama et al., 1997]. Ген *HY5* кодирует bZIP-подобный белок, необходимый для экспрессии значительного числа генов (включая *LZF1* и *ABI5*), контролирующих фотоморфогенез [Lee et al., 2007; Chang et. al., 2008]. Полагают, что после активации синим светом белок CRY1 образует комплексы с белками SPA, тем самым, предотвращая связывание с COP1, что в свою очередь ведет к освобождению фактора транскрипции HY5 (рисунок 1.24), позволяя ему активировать транскрипцию генов БФ [Liu, 2011]. Еще один позитивный регулятор транскрипции генов БФ - белок HFR1 (*long hypocotil in far-red1*) семейства bHLH, регулирует оба пути передачи сигналов: от фитохромов и криптохромов [Duek et al., 2004].

Транскрипционные факторы семейства GATA имеют ДНК-связывающий домен, которых содержит «цинковый палец», узнающий мотив: 5'-(A/T)GATA(A/G)-3' в промоторах светозависимых генов. К настоящему времени, для двух из 30 известных у арабидопсиса транскрипционных факторов GATA-типа – GNC и GATA2, установлено прямое влияние на биосинтез хлорофилла. Отсутствие белка GNC (*GATA, nitrate-inducible, carbon metabolism-involved*) в результате Т-ДНК инсерции в кодирующем его гене, вызывает редукцию синтеза хлорофиллов [Bi et al., 2005]. Полагают, что GNC участвует в координации метаболизма азота, углерода и хлорофиллов во время фотоморфогенеза - при переходе от гетеротрофного к фототрофному росту на свету. Критическая роль в фотоморфогенезе была установлена и для фактора транскрипции GATA2 [Toledo-Ortiz et al., 2010]. Сверхэкспрессия гена *GATA2* приводила к укорочению гипокотилей в темноте, а замолкание этого гена в результате антисенс-конструкций вело к удлинению гипокотилей на свету, свидетельствуя, что ген кодирует активатор фотоморфогенеза. Для белка GATA2 описана авторегуляция – он светозависимо регулирует экспрессию кодирующего его гена через механизм обратной связи – светоиндуцированное накопление белка ведет к подавлению транскрипции кодирующего его гена

В генетическом контроле фотоморфогенеза растений участвуют и ядерные

гены *SCO1* и *SCO2* (*snowy cotilidon*), мутации в которых вызывали появление белых, не зеленеющих на свету проростков. Они кодируют хлоропластные белки *SCO1* и *SCO2*, один из которых – *SCO1* оказался фактором трансляции G [Albrecht et al., 2006; 2008].

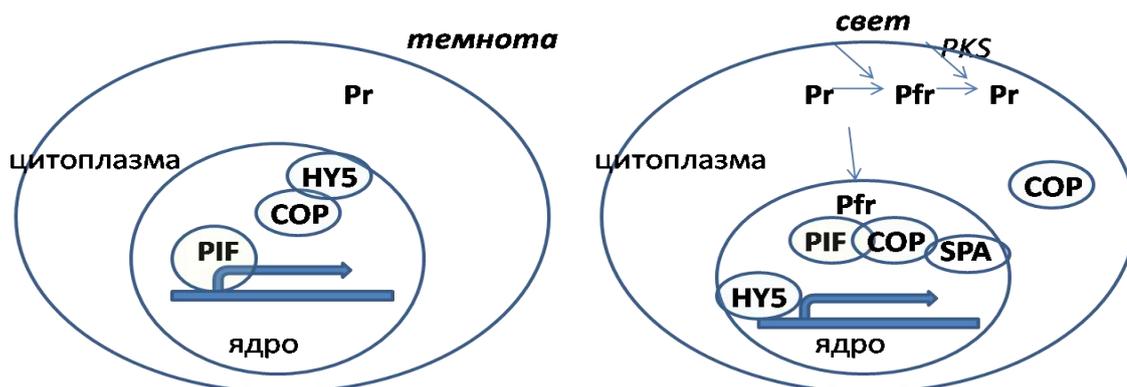


Рисунок 1.24. Модель световой регуляции экспрессии генов, кодирующих белки фотосинтеза (БФ). Фитохромы – гомодимеры, где оба мономера ковалентно связаны с тетрапирролом фитохромобилином. Неактивные формы фитохромов Pr (поглощающие красный свет), синтезируются в цитоплазме. Под действием света Pr превращаются в активную форму Pfr (поглощающие длинноволновый красный свет - FR), которые, связываясь с белками PIF, мигрируют в ядро, а оставшиеся подвергаются фотодеструкции и реверсии в Pr. PKS – протеин-киназы, имеющие сродство к фитохромам; Белки репрессоры - факторы транскрипции (PIF) в темноте связываются с промоторами генов БФ, блокируя их транскрипцию. На свету происходит их фосфолиллирование фотоактивированными фитохромами (Pfr), после чего они подвергаются светоиндуцированной протеолитической деградации через COP-SPA комплексы. Транскрипционные активаторы - (+) факторы транскрипции (HY5 и GATA2) в темноте неактивны, так как связаны с белками COP, которые под воздействием света мигрируют в цитоплазму.

Мембранные фоторецепторы фототропины - это активируемые синим светом протеин-киназы серин-треонинового типа, обеспечивающие направленное движение частей растений к свету [Christie, 2008]. Молекулы этих белков (PHOTO1 и PHOTO2) содержат домены LOV (*light, oxygen, voltage*), связывающие флавины. В отличие от высших растений, у которых фотоморфогенез в большей степени обеспечивают фитохромы, у зеленой

водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* фототропины являются основными фоторегуляторами процессов гаметогенеза и биосинтеза хлоропластных пигментов – ХЛ и каротиноидов [Im et al., 2006].

В световой регуляции клеточных процессов у растений принимают участие и белки, кодируемые генами *PKS(1-4)* (*phytochrome kinase substrate*). Взаимодействие PKS с фотоактивированными формами фитохромов в цитоплазме приводит к их фосфориллированию и дезактивации P_{HYA} [Fankhauser et al., 1999]. Показано, также, что PKS1-4 необходимы для фототропизма гипокотилей, – они взаимодействуют с P_{HOTO1} [Lariguet et al., 2006]. Будучи участниками двух путей передачи светового сигнала: от фототропинов и фитохромов, белки PKS, по-видимому, обеспечивают их координацию [Schepens et al., 2008].

Белки BLUF– древние фоторецепторы, найденные у прокариот и низших эукариот. Это фотоактивируемые аденилат-циклазы, имеющие в своем составе фоторецепторные домены F (*Flavin adenine dinucleotide*), связывающие флавины, и каталитические домены C (*Cyclase*). У *Rhodobacter sphaeroides* этот белок, названный AppA (*for activation of photopigment and puc expression*) функционирует как зависимый от синего света дерепрессор генов фотосинтетического генного кластера [Hegemann, 2008].

1.7.3. Регуляция светом. Посттрансляционный уровень

Белки-репрессоры фотоморфогенеза были обнаружены при анализе группы мутантов арабидопсиса: *cop/det/fus*, проростки которых, в отличие от дикого типа, зеленели и формировали тилакоидные мембраны в темноте [Kwok et al., 1996]. Ген *COP1* (*constitutive photomorphogenesis*), клонировали с использованием T-ДНК инсерционного мутанта [Deng et al., 1991; 1992], и в дальнейшем, установили, что кодируемый им белок является убиквитин-лигазой E3, которая физически взаимодействует с фитохромами в клетках растений [Seo et al., 2004]. В темноте COP1, связываясь в ядре с факторами транскрипции HY5, GATA2 и LAf1, запускает процесс их деградации через 23S протеосомы [Osterlund et al.,

2000; Luo et al., 2010]. Под воздействием света он мигрирует из ядра в цитозол, тем самым, позволяя факторам транскрипции HY5 и GATA2 активировать экспрессию генов, существенных для фотоморфогенеза (рис. 1.24). В ядре COP1 образуют комплексы с SPA (*suppressor PhyA*) - белками, описанными как супрессоры фитохрома А, которые репрессируют фотоморфогенез через связывание факторов транскрипции и PhyA [Laubinger, et al., 2004]. Накопившиеся в ядре свободные формы PHYA после фосфорилирования узнаются комплексом COP1-SPA, и подвергаются протеолизу [Saijo et al., 2008]. Известно 3 функциональные группы COP-белков: COP1, COP9 и COP10. Белковый комплекс Cop9 - сигналосома (CSN) - взаимодействует с COP1 и COP10, регулируя активность убиквитин-протеосомной системы [Yanagawa et al., 2004]. Наличие в структуре COP1 сайтов для белок-белковых взаимодействий определило стратегию поиска молекул, связанных с ним в процессе фотоморфогенеза. Было обнаружено два таких ядерных белка: CIP7 и CIP4 (*COP1-interacting protein*), активирующих биосинтез хлорофиллов [Yamamoto et al., 1998; 2001]. В реализации генетических программ адаптации растений к свету (зеленения, фотоморфогенеза, перенастройки метаболизма азота и углерода), COP-белки, по-видимому, выполняют функции светорегулируемой системы убиквитин-зависимого протеолиза факторов транскрипции: Pif1-7, HY5, GATA2 и других, необходимых для этих процессов, молекул.

После абсорбции света фоторецепторами системы передачи светового сигнала взаимодействуют с другими сигнальными путями, включая гормональный статус, циркадные ритмы и сигналы хлоропласта. Гормональный контроль COP1-зависимой регуляции осуществляют гиббереллины [Alabadi et al., 2008].

1.7.4. Белки ELIP регулируют уровень синтеза хлорофиллов

Фотосинтетические пигменты – хлорофиллы и каротиноиды локализованы в тилакоидных мембранах хлоропластов и образуют комплексы с белками двух

типов: способных связывать только хлорофилл *a* (ХЛа-белки), и хлорофиллы *a* и *b* (ХЛа/*b*-белки). Пластидный геном кодирует ХЛа-связывающие белки, которые входят в состав реакционных центров фотосистем: I и II (ФСI и ФСII). ХЛ *a/b* белки - САВ (*Chlorophyll a/b*) локализованы в светособирающих комплексах фотосистем и кодируются ядерными генами. К этому семейству принадлежат белки светового стресса ELIP (*early light-induced proteins*), участвующие в регуляции уровня синтеза хлорофиллов (Adamska, 1997). Они были обнаружены у гороха как белки, транскрипты генов которых первыми появляются в процессе зеленения – при переносе этиолированных проростков из темноты на свет, и исчезают прежде, чем закончится фотоморфогенез [Meyer and Kloppstech, 1984]. Гены *ELIP* консервативны и обнаружены у большого числа растений, а в геноме арабидопсиса они представлены в двух копиях: *ELIP1* и *ELIP2* [Casazza et al., 2005]. У трансгенных растений арабидопсиса, содержащих бинарный вектор с кДНК гена *ELIP2* под промотором 35S, сверхэкспрессия этого гена ведет к редукции активности двух узловых шагов в биосинтезе ХЛ: синтезе АЛК и Mg-протопорфирина IX, вследствие чего уменьшается уровень содержания ХЛ [Tzvetkova-Chevolleau et al., 2007]. Возможно, регуляторная роль белков ELIP состоит в контроле уровня содержания свободных порфиринов в мембранах растительной клетки на свету. Появляясь в ответ на фотоокислительный стресс - образование активного кислорода в хлоропласте в условиях освещения, они подавляют биосинтез потенциальных фотосенсибилизаторов – свободных хлорофиллов.

1.7.5. Координация экспрессии генов ядра и хлоропласта в процессе биосинтеза хлорофиллов

Хлоропласты арабидопсиса содержат около 3000 белков, большинство из которых (более 95%), включая ферменты синтеза хлорофиллов, кодируются ядерными генами. Процессы формирования и функционирования

фотосинтетических мембран зависят от координированной экспрессии генов ядра и пластид в ответ на воздействия факторов внешней среды (свет, питание, температура) и внутриклеточных сигналов (активные формы кислорода, сахара, интермедиаты синтеза ХЛ и редокс-активные молекулы) [Kleine et al., 2009]. Взаимодействие ядра и хлоропластов фотосинтезирующей клетки обеспечивается двойной системой генетической регуляции: кодируемые ядром белки и цитоплазматические факторы, поступая в хлоропласт, влияют на экспрессию генов хлоропласта, а сигналы, генерируемые хлоропластом, регулируют экспрессию генов ядра. Многочисленные исследования посвящены изучению кодируемых ядром молекул, влияющих на экспрессию генов хлоропласта [Barkan and Goldschmidt-Clermont, 2000]. Активно ведутся поиски факторов пластид, так называемых «сигнальных молекул» хлоропластного происхождения, которые регулируют экспрессию ядерных генов [Юрина и Одинцова, 2007]. Для выяснения природы этих сигнальных молекул наиболее эффективным оказался генетический подход - изучение мутантов с нарушенной регуляцией биосинтеза пигментов.

Влияние ядерного генома на экспрессию генов хлоропласта. Геномы пластид зеленых водорослей и высших растений – это кольцевые молекулы, которые содержат 90-120 генов, кодирующих компоненты фотосинтетических мембран и аппарата транскрипции-трансляции хлоропласта. Белковые комплексы фотосистем (ФС I и ФС II), цитохром *b6/f*, АТФ-синтетаза, НАДФ-дегидрогеназа, рибулозо-бифосфат карбоксилаза (*Rubisco*), и хлоропластные рибосомы состоят из белков, кодируемых хлоропластной и ядерной ДНК [Одинцова и Юрина, 2005]. Под двойным генетическим контролем находится и транскрипция генов пластид. В хлоропластах растений обнаружены РНК-полимеразы двух типов [Hess and Börner, 1999]. Одна из них - PEP (*plastid encoded RNA-polymerase*) - преимущественно ведёт транскрипцию генов БФ [De Santis-MacIossek et al., 1999]. Она состоит из закодированной в хлДНК коровой субъединицы и сигма-факторов *SIG1-6*, кодируемых ядерными генами [Fujiwara et al., 2000]. Вторая

РНК-полимераза, - кодируемая ядром NEP (*nuclear encoded RNA-polymerase*), - транскрибирует гены «домашнего хозяйства» (*house-keeping genes*), необходимые для осуществления матричных процессов [Hajdukiewicz et al., 1997]. Регуляторный механизм, обеспечивающий в хлоропласте сборку и функционирование молекул, имеющих в своем составе продукты двух геномов, состоит в координированной экспрессии кодирующих их ядерных и хлоропластных генов [Шестаков, 1998; Юрина и Одинцова, 2007]. Изучение мутантов арабидопсиса, хламидомонады и кукурузы с нарушенной экспрессией генов хлоропласта позволило найти ядерные гены, отвечающие за регуляцию хлоропластных геномов. Продукты этих генов обнаруживают способность к связыванию ДНК и РНК хлоропластов [Barkan, 1998].

Каждый шаг в экспрессии генов пластид: транскрипцию, сплайсинг, процессинг и деградацию РНК, также как трансляцию и посттрансляционные модификации белков, проходит с участием кодируемых ядром регуляторных факторов [Barkan and Goldschmidt-Clermont, 2000]. К ним относятся и оказывающие влияние на процессы хлорофиллообразования факторы транскрипции семейства «Whirly» [Prikryl et al., 2008], фактор трансляции АТАВ2 [Barneche et al., 2006] и киназы CSK [Puthiyaveetil et al., 2008]. ДНК- и РНК-связывающие растительные белки семейства Whirly регулируют экспрессию генов пластид (Krause et al., 2005). Утрата белка WHY1 в результате выключения кодирующего его гена *Why1* у кукурузы приводит к появлению белых мутантов, лишенных пластидных рибосом [Prikryl et al., 2008]. Ядерный ген арабидопсиса АТАВ - ортолог обнаруженного у хламидомонады гена *TAB2* [Dauvillée et al., 2003], кодирует РНК-связывающий белок, активируемый синим светом, – позитивный регулятор трансляции в хлоропласте [Barneche et al., 2006]. Отсутствие АТАВ у мутантов ведет к блокированию биосинтеза хлорофилла и биогенеза мембран хлоропласта [Barneche et al., 2006]. Вероятно, этот белок служит компонентом сигнальной системы световой индукции трансляции в хлоропласте. В регуляции экспрессии генов хлоропластов участвует и кодируемая ядром сенсорная киназа

CSK (*chloroplast sensor kinase*) [Puthiyaveetil et al., 2008], - элемент двухкомпонентных систем передачи регуляторных сигналов, известных у прокариот, включая цианобактерии [Ashby and Houmard, 2006]. В хлоропластах арабидопсиса CSK по-видимому, вовлечена в редокс-контроль транскрипции [Puthiyaveetil et al., 2008].

Хлоропластный контроль экспрессии ядерных генов. У мутантов растений и зеленых водорослей с нарушениями функций хлоропластов, экспрессия ядерных генов, кодирующих белки фотосинтеза (БФ), репрессирована [Mayfield and Taylor, 1984]. Впервые этот феномен был описан в 1979 году при изучении пигментных мутантов ячменя *albostrains* и *Saskatoon*, листья которых имели белую или крапчатую (с белыми участками) окраску [Bradbeer et al., 1979]. Их хлоропласты были лишены рибосом, а активность кодируемых ядром генов БФ, - подавлена. Мутанты растений, лишенные каротиноидов, - основных фотопротекторов клетки, демонстрировали сходный фенотип: под воздействием света у них, в результате индуцированного хлорофиллами фотоокисления, разрушаются тилакоидные мембраны хлоропластов, и резко снижается уровень транскрипции ядерных генов: *CAB* и *RBCS* - малой субъединицы *Rubisco* [Batschauer et al., 1986; Oelmuller and Mohr, 1986; Oelmuller, 1989]. Тот же эффект наблюдали при освещении растений дикого типа, обработанных ингибитором биосинтеза каротиноидов норфлюразоном (НФ) [Taylor, 1989] или антибиотиком линкомицином, который подавляет трансляцию в хлоропластах [Ruckle et al., 2007].

Для объяснения фактов подавления экспрессии ядерных генов, контролирующей синтез хлорофиллов в ответ на блокирование функций хлоропластов, было высказано предположение о существовании пластидных факторов, - сигнальных молекул, которые продуцирует хлоропласт для регуляции (позитивно или негативно) транскрипции ядерных генов [Batschauer et al., 1989]. Поисками этих факторов ретроградного (из хлоропласта в ядро) пути передачи сигналов занялись многие исследовательские группы, и наиболее значимые

результаты были достигнуты в экспериментах с применением генетических методов и подходов.

Протопорфирины как сигнальные молекулы хлоропласта.

Предположение о том, что в роли «пластидного фактора» могут выступать предшественники хлорофилла, впервые было проверено в экспериментах Иоханнингсмейера и Ховела [Johanningmeier and Howell, 1984]. Авторы провели сравнительное изучение экспрессии гена *CAB1* у бесхлорофильных мутантов зеленой водоросли хламидомонады: *brs1*, *brc1* и *y-1*, накапливающих интермедиаты биосинтеза хлорофилла: протопорфирин-IX (ПП), магний-протопорфирин IX (Mg-ПП) и ПХЛД, соответственно. В экспериментах также использовали культуры штаммов дикого типа, которые после обработки ингибиторами: левулиновой кислотой и α,α -дипиридилем накапливали, соответственно, ранний предшественник – АЛК и Mg-ПП-монометилловый эфир (Mg-ППМЭ). Результаты экспериментов демонстрировали, что избыточное содержание только одного интермедиата - Mg-ПП вело к ингибированию световой индукции экспрессии гена *CAB1*. Мутанты хламидомонады *brs1* и *brc1* также были использованы в экспериментах Я. Кропат при изучении влияния ПП и Mg-ПП на экспрессию генов белков теплового шока *HSP70A* и *HSP70B* [Kropat et al., 1997]. В работе было показано, что экзогенный ПП подавляет индуцированную светом транскрипцию этих генов, а накопление Mg-ПП в темноте напротив, стимулировало (подобно свету) их экспрессию.

Облучение проростков арабидопсиса длинноволновым красным светом в норме ведет к замедлению роста гипокотыля. Мутанты с нарушенным фотоморфогенезом, названные *laf6* (*long after far-red*), в этих условиях формировали длинные проростки, у которых был нарушен биосинтез хлорофилла: они имели бледно-зеленую окраску и накапливали ПП. Мутация *laf6* блокировала ген, кодирующий хлоропластный АТФ-связывающий транспортный белок ABC-типа, который переносит ПП из мембран хлоропласта, где он синтезируется, в цитоплазму [Moller et al., 2001]. Поскольку блокирование

транспорта ПП вызывает нарушения фотоморфогенеза, можно было предположить, что для световой регуляции экспрессии ядерных генов БФ необходимо присутствие ПП в цитоплазме. Методом конфокальной лазерной спектроскопии в экспериментах по визуализации интермедиатов хлорофилла: ПП и Mg-ПП, удалось показать, что в условиях фотоокислительного стресса (при освещении обработанных норфлурозоном (НФ) проростков арабидопсиса) Mg-ПП накапливался в хлоропласте и цитоплазме, а ПП – в цитоплазме [Ankele et al., 2007]. Отсутствие этих предшественников хлорофилла в ядре исключало возможность их прямого влияния на транскрипцию ядерных генов. По-видимому, протопорфирины в цитоплазме взаимодействуют с регуляторными белками, опосредованно снижая экспрессию ядерных генов БФ. Накопление ПП и Mg-ПП в условиях фотодеструкции хлоропластов (НФ+свет), также ведет к подавлению экспрессии ядерных генов белков светового стресса ELIP [Погульская и др., 2006; Осипенкова и др., 2007] и белков SIG1-6 - компонентов хлоропластной РНК-полимеразы PEP, которая преимущественно транскрибирует гены БФ у проростков дикого типа, [Ankele et al., 2007].

Участие Mg-ПП в репрессии транскрипции ядерных генов БФ активно обсуждается с 1984 года [Johanningmeier and Howell, 1984]. Гипотеза, согласно которой этот пигмент является негативным сигналом, продуцируемым хлоропластом, в случае его дисфункции, считались почти доказанной вплоть до 2008 года, когда в журнале PNAS (v. 105) появилось две экспериментальные статьи, ставящие под сомнение это утверждение. Японские исследователи, работая с мутантами арабидопсиса, не обнаружили прямой корреляции между накоплением Mg-ПП и уровнем экспрессии ядерных генов: *CAB*, *RBCS*, *GluTR* и других, существенных для фотосинтеза [Mochizuki et al., 2008]. Их английские коллеги [Moulin et al., 2008] не нашли Mg-ПП в растениях арабидопсиса, у которых в условиях фотодеструкции (НФ+свет), экспрессия генов БФ репрессирована. Напротив, искусственное повышение уровня эндогенных протопорфиринов за счет добавления АЛК, - прием, известный со времен С.

Граника [Granick, 1959], вело к усилению экспрессия генов БФ. Эти данные свидетельствуют, что роль протопорфиринов в передаче сигналов из хлоропласта в ядро еще предстоит выяснить.

FNR- фактор транскрипции, регулирующий синтез тетрапирролов в анаэробных условиях [Ouchane et al., 2007]. При недостатке кислорода на свету он активирует транскрипцию генов *HEMN* и *BCHE*, кодирующих независимые от кислорода ферменты синтеза хлорофиллов: копропорфириноген III- дегидрогеназу и магний-ПП-монометилциклазу, соответственно.

Нарушения путей передачи сигналов из хлоропластов в ядро. GUN-мутанты. Роль Mg-ПП как сигнальной молекулы хлоропластной природы, влияющей на регуляцию экспрессии генов ядра (рисунок 1.25), активно обсуждалась и при изучении мутантов арабидопсиса по ретроградному контролю, названных *gun* (*genomes uncoupled*) [Susec et al., 1993]. У этих мутантов транскрипция ядерных генов *CAB* и *RBCS*, кодирующих белки хлоропласта, сохраняется (в отличие от нормальных растений) в условиях фотодеструкции хлоропластов – при освещении обработанных норфлюороном проростков. Для получения *gun*-мутантов использовали трансгенные растения арабидопсиса, у которых промотор гена *CAB1* контролировал экспрессию двух репортерных генов, позволяющих легко тестировать его активность по устойчивости к антибиотик [Susec et al., 1993]. Трансгенные семена обрабатывали мутагеном – этил-метансульфонатом (ЭМС) и отбирали *gun*-мутанты, у которых экспрессия трансгена *CAB* сохранялась в условиях фотодеструкции. Изучение пяти таких мутантов показало, что гены, затронутые *gun*-мутациями, кодируют белки, участвующие в биосинтезе тетрапирролов. Мутация *gun5* представляет собой замену нуклеотидов (С-Т) в гене *CHLH* большой (Н) субъединицы магний-хелатазы (МХ), которая ведет к замене аминокислот А990V в белке CHLH [Mochizuki et al., 2001]. Продукт гена *GUN4* оказался способен *in vitro* связывать ПП и стимулировать активности МХ и АЛК-синтезирующего комплекса [Larkin

et al., 2003; Verdecia et al., 2005; Adhikari et al., 2011].

Мутанты арабидопсиса с удлинёнными гипокотиллями: *hy1* и *hy2* (*long hypocotile*), изолированные как формы с нарушенными функциями фитохромов, имели бледно-зеленую окраску, и демонстрировали *gun*-фенотип. Одноименные мутации оказались аллельными мутациям *gun2* и *gun3*, соответственно [Vinti et al., 2000]. Гены, маркированные мутациями *hy1/gun2* и *hy2/gun3*, кодируют ферменты биосинтеза фитохромобилинов: гем-оксигеназу [Muramoto et al., 1999; Davis et al., 1999] и фитохромобилин синтетазу [Kohchi et al., 2001], соответственно. Мутанты по обоим генам накапливали гем, и снижение уровня хлорофилла в их листьях объясняли свойством гема подавлять синтез АЛК по принципу обратного ингибирования (рисунок 1.21). Тот факт, что у них заблокирован синтез хромофоров фитохромобилинов (в составе фитохромов они задействованы в пути передачи светового сигнала), свидетельствовал о взаимодействии путей светового и хлоропластного сигналов. Эта взаимосвязь была показана и сотрудниками лаборатории Роберта Ларкина [Ruckle et al., 2007], которые среди вновь полученных *gun*-мутантов отобрали формы с удлинёнными гипокотиллями - мутанты по фоторегуляции. Четыре таких мутанта несли аллельные мутации в гене *CRY1*, кодирующем фоторецептор синего света криптохром. Мутанты *cry1* имели «неполный» *gun*-фенотип: увеличение на 5-10% по сравнению с диким типом уровня экспрессии генов САВ в условиях деструкции хлоропластов (за 100% был принят уровень такой экспрессии у растений с нормальными хлоропластами – не обработанных линкомицином).

Мутация *gun1* затрагивает ген *GUN1*, который кодирует ДНК-связывающий белок хлоропласта [Koussevitzky et al., 2007]. По мнению авторов, *GUN1* работает в пути передачи пластидного сигнала, в результате включения которого факторы транскрипции, один из которых известен - *ABI4* (*abscisic acid-insensitive 4*), связываясь с G-боксами промоторов генов БФ, подавляют их экспрессию. Таким образом, G-боксы промоторов генов БФ являются, по-видимому, общими для путей световых сигналов и сигналов хлоропласта (по крайней мере, в зависимом

от GUN1 пути передачи ретроградного сигнала). Для выяснения механизмов взаимодействия этих путей, контролируемых GUN1 и CRY1, в условиях деструкции хлоропластов, был сконструирован и исследован двойной мутант генотипа: *gun1, cry1* [Larkin and Ruckle, 2008]. Его проростки имели 100% *gun*-фенотип, - при освещении синим светом, уровень экспрессии *LHCB (CAB)*-гена после обработки линкомицином у них был таким же, как у растений дикого типа, не обработанных антибиотиком. Это означало, что при освещении растений синим светом GUN1 и CRY1 полностью отвечают за репрессию генов *CAB*. Более того, оказалось, что CRY1 репрессирует транскрипцию *CAB*-гена в условиях дисфункции хлоропластов путем переключения активности (с позитивной на негативную) фактора HY5.

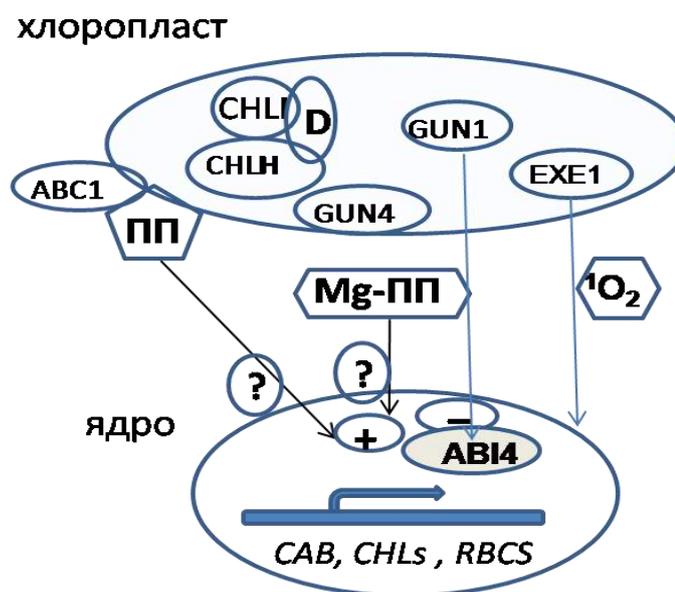


Рисунок 1.25. Пути передачи ретроградных (из хлоропласта в ядро) сигналов в фотосинтезирующей клетке. Экспрессию ядерных генов БФ, кодирующих белки светособирающих комплексов (*CAB*), ферментов биосинтеза хлорофилла (*CHLs*) и малой субъединицы рибулозобифосфат- карбоксилазы (*RBCS*) регулируют «факторы хлоропласта» - тетрапирролы: протопорфирин IX (ПП), магний-протопорфирин IX (Mg-PP), и молекулы белков (в виде овалов). Вопросительные знаки означают еще не обнаруженные факторы, «работающие» в путях передачи сигналов

Напомним, что по современным представлениям, криптохромы активируют

экспрессию ядерных генов - при освещении они запускают механизм дезактивации COP1-протеаз, связывающих активатор транскрипции генов БФ HY5 [Deng et al., 1992]. Все исследованные одиночные и двойные мутанты генотипа: *cry1*, *gun1*, *cry1,gun1* и *cry1,hy5* демонстрировали нарушения биосинтеза хлорофилла в процессе зеленения – при освещении выращенных в темноте проростков, свидетельствуя, на наш взгляд, о тесном взаимодействии биосинтеза пигментов хлоропласта и путей передачи световых и хлоропластных сигналов, регулирующих экспрессию ядерных генов биосинтеза ХЛ. Таким образом, *Gun*-мутации нарушают пути передачи ретроградных сигналов (из хлоропласта в ядро) затрагивая гены, продукты которых участвуют в подавлении светоиндуцированной экспрессии САВ-генов в условиях деструкции хлоропластов. Изучение *gun*-мутантов показало, что при разрушении хлоропластов блокирование экспрессии ядерных генов БФ на свету осуществляют следующие белки хлоропласта: GUN1, GUN5 (CHLH – большая субъединица магний-хелатазы), GUN4 – мембранный белок, связывающий интермедиаты синтеза хлорофилла: ПП и Mg-ПП, ABC1 – белок-транспортер ПП из цитоплазмы в хлоропласт; ферменты синтеза фитохромов: GUN2 – гем оксигеназа, GUN3 – фитохромобилин синтетаза, и CRY1 - фоторецептор синего света криптохром.

1.7.6. Этапы биосинтеза, существенные для механизмов регуляции

Для регуляции уровня содержания хлорофиллов в растительной клетке наиболее существенны следующие шаги биосинтеза тетрапирролов (Рис.1.21):

а) синтез АЛК – первого специфического продукта в биосинтезе тетрапирролов;

б) включение металлов (Mg^{2+} или Fe^{2+}) в молекулу протопорфирина IX – последнего общего предшественника хлорофиллов и гема, соответственно;

в) фотоконверсия ПХЛД – строго светозависимый процесс у высших растений;

г) биосинтез хлорофилла «б».

Синтез АЛК. В хлоропластах фотосинтезирующих эукариот АЛК образуется из глутамата в три этапа. После его активации – присоединения транспортной тРНК^{GLU}, ферментом Glu-тРНК-синтетазой следует превращение глутамил-тРНК^{Glu} в глутамат-1-полуальдегид с освобождением тРНК^{Glu} ферментом тРНК^{Glu}-редуктазой (*GluTR*). Далее фермент – глутамат-1-полуальдегид-аминотрансфераза (*GSA-AT*) осуществляет транс-аминирование с образованием АЛК [Beale, 1990]. Из всех молекул, участвующие в формировании АЛК, для регуляции биосинтеза хлорофилла наиболее важны две: тРНК^{Glu} и *GluTR* [Tanaka and Tanaka, 2007].

Кодируемые хлоропластными генами тРНК^{Glu} задействованы в синтезе АЛК и белков, и узнаются, по крайней мере, двумя ферментами: *GluRS*, *GluTR* и фактором элонгации EF-Tu. Установлено, что эти тРНК выполняют также функции регулятора транскрипции в хлоропласте [Hanaoka et al., 2005]. В процессе индуцируемого светом синтеза тилакоидных мембран, тРНК^{Glu} непосредственно связываются с *NEP*, ингибируя ее активность, и позволяя *PEP* транскрибировать гены БФ. В пластидах синтез белков и тетрапирролов, возможно, конкурируют за глутаминовую тРНК. По-видимому, этой молекуле принадлежит ключевая роль в координации обоих процессов, столь необходимой при формировании пигмент-белковых комплексов.

Фермент *GluTR*- важнейший элемент в регуляции синтеза хлорофиллов. Его активность *in vitro* ингибируется гемом и ПХЛД не аллостерически, а только в присутствии фракции растворимых белков, то есть через регуляторные белки [Srivastava et al., 2005]. Экспрессию генов *GluTR* у растений и водорослей регулируют свет, растительные гормоны и циркадные ритмы [Gagne and Guertin, 1992; McCormac et al., 2001].

Ранние этапы биосинтеза хлорофилла – фермент магний-хелатаза. Большинство известных мутантов с нарушениями в пути передачи сигналов из хлоропласта в ядро одновременно являются мутантами по биосинтезу хлорофилла.

Мутации *gun2-4* и *laf6*, ведут к накоплению ПП или Mg-ПП и затрагивают гены, контролирующие работу магний-хелатазы (МХ). Ряд мутаций в гене *CHLN*, кодирующем большую субъединицу (Н) этого фермента, обуславливают *gun*-фенотип: *sch* (P642L) и *gun5* (A990L), - у арабидопсиса, и *brs-1* (3152insT) хламидомонады. Все эти факты позволяют предполагать участие МХ в передаче ретроградных сигналов.

В процессе зеленения свет активирует транскрипцию гена *CHLN*, также как и *GUN4*. Изучение световой регуляции экспрессии этих генов у мутантов по фоторецепторам: *phyA* и *phyB* показало, что *CHLN* в комплексе с *GUN4* участвуют в передаче световых сигналов от фитохромов [Stephenson and Terry, 2008].

Фитогормон абсцизовая кислота (АБК) – антагонист гормонов роста - ауксинов, гибберрилинов и цитокининов, подавляет метаболизм фотосинтезирующей клетки и играет ключевую роль в адаптации растений к неблагоприятным условиям внешней среды. Поиски рецепторов АБК привели к выделению белка арабидопсиса, названного *ABAR* (*abscisic acid receptor*). По аминокислотной последовательности была прочитана нуклеотидная последовательность кодирующего его гена, который оказался геном *CHLN* - большой субъединицы МХ [Shen et al., 2006]. Способность С-концевого фрагмента белка *CHLN* специфически связываться с АБК была подтверждена и в экспериментах *in vitro* [Shen et al., 2006]. При этом, результаты, полученные на арабидопсисе, не нашли подтверждение при анализе белка *CHLN* ячменя [Muller and Hansson, 2009] и, следовательно, вопрос о прямом участии *CHLN* в гормональной регуляции АБК остается дискуссионным. На сегодняшний день установлено, что Н субъединица МХ, будучи встроенной с мембрану хлоропласта своим С-концевым участком, взаимодействует с транскрипционными факторами семейства *WRKY* (*WRKY40,18,60*), и этот комплекс способен модулировать экспрессию АБК-зависимых генов [Shang et al., 2010].

Белок малой субъединицы *CHL1* магний-хелатазы имеет сайты связывания

с тиоредоксином [Ikegami et al., 2007]. Эти белки, подверженные окислительно-восстановительным превращениям, регулируют окислительно-восстановительные состояния белков (редокс-состояния). В хлоропласте при освещении начинает работать цепь переноса электронов, в результате чего образуется восстановленные молекулы ферридоксина, которые, окисляясь, передают электроны на тиоредоксин, активирующий хлоропластные ферменты [Тихонов, 1999]. *К настоящему времени накоплено немало экспериментальных фактов, свидетельствующих об участии большой субъединицы магний-хелатазы CHLH в регуляции биосинтеза хлорофилла. Помимо выполнения ферментативных функций – встраивания магния в молекулу ПП, она является звеном в передаче светового и ретроградного сигналов, и, возможно, служит мишенью фитогормона – абсцизовой кислоты. Фермент магний-хелатаза также находится под редокс-контролем - усиление его активности на свету происходит за счет тиоредоксин-опосредованной активации.*

Фотознзим биосинтеза хлорофилла сПОР регулирует зеленение. У высших растений индукция светом фермента сПОР запускает не только механизм синтеза хлорофилла, но и фотоморфогенез - процесс формирования хлоропластных мембран из этиопластов. Внутренние мембраны этиопластов проростков, выращенных в темноте, содержат протилакоиды и проламеллярное тело - крупное образование, в котором находится протохлорофиллид-голохром (комплексы, содержащие ПХЛД – одновременно субстрат и светособирающий пигмент, POR и НАДФН). На свету начинается активный синтез ХЛД, проламеллярное тело дезинтегрируется, а протилакоиды превращаются в тилакоидные мембраны, на которых формируются пигмент-белковые комплексы фотосистем [Беляева и Литвин, 2007]. Таким образом, только с началом синтеза ХЛ в про-хлоропласт из цитоплазмы поступают ХЛ-связывающие белки. Генетическая детерминация механизма, обеспечивающего баланс синтезов пигментов и связывающих их белков в хлоропласте, остается пока предметом

экспериментальных исследований [Philippart et al., 2007].

При изучении явления, названного «индуцированный длинноволновым красным светом блок процесса зеленения» (FRBG - *Far Red block of greening response*), было показано, что фермент сПОР участвует в координации процессов фотоморфогенеза и синтеза хлорофиллов – зеленения [McCormac and Terry, 2002]. Облучение длинноволновым красным светом (FR, $\lambda > 700$ нм) проростков арабидопсиса, выращенных в темноте, ведет к стимуляции фотоморфогенеза - запускаются процессы активации экспрессии ядерных и хлоропластных генов БФ, но не зеленения, поскольку FR не активирует сПОР. При этом количество молекул фермента снижается и накапливается его субстрат - ПХЛД. В результате у проростков укорачиваются гипокотили, но сохраняется желтая окраска. Если их поместить на обычный свет, процесс зеленения замедляется или блокируется (когда длительность FR-облучения превышает 24 часа). Исчезновение PORA белков сопровождалось снижением экспрессии генов *HEMA* и *LHCB*, кодирующих фермент GluTR и САВ- белки, соответственно. Сверхэкспрессия гена *POR* у трансгенных растений вела к супрессии FRBG-эффекта, что позволило сделать вывод об участии сПОР в регуляции экспрессии генов ферментов синтеза ХЛ. Влияние этого фермента на формирование тилакоидных мембран также обусловлено существованием в мембранах хлоропластов ПХЛД-зависимых Тос/Тис транслоконов - белковых комплексов, через которые белки из цитоплазмы попадают в пластиды [Schemenewitz et al., 2007].

Продукты фотосинтеза - сахара также вовлечены в обратную регуляцию экспрессии ядерных генов, кодирующих БФ. Низкое содержание сахаров в хлоропласте активизирует фотосинтез, тогда как их избыток стимулирует процессы роста и накопления углеводов [Oswald et al., 2001].

Регуляция биосинтеза хлорофилла *b*. Фермент САО. Хлорофилл *b* (ХЛ*b*) - дополнительный пигмент растений, водорослей и прохлорофит. В процессе его биосинтеза происходит двухступенчатое окисление метильной группы ХЛ*Д*_a или

ХЛ_а до формильной ферментом хлорофиллид/хлорофилл оксигеназа (САО, *chlorophyll a oxygenase*) в присутствии кислорода [Tanaka et al., 1998].

На тилакоидных мембранах хлоропластов световая энергия поглощается пигмент-белковыми светособирающими комплексами (ССК) двух фотосистем. Основная часть молекул ХЛ_б входит в состав ССК фотосистемы 2 (ССК2). Растения строго контролируют соотношения ХЛ_а и ХЛ_б, которые варьируют от 3 (в норме) до 4 (в условиях стресса). Избыток мРНК ядерного гена САО у трансгенных растений приводит к снижению этого соотношения до 2,7 и увеличению уровня экспрессии генов *LHCB1-6* (*light-harvesting chlorophyll a/b proteins*) белков ССК2. По-видимому, транскрипции генов САО и *LHCB* регуляторно связаны [Tanaka and Tanaka, 2005].

В составе фермента САО три домена (А, В и С), из которых каталитическую функцию выполняет С-домен, тогда как А - участвует в контроле уровня белка САО в ответ на накопление ХЛ_б через протеолитическую деградацию хлоропластной протеазой CLP (*chloroplast protease*) [Nakagawara et al., 2007; Yamasato et al., 2008]. У мутантов без ХЛ_б заблокирован импорт белков ССК из цитоплазмы в хлоропласт. Изучение этого явления позволило установить, что А-домен фермента САО взаимодействует с субъединицами Тос/Тис транслоконов, влияя, таким образом, на транспорт белков в хлоропласт [Hooper and Eggink, 2008; Reinbothe et al., 2006].

1.7.7. Механизмы обратного ингибирования синтеза хлорофилла

Промежуточные продукты биосинтеза ХЛ фототоксичны. Протопорфирин IX и его магниевые производные являются фотосенсибилизаторами – веществами, вызывающими образование реактивных форм кислорода (РФК) на свету [Красновский, 2001]. Их накопление приводит к фотодеструкции - фотоокислению липидов мембран и разрушению клетки. Один из основных механизмов регуляции хлорофиллообразования состоит в предотвращении избыточного накопления этих

интермедиатов путем обратного ингибирования синтеза первого предшественника ХЛ - АЛК гемом и протохлорофиллидом.

Ингибирование протохлорофиллидом. Белок FLU. Протохлорофиллид (ПХЛД) - субстрат фотофермента сПОР у высших растений. В темноте сПОР не работает, а накопление свободных молекул ПХЛД ведет к обратному ингибированию синтеза АЛК, и, соответственно, снижению активности всей системы синтеза ХЛ. Сравнительно недавно, с использованием генетических подходов был обнаружен белковый компонент этой «регуляторной петли», негативный регулятор биосинтеза тетрапирролов – белок FLU, который через взаимодействие с ферментом глутамил-тРНК редуктазой (GluTR) ингибирует активность АЛК-синтезирующего комплекса [Meskauskiene et al., 2001; 2002]. Под действием EMS были независимо получены 4 мутанта арабидопсиса с нарушенной регуляцией - накапливающие в темноте избыточное количество ПХЛДа. Они были названы *flu*-мутанты (*fluorescent*), из-за характерной ярко-красной флюоресценции ПХЛДа при облучении этиолированных проростков синим светом (длиной волны 400–450 нм). Мутанты по этому гену накапливали примерно в 10 раз больше ПХЛД и имели более чем в 3 раза увеличенную активность АЛК синтезирующих ферментов. Сходный фенотип был описан в 1974 году для мутантов ячменя *tigrina* [Nielsen, 1974], а ранее, в конце 50-х годов 20 века, С. Граник обнаружил, что при добавлении экзогенной АЛК к проросткам, растущим в темноте, в их клетках накапливается ПХЛД [Granick, 1959]. Генетический анализ *flu*-мутантов показал, что все анализируемые мутации аллельны и принадлежат одному ядерному гену *FLU*. Для его изоляции были использованы стратегии позиционного клонирования и геномной комплементации: ген был картирован, и мутантные растения трансформировали ДНК из библиотеки ВАС-клонов, содержащих фрагменты участка хромосомы, маркированного мутацией. По способности восстанавливать фенотип дикого типа у трансформантов, был обнаружен фрагмент привнесенной ДНК, содержащий ген *FLU*, – он компенсировал проявление мутантной аллели *flu* [Meskauskiene and

Apel, 2002]. Вскоре, ортолог этого гена - *FLP (Flu-Like Protein)* был обнаружен в геноме хламидомонады [Falciatore et al., 2005]. Его экспрессия позитивно регулируется светом, а в условиях темнового роста – интермедиатами биосинтеза хлорофилла: ПП, Mg-ПП и ПХЛД. У мутантов ячменя *tigrina-d*, накапливающих ПХЛД в темноте, ген, затронутый мутацией, также является ортологом гена *FLU* арабидописа [Lee et al., 2003]. Таким образом, взаимодействие *FLU*-белка с ферментом глутамил-тРНК редуктазой обеспечивает механизм обратного ингибирования синтеза хлорофилла.

У хламидомонады найдена еще одна регуляторная мутация, фенотипическое проявление которой состоит в усилении активности АЛК-синтезирующих ферментов. Продукт хлоропластного гена *Mod-u-25*, подобно белку *FLP* действует как негативный регулятор синтеза АЛК [Chekunova et al, 1995], являясь, таким образом, еще одним фактором хлоропласта, контролирующим экспрессию ядерных генов.

Активация программ стрессового ответа. Белки EX. *Flu*-мутанты, накапливающие ПХЛД в темноте, при переносе на свет перестают расти, а их проростки погибают в результате фотодеструкции - действия синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), индуцированного ПХЛД. Эти мутанты были использованы в генетических экспериментах для получения ответа на вопрос, действуют ли молекулы $^1\text{O}_2$ непосредственно на мембраны, разрушая их химически, или их появление в хлоропласте активирует генетически детерминированные программы стрессового ответа. На основе *flu*-мутанта были получены двойные мутанты - ревертанты, которые при переносе на свет не гибли, подобно исходной форме, а продолжали расти как растения дикого типа [Wagner et al., 2004]. У них нормальный «стрессовый ответ» в виде гибели проростков или остановки роста растений оказался заблокированным в результате рецессивных мутаций, в гене, названном *EX1 (executer1)*. Двойные мутанты генотипа: *ex1,flu* в темноте накапливали ПХЛД, а при освещении генерировали $^1\text{O}_2$ в тех же количествах что и одиночные *flu*-мутанты, но сохраняли способность к росту. Ядерный ген *EX1*

был картирован и клонирован методом геномной комплементации. Авторы предположили, что кодируемый им хлоропластный белок необходим для активации программы клеточной гибели, индуцированной $^1\text{O}_2$. В геноме арабидопсиса был обнаружен еще один *EX*-подобный ген, названный *EXECUTER2*, нуклеотидная последовательность которого частично совпадала (42%) с геном *EX1* [Lee et al., 2007]. Белок EX2, также как и EX1, локализован в хлоропласте и связан с тилакоидными мембранами. Авторы показали, что инсерционное разрушение гена *EX2* у *flu*-мутанта приводит к усилению уровня светоиндуцированной экспрессии $^1\text{O}_2$ -зависимых ядерных генов, по сравнению с диким типом и двойными мутантами генотипа: *exe1,flu*, и предположили, что EX2 белок участвует в пути передачи сигнала из хлоропласта в ядро, индуцируемом $^1\text{O}_2$.

Супрессия *flu*-фенотипа была показана и в случае мутации *ulf3* (аллельной мутациям *hyl* и *gun2*) в гене, кодирующем гем-оксигеназу [Goslings, 2004]. Потеря функции этого фермента ведет к накоплению гема, который, наряду с ПХЛД, но независимо от него, подавляет активность глутамил-тРНК редуктазы (GluTR). С-конец молекулы GluTR специфически связывается с белком FLU, тогда как его N-конец необходим для ингибирования гемом.

1.7.8. Заключение

Биосинтез хлорофиллов у растений и водорослей происходит в хлоропласте. Большинство белков, вовлеченных в этот процесс, кодируются ядром, синтезируются в цитоплазме, и транспортируются в хлоропласт. Для оптимизации взаимодействий хлоропласта и ядра при реализации функций фотосинтеза клетка осуществляет координированный контроль экспрессии ядерных генов в ответ на метаболические сигналы хлоропласта (активные формы кислорода, сахара, интермедиаты синтеза хлорофилла, редокс-активные молекулы) и факторы внешней среды, главным из которых является свет. Свет и сигналы хлоропласта

регулируют фотоморфогенез - биогенез фотосинтетически-активных тилакоидных мембран хлоропластов, на которых происходят основные процессы синтеза пигментов и реакции фотосинтеза.

Система передачи светового сигнала (от фоторецепторов до промоторов ядерных генов) обеспечивает световую регуляцию экспрессии генов БФ, основным инструментом которой служат факторы транскрипции. На посттрансляционном уровне, важнейшим компонентом системы адаптации растений к условиям освещения являются COP-белки, осуществляющие светозависимый протеолиз факторов транскрипции. Свет также регулирует активность ферментов биосинтеза ХЛ через механизмы модификации белков: фосфорилирование и изменение редокс-состояния [Тихонов, 1999]. При освещении в хлоропластах растений начинает работать электронно-транспортная цепь, и, образуемые при этом восстановленные молекулы ферридоксина активируют ферменты хлоропласта. Механизм перераспределения световой энергии между светособирающими комплексами фотосистем (ФС1 и ФС2) включает фосфорилирование, которое ведут STN7 протеин-киназы [Rochaix, 2007]. В редокс-контроль транскрипции хлоропластных генов также вовлечены сенсорные киназы CSK (*chloroplast sensor kinase*), известные как элемент двухкомпонентных систем передачи регуляторных сигналов у цианобактерий [Puthiyaveetil et al., 2008]. Участие киназ в процессах регуляции синтеза ХЛ и фотоморфогенеза растений становится все более понятным, но требует серьезного дальнейшего изучения.

Оптимизацию экспрессии ядерных генов, кодирующих белки хлоропласта, осуществляет сигнальная система, действующая между хлоропластом и ядром фотосинтезирующей клетки. В зависимости от своего функционального состояния, хлоропласт продуцирует факторы, усиливающие, и(или) блокирующие экспрессию ядерных генов БФ.

Наиболее часто, нарушения в работе хлоропласта связаны с фотодеструкцией, которую вызывают реактивные формы кислорода (РФК). Они

появляются на свету в результате работы электронно-транспортной цепи (супероксидные радикалы) или при фотосенсибилизации свободных порфиринов (от ПП до ХЛ), когда образуются молекулы синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$). В отсутствие фотопротекторов – каротиноидов, РФК вызывают окислительный стресс, сигналы о котором передают белки EX1,2 [Wagner et al., 2004; Lee et al., 2007]. В передаче сигнала о дисфункции хлоропласта в ядро участвуют также белки GUN1 и CHLH. Роль интермедиатов биосинтеза хлорофилла – ПП и Mg-ПП в ретроградном контроле и световой регуляции ядерных генов биосинтеза ХЛ еще предстоит установить.

Свет и пластидные сигналы служат потенциальными индукторами или репрессорами факторов транскрипции, регулирующих экспрессию генов синтеза ХЛ. При этом, G-боксы в промоторах светорегулируемых генов, по-видимому, являются общими для путей световых сигналов и сигналов хлоропласта (по крайней мере, в GUN1-зависимом пути передачи ретроградного сигнала) [Larkin and Ruckle, 2008]. Эти сигналы могут быть взаимозависимы, и факторы хлоропласта способны «перезапускать» систему передачи светового сигнала, переключая индуцибельные и репрессибельные функции. Более того, эти факторы могут выступать в качестве эндогенных регуляторов светового сигнала, позволяя растениям сохранять жизнеспособность клетки в условиях фотодеструкции.

Регуляция уровня биосинтеза ХЛ в хлоропласте осуществляется по принципу обратного ингибирования первого специфического предшественника тетрапирролов – АЛК конечными продуктами светонезависимого биосинтеза – ПХЛД и гемом. Такая регуляция необходима клетке, прежде всего, для предотвращения фотодеструкции, вызываемой интермедиатами тетрапиррольного биосинтеза. В этой регуляторной сети важнейшая роль принадлежит ферменту синтеза АЛК - *GluTR* – глутамил тРНК-редуктазе и его активатору – транспортной РНК^{Glu}. К ферментам биосинтеза ХЛ, выполняющим помимо энзиматических, еще и регуляторные функции, можно отнести: магний-хелатазу, СПОР (ПХЛД-оксидоредуктазу) и САО – хлорофиллид *a* /хлорофилл *a*-оксигеназу.

Уровень современных знаний о генетической регуляции биосинтеза ХЛ позволяет утверждать, что синтез пигментов взаимосвязан с реакциями фотосинтеза, биогенеза хлоропластов, фотоморфогенеза. Реализация генетических процессов, контролирующих биосинтез основных пигментов фотосинтеза – ХЛ, находится под системным контролем целого ряда эндогенных и экзогенных факторов (свет, кислород, содержание сахаров и т.д.), определяющих физиологическое состояние хлоропластов – органелл, в которых осуществляется фотосинтез. Исследования мутантов с нарушенной регуляцией показали, что физиологический статус хлоропласта регулирует экспрессию ядерных генов БФ через систему сигналов, одним из основных атрибутов которой, помимо белков, являются тетрапирролы – интермедиаты биосинтеза ХЛ, и молекулы тРНК.

Генетические механизмы световой, ретроградной, гормональной и метаболической регуляции, редокс-контроля и апоптоза в фотосинтезирующей клетке тесно связаны и образуют единую сеть, неотъемлемую частью которой составляют процессы биосинтеза тетрапирролов. В последние годы удалось обнаружить значительное количество факторов, участвующих в этих процессах, однако в области генетики регуляции биосинтеза хлорофиллов осталось много тайн, раскрытие которых еще предстоит.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Генетический материал

В работе использованы штаммы *Chlamidomonas (C.) reinhardtii* из Петергофской Генетической Коллекции (ПГК) [Квитко и др., 1983] и из коллекции Центра Генетики Хламидомонады (CGC) [Harris, 1989], поддерживаемые на кафедре генетики СПбГУ. Их краткая характеристика представлена в таблице 2.1. Описания рекомбинантов, гаплоидных и диплоидных штаммов, полученных и использованных в работе, даны в ходе изложения экспериментального материала.

2.2. Условия культивирования штаммов хламидомонады

Для поддержания культур клеток *C. reinhardtii* использовали стандартные питательные среды [Квитко, 1975], состав которых представлен в таблице 2.2. Культуры выращивали при температуре 20-25 °С на белом свете (200 - 300 мкЕ/м²сек), а светочувствительные штаммы – в темноте. Контроль генетических маркеров осуществляли, используя селективные среды. Они содержали: аргинин – 50 мг/л, никотинамид – 0,75 мг/л, стрептомицин – 5-50 мг/л, актидион (циклогексимид) – 2,5 мг/л, метионинсульфоксиимин – 300 мг/л, эритромицин – 50-200 мг/л. Тиаминзависимость определяли как чувствительность к его антиметаболиту – окситиамину (1 мг/л). Тестирование признаков ауксотрофности и устойчивости проводили методом отпечатков на серию сред [Захаров, Квитко, 1967].

2.3. Тестирование признака – парализованные жгутики

Клетки *C. reinhardtii* суспензировали в воде, помещали на свет, и через 2 часа этот признак можно было выявлять по оседанию на дно пробирки клеток с парализованными жгутиками, тогда как клетки дикого типа плавали в толще

воды. Нарушение подвижности и дефекты жгутикового аппарата также наблюдали с помощью оптического микроскопа (окуляр 20^x, объектив 10^x).

Таблица 2.1. Штаммы хламидомонады, использованные в работе

Штамм	Фенотип	Генотип	Происхождение
1	2	3	4
494	Зеленый прототроф	<i>mt-</i>	Колл. Р. Смита (США)
СС-124	Зеленый прототроф	<i>mt-</i>	Колл. Р. Левина (США)
137С(+)	Зеленый прототроф	<i>mt+</i>	Колл. Р. Левина (США)
СР-2-60	Зеленый стрептомицин-устойчивый	<i>mt-,sr-u-2</i>	Колл. Н. Гилхема (США)
НР	зеленый неоминустойчивый	<i>mt+, nr-u-2-1</i>	- // -
Ник-11	Зеленый никотинамид-зависимый	<i>mt+, nic-11</i>	Колл. М. Адамса (США)
277		<i>mt+, nic7</i>	Колл. Эберсольда (США)
430	Зеленый множественно-маркированный	<i>mt+, ac-17, nic-13, pf-2, pir-1, can-1, msr-1, act-2</i>	Колл. Н. Гилхема (США)
СС-1336	- // -	<i>mt-, pf-14, act-2</i>	CGC
СС-78	Зеленый эритромицин-устойчивый	<i>mt-, ery3</i>	- // -
Арг7	Зеленый аргинин-зависимый	<i>mt-, arg7</i>	Колл. Н. Гилхема (США)
Арг2	- // -	<i>mt-, arg7-8</i>	
11-32ф	- // -	<i>mt+, arg7-8</i>	Колл. Э. Георга (Англия)
Д-2	Зеленый прототроф	<i>mt+/mt-, arg7/arg7-8</i>	ПГК (Карпова, 1982)
Т-5-52г	Зеленый аргинин-зависимый	<i>mt+/mt-, arg7/arg7-8</i>	ПГК (Чумакова, 1976)
Д-19/2-20	Зеленый прототроф	<i>mt+/mt-, chl1-19/+, arg7/arg7-8</i>	- // -
Н-19	Оранжевый светочувствительный	<i>mt-, chl1</i>	ПГК (Столбова, 1971)
Н-122	- // -	<i>mt-, lts3</i>	- // -
НГ-2	- // -	<i>mt-, lts7</i>	- // -
СР-2-60/13	- // -	<i>mt-, or13</i>	ПГК (Бояджиев, 1974)
494/3	- // -	<i>mt-, or3</i>	- // -
494/69	- // -	<i>mt-, or69</i>	- // -
brs-1	- // -	<i>mt+, brs-1</i>	От В. Т. Ванга (Wanget. al., 1974)
brc-1	- // -	<i>mt+, brc-1</i>	
АС-20-5	- // -	<i>mt+, ac-20</i>	ПГК

ПГК – Петергофская генетическая коллекция

Таблица. 2.2. Состав сред, использованных в работе

Компоненты	Состав	на 1л среды		
		ТАР	ТАР обог.	Т
Раствор Бейеринка*	<u>На 1л H₂O</u> NH ₄ Cl 16гр MgSO ₄ 4гр CaCl ₂ 2гр	25 мл	25 мл	25 мл
Фосфатный буфер	<u>На 100мл H₂O</u> K ₂ HPO ₄ 9,36гр KH ₂ PO ₄ 6,3гр	1 мл	1 мл	1 мл
Tris буфер	<u>На 1л H₂O</u> Tris base 24,2гр HCl 15мл	100 мл	100 мл	100 мл
Ацетат натрия		2 гр	2 гр	-
Раствор микро-элементов	<u>На 1л H₂O</u> H ₃ BO ₃ 1гр ZnSO ₄ ...7H ₂ O 1гр MnSO ₄ ...4H ₂ O 0,4гр CoCl ₂ ...6H ₂ O 0,2гр CuSO ₄ 0,04гр Na ₂ MoO ₄ ...2H ₂ O 0,2гр	1 мл	1 мл	1 мл
Дрожжевой автолизат		-	0,4 гр	-
Агар		15 гр	15 гр	15 гр

*Для приготовления безазотистой среды Т использовали раствор Бейеринка без NH₄Cl

2. 4. Гибридологический анализ мейотического потомства

Постановка скрещиваний. Скрещивания проводили по методу, описанному А.В. Столбовой [Столбова, 1971]. Выросшие на агаре клетки родительских форм суспензировали в воде (или среде Т без азота) и культивировали 24 часа на свету для индукции гаметогенеза. Суспензии гамет противоположных типов спаривания объединяли и выдерживали на свету в течение 2-х часов, а затем копуляционную смесь выливали на чашки Петри с твердой (3% агар) средой ТАР. Эти чашки со смесью зигот и вегетативных клеток оставляли на свету на сутки, а затем помещали на 6 суток в темноту. За это время зиготы созревали и были готовы к индукции мейоза.

Тетрадный анализ. Для индукции мейоза созревшие зигоспоры штрихом через середину чашки Петри переносили на среду, разлитую тонким слоем (2-3 мм), и обрабатывали 25 секунд парами хлороформа, убивающими вегетативные клетки. Через 20-24 часа культивирования на свету зиготы прорастают, образуя 4-8 зооспор. Изоляцию зооспор индивидуальных зигот проводили на агаровых пластинках при помощи оплавленной иглы, с использованием микроманипулятора ММ-1 в сочетании с микроскопом МБС-1. После того, как мейотические продукты формировали колонии, тетрады нумеровали, описывали и тестировали методом реплик на серию сред. При математической обработке результатов тетрадного анализа, расстояния между генами (Д) в сантиморганидах (сМ) в случае наличия их сцепления определяли по формуле:

$$Д=(0,5fT+3fN) \cdot 100.$$

Расстояние ген-центромер рассчитывали по формуле:

$$Д=0,5fT \cdot 100,$$

где fN и fT – частоты появления неродительских дитипов и тетратипов в потомстве анализируемых зигот [Захаров, 1978].

Посемейственный анализ. Методика посемейственного анализа состоит в переносе смеси зигот и вегетативных клеток на свежую среду в расчете 300-700 зигот на одну чашку Петри (концентрацию определяли в камере Горяева). После элиминации вегетативных клеток (парами хлороформа в течение 30 секунд) и индукции мейоза светом (24 часа), зиготы прорастают. Продукты мейоза одной зиготы вырастают вместе и дают начало одной общей колонии.

Случайная выборка зооспор. В отличие от посемейственного анализа, при случайной выборке зооспор после обработки хлороформом смеси зигот и вегетативных клеток и индукции мейоза светом, содержимое «зиготических мешков» равномерно распределяют шпателем по поверхности чашки Петри. Проросшие споры - потомство всех зигот, прошедших мейоз, и являются случайной выборкой зооспор.

2.5. Определение типа спаривания

Тип спаривания клеток *C. reinhardtii* определяли, скрещивая исследуемые культуры со штаммами-тестерами: СР-2-60 (*mt-*) и НР (*mt+*). Наличие зигот регистрировали по пленке, образуемой ими на поверхности суспензии с копуляционной смесью (полученной, как описано в подразделе 2.4) на свету в течение 24-28 часов. Для светочувствительных бесхлорофилльных штаммов, интенсивность света была ниже пороговой (50–100 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{сек}$). В сомнительных случаях образование зигоспор регистрировали с помощью микроскопа.

2.6. Определение размеров клеток

Для определения размеров клеток использовали культуры в линейной стадии роста. Препараты клеток *C. reinhardtii*, обездвиженных йодом и наносили на слой полужидкого (0,5%) агара. Измерения проводили на микроскопе NU2 (фирмы CARLZEISS, JENA) с проекционным экраном, на который предварительно наводили шкалу объект-микрометра и устанавливали 1000-кратное увеличение (1 $\mu\text{м}$ в 1 мм). Промеряли наибольший диаметр (Д) каждой клетки; просчитывали не менее 200 клеток каждого штамма. Средний объем (v) вычисляли по формуле:

$$V (\text{мкм}^3) = 1/6 \cdot \text{Д} \cdot 0,64,$$

где 0,64 – поправочный коэффициент, учитывающий эллипсоидную форму клеток [Чемерилова, 1979].

2.7. Мутагены и методы мутагенеза

Химический мутагенез. В работе использовали следующие химические мутагены: N-метил-N-нитро-N-нитрогуанидин (МННГ, получен в лаборатории химического мутагенеза ИХФ АН СССР); 2-амино-6N-гидроксилампурин (АГАП) и диэпоксидоктан (ДЭО). Оценку частоты ревертирования проводили в спот-тесте по методу Айера и Шибальского, внося вещества на дисках фильтровальной бумаги в центр чашки Петри, куда предварительно высевали суспензии клеток в концентрации 10^7 кл/мл. Для учета ревертирования оранжевых

светочувствительных мутантов чашки после 4-х суток инкубирования в темноте помещали на свет. В работе использовали следующие стандартные количества мутагенов, наносимых на чашки с культурой клеток: МННГ – 10 мкг; ДЭО – 1 мкл; АГАП – 20 мкл 1% раствора.

Облучение суспензий клеток хламидомонады УФ-лучами проводили, используя лампу ДВЗО-1 (5 дж/м²).

Инсерционный мутагенез. Нуклеотидные последовательности, фланкирующие инсерцию, были идентифицированы методом LMS-PCR, предложенным Олафом Крузом (*Olaf Kruse*) с соавторами [Strauss et al., 2001]. При использовании этого метода амплификация фрагмента ДНК, не содержащего локус-специфичный сиквенс, супрессирована за счет образования похожих на сковородки структур (panhandle) с ручками, образуемыми адаптерами.

2.8. Методы спектрофотометрии

Фенотип мутантов по пигментации описывали спектрофотометрически – регистрируя спектры поглощения водных суспензий клеток *in vitro* на спектрофотометре СФ-10. Микроспектрофотометрирование одиночных живых клеток (гамет и зигот) проводили по методике, разработанной для хламидомонады [Бояджиев и др., 1973], с модификациями. Препараты готовили следующим образом: на покровное стекло наносили суспензию клеток или пленки с зиготами, после чего это стекло помещали на тонкий слой полужидкого (0,5%) Дифко-агара, предварительно нанесенного на предметное стекло. При этом клетки довольно долго сохраняются в нативном состоянии. Спектральные характеристики индивидуальных клеток получали, используя микроспектрофотометр МУФ-5. Микроспектрофотометрирование проводили в видимой области спектра (400-700 нм). Освещали препарат методом светового зонда: сверху через объектив микроскопа. Использовали световой зонд диаметром 2 мкм, который при объективе 40^x и окуляре 8^x имел площадь, примерно равную половине хлоропласта. Препараты переносили на предметный столик МУФ-5 и

выбранный объект «накрывали» зондом, ориентируя его в участок, где расположен хлоропласт. Запись проводили на малой скорости – 2,5 нм/сек, которая дает четкую картину в видимой области спектра. Рядом с записью объекта записывали фоновое поглощение – поглощение участка без клетки для учета рассеивания, вызванного предметным стеклом и агаром. Величину экстинкции (E) измеряли при длинах волн (λ): 440 нм, 480 нм, 560 нм, 660 нм. Расчеты проводили в условных единицах, измеряя высоту пиков поглощения в миллиметрах, вычитая фон для каждой точки и относя полученную величину к экстинкции в полосе 560 нм – условной мере светорассеяния и неспецифического поглощения света.

Спектральные характеристики индивидуальных клеток получали также с помощью микроспектрофотометра SMS-03 фирмы «Opton» (ФРГ) с системой обработки данных «IBAS-1». В этом случае регистрировали оптическую плотность в полосе светорассеяния при 560 нм и в максимуме поглощения ХЛа - при 680 нм. Соотношения E680/E560 использовали как показатель накопления хлорофиллов в клетках хламидомонады.

2.9. Определение качественного и количественного состава порфиринов

Оценка качественного состава порфиринов. К водной суспензии клеток *C. reinhardtii* (5 мл) добавляли 50 мл смеси этилацетата и ледяной уксусной кислоты (4:1 v/v), встряхивали в течение 3-х минут и помещали на 12 часов в темноту при 4 °С. Разделение порфиринов на фракции и получение их солянокислых растворов: протопорфирина IX (ПП) – в 1,5 М HCl и в 0,1 М HCl; уропорфирина – в 0,5 М HCl, проводили по методу Римингтона с модификациями [Falk, 1961].

Флуорисценцию порфиринов регистрировали на спектрофлуориметре УЛФ, изготовленном КБ АМН СССР, возбуждая ее длиной волны 405 нм. В ряде случаев, после доведения pH солянокислого раствора ПП до 3,2 – 3,6 пигмент переводили в диэтиловый эфир и записывали спектры поглощения на спектрофотометре UV-800 фирмы «Shimadzu».

Хроматографию порфиринов проводили на бумаге FN-1 фирмы «Filtrak» в системе растворителей 2,6-лутидин-вода (5:3 v/v) в атмосфере аммиака. В качестве стандартных пигментов использовали ПП фирмы «Serva» и бактериальный копропорфирин, полученный от В. Я. Быховского (Институт биохимии им. А. Н. Баха АН СССР).

Количественное определение магниевых производных ПП. Клеточную массу *C.reinhardtii* в фарфоровой ступке растирали с CaCO₃ под слоем 100% ацетона. Полученный гомогенат центрифугировали (6000 g, 15 минут), а затем доводили содержание ацетона в супернатанте до 85% 0,1 N раствором NH₄OH. Разделение пигментов на фитольные и бесфитольные формы проводили с помощью гексана по методике Авериной [Аверина и др., 1980]. Содержание предшественников хлорофилла (МПЭ, ПХД, ХДа) и ХЛа в щелочном ацетоне, отмытом гексаном, рассчитывали из спектров флуоресценции [Shlyk et al., 1982]. Содержание ХЛа и ХЛb в гексане рассчитывали из спектров поглощения, используя формулы, выведенные для этих пигментов в диэтиловом эфире [Falk, 1961].

Для оценки продуктивности мутантов хламидомонады по протопорфиру IX (ПП), 8 мл водной суспензии клеток обрабатывали ультразвуком (22 кГц, 90 сек), заливали 8 мл 3N HCl и центрифугировали (6000 g, 15 мин). Концентрацию ПП определяли после регистрации оптической плотности (E) растворов при 380 нм, 407 нм и 430 нм по формуле:

$$\text{ПП (нмоль)} = (2E_{407} - (E_{380} + E_{430})) \cdot 2,2 \cdot V$$

2.10. Определение АЛК-синтетазной активности

Культуры клеток *C. reinhardtii* выращивали в жидкой среде в течение 5 дней, затем собирали центрифугированием и переносили в свежую среду с добавкой 0,004 М левулината кальция. Через 24 часа клетки осаждали и определяли количество накопленной АЛК в осадке и в супернатанте отдельно. Клетки

заливали 5% ТХУ (2 мл) и кипятили на водяной бане (15 минут), затем осаждали центрифугированием. Осадок промывали ацетатным буфером (буфер составлял $\frac{1}{2}$ v ТХУ) и центрифугировали (15 минут, 7000 g). Супернатанты объединяли, добавляли 3-4 капли ацетил-ацетона, кипятили 15 минут и центрифугировали. Супернатант сливали в мерную пробирку, из которой брали 2 мл, добавляли 2 мл раствора Эрлиха и через 15 минут снимали показания оптической плотности этих растворов в области 555 нм на спектрофотометре. К культуральной жидкости добавляли ТХУ до конечной концентрации 5%, добавляли ацетат натрия до pH 4,5 и наносили на ионо-обменную колонку. После конденсации на колонке, элюат собирали в мерные пробирки по 2 мл (12-15 пробирок). В каждую пробирку добавляли по 0,2 мл ледяной уксусной кислоты и 3 капли ацетил-ацетона. После их кипячения (15 минут) в пробирки добавляли раствор Эрлиха (1:1 v/v) и снимали показания оптической плотности в полосе поглощения АЛК-пиррола – 555 нм. Концентрацию АЛК определяли по формуле:

$$\text{АЛК (нмоль)} = D \cdot 2v \cdot 14,71;$$

где D – поглощение в области 555 нм [Miller et al., 1979].

2.11. Определение содержания протогема в клетках *C. reinhardtii*

Клетки *C. reinhardtii* осаждали центрифугированием и при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ заливали охлажденным щелочным ацетоном (ацетон : 0,1 М NH_4OH , 9:1 v/v), переносили на фильтр Шота и проводили последовательную экстракцию пигментов щелочным ацетоном (трижды) для элиминации хлорофиллов и каротиноидов. В условиях низких температур ($18\text{ }^{\circ}\text{C}$) гем из клеток не вымывается, и его извлекали кислым ацетоном (ацетон - концентрированная HCl, в объемных соотношениях 49 : 1). Проводили экстракцию трижды, каждый раз приливая по 5 мл кислого ацетона. Объединенный экстракт испаряли в ротаторном испарителе. Для удаления остатков HCl осадок растворяли в 100% ацетоне и вновь испаряли. Остаток растворяли в 7 мл щелочного пиридина (20 мл пиридина в 30 мл 0,2 М KOH) и разделяли на две кюветы: в первую добавляли твердый дитионид натрия и через

две минуты снимали дифференциальные спектры окисленного и восстановленного пиридин-голохрома при 557 и 540 нм, используя спектрофотометр Shimadzu (Япония). Количество гемма рассчитывали по формуле:

$$\text{Гем (нмоль)} = 10^3 \cdot V(\text{мл}) \cdot \Delta E / 20,7 \text{ (mM)},$$

где V – объем щелочного пиридина: ΔE – разница в поглощении при 557 и 549 нм в дифференциальном спектре [Falk, 1964].

2.12. Определение активности магний-хелатазы

Клетки *S. reinhardtii* ресуспензировали в 0,5 мл буфера для инкубирования (сорбитол – 0,5М, трицин – 0,05М, EDTA – 1 mM, MgCl₂ – 1mM, BSA – 0,1%, DTT – 1 mM), культивировали 1 час при комнатной температуре и аликвотировали (в расчете 120 мкл на пробу) по четырем пробиркам: 1 – контроль и три опытных образца. В полной темноте к клеткам добавляли по 20 мкл каждого из элементов субстрата: Креатин-фосфат – 60 mM, АТФ магниевая соль – 4 mM, Креатин фосфокиназа – 0,8 единиц активности на 200 мкл буфера, протопорфирин IX – 10 μM раствор в DMSO. В контрольную пробирку добавляются все компоненты, кроме протопорфирина IX – основного субстрата фермента МХ, запускающего реакцию. Реакция проходит в темноте при 30 °C при помешивании (термостатируемый шейкер) 30 -35 минут. Фиксацию материала осуществляют паром (2 мин) и ацетоном - в каждую пробирку с 200 мкл реакционной смеси добавляют 800 мкл ацетона. Пигменты из фиксированных клеток экстрагировали, добавляя щелочной ацетон (ацетон : 0,1 M NH₄OH, 9:1 v/v) до полного вымывания. Промытая гексаном фракция ацетона используется для определения концентрации пигмента магний-протопорфирина IX - продукта функционирования фермента магний-хелатазы. Скорость накопления этого интермедиата относят к количеству клеток, участвующих в реакции.

2.13. Выделение и анализ нуклеиновых кислот из *C. reinhardtii*

Получение нуклеиновых кислот. Для выделения ДНК из клеточной культуры *C. reinhardtii* успешно применяется метод СТАВ, когда в составе экстракционного буфера используется цетилметиламмоний бромид (ЦТАБ) – детергент, разрушающий клеточные мембраны и образующий комплексы с белками и кислыми полисахаридами. Клетки, ресуспензированные в экстрагирующем буфере, 100 мл которого содержат: ЦТАБ – 2 гр, 5 М NaCl - 28 мкл, 0,5 М EDTA (pH8) - 4 мл, 2 М Tris-HCl (pH 8) – 5 мл, культивировали, помешивая, при 56°C в течение одного часа. После депротенинизации хлороформом нуклеиновые кислоты осаждали изопропанолом, а, затем, после дополнительной очистки, – этанолом. Просушенные образцы ДНК растворяли в буфере TE, хранили в холодильнике (+4 °C) и использовали для ПЦР-амплификации генов интереса и Саузерн-блот гибридизации. Тотальную РНК из клеток *C. reinhardtii*, находящихся в экспоненциальной фазе роста, экстрагировали реагентами набора «YellowSolve» фирмы Силекс в соответствии с инструкцией производителя. Полученные РНК использовали для Нозерн-блот гибридизации и для ОТ-ПЦР.

Гибридизация по Саузерну. Образцы ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции, разделяли полученные фрагменты в агарозном геле (0,8%) в буфере TAE (tris/acetate/EDTA) и переносили на нитроцеллюлозные фильтры, которые затем гибридизовали с радиоактивными ДНК-зондами. Зонды получали методом случайных праймеров с использованием [³²P]dCTP (Gibco-BRL, Eggenstein, Германия) и ДНК-полимеразы I из *E. coli* (AP-Biotech, Freiburg, Германия).

Нозерн-блот гибридизация. При подготовке к гибридизации образцы (12-20 мкг тотальной РНК), разделяли в 1%-ном агарозном геле, содержащем формальдегид, переносили на нитроцеллюлозный фильтр HybondN⁺ и гибридизовали с радиоактивно-мечеными кДНК-зондами. Гибридизационные

сигналы регистрировали с помощью фосфоимиджера (Molecular Dynamics, Krefeld, Германия).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР-амплификацию проводили на приборе Терцик (ДНК-Технологии, Москва). Реакции ставили в 50 мкл смеси, содержащей 0,2 мМ специфичных праймеров, 2mM dNTP и 5 единиц фермента Taq-полимеразы (Силекс, Москва) в соответствующем буфере. Полученные продукты ПЦР (ампликоны) анализировали методом гель-электрофореза в 1,2% агарозном геле в буфере TBE (tris/borate/EDTA), клонировали в вектор pGEM-T (Promega, USA) и секвенировали.

ОТ-ПЦР. Метод обратной транскрипции, совмещенной с ПЦР (ОТ-ПЦР), включает синтез кДНК на матрице тотальной РНК (после предварительной обработки ДНК-азой), используя фермент обратная транскриптаза М-MLV фирмы Силекс (Москва) и олиго-dT праймеры по протоколу производителя. На матрице полученной кДНК проводили ПЦР с ген-специфичными праймерами для оценки уровня транскрипции генов интереса.

Секвенирование. Определение нуклеотидных последовательностей по методу Сэнджера проводили на Генетическом анализаторе ABI Prism 310 (фирмы Applied Biosystems).

2.14. Вестерн-блот анализ

Белки из клеток хламидомонады экстрагировали в раствор, содержащий: 2%-ный додецилсульфат Na, ДТТ – 56 мМ, Na₂CO₃ – 56 мМ, 12%-ую сахарозу, 2 мМ этилендиаминтетраацетат. Гомогенат центрифугировали при 6000 g в течение 5 мин. Надосадочную фракцию далее хранили при температуре –20 °С. Электрофорез белков проводили в 12,5%-ном полиакриламидном геле с добавлением 2%-ного додецилсульфата Na. После разделения осуществляли электроперенос белков с геля на нитроцеллюлозную мембрану HybondP⁺. Иммунодетекцию белков на нитроцеллюлозной мембране проводили с использованием специфичных для анализируемых белков антител, и вторичных

антител, конъюгированных или со щелочной фосфатазой, либо с пероксидазой. Антитела для ферментов биосинтеза тетрапирролов были любезно предоставлены профессором Б. Гриммом (*Bernhardt Grimm, Университет им. Гумбольдта, Берлин, Германия*). Обработку изображений результатов иммуноблотинга проводили с помощью программы «Total Lab 2.01» (США).

2.15. Трансформация клеток методом «стеклянных шариков»

Клетки *C. reinhardtii* в экспоненциальной фазе роста осаждали центрифугированием (5000 g, 5 мин.), ресуспензировали в растворе автолизина до концентрации 3×10^7 кл/мл и пультивировали при слабом перемешивании в течение 2-4 часов до тех пор, пока не произойдет растворение клеточных оболочек автолизином. Отсутствие клеточных стенок тестировали, добавляя к клеткам равный объем 1% раствора тритона, – такие клетки разрушаются в течение 1 мин. Клеточную суспензию (0,3 мл) помещали в эппендорфы со стеклянными шариками (0,5 мм диаметре), в которую затем добавляли трансформируемую ДНК (плазмидную ДНК или ДНК из ВАС-клонов). Содержимое сильно встряхивали на вортексе в течение 20-30 секунд, добавляли свежую среду (0.3 мл) и переносили на чашки Петри с агаризированной селективной средой для культивирования. Результаты учитывали через 10-15 дней. Клоны геномной библиотеки ВАС-клонов *C. reinhardtii* были получены из ресурсного центра Института генетики Университета г. Клемсон (CUGI, USA) <http://www.genome.clemson.edu>. ДНК из ВАС-клонов, содержащая маркерный ген устойчивости к хлорамфениколу, была использована для трансформации мутантных клеток методом «стеклянных шариков» [Rymarquis, 2005]. Трансформированные клетки высевали на среду ТАР и выращивали в темноте при 24 °С. Зеленые в темноте трансформанты проверялись на устойчивость к хлорамфениколу.

2.16. Время генерации культур

Время генерации (ВГ) культур рассчитывали по формуле:

$$\text{ВГ (час.)} = 11 + 0,75 \text{ВД},$$

где ВД – время удвоения численности клеток в культуре [Harris, 1989].

2.17. Получение автолизина

Автолизин (или гаметолизин), – вырабатываемый гаметами *C. reinhardtii* белок размером 638 аа, – обладает протеазной активностью. Он относится к Zn-содержащим металлопептидазам и существует в двух формах – неактивная V-форма – в вегетативных клетках, и активная G-форма образуется при гаметрогенезе на среде без азота. Для получения автолизина используют хорошо скрещивающиеся штаммы СС-620 и СС-621 из коллекции CGC (*Chlamydomonas Genetic Center*). После гаметрогенеза (24 часа в среде без азота на свету), гаметы обоих штаммов сливают, и копуляционную смесь оставляют на свету в течение 2-4 часов. Затем, клетки осаждают центрифугированием (4 °С, 10000g), а супернатант, содержащий автолизин, очищают, пропуская через фильтры (0,25-0,45 мкм), аликвотируют (по 50 мл) в стерильную посуду и хранят в морозильнике (-20 °С).

2.18. Статистическая обработка данных

В работе использованы стандартные биометрические методы [Глотов и др., 1982]. Для статистической обработки экспериментальных данных и учета полученных результатов использовали пакеты программ «Statistica 6.0», «Excel 2003», «SigmaPlot 9.0», и статистические методы, принятые в области биологических исследований. Статистическая обработка данных состояла в определении средней квадратичной ошибки их среднего.

2.19. Компьютерные программы и базы данных

Информационные ресурсы баз данных генетической информации и компьютерные программы сравнительного анализа структуры и функций молекул ДНК, РНК и белков, использованные в работе, доступны в интернете по адресам:

NCBI - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>;

ExPASy Proteomics Server - <http://www.expasy.ch/tools>;

Базы данных генетического центра хламидомонады (CGC, *Chlamydomonas Genetic Center*) и геномного проекта хламидомонады (JGI, *Joint Genome Institute*) находятся:

<http://www.chlamy.org/index.html>;

<http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/Chlre4.home.html>.

Раздел 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Генетико-биохимические исследования хлорофильных мутантов хламидомонады, накапливающих порфирины

На кафедре генетики и биотехнологии биологического факультета СПбГУ более сорока лет ведутся исследования зеленой одноклеточной водоросли хламидомонады (*C. reinhardtii*) – модельного объекта генетики фотосинтеза. Эксперименты А.В. Столбовой [Столбова, 1971] положили начало созданию уникальной коллекции пигментных мутантов *C. reinhardtii*, что позволило изучать генетический контроль пигментов хлоропласта – хлорофиллов (ХЛ) и каротиноидов. Настоящая работа посвящена исследованиям бесхлорофильных мутантов, накапливающих биосинтетический предшественник ХЛ – протопорфирин IX (ПП), который вместе с каротиноидами придает клеткам оранжевую окраску. Генетический анализ показал, что накопление ПП у этих мутантов обусловлено рецессивными мутациями в двух ядерных генах: *CHL1* и *LTS3*, представленных рядом аллелей [Чекунова и Квитко, 1986; Чекунова и Чунаев, 1990]. В отличие от гибнущих на свету мутантов по гену *CHL1* генотипа: *chl1* и *brs-1*, культуры штаммов *C. reinhardtii*, несущих аллельные мутации *lts3* и *brc-1* в гене *LTS3*, при освещении зеленеют, сохраняя способность к биосинтезу хлорофилла на свету. Биохимические и молекулярно-генетические исследования мутантов хламидомонады по генам *LTS3* и *CHL1* (позднее переименованного в *CHLH*), позволили автору клонировать эти гены и определить функции кодируемых ими белков [Chekunova et al., 2001; Чекунова, Савельева, 2010].

3.1.1. Первичная характеристика мутантов

3.1.1.1. Мутанты хламидомонады, использованные в работе

Основой Петергофской генетической коллекции (ПГК) пигментных мутантов *C. reinhardtii* [Квитко и др., 1983] стали штаммы, полученные Анной Владимировной Столбовой, в лаборатории генетики микроорганизмов БиНИИ ЛГУ. В результате экспериментов по химическому мутагенезу она изолировала 97 мутантов, индуцированных нитрозоэтилмочевинной (НЭМ), два из которых: N-19 и N-122 были описаны как «оранжевые в темноте» [Столбова, 1971]. Позднее, П.Х. Бояджиев использовал для мутагенеза N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (МННГ) и УФ-излучение [Бояджиев, 1974]. Среди 169 отобранных им мутантов было обнаружено несколько «оранжевых» штаммов, у которых признак «оранжевости» наследовался моногенно. На основе результатов спектро- и микроспектрофотометрии клеток этих мутантов предположили, что красный пигмент в их клетках может быть предшественником хлорофиллов (ХЛ) - протопорфирином IX (ПП). Обработывая клетки зеленых диплоидов МННГ, Елена Чумакова также получала оранжевые формы [Чумакова, 1976]. Оранжевые мутанты *C. reinhardtii* были изолированы и в США [Wang et al., 1974, 1978]. Исследователи описали два неаллельных, накапливающих в темноте протопорфирин IX мутанта: *brs-1* и *brc-1*. Фенотипические различия между ними были заметны в условиях освещения – клетки мутанта *brs-1* погибали, а культуры штамма *brc-1* зеленели, накапливая ХЛ. Мутации *brs-1* и *brc-1* оказались ядерными, рецессивными, наследовались моногенно и не демонстрировали генетического сцепления. Объясняя фенотип этих мутантов, авторы предположили, что превращение ПП в Mg-ПП осуществляется отдельно на свету и в темноте. Лocus *brs* кодирует фактор, существенный для обеих – темновой и световой реакций, а мутация *brc-1* блокирует светонезависимую (темновую) реакцию [Wang et al., 1974, 1978]. К началу 80-х годов в лаборатории был накоплен обширный генетический материал, и возникла необходимость

системных исследований групп фенотипически сходных мутантов. Предметом настоящего исследования (таблицы: 3.1, 3.2) стали бесхлорофильные, накапливающие красный пигмент (предположительно протопорфирин), мутанты *C. reinhardtii* из Петергофской Генетической Коллекции и из коллекции Центра Генетики Хламидомонады (CGC, *Chlamydomonas Genetic Center*). Описание рекомбинантов, гаплоидных и диплоидных штаммов, полученных и использованных в работе, будут даны в ходе изложения экспериментального материала.

Таблица 3.1. Гаплоидные мутанты *C. reinhardtii*, использованные в работе

Мутант	Условия получения*	Генотип	Ссылка
N-19	НЭМ	<i>mt-, chl1</i>	Столбова, 1971
N-122	НЭМ	<i>mt-, lts3</i>	Столбова, 1971
НГ-2	НГ	<i>mt-, lts7</i>	Бояджиев, 1974
sr-2-60/13	НГ	<i>mt-, or13</i>	Бояджиев, 1974
494/3	НГ	<i>mt-, or3</i>	Бояджиев, 1974
494/69	МННГ	<i>mt-, or69</i>	Бояджиев, 1974
Brs-1	УФ	<i>mt+, brs-1</i>	Wang et al., 1974
Brc-1	УФ	<i>mt+, brc-1</i>	Wang et al., 1974

- * -- мутации индуцированы: НЭМ – нитрозоэтилмочевинной;
- МННГ - N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином;
- УФ - ультрафиолетовым излучением

3.1.1.2. Спектрофотометрия мутантов

Для всех штаммов из группы изучаемых мутантов характерно отсутствие ХЛ и способность клеток в условиях гетеротрофного роста накапливать бурый пигмент порфириновой природы, который придает желто-оранжевую окраску их колониям. На этом основании мутанты были объединены общим названием – хлорофильные оранжевые мутанты (ХОМ).

Фенотипическое описание ХОМ начали с получения их спектральных характеристик. Спектры поглощения нативных культур (рисунок 3.1А, Б) демонстрировали, что для всех изучаемых мутантов характерно уменьшение поглощения в специфических для ХЛ полосах: 650 нм и 670-680 нм. Поглощение в области 540 нм характерно для протопорфиринов (Wettstein, 1971). В синей области (490 нм) поглощают каротиноиды, но они имеются в клетках всех

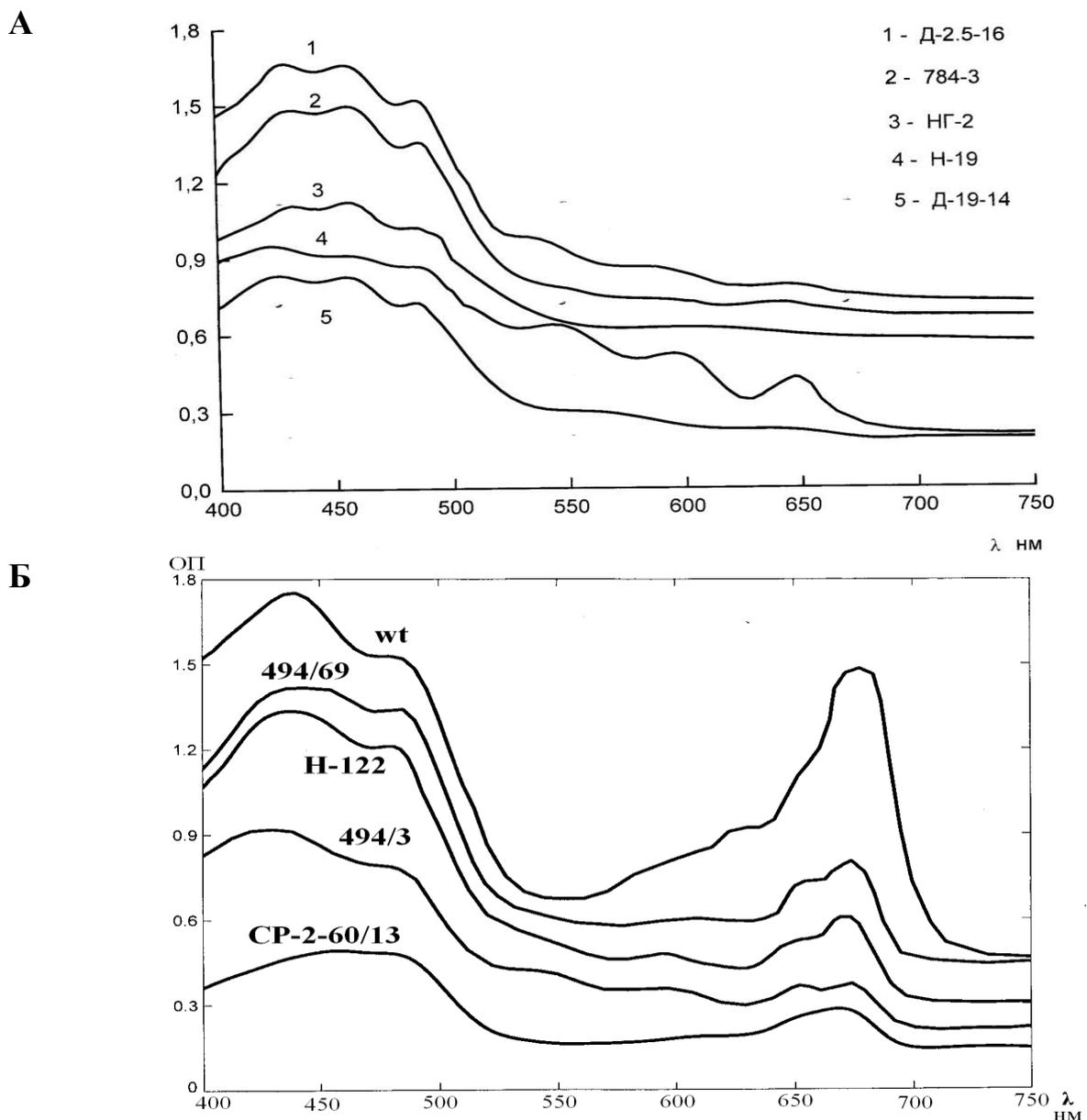


Рисунок 3.1. Спектры поглощения суспензий гетеротрофно-выращенных культур дикого типа (wt) и хлорофильных оранжевых мутантов *C. reinhardtii*

штаммов, и не служат отличительными признаками. По содержанию ХЛ наблюдаются межштаммовые различия. Для клеток генотипа: *chl1-19*, *or2/5* и *or3* характерно полное отсутствие хлорофиллов, тогда как формы с мутациями *or13* и *lts3-122* содержат некоторое его количество.

3.1.2. Гибридологический анализ хлорофильных оранжевых мутантов

3.1.2.1. Оптимизация условий проведения скрещиваний

Гибридологический анализ хлорофильных оранжевых мутантов (ХОМ) долгое время был затруднен из-за крайне низкой фертильности мутантных клеток [Бояджиев, 1974]. Его осуществление стало возможным только после предварительной работы, направленной на повышение их фертильности. Эта задача была решена с применением нескольких подходов:

- а) выяснением оптимальных условий культивирования ХОМ;
- б) получением фертильных рекомбинантов исходных мутантных штаммов;
- б) получением диплоидных форм для проведения анализа на полиплоидном уровне.

Оптимальной средой для выращивания культур ХОМ оказалась среда ТАР с высоким содержанием буферных растворов и ионов магния. Добавление в среду тиамин (1 мг/л), благоприятно влияло на состояние культур, поскольку их клетки чувствительны к антиметаболиту тиамин – окситиамину.

Проведение тетрадного анализа возможно только при наличии фертильных (обладающих высокой жизнеспособностью мейотического потомства) гибридов-зигот (Инге-Вечтомов, 1971). У *S.reinhardtii* использование рекомбинантов, прошедших несколько туров скрещиваний, увеличивает выживаемость мейотических спор, повышая эффективность гибридологического анализа [Александрова и др., 1979]. Коллекцию фертильных рекомбинантов получали, проводя исходные мутанты через серии внутритетрадных и возвратных скрещиваний (таблица 3.3). Типичная схема получения фертильного

рекомбинанта представлена на рисунке 3.2. Так, штамм Н-19 из ПГК помимо мутантной аллели *chl1-19*, несет модификаторную мутацию, усиливающую накопление пигмента порфириновой природы.

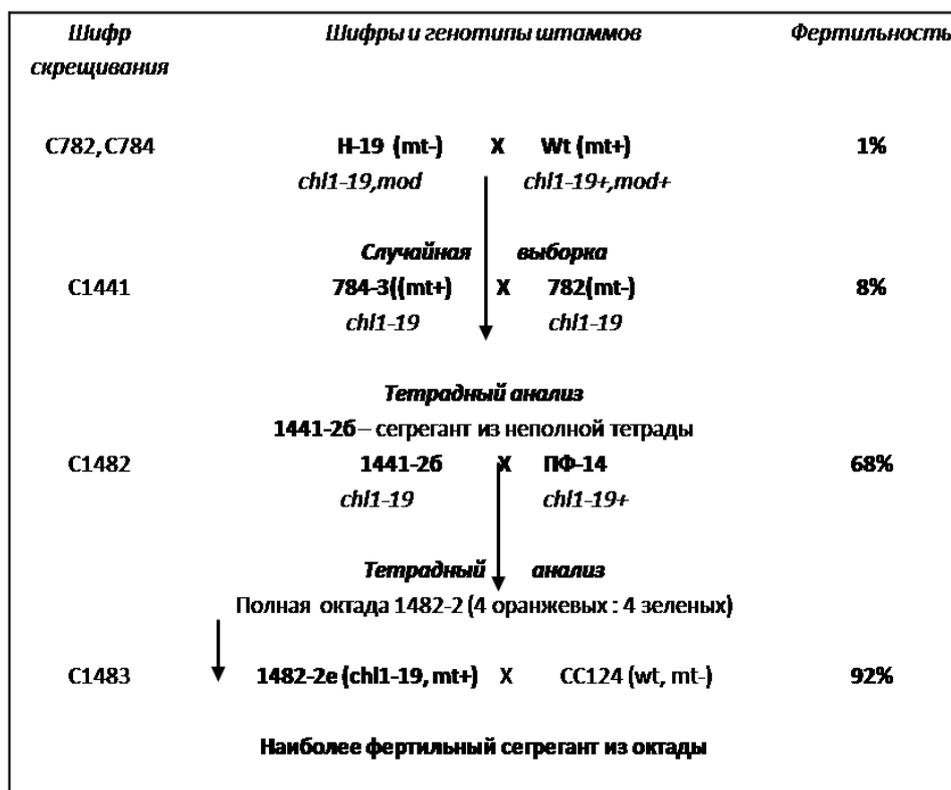


Рисунок 3.2. Получение фертильного штамма 1482-2e – рекомбинанта штамма Н-19 из ПГК

В потомстве скрещиваний с участием Н-19 и его рекомбинантов последовательно отбирали мейотические сегреганты мутантного фенотипа по признакам повышенной фертильности и гомогенной окраски. Гибридологический анализ зигот от скрещивания оранжевых мутантов между собой подтвердил отсутствие модификатора в их генотипах, и в ходе дополнительных туров скрещиваний был получен фертильный сегрегант 1482-2e, генотипа: *chl1-19*.

У *S. reinhardtii* вероятность образования зигот повышается при увеличении ploидности родительских форм, участвующих в скрещивании, а жизнеспособность зооспор в мейотическом потомстве тетраплоидных зигот много выше, чем диплоидных (Чемерилова, 1979). Для повышения

эффективности гибридологического анализа получали оранжевые диплоиды, используя имеющиеся в ПГК гетерозиготные по мутациям “оранжевости” формы (таблица 3.2). Плоидность исходных и полученных в работе штаммов определяли по нескольким критериям: средний объем клеток, суммарное количество ДНК на клетку, и характер расщепления в потомстве гибридов.

Таблица 3.2. Штаммы, использованные для получения полиплоидных форм

<i>Штамм</i>	<i>Фенотип</i>	<i>Генотип</i>	<i>Происхождение</i>
11-32f	зеленый, аргининзависимый	<i>mt+,arg7</i>	CGC
<i>Arg7</i>	зеленый, аргининзависимый	<i>mt-,arg7-8</i>	CGC
Д-2	зеленый, прототроф	<i>mt+/-,arg7/arg7-8</i>	Получен в работе
Т-5-52г	зеленый, аргининзависимый	<i>mt+/-,arg7-8/arg7-8, or2/5/+</i>	Чумакова, 1979
Д-13/1sr-10	зеленый, прототроф	<i>mt+/-, or13/+</i>	Чумакова, 1979
Д19/2-20	зеленый, прототроф	<i>mt+/-, arg7-8/+, chl1/+</i>	Чумакова, 1979

Так, диплоид Д-19-14 был отобран из потомства скрещивания двух диплоидов: гетерозиготного по мутации *chl1-19* штамма Д-19/2-20 и штамма Т-5-52г. Последний был описан как рекомбинант из тетраплоидного расщепления (Чумакова, 1976). В семейном анализе зигот от скрещивания Т-5-52г и зеленого диплоида Д-2, гетерозиготного по комплементирующим аллелям гена *Arg7* (*arg7/arg7-8*), среди 1760 проанализированных зеленых колоний было отобрано два оранжевых клона: Д-2/5-16 и Д-2/5-18, которые по критерию среднего объема клеток (99 мкм^3) были отнесены к гаплоидам. Вероятно, спонтанно возникшая мутация, названная *or2/5*, рецессивна и локализована рядом с центромерой.

Итогом работы по повышению эффективности гибридологического анализа стала коллекция фертильных штаммов (таблица 3.3), включающая гаплоидные рекомбинанты исходных мутантов, где каждый генотип представлен формами обоих типов спаривания, и диплоид Д-19-14. Штамм со спонтанно возникшей мутацией *or2/5* также пополнил коллекцию оранжевых гаплоидов. Проверка

характера наследования изучаемых мутаций (таблица 3.4) показала, что они наследуются моногенно (2+ : 2-) без реципроктных различий, и, следовательно, локализованы в ядерном геноме хламидомонады.

3.1.2.2. Анализ комплементации мутаций у ХОМ *C. reinhardtii*

Генетические исследования фенотипически-сходных мутантов предполагают выявление их аллельных взаимоотношений. Аллельность в группе хлорофильных оранжевых мутантов изучали, используя два традиционных теста: комплементационный и рекомбинационный.

В жизненном цикле *C. reinhardtii* диплоидная стадия представлена покоящейся зиготой, которая в благоприятных условиях претерпевает мейоз. Часть зигот (1-5%) не приступает к мейотической редукции, и дает начало колониям вегетативно размножающихся диплоидов [Harris, 1989]. Метод получения вегетативных диплоидов состоит в скрещивании двух ауксотрофных мутантов и отборе на селективной минимальной среде диплоидных клонов, способных к прототрофному росту [Ebersold, 1967]. Диплоиды характеризуются увеличенным вдвое объемом клеток и изменением характера расщепления при скрещивании их с гаплоидами [Ebersold, 1967]. После обнаружения межаллельной комплементации в гене *Arg7* [Loppes et al., 1972], для получения диплоидов стали использовать ауксотрофы, мутантные по комплементирующим аллелям *arg7* и *arg7-8* этого гена, что практически предотвращало появление гаплоидных прототрофных рекомбинантов. Вышеописанный метод получения вегетативных диплоидов предусматривает предварительное конструирование двойных мутантов, сочетающих анализируемые мутации и мутации аргининзависимости. В случае ХОМ, высокая летальность, преимущественная гибель двойных рекомбинантов и ряд других причин затрудняют получение штаммов, объединяющих мутации «оранжевости» и мутантные аллели гена *ARG7*. Поэтому, для изучения комплементации в группе хлорофильных

Таблица 3.3. Рекомбинанты ХОМ, полученные в работе

Шифр штамма	Генотип	Происхождение (родители)	
		<i>mt+</i>	<i>mt-</i>
784-3	<i>mt+</i> , <i>chl1-19</i>	301-4a	N-19
762-6	<i>mt+</i> , <i>chl1-19</i>	301-4a	N-19
1482-2e	<i>mt+</i> , <i>chl1-19</i>	См. рис. 3.1	
1496-1a	<i>mt+</i> , <i>chl1-19</i>	1482-2e	CC1336
1419-1в	<i>mt-</i> , <i>or13</i>	Nic-11	Sr-2-60/13
1435-1a	<i>mt-</i> , <i>or13</i>	1429-13a	1429-13c
1481-7б	<i>mt-</i> , <i>or13</i>	CC78	1419-1d
1486-3в	<i>mt-</i> , <i>or13</i>	1481-7b	494
1416-4	<i>mt-</i> , <i>lts3-122</i>	Arg2	N122
1423-25a	<i>mt+</i> , <i>lts3-122</i>	277	1416-4
Д-2/5-16	<i>mt+</i> , <i>or2/5</i>	T-5-52г	D-2
1439-14a	<i>mt+</i> , <i>or2/5</i>	D-2/5-16	1430-25a*
1439-8г	<i>mt-</i> , <i>or2/5</i>	-	-
1480-3б	<i>mt-</i> , <i>or69</i>	301-4a	494/69
1480-5в	<i>mt+</i> , <i>or69</i>	- “ -	- “ -
1430-20б	<i>mt-</i> , <i>or3</i>	430	494/3
1430-23a	<i>mt+</i> , <i>or3</i>	- “ -	- “ -
Д-19-14	<i>mt-/+</i> , <i>arg7-8/arg7/8</i> , <i>chl1-19/chl1/19</i>	T-5-52г	D-19/2-20
1510-3в	<i>mt+</i> , <i>or5</i>	Ac-20-5	Sr-2-60

* - аналог штамма 430 (см. табл. в «Материалы и методы»)

Таблица 3.4. Тетрадный анализ скрещиваний ХОМ на штаммы дикого типа

Шифр скрещивания	Родители:		Генотип мутанта	Число тетрад (2+ : 2-)
	ХОМ	Дикий тип		
C1436	782-6	430	<i>mt-</i> , <i>chl1-19</i>	45
C1496	1482-2e	CC-1336	<i>mt+</i> , <i>chl1-19</i>	36
C1430	494/3	430	<i>mt-</i> , <i>or3</i>	46
C1438	1430-20б	Arg-7	<i>mt+</i> , <i>or3</i>	10
C1439	Д-2/5-16	1430-25a	<i>mt+</i> , <i>or2/5</i>	15
C1429	1419-1в	430	<i>mt-</i> , <i>or13</i>	32
C1425	1416-4	277	<i>mt+</i> , <i>lts3-122</i>	7
C1426	494/69	Nr	<i>mt-</i> , <i>or69</i>	7
C1509	НГ-2	Nr	<i>mt-</i> , <i>lts7</i>	12
C1510	Ac-20-5	Sr-2-60	<i>mt+</i> , <i>or5</i>	6

оранжевых мутантов был использован иной метод – микроспектрофотометрия отдельных клеток молодых зигот и гамет, разработанный П. Бояджиевым и К.В. Квитко [Бояджиев с соавт, 1973]. Этот метод обладает высокой эффективностью при работе с живыми клетками, так как позволяет получить контрастную характеристику отдельного фенотипа – хлоропласта. Комплементацию мутаций, нарушающих процессы фотосинтеза у хламидомонады можно изучать прямо на молодых зиготах в силу следующих причин:

а). Молодые (двух-трехдневные) зиготы заведомо диплоидны, так как мейоз можно индуцировать только после 4-10-дневного периода покоя [Bernoun et al., 1980];

б). Молодые зиготы всегда содержат одно ядро и один хлоропласт, несущие генетическую информацию от обоих родителей [Cavalier-Smith, 1976];

в) Фотосинтетические мутанты имеют характерный спектр поглощения как в суспензии, так и в одиночных клетках, что позволяет использовать их спектральные характеристики как фенотипический признак.

Спектры поглощения ХОМ являются их четкой фенотипической характеристикой, поэтому изучение комплементации мутаций «оранжевости» методом спектрофотометрирования явилось оптимальным и обоснованным выбором.

Хлорофильные оранжевые мутанты, исследованные нами, имеют свой характерный спектр поглощения как в суспензии, так и в одиночных клетках. На рисунке 3.3 представлены спектры отдельных молодых зигот дикого типа и гетерозигот по мутациям «оранжевости». Для мутантных гамет и гомозигот характерно сильное уменьшение (по сравнению с диким типом) поглощения величины оптической плотности в полосе 440 нм, соответствующего поглощению хлорофилла *a in vivo*.

Для количественной оценки содержания хлорофиллов (ХЛ) у зигоспор с различными сочетаниями хлорофильных мутаций, их гомо- и гетерозигот, была использована величина $K = E_{440}/E_{650}$, где значения экстинкции, характеризующие

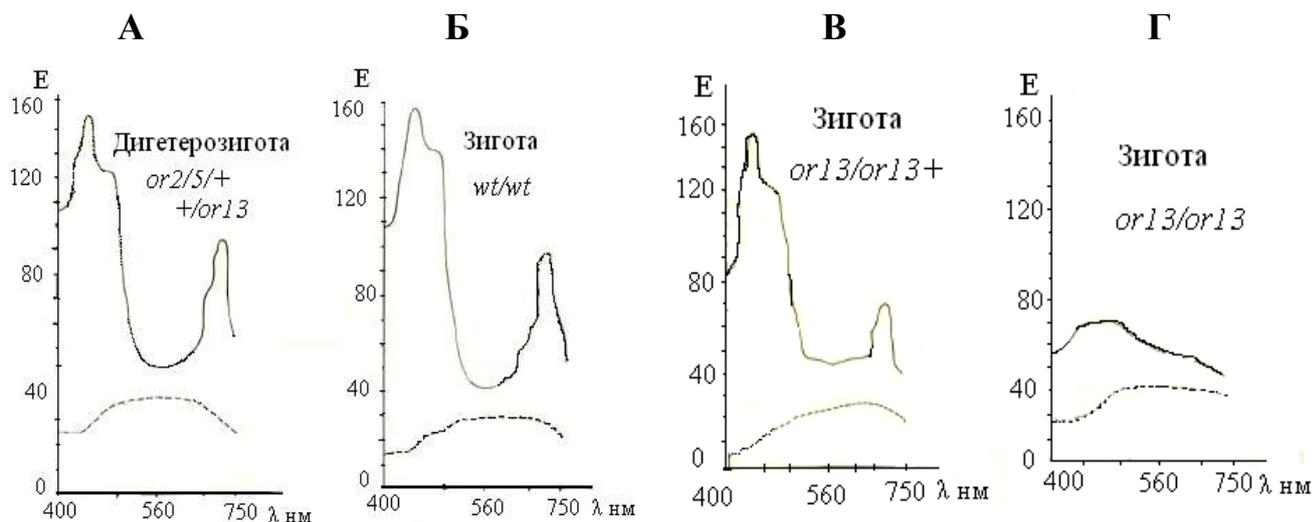


Рисунок 3.3. Микроспектрофотометрия отдельных зигот *C. reinhardtii* (микроспектрофотометр МУФ5)

накопление хлорофилла (E_{440}) отнесено к E_{650} , которая служит мерой светорассеяния (таблица 3.5). У зигоспор дикого типа и гетерозигот по мутациям «оранжевости» численные значения величины K составляют 8,7 и выше, тогда как у мутантных гамет и гомозигот – не превышает 3. Величины K для гомо и гетерозигот достоверно различаются ($P < 0,005$). Восстановление фенотипа дикого типа у гетерозигот позволило сделать вывод о рецессивности изучаемых мутаций. По итогам комплементационного теста все проверенные мутации распределились по двум группам комплементации:

Таблица 3.5. Комплементация мутаций бесхлорофильности

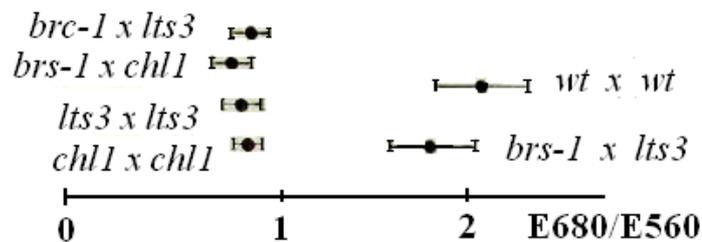
Генотип зигот:	Относительное поглощение света хлорофиллом ($K=E_{440}/E_{560}$) индивидуальных гамет и зигот								
	<i>or13</i>	<i>lts3-122</i>	<i>or69</i>	<i>chl1-19</i>	<i>or3</i>	<i>Or2/5</i>	<i>lts7</i>	<i>wt</i>	гаметы
<i>or13</i>	3,0±0,36	2,9±0,23	3,1±0,38	8,9±1,41	8,9±1,21	9,3±2,44	8,8	8,7±1,19	2,3±0,11
<i>lts3-122</i>		2,1±0,68	2,8±0,74	9,0±1,84	9,9±1,64	9,1±1,83	8,8	8,8±2,11	2,0±0,11
<i>or69</i>			2,8±0,91	9,0±1,44	9,0±1,31	9,1±1,54	8,8	8,8±1,73	2,2±0,54
<i>chl1-19</i>				1,1±0,03	1,3±0,02	1,1±0,06	1,1	8,9±0,51	1,1±0,21
<i>or3</i>					1,7±0,02	1,8±0,72	1,7	9,3±2,18	1,7±0,41
<i>or2/5</i>						1,1±0,48	1,1	9,9±1,35	1,2±0,42
<i>lts7</i>							н.о.	8,7±1,54	1,2±0,97
<i>wt</i>								8,7±2,31	7,4±0,61

Группа I, куда вошли мутации *lts3-122*, *or13* и *or69*.

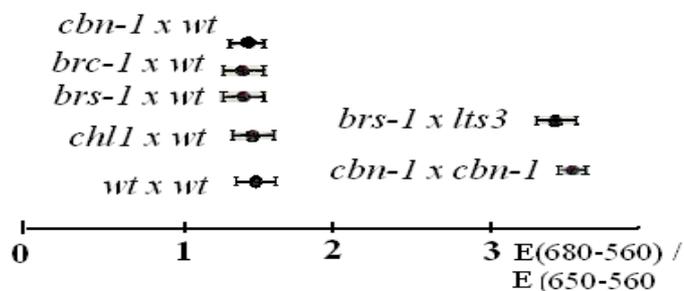
Группа II, объединяющая мутации: *chl1-19*, *or3*, *lts7* и *or2/5*.

Представители каждой из групп различаются фенотипически. Так, штаммы, несущие некомплементирующие мутации *lts3-122*, *or13* и *or69*, способны накапливать некоторое количество хлорофилла ($K=2,6$), тогда как мутанты из другой группы его практически не имеют ($K=1,4$).

В дальнейшем, удалось вовлечь в анализ бесхлорофильные, накапливающие протопорфирин IX мутанты: *brs-1* и *brc-1*, полученный в США [Wang et al., 1974]. Комплементацию этих мутаций изучали с помощью микроспектрофотометра SMS-03 фирмы "Opton" с системой обработки данных "IBAS", обладающего хорошей разрешающей способностью в длинноволновой части спектра. Он позволяет регистрировать оптическую плотность ХЛ в максимумах поглощения: ХЛа - 680 нм, и ХЛb - 650 нм. Уровень накопления ХЛа у гомо- и гетерозигот определяли по величине соотношения E_{680}/E_{650} (рисунок 3.4), которая у зигоспор



А



Б

Рисунок 3.4. А - Содержание ХЛа (E_{680}/E_{560}) и Б - соотношения ХЛа/ХЛb (E_{650}/E_{560})/(E_{650}/E_{560}) в зигоспорах хламидомонады. Мутация *cbn-1* приводит к отсутствию ХЛb

дикого типа оказалась близка к 2, у зигоспор генотипа: *chl1/chl1* и *lts3/lts3* из изоаллельных скрещиваний - около 1. Зигоспоры генотипов: *brs-1/chl1* и *brc-1/lts3* достоверно не отличаются по этому показателю от изоаллельных вариантов. В гетерозиготах генотипов: *chl1/+*, *brs-1/+*, *lrs3/+* и *brc-1/+* полностью восстанавливается фенотип дикого типа. В зигоспорах, полученных от скрещивания мутантов *brs-1* и *lts3*, полностью восстанавливается уровень ХЛа ($K=1,84$). Этот тест показал, что мутация *brc-1* принадлежит группе комплементации I, объединяющей мутации *lts3-122*, *or13* и *or69*, а мутация *brs-1* аллельна мутациям из группы комплементации II - *chl1-19*, *or3*, *lts7* и *or2/5*.

3.1.2.3. Изучение рекомбинации мутантных аллелей в группе ХОМ

Для уточнения результатов комплементационного теста изучали рекомбинацию мутантных аллелей методом посемейственного анализа гибридных зигот (таблица 3.6), и показали, что для мутаций: *chl1-19*, *or13*, *or5* и *lts7* частота появления зеленых рекомбинантов (ω_R) в потомстве двух «оранжевых» штаммов меньше величины $3,9 \times 10^{-4}$. Одна секторная колония, обнаруженная в потомстве С1450, может быть результатом либо реверсии одного из родительских штаммов, или внутригенной рекомбинации аллелей: *or2/5* и *chl1-19*. Мутации второй группы комплементации: *lts3-122*, *or13* и *or69* не рекомбинировали. В потомстве зигот, объединяющих мутации разных групп комплементации, наблюдали свободную рекомбинацию анализируемых маркеров.

В тетрадах мейотического потомства скрещивания С1451 выживаемость зигот составила 98%, а летальность зооспор - менее 5%. Такие высокие показатели выживаемости позволили наиболее полно использовать данные семейного анализа потомства этого скрещивания для оценки рекомбинации маркеров *or2/5* и *or13* (таблица 3.7), принадлежащих к разным группам сцепления. В этом случае, оранжевые колонии можно интерпретировать как клоны, образованные тетрадой родительского дитипа (PD), а секторные колонии появляются только в результате рекомбинации. Зеленые колонии могут быть

диплоидами, неполным потомством неродительских дитипов (ND) и тетратипов (T), или результатом аномального мейоза. Наблюдаемое соотношение оранжевых

Таблица 3.6. Посемейственный анализ потомства зигот скрещиваний оранжевых хлорофильных мутантов *C. reinhardtii*

Шифр гибрида	Родители:		Генотип зигот	Sz (%)*	Число колоний фенотипа:					ωR**
	mt+	mt-			ор	зел	ор/зел	б.к	всего	
C1442	784-3	782-6	<i>chl1-19/chl1-19</i>	0,48	680	0	0	0	680	< 1,1·10 ⁻⁴
C1528	1482-2e	H-19-25	<i>chl1-19/chl1-19</i>	5,14	8520	0	0	0	8520	
C1443	784-3	494-3	<i>chl1-19/or3</i>	0,11	1368	0	0	0	1368	< 3,8·10 ⁻⁴
C1441	784-3	1430-20б	<i>chl1-19/or3</i>	0,04	400	0	0	0	400	
C1445	1430-23a	782-6	<i>or3/chl1-19</i>	19,3	766	0	0	74	840	< 1,2·10 ⁻³
C1450	Д-2/5-16	782-6	<i>or2/5/chl1-19</i>	18,7	384	0	1	163	547	1,8%
C1498	1482-2e	НГ-2	<i>chl1-19/lts7</i>	0,54	3956	0	0	0	3956	< 2,5·10 ⁻⁴
C1499	Ac-20-5	1519-19в	<i>or5/chl1-19</i>	0,78	8962	0	0	0	8962	< 1,1·10 ⁻⁴
C1446	784-3	1419-1в	<i>chl1-19/or13</i>	4,84	240	44	10	0	294	18,4%
C1447	1430-23a	1419-1в	<i>or3/or13</i>	32,4	61	111	151	0	323	81%
C1449	1425-23	494/3	<i>lts3-122/or3</i>	0,01	480	221	0	0	701	31,5%
C1451	Д-2/5-16	1419-1в	<i>or2/5/or13</i>	68,9	229	595	1159	0	1983	88,4%
C1452	1425-23	782-6	<i>lts3-122/chl1-19</i>	0,05	78	0	24	0	102	23,5%
C1493	Brs-1	1481-1в	<i>brs1/or13</i>	0,01	171	258	31	0	460	43,5%
C1494	Brc-1	1481-1в	<i>brc1/or13</i>	0,03	6682	0	0	0	6682	< 1,5·10 ⁻⁴
C1492	Brs-1	1496-1a	<i>brs1/chl1-19</i>	0,06	8131	0	0	0	8131	< 1,2·10 ⁻⁴
C1453	1425-23	1419-1в	<i>lts3-122/or13</i>	0,21	9193	0	0	0	9193	< 1,1·10 ⁻⁴
C1454	1470-5a	1419-1в	<i>or69/or13</i>	0,03	8494	0	0	0	8494	< 1,2·10 ⁻⁴
C1502	Ac20-5	1419-1в	<i>or5/or13</i>	0,96	314	54	6	0	374	16%

*- выживаемость зигот;

** - частота появления зеленых рекомбинантов; б.к. – белые колонии.

и зеленых колоний (таблица 3.7) соответствуют теоретически-ожидаемым при свободной рекомбинации (1PD:1ND:4T) для выборки заведомо гаплоидных потомков, а при учете всей совокупности виден дефицит рецессивов, естественный при низкой выживаемости мутантных спор. Свободная рекомбинация мутаций *or2/5* и *or13* - результат отсутствия их генетического сцепления. Таким образом, мутации, принадлежащие разным группам комплементации, рекомбинируют свободно, то есть, не сцеплены между собой.

Таблица 3.7. Анализ потомства зигот (генотипа: or2/5/or13) скрещивания C1451

<i>Тетрадный анализ</i>		<i>Семейный анализ (число колоний)</i>				
<i>Тип тетрад</i>	<i>Число тетрад</i>	<i>наблюдаемое</i>	<i>Теоретически ожидаемое при 1PD:1ND:4T</i>			
			<i>*</i>	<i>*χ²</i>	<i>**</i>	<i>**χ²</i>
4 оранж. : 0 зел.	1	229	231	0,02	330	37,08
2 оранж. : 2 зел.	2	1159	1157		1653	
3 оранж. : 1 зел.	4					
4 зел. : 0 оранж.	3	595	0			
всего	10	1983	1388		1983	

* - выборка без учета зеленых колоний;

** - вся выборка.

Менделевское расщепление по локусу типа спаривания ($2mt+ : 2mt-$) в тетрадах, где все зооспоры имели зеленую окраску, свидетельствовало, что такие «зеленые» тетрады (в семейном анализе - это зеленые колонии) не результат диплоидии (в этом случае все потомство должно иметь тип спаривания $mt-$), а потомство зигот, прошедших мейоз. Причиной однообразия спор по пигментации могло стать нерасхождение хромосом с этими локусами. В потомстве C1451 зеленые колонии появлялись с частотой ок. 30% , и для выяснения их генотипов были поставлены дополнительные эксперименты (подраздел 3.1.2.5).

3.1.2.4. Тетрадный анализ мутантов по генам *CHL1* и *LTS3* *C. reinhardtii*

Тесты на аллелизм показали, что фенотип изучаемых хлорофильных оранжевых мутантов хламидомонады обусловлен мутациями в двух ядерных генах *CHL1* и *LTS3*. Следующая задача, которую следовало решить, состояла в их картировании. Для локализации этих генов на генетической карте *C. reinhardtii* штаммы, несущие изучаемые мутации, скрещивали с ауксотрофными и множественно-маркированными линиями (таблица 3.8) и анализировали мейотическое потомство методом тетрадного анализа.

Таблица 3.8. Характеристика скрещиваний хлорофильных оранжевых мутантов на множественно-маркированные линии хламидомонады

Скрещивания			Тетрадный анализ			Прим. (%)
Шифр	Родители (штамм и генотип)		Прорастаемость (%)		Число полных тетрад	
	<i>mt+</i>	<i>mt-</i>	зигот	спор		
C1429	430*	1419-1в (<i>or13</i>)	48	68	50	17
C1430	430*	494/3 (<i>or3</i>)	38	74	50	4
C1436	430*	782-6 (<i>chl1-19</i>)	94	89	80	20
C1439	Д-2/5-16 (<i>or2/5</i>)	1430-25а**	95	64	33	21
C1428	Apr2 (<i>arg7-8</i>)	1419-1в (<i>or13</i>)	96	97	20	100
C1433	1425-23 (<i>lts3</i>)	Apr7 (<i>arg7</i>)	97	100	80	100
C1495	1490-17 (<i>or13,ery3</i>)	М-3 (<i>msr-1</i>)	97	74	96	21
C1501	1495-47г (<i>or13,ery3</i>)	Apr7 (<i>arg7</i>)	92	98	60	100
C1526	137С (<i>wt</i>)	1501-376	31	44	30	-
C1489	1482-2е (<i>chl1</i>)	А-3 (<i>act2</i>)	81	91	50	34
C1496	1482-2е (<i>chl1</i>)	СС1336***	28	69	35	14
C1497	1482-2е (<i>chl1</i>)	521-8г (<i>cbn1</i>)	24	61	9	15

* - штамм 430 – множественно-маркированный, генотипа: *pf2, nic13, msr1, act2, mt+*;

** - штамм 1430-35а – рекомбинант штамма 430, генотипа: *pf2, nic13, msr1, act2, mt-*;

*** - штамм СС1336 имеет генотип: *pf14, nic7, act2, mt+*;

Прим. – частота «зеленых» тетрад

В таблице 3.9 представлены результаты тетрадного анализа зигот скрещиваний C1429 (с участием мутации *or13* в гене *LTS3*), и C1430, C1436 и C1439 (мутации: *or3, chl1-19, or2/5*, соответственно, в гене *CHL1*). Проверка на сходимость расщеплений для последних трех мутаций позволила их суммировать в графе «*CHL1*». Данные этой таблицы демонстрируют отсутствие сцепления мутации *or13* в локусе *LTS3* с маркерами VI, X, XI групп сцепления, и слабое сцепление (33 сМ) с маркером *msr-1* группы сцепления I. Соотношение родительских (P) дитипов и неродительских (N) дитипов достоверно не отличаются от 1:1 во всех вариантах, кроме пары маркеров *lts3 - msr-1* ($P < 0,001$).

Таблица 3.9. Результаты тетрадного анализа зигот скрещиваний ХОМ с маркированными линиями хламидомонады

<i>Маркеры и их локализация:</i>		<i>LTS3</i>		<i>CHL1</i>	
<i>Маркер</i>	<i>Группа сцепления*</i>	<i>P:N:T**</i>	<i>P (P=N)</i>	<i>P:N:T**</i>	<i>P (P=N)</i>
msr-1	I /43/	29:7:30	< 0,01	5:11:27	> 0,95
pf-14	VI /12/			3:2:9	> 0,95
act-2	VI /44/	7:8:17	> 0,99	25:12:43	< 0,05
nic-13	X /3/	3:5:12	> 0,95	7:9:9	> 0,95
pf-2	XI /2/	7:7:18	> 0,99	18:18:35	> 0,99
mt	VI /24/	18:17:47	> 0,99	***	

*- в скобках даны расстояния маркера от центромеры (в сантиморганах - сМ);

** - соотношения тетрад родительских (P) дитипов, неродительских (N) дитипов и тетратипов (T); *** - нерегулярное расщепление

3.1.2.5. Использование анеуплоидии для картирования мутаций

После установления слабого сцепления локуса *LTS3* с дистальным маркером хромосомы I, в генетический анализ были включены еще несколько маркеров этой хромосомы. В потомстве скрещиваний штаммов, несущих мутации *or13* и *lts3-122*, с мутантами по локусу *ARG7* обоих типов спаривания (C1428 и C1433), отсутствовало расщепления по анализируемым признакам. Все споры были зеленые, аргининзависимые и имели тип спаривания *mt-*. После включения в схему скрещиваний (C1501) еще одного маркера хромосомы I – *ery3*, в потомстве также наблюдали единообразие: все споры были зеленые, аргининзависимые и эритромицин-чувствительные. Такие клетки по параметрам типа спаривания (*mt-*) и среднего объема клетки (200 – 240 мкм), соответствовали диплоидам. По-видимому, в этих скрещиваниях формировались вегетативные диплоиды, у которых гетерозиготное состояние по локусам: *lts3*, *ery3* и *mt* сопровождалось сохранением ауксотрофности по аргинину. Гетерозиготность по вышеперечисленным маркерам была подтверждена в гибридологическом анализе сегрегантов из “зеленых” тетрад. В семейном анализе потомства скрещивания

такого “зеленого” сегреганта 1501-376 (*mt+*) на штамм дикого типа (C1526), 22,3% зигот выщепляли оранжевые сегреганты. Анализ клонов из случайной выборки зооспор этого скрещивания показал, что в генотипе диплоида 1501-376 присутствует одна аллель гена *ARG7*, - 12% всех проверенных зеленых клонов оказались аргининзависимыми и устойчивыми к эритромицину при росте на свету (таблица 3.10). В темноте, на среде с эритромицином такие клоны гибли.

Расщепление маркеров *ery-3* и *msr-1* группы сцепления I хламидомонады в сочетании с мутацией *or13* (локус *LTS3*) анализировали в потомстве C1495, где двойной мутант генотипа: *or13,ery-3,mt+* скрещивали с устойчивым к метионинсульфоксиимину штаммом М-3. В этом случае также наблюдали отклонения от менделевского расщепления по маркерам хромосомы I, при сохранении его по маркеру *mt* хромосомы VI (таблица 3.11).

Появление в мейотическом расщеплении тетрад типа: 0+ : 4- и 1+ : 3- по маркеру *msr-1* позволило предположить, что родительский штамм М-3 – дисомик по хромосоме I, и мы анализируем расщепление трисомика (++-) по группе сцепления I. Наблюдаемые при этом отклонения от менделевского расщепления (2+ : 2-) по нелокализованному маркеру *or13* могут служить подтверждением его локализации в хромосоме I [MacMartin, James, 1979].

Таблица 3.10. Результаты анализа потомства скрещивания C1526 (случайная выборка)

Анализируемые клоны		Частота клонов (%) фенотипа (генотипа):		
Фенотип	число	Аргинин-зависимых (<i>arg7-</i>)	Устойчивых к эритромицину (<i>ery3^R</i>)	Двойных мутантов: (<i>arg7-</i> , <i>ery3^R</i>)
Оранжевые	64	50%	36%	16%
Зеленые	65	12%	12%	12%

Таблица 3.11. Тетрадный анализ скрещивания С1495

Пары маркеров	Группа сцепления	Число тетрад типа:					Всего тетрад
		0+ : 4-	1+ : 3-	2+ : 2-	3+ : 1-	4+ : 0-	
<i>or13/or13+</i>		0	0	6	26	11	43
<i>ery3/ery3+</i>	I	0	0	10	12	7	29
<i>msr-1/msr-1+</i>	I	2	7	17	2	2	31
<i>mt+/mt-</i>	VI	0	0	49	0	0	49

Среди зеленых сегрегантов в потомстве С1495 было два типа клонов: стабильные и нестабильные – выщепляющие оранжевые клоны, и вероятно, гетерозиготные по мутации *or13*. Генотип зеленых дисомиков определяли по окраске колоний, которые появлялись в посевах их культур. В посевах дисомиков генотипа: *or13+/or13+* росли только зеленые клоны, у гетерозигот генотипа: *or13+/or1* – зеленые и оранжевые клоны, клоны генотипа: *or13/or13* – всегда оранжевые. Мутация *or13* проявляет слабое сцепление с центромерой (таблица 3.9). При вычислении теоретически-ожидаемого расщепления по этому локусу при тривалентной конъюгации предполагается, что после прохождения кроссинговера, у центромеры с равной вероятностью может оказаться любая пара из 6-ти аллелей гомологичных хроматид тривалента. Статистическая обработка результатов скрещивания С1495 показывает (таблицы: 3.12 и 3.13), что наблюдаемое расщепление по мутации оранжевости возможно, если во всех мейозах идет тривалентная конъюгация трех хромосом I [MacMartin and James, 1979]. Анеуплоидия ведет себя в мейозе как маркер, абсолютно сцепленный с центромерой, так как расщепление по анеуплоидии определяется в I-ом делении мейоза, когда центромеры отходят к полюсам. Таким образом, тетратип по анеуплоидии появляется только в результате кроссинговера между анализируемым маркером и центромерой. В связи с этим, в тетрадном анализе расщепления диплоидов-трисомиков можно проводить непосредственные измерения частот расщепления по этим генам в f_{II} - во II-ом делении мейоза. Эта величина равна частоте тетратипов в сочетании исследуемого маркера и анеуплоидии (n+1) среди тетрад диплоида-трисомика (2n+1) [Горденин, 1978].

Таблица 3.12. Хроматидное расщепление у триплоида трисомика (++-)*

Тип тетрад:	1	2	3	4
<i>Расщепление в тетраде</i>	+	+	+	-
	+	-	+	-
	+/-	-/-	-/-	+/+
	+/-	+/+	+/+	+/+
**Тривалентная	4/15	8/15	2/15	1/15
**Бивалент-унивалент	4/9	4/9	0	1/9

* по MacMartin, James, 1979;

** Тип конъюгации

Таблица 3.13. Расщепление по маркеру *or13* у анеуплоида-трисомика по хромосоме I хламидомонады (С1495)

<i>Тетрады:</i>		<i>Данные эксперимента (С1495)</i>	<i>(Но) Т.о. при тривалентной конъюгации</i>	<i>Т.о. при бивалент-унивалент конъюгации</i>
<i>Тип</i>	<i>Фенотип*</i>			
1	2з : 2з/н	11	11,5	19,1
2	2з : 1з/н : 1ор	20	22,9	19,1
3	3з : 1ор	6	5,7	0
4	2з : 2ор	6	2,9	4,8
Всего тетрад:		43	43	43
ВероятностьР (Но)			> 0,95	

*Обозначения: з – зеленый; з/н - зеленый нестабильный; ор – оранжевый

В потомстве С1495 (см. табл.3.11) расщепление по $or3/n+1$ было:

$$6P (2+ : 2-) : 11 N (4+ : 0-) \text{ и } 26 T (3+ : 1-);$$

тогда частота тетратипов $f(T)$ составляет $26/43 = 0,6046$; и расстояние генцентромер определяется как: $D = 0,5f(T) \times 100 = 30,23$ сантиморганов.

Нестабильность анеуплоидов-дисомиков. Нестабильность зеленых клонов при вегетативном размножении выражается в появлении оранжевых и секторных колоний в посевах культур. Такие события у дисомиков генотипа: *or13/or13+* могут происходить за счет митотической рекомбинации, нерасхождения хроматид или в результате гемизиготизации штаммов. Оценка частоты мейотического

выщепления оранжевых клонов в потомстве зигот от скрещиваний анеуплоидов-дисомиков на штаммы дикого типа и их митотической нестабильности как спонтанной, так и индуцированной УФ-излучением, позволила обнаружить (таблица 3.14) высокую частоту совместной сегрегации маркеров *or13* и *ery3* при митотической гомозиготизации дисомиков по хромосоме I, когда мутации находятся в цис-конфигурации. Крайне малая вероятность свободной рекомбинации этих маркеров ($P < 0,001$) позволяет говорить об их сцеплении. Мейотическое выщепление оранжевых сегрегантов определяли в потомстве (семейный анализ) зигот скрещиваний зеленых нестабильных сегрегантов на штамм дикого типа. Их частоты не превышают 16%, что также подтверждает гипотезу о дисомии по маркеру *or13* [Инге-Вечтомов, 1971]. Изучение митотической сегрегации (гомозиготизации) дисомиков 1495-10а и 1495-10б по маркеру *ery3* группы сцепления I и мутации оранжевости *or13* (таблица 3.15)

Таблица 3.14. Анализ нестабильности анеуплоидов-дисомиков генотипа: *or13/or13+*

Штамм	Генотип по мутации оранжевости <i>or13</i>	Частота секторных колоний (10^{-2})			Мейоз
		Митотическая сегрегация, индуцированная УФ-излучением (дж/м ²):			
		0	780	1560	
1495-10а	<i>or13/or13+</i> , <i>mt+</i>	1,2	16,6	33,1	16,2
1495-10б	<i>or13/or13+</i> , <i>mt+</i>	1,9	н.о.	50,0	14,1
1495-56а	<i>or13/or13+</i> , <i>mt+</i>	2,2	15,0	40,0	13,6
1495-56г	<i>or13/or13+</i> , <i>mt+</i>	3,1	18,0	-	12,4

показало высокую частоту их совместной сегрегации, свидетельствующую о тесном генетическом сцеплении. Таким образом, анализ расщеплений анеуплоида-трисомика (++-) и изучение мейотической и митотической нестабильности дисомиков генотипа: *or3/or3+* позволили с высокой степенью вероятности предположить, что локус *LTS3* картируется в группе сцепления I, на

расстоянии 30 сМ от своей центромеры, и близко сцеплен с локусом *ERY3*, картированным в 31 сМ от центромеры [Harris, 1989].

Таблица 3.15. Митотическая гомозиготизация дисомиков по группе сцепления I *S. reinhardtii* генотипа: *or13,ery3,msr-1/or13+,ery3+,msr-1+*

Штамм	Частота выщепления клонов ($\times 10^{-2}$) фенотипа:				P (Ho)
	Оранжевых	Устойчивых к эритромицину	Совместная сегрегация		
			эксперимент	Теория (Ho)*	
1495-10a	1,20	5,82***	94,01%	0,07	< 0,001
1495-10a **	16,61	21,04	99,12%	3,49	< 0,001
1495-10б	1,88	6,03	94,04%	0,11	< 0,001

Ho – гипотеза о свободной рекомбинации маркеров;

** -представлена частота выщепления в условиях УФ-облучения;

*** - зеленые сегреганты устойчивы к эритромицину на свету, в темноте – на среде с антибиотиком они не растут.

Мутации локуса *CHL1* не сцеплены с маркерами I, X, XI хромосом (таблица 3.9). В потомстве скрещивания С1489 (*chl1* x *act2,pf14,msr1,mt-*) наблюдалось нерегулярное расхождение по мутации *chl1* и маркерам хромосомы VI, при менделевском наследовании маркера *msr1* хромосомы I. Для оценки расстояния локуса *CHL1* до центромеры, скрещивали гетерозиготы генотипа: *chl1-19/+*, *pf14/+*, *mt-/mt+* на штаммы дикого типа, конструируя зиготы-трисомики (++-), и рассчитывали f_{II} , которая соответствует частоте появления тетрад типа: 3+ : 1- (таблица 3.16). Расстояние ген-центромер, определяемое как $0,5 f_{II}$, для маркера *chl1-19* оказалось равным 5,0-5,8 сМ. Для маркеров *pf14* и *mt* с известной локализацией эти расстояния составляют 11,5 и 20,0 сМ, что соответствует данным литературы - 12 и 24 сМ, соответственно [Harris, 1989].

Таблица 3.16. Тетрадный анализ потомства скрещиваний штаммов, гетерозиготных по мутации *chl1-19* и маркерам хромосомы VI на штамм дикого типа

Шифр зигот	маркеры	Число тетрад с расщеплением:						f_{II}	D (сМ)
		1+:0-	3+:1-	2+:2-	3+:1-	4+:0-	сумма		
C1515	<i>chl1-19</i>	44	5	1	0	0	50	0,100	5,0
	<i>pf-14</i>	20	6	1	0	0	27	0,222	11,1
C1520	<i>chl1-19</i>	36	5	2	0	0	43	0,116	5,8
C1523	<i>chl1-19</i>	17	2	1	0	0	20	0,100	5,0
	<i>pf14</i>	13	5	2	0	0	20	0,250	12,5
	<i>mt</i>	10	8	2	0	0	20	0,400	20,0

3.1.3. Биохимические исследования ХОМ *C. reinhardtii*

Спектры поглощения *in vivo* культур хлорофильных оранжевых мутантов демонстрировали сниженное по сравнению со штаммом дикого типа содержание ХЛ и наличие в них пигмента протопорфириновой природы. Для установления их пигментного состава был осуществлен качественный и количественный анализ порфиринов из клеток ХОМ. Накапливающие протопорфирин IX мутанты *brs-1* и *brc-1*, описанные Энди Вангом [Wang et al., 1974], по результатам гибридологического анализа оказались аллельными мутантам по генам *CHL1* и *LTS3* из ПГК (см. подраздел 3.1.2.). Для подтверждения результатов тестов на аллелизм требовалось сравнить составы порфиринов в клетках «американских» и «русских» мутантов.

3.1.3.1. Анализ пигментного состава клеток ХОМ *C. reinhardtii*

Качественный и количественный состав пигментов определяли с использованием методов абсорбционной спектроскопии, анализа флуоресценции и бумажной хроматографии. На рисунке 3.5 представлены спектры флуоресценции фракций различных порфиринов (уро- копро- и протопорфирина

IX), выделенных из клеток мутанта Н-19. При возбуждении флуоресценции длиной волны $\lambda=405$ нм не наблюдалось свечения фракции уропорфирина между 550 нм и 700 нм (линия 1), однако видна отчетливая флуоресценция фракции копропорфирина с максимумами при 601 нм и 656 нм (линия 2).

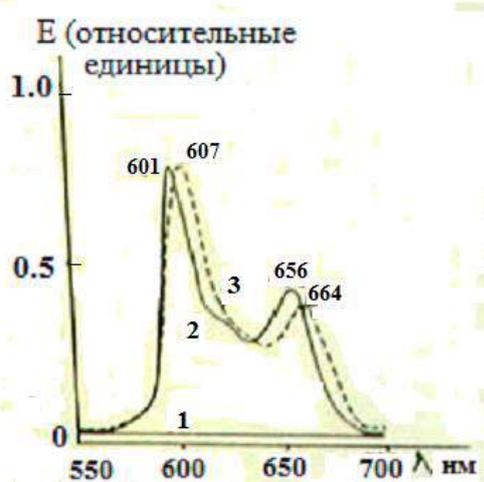


Рисунок 3.5. Спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 405$ нм) солянокислых растворов фракций порфиринов, выделенных из мутанта Н-19 (генотипа *chl1*) хламидомонады. 1 – фракция уропорфириногена (УП) в 0,5N растворе HCl; 2 – фракция копропорфириногена (КП) в 0,1N растворе HCl; 3 – фракция протопорфирина IX (ПП) в 1,5N растворе HCl

Стандартный копропорфирин в 0,1 N растворе соляной кислоты имеет другие положения полос свечения – 697 нм и 654 нм. Во фракции протопорфирина IX флуоресценция наблюдалась при 607 нм и 664 нм (линия 3), что соответствует максимумам флуоресценции стандартного протопорфирина IX в 0,5 N растворе HCl. Хроматографическая идентификация пигмента, содержащегося во фракции копропорфирина, показала, что он имеет подвижность, сходную с подвижностью стандартного ПП, а не КП (рисунок 3.6).

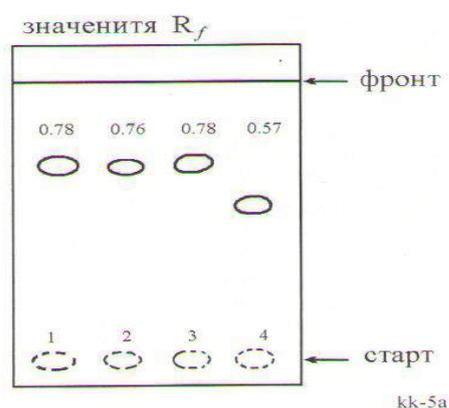


Рисунок 3.6. Бумажная хроматография порфиринов из мутантов по гену *CHL1* *C. reinhardtii*: 1 – фракция протопорфирина IX; 2 – копропорфирина IX; 3 – стандартный протопорфирин IX; 4 – стандартный копропорфирин IX

Принимая во внимание флуоресцентные свойства этого порфирина (рисунок 3.5), а также его хроматографическую подвижность, можно утверждать, что пигмент, флуоресценция которого регистрируется во фракции КП, является продуктом деградации ПП. На рисунке 3.6 также видно, что порфирин фракции ПП имеет хроматографическую подвижность, аналогичную подвижности стандартного ПП. Положения максимумов в спектре поглощения этого пигмента (рисунок 3.7) в диэтиловом эфире (407, 503, 536, 577 и 634 нм) соответствуют таковым в спектре поглощения стандартного ПП [Rebeiz et al., 1970]. Таким образом, качественный анализ порфиринов у мутанта по гену *CHL1* показал, что из безметалльных порфиринов, в его клетках накапливается только один – протопорфирин IX.

Результаты количественного анализа ПП и его магниевых производных: Mg-ПП и его метилового эфира (МПЭ), протохлорофиллида (ПХЛД), хлорофиллида «а» (ХЛДа) и хлорофиллов (ХЛа и ХЛб) в клетках исследуемых мутантов, представлены в таблице 3.17. Только в диком типе, содержащем

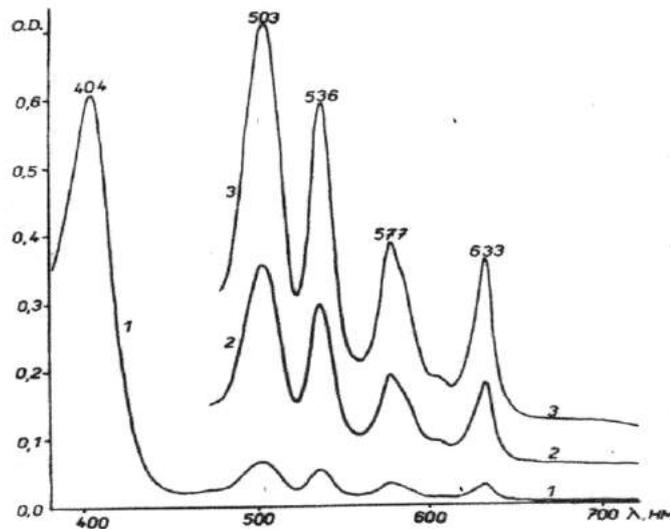


Рисунок 3.7. Спектр поглощения протопорфирина IX (в диэтиловом эфире). Пигмент экстрагирован из мутанта *C. reinhardtii* H-19 генотипа: *chl1* (1,2); 3. – стандартный ПП

максимальные количества ХЛ, по спектрам флуоресценции отмечено присутствие реальных количеств его поздних предшественников – ПХЛД и ХЛД. В мутантах, как правило, или вообще не удается их обнаружить, либо они присутствуют в следовых количествах. В отличие от штамма дикого типа, исследуемые хлорофильные оранжевые мутанты накапливают значительные количества ПП. При этом, сегреганты, несущие аллельные мутации по гену *CHL1*: *chl1-19*, *or2/5*, *or5* и *brs-1*, достоверно не различаются между собой по количественному содержанию ПП ($P > 0,95$) и уровень накопления ПП стабилен в потомстве (таблица 3.17). Хотя мутация *or3* обуславливает несколько сниженный уровень ПП, существенно не различаются между собой по количественному показателю и мутанты по гену *LTS3* (штаммы, несущие мутации: *or13*, *lts3-122* и *brc-1*). Наряду с отсутствием четко выраженных различий в накоплении ПП у аллельных мутантов, обнаружались различия по содержанию пигментов между мутантами, принадлежащими разным группам комплементации. В клетках мутантов по гену *CHL1*, практически нет ХЛ и его магниевых производных (от МПЭ до ХЛ), тогда

как у мутантов по гену *LTS3* они обнаружены в следовых количествах. На свету мутанты по гену *CHL1* гибнут, тогда, как *lts3*-штаммы - зеленеют.

Таблица 3.17. Содержание протопорфирина IX и его магниевых производных у штамма дикого типа и ХОМ *C. reinhardtii*, выращенных в темноте

Штамм	Генотип	Содержание пигментов ($\mu\text{Моль} \times 10^9$ клеток)*				
		ПП	МПЭ	ПХЛД	ХЛД	ХЛ
137С	<i>wt</i>	н.о.	н.о.	0,017	0,034	3,457
1482-2е	<i>chl1-19</i>	0,191	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
1514-7в	<i>chl1-19</i>	0,154	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
1517-1	<i>chl1-19</i>	0,162	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
<i>brs-1</i>	<i>brs-1</i>	0,150	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Д-2/5-16	<i>or2/5</i>	0,182	н.о.	н.о.		0,007
<i>brc-1</i>	<i>brc-1</i>	0,124	н.о.	н.о.		0,096
1430-23а	<i>or3</i>	0,131	н.о.	н.о.		0,042
1419-1в	<i>or13</i>	0,093	0,001	0,001	0,001	0,217
1423-25а	<i>lts3-122</i>	0,101	0,002	0,001	0,001	0,123

* - Примечание: измерения проводились в 3-5 повторностях, во всех случаях ошибки составляют не более 2-3%. В таблице пигменты обозначены следующим образом:

ПП – протопорфирин IX; МПЭ - протопорфирина IX монометилового эфира;

ПХД – протохлорофиллид; ХД - хлорофиллида «а»; ХЛ - хлорофиллы «а» и «б»;

н.о. – не обнаружено.

Экспериментальная работа по определению пигментного состава клеток мутантов по генам *CHL1* и *LTS3* была продолжена на базе двух немецких научных центров: в лаборатории проф. Рюдигера (*W. Rudiger, Botanisches Institut, Ludwigs-Maximilian-Universitat, Munich*), и в лаборатории проф. Гримма (*B. Grimm, Institut fur Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, Gatersleben*). Содержание ХЛ и их предшественников определяли методами абсорбционной спектроскопии и жидкостной хроматографии (HPLC). Финальные результаты этих исследований представлены в таблице 3.18.

Таблица 3.18. Содержание хлорофилла и его предшественников в клетках мутантов, неспособных синтезировать хлорофилл в темноте*

Штамм	Условия роста культур	Генотип	Содержание пигментов (нМол/10 ⁹ клеток)						
			ПП	Mg-ПП	МПЭ	ПХЛД	ХЛД	ХЛ	Гем
СС124	свет	<i>wt</i>	0,19	0,20	0,18	н	н	5000	23
Lts3	свет	<i>lts3</i>	0,41	0,54	0,56	н	89-529*	2400	
Brc1	свет	<i>brc1</i>	0,37	0,67	0,39	н	54-385*	2700	
y-7	свет	<i>y-7</i>	0,2	-	-	н	-	4200	
СС124	темнота	<i>wt</i>	0,3	0,20	0,08	0,8	н	2450	47
Lts3	темнота	<i>lts3</i>	12,0	0,77	0,62		н	180	94
Brc1	темнота	<i>brc1</i>	14,0	0,54	0,82	17,0	н	240	82
y-7	темнота	<i>y-7</i>	0,43			42,0		54	
Л-7	темнота	<i>y-7, pc-1</i>	0,81	н	н	36	н	н	н
1482-2e	темнота	<i>chl1</i>	30,0	н	н	н	н	н	270
brs-1	темнота	<i>brs-1</i>	50,0	н	н	н	н	н	210

* - Условные обозначения: ПП – протопорфирин IX; Mg-ПП – магний протопорфирин IX; МПЭ – монометилловый эфир Mg-ПП; ПХЛД – протохлорофиллид; ХЛД – хлорофиллид; ХЛ – хлорофиллы (a+b); н. – наличие пигмента не регистрируется; В таблице даны средние значения 5-7-повторностей измерений. Во всех случаях ошибка не превышает 5%;

* - содержание пигмента измеряли в условиях переноса культуры из темноты на свет, так как при постоянном освещении протохлорофиллид не накапливается.

3.1.3.2. Активности ферментов биосинтеза хлорофилла у ХОМ *C. reinhardtii*

Результаты анализа активности трех ферментов ранних этапов биосинтеза ХЛ: магний-хелатазы (МХ), магний-протопорфирин IX-метилтрансферазы и АЛК–синтезирующего комплекса, представленные в таблице 3.19, свидетельствуют, что у *chl1*-мутанта резко снижена активность только одного из них – МХ. Эти данные, наряду со способностью мутантов по гену *CHL1* накапливать субстрат этого фермента - ПП, с высокой долей вероятности позволяли предполагать, что продуктом гена *CHL1* является одна из субъединиц магний-хелатазы. В световой культуре мутанта по гену *LTS3* активность двух

сопряженно-функционирующих ферментов: МХ и Mg-ПП-метилтрансферазы имела промежуточные значения между темновыми и световыми культурами штамма дикого типа. Относительная активность АЛК-синтезирующего комплекса у темновых культур снижена примерно на 40% от уровня растущих на свету клеток.

Таблица 3.19. Активность ферментов биосинтеза хлорофилла у мутантов хламидомонады по генам *CHL1* и *LTS3*

Штамм, условия культивирования	Генотип	Активность ферментов:		
		Mg-хелатазы (<i>fkat/g</i>)	Mg-ПП-метил- трансфераза (<i>μkat/g</i>)	АЛК (%)
СС124 (свет)	<i>wt</i>	144	3,5	100
1500-1a (свет)	<i>lts3</i>	107	3,2	91
СС124 (темн.)	<i>wt</i>	90	2,7	60
1482-2e (темн.)	<i>chl1</i>	2,7	2,7	63

У высших растений и зеленых водорослей активность ферментов биосинтеза ХЛ в норме индуцируется светом. Продуктивность АЛК-синтезирующего комплекса на свету обычно на 40 - 50% выше, чем в темноте, и поскольку количество субстрата - АЛК на свету в клетке увеличивается, ферменты, осуществляющие дальнейшее превращение АЛК до ХЛ начинают функционировать на 20-40% эффективнее. Более древним в эволюционном отношении является темновой синтез ХЛ. Если в клетках существует два пути синтеза хлорофилла: темновой и световой, то на долю каждого приходится 60% и 40% активности, соответственно.

3.1.3.3. Белковые компоненты магний-хелатазы у мутантов *C. reinhardtii* по генам *CHL1* и *LTS3*

Накопление протопорфирина IX клетками мутантов по генам *CHL1* и *LTS3* указывало, что биосинтез ХЛ у них нарушен на этапе превращения ПП в Mg-ПП. Встраивание магния в молекулу ПП осуществляет фермент магний-хелатаза

(MX), который у всех, изученных к настоящему времени организмов, представляет собой белковый комплекс, состоящий из трех субъединиц: большой (H), средней (D) и малой (I). К моменту начала экспериментов, мы располагали антителами к субъединицам H и I MX табака и арабидопсиса. Эти антитела и были использованы для Western-blot анализа белков, экстрагированных из клеток дикого типа и ХОМ *C. reinhardtii*. Применение гетерологичных антител затрудняло иммунодетекцию искомым белков, однако нам удалось показать наличие белков с ожидаемой молекулярной массой для субъединиц H и I MX (рисунок 3.8) в экстрактах штамма дикого типа *C. reinhardtii* и мутанта по гену *LTS3*.

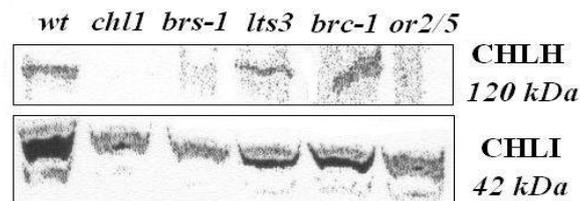


Рисунок 3.8. Вестерн-блот анализ белков из клеток мутантов по генам *CHL1* (генотипа: *chl1*, *brs-1*, *or2/5*), *LTS3* (генотипа: *lts3*, *brc-1*) и штамма дикого типа (*wt*). Иммуноблотинг с антителами к субъединицам H и I MX арабидопсиса

Среди белков, выделенных из мутантов по гену *CHL1* не удалось обнаружить субъединицу H магний-хелатазы. Хотя качество «картинок», полученных в эксперименте, далеко от идеала, они однозначно указывали на отсутствие в *chl1*-мутантах белка большой субъединицы (H) магний-хелатазы.

3.1.4. Обсуждение результатов

Генетические исследования процессов биосинтеза хлорофилла (ХЛ) начались с создания коллекций пигментных мутантов фотосинтезирующих организмов: цианобактерий, водорослей и высших растений. В этой области науки пионерскими стали работы Самуэля Граника, который первым изолировал бесхлорофильный мутант зеленой водоросли хлореллы, накапливавший

протопорфирин IX (ПП) – соединение, тогда известное как предшественник железосодержащего порфирина гема [Granick, 1948a]. Основываясь на изучении этого мутанта и мутанта, накапливающего магний-ПП [Granick, 1948b], он предложил схему общего пути биосинтеза порфиринов из 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), где магний, встраиваясь в ПП, образует Mg-ПП, который превращается в протохлорофиллид (ПХЛД) и, далее, в ХЛ [Granick, 1950]. Биохимические и физиологические исследования бесхлорофильных мутантов хлореллы дали обширную информацию о метаболизме ХЛ и его предшественников, но генетическая регуляция этих процессов оставалась неизвестной, поскольку гибридологический анализ у хлореллы невозможен. Первые данные о генетическом контроле процессов хлорофиллообразования появились при изучении мутантов зеленой водоросли *C. reinhardtii* и ячменя. В 1955 году Р. Сэджер описала индуцированный УФ-излучением коричневый светочувствительный мутант *br* хламидомонады, накапливающий предшественники ХЛ. Описанная мутация была рецессивна, наследовалась моногенно (2+ : 2-) и была локализована в 17 сМ от центромеры [Sager, 1955]. В начале 60-х годов XX века пигментный состав мутантов ячменя с нарушениями синтеза ХЛ начал исследовать Дитер Веттштейн [von Wettstein, 1959]. Используя абсорбционную и флуоресцентную спектрофотометрию, он показал отсутствие протохлорофиллида (ПХЛД) и ХЛ у желтых мутантов, названных *xantha-f*, и предположил, что у них генетический блок находится между ПП и ПХЛД. Только 38 лет спустя ему и его ученикам удалось показать, что *Xantha-f* кодирует большую субъединицу магний хелатазы – фермента, осуществляющего встраивание магния в молекулу ПП [Jensen et al., 1996]. Интенсивные генетические и биохимические исследования бесхлорофильных мутантов началось в конце 60-х – начале 70-х годов. Почти одновременно появляются работы о мутантах ячменя [von Wettstein et al., 1971, 1974] и хламидомонады [Столбова, 1971; Wang et al., 1974]. Генетико-биохимические исследования

бесхлорофилльных, накапливающих ПП, мутантов *C. reinhardtii*, описаны в этом разделе 3.1 настоящей работы.

Петергофская генетическая коллекция штаммов зеленых водорослей [Квитко с соавт., 1983] была создана около 40 лет назад на кафедре генетики и селекции ЛГУ. По мере ее пополнения, возникла необходимость системного исследования групп фенотипически-сходных мутантов хламидомонады. Задачей автора стало изучение хлорофильных оранжевых мутантов (ХОМ). Клетки ХОМ не синтезируют ХЛ и в гетеротрофных условиях накапливают бурый пигмент порфириновой природы, придающий их колониям желто-оранжевую окраску. ХОМ, вместе с полученными в США штаммами *brs-1* и *brc-1* сходного фенотипа [Wang et al., 1974, 1978], были вовлечены в гибридологический анализ для выяснения их генетической природы. Менделевский характер наследования мутантных аллелей свидетельствовал о том, что они являются единичными мутациями в ядерных генах.

Спектрофотометрия нативных культур ХОМ показала наличие в их клетках пигмента с максимумом поглощения в области 540 нм, характерным для протопорфиринов. По содержанию ХЛ мутанты можно было разделить на две группы. Для штаммов генотипа: *chl1-19*, *or2/5* и *or3* характерно полное их отсутствие, тогда как другие формы оказались способны зеленеть на свету.

Аллельные взаимоотношения ядерных мутаций, обуславливающих блокирование биосинтеза ХЛ и накопление порфириновых пигментов у *C. reinhardtii*, изучали, используя комплементационный и рекомбинационный тесты. Для анализа комплементации в группе фенотипически-сходных ХОМ был выбран метод микроспектрофотометрии молодых гамет и зигот, позволяющий получать спектральные характеристики индивидуальных клеток, по которым оценивали уровень содержания в них пигментов (прежде всего ХЛ). Спектры поглощения зигот, полученных при скрещивании ХОМ между собой, снимали, используя микроспектрофотометр МУФ5. Оценка содержания хлорофиллов ($K=E_{440}/E_{560}$) в зигоспорах дикого типа и зигоспорах с различными сочетаниями мутаций

бесхлорофильности, их гомо- и гетерозигот, показала, что все изучаемые ядерные мутации рецессивны и распределены по двум группам комплементации:

группа I, куда входят мутации: *lts3-122*, *or13* и *or69*;

группа II, объединяющая мутации: *chl1-19*, *or3*, *lts7* и *or2/5*.

Таким образом, нарушения биосинтеза ХЛ, приводящие к накоплению порфиринов у ХОМ, оказались обусловлены мутациями в двух ядерных генетических локусах, названных *LTS3* и *CHL1*. Микроспектрометрия подтвердила ранее выявленные фенотипические различия мутантов по этим генам – *chl1*-мутанты не содержат ХЛ, тогда как мутации в гене *LTS3* ведут к накоплению некоторого его количества.

Бесхлорофильные мутанты Э. Ванга, накапливающие протопорфирин IX [Wang et al., 1974], также были вовлечены в исследования. Для анализа комплементации мутаций *brc-1* и *brs-1* с мутациями в генах *CHL1* и *LTS3* использовали микроспектрофотометр SMS-03 фирмы Opton, который в отличие от МУФ-5 обладает хорошим разрешением в красной области спектра, и позволяет регистрировать оптическую плотность в максимумах поглощения ХЛа и ХЛb – 680 нм и 650 нм, соответственно. Результаты экспериментов свидетельствовали об аллельности мутаций *brs-1* и *chl1*, а также *brc-1* и *lts3*. В клетках диплоидов, гетерозиготных по этим мутациям, полностью восстанавливается фенотип дикого типа, а у дигетерозигот генотипа: *brs-1/+*, *+/lts3* восстанавливался синтез ХЛа при более низком (по сравнению с зиготами дикого типа) относительном содержании ХЛb. Снижение уровня ХЛb могло быть связано с нарушением экспрессии генов для хлорофилл а/б-связывающих полипептидов, описанное для мутантов *brs-1* и *brc-1* [Johanningmeier, 1984]. При сохранении нормальной структуры хлоропласта одного из родителей, наличие ПП не препятствует нормальному биогенезу хлоропласта в гетерозиготе, и, по-видимому, регуляция экспрессии ядерных генов, контролирующей синтез ХЛ у хламидомонады, происходит по-разному в уже сформированных хлоропластах и в новообразующихся хлоропластных мембранах.

Рекомбинационные тесты, проведенные методом посемейственного анализа, показали, что аллельные мутации, принадлежащие к разным группам комплементации, рекомбинируют свободно, то есть, не сцеплены между собой. Хотя объемы выборок потомства анализируемых зигот не позволяют говорить о внутригенной рекомбинации, они подтверждают результаты комплементационного теста.

Для выяснения генетической природы анализируемых мутаций был проведен гибридологический анализ мутантов *C. reinhardtii* по генам *CHL1* и *LTS3*. Низкая фертильность ХОМ и высокая летальность зооспор в потомстве зигот с их участием, затрудняли тетрадный анализ – основной метод идентификации и картирования мутаций. В связи с этим, были созданы фертильные мутантные штаммы и использованы все возможные методы генетического анализа, включая посемейственный анализ, случайную выборку зооспор, учет расщепления трисомиков (++) и митотическую рекомбинацию гетерозиготных диплоидов. ХОМ скрещивали с ауксотрофными и множественно-маркированными линиями *C. reinhardtii* и анализировали потомство методом тетрадного анализа. Результаты демонстрировали отсутствие сцепления мутаций в гене *LTS3* с маркерами VI, X и XI групп сцепления, а для мутаций в гене *CHL1* отсутствие сцепления показано для маркеров I, IV, X, и XI хромосом *C. reinhardtii*.

ХОМ скрещивали (С1489 и С1495) со штаммами А-3 и М-3 – дисомиками по VI и I группам сцепления, соответственно. Дисомики используются для локализации генов в хромосомах [Mortimer and Hawthorne, 1973]. Их скрещивают с гаплоидами, несущими нелокализованную мутацию, и учитывают расщепление трисомного гибрида (++)-. Отклонение от менделевского расщепления 2+ : 2- по анализируемому маркеру служит подтверждением дисомии [Горденин, 1976]. Такие отклонения по маркерам *chl1-19* и *or13* в потомстве С1489 и С1495 говорят об их возможной локализации в VI, и I группах сцепления (соответственно), или о том, что родительские штаммы А-3 и М-3 являются дисомиками и по хромосомам, несущим гены *CHL1* и *LTS3*, соответственно. Мейотическое

расщепление анеуплоидов-трисомиков (++-) также было использовано для определения расстояний анализируемых маркеров от своих центромер - анеуплоидия ведет себя как маркер, абсолютно сцепленный с центромерой. Частота рекомбинации (f_{II}) на участке ген-центромер определяется как частота тетратипов в сочетании исследуемого маркера и анеуплоидии ($n+1$) среди тетрад диплоида-трисомика, и, без учета множественных обменов, расстояние между геном и центромерой определяется как $0,5 f_{II}$, [Горденин, 1978].

Анализ митотического расщепления гетерозиготных гибридов – классический метод генетического анализа. Диплоиды (дисомики), гетерозиготные по изучаемым маркерам, оказались нестабильны. Нестабильность проявляется в высокой частоте появления секторных (зеленый/оранжевый) колоний ($2-24 \times 10^{-2}$) при их вегетативном размножении. Для *C.reinhardtii* показано, что причиной нестабильности диплоидов является митотическая рекомбинация, нерасхождение, гемизиготизация или гаплоидизация, причем, УФ-облучение увеличивает частоту митотической рекомбинации и не влияет на нерасхождение [Lee et al., 1976; Martinek et al., 1969; 1970]. При этом, сегрегация в большей степени является результатом митотической рекомбинации, хотя частота постмейотической сегрегации может быть увеличена за счет хромосомных делеций [Eves and Chiang, 1982]. Высокая частота совместной сегрегации мутации *or13* и маркера I группы сцепления *msr-1*, позволила сделать заключение об их тесном сцеплении. Увеличение частоты секторных колоний при УФ-облучении гетерозигот *or13/or13+* (таблица 3.8) подтверждает, что причина сегрегации – митотическая рекомбинация.

В ряде скрещиваний (С1433, С1495) наблюдалась высокая частота образования вегетативных диплоидов. Для скрещиваний с участием *or13*-мутантов и штаммов, несущих мутации аргининзависимости *arg7* и устойчивости к эритромицину *ery3*, частота появления таких диплоидов достигала 100%, тогда как в норме она не превышает 2-4% [Ebersold, 1967]. Диплоидность культур может быть подтверждена цитологическими и генетическими критериями:

средний объем клетки, тип спаривания *mt-*, характер расщепления при скрещивании их с гаплоидами и диплоидами. Показано, что объем клетки пропорционален содержанию ДНК в ядре и изменяется соответственно увеличению числа наборов хромосом [Косиков и др., 1975; Матюшина, 1964]. У вегетативных диплоидов хламидомонады он в 2-2,5 раза выше, чем у гаплоидов, и они имеют тип спаривания *mt-*, который доминирует в гетерозиготе: *mt-/mt+* [Ebersold, 1969; Чемерилова, 1978]. Средний объем клеток потомства скрещивания С1501 составлял 209 – 240 мкм³, и они имели тип спаривания *mt-*. Гетерозиготность по мутации *or13*, также служила подтверждением их диплоидности.

Хлорофиллы в фотосинтезирующей клетке формируются в результате цепи последовательных ферментативных реакций, и для обнаружения звеньев этой цепи, контролируемых генами *CHL1* и *LTS3*, у мутантов по этим генам был осуществлен анализ ХЛ и их предшественников. Качественный и количественный состав пигментов в клетках *C. reinhardtii* определяли методами хроматографии (от бумажной хроматографии до HPLC) и спектроскопии (от абсорбционной спектроскопии до индукции флуоресценции). Хотя данные по уровню содержания предшественников ХЛ, полученные с применением флуоресцентных методов, количественно отличаются от результатов HPLC-анализа (таблицы 3.17 и 3.18), существенных качественных различий между ними обнаружено не было. Установлено, что светочувствительные мутанты по гену *CHL1* в темноте не синтезируют ХЛ и способны накапливать только один его интермедиат – протопорфирин IX (ПП) - общий предшественник гема и ХЛ. Причиной высокого уровня содержания гема (5-тикратно увеличенного по сравнению со штаммом дикого типа) как у штамма генотипа *chl1-19* из ПГК, так и у мутанта *brs-1*, мог стать блок хлорофильной ветви - весь пул молекул ПП оказался задействован в синтезе гема.

Протопорфирин IX (ПП) в цепи синтеза ХЛ является субстратом для фермента магний-хелатазы (МХ), который встраивает ионы магния Mg²⁺ в

молекулы ПП с образованием Mg-ПП (рис. 3.9). Накопление химически чистого ПП в клетках *chlI*-мутантов послужило указанием, что у них генетически заблокирован процесс включения магния в молекулу ПП, и мутации в гене *CHLI* нарушают функционирование МХ. По-видимому, ген *CHLI* или кодирует этот фермент, либо регулирует его активность.

Для ответа на вопрос, - влияют ли мутации в генах *CHLI* и *LTS3* на работу ферментов ранних этапов БХ, - проверяли активность: МХ, Mg-ПП-метилтрансферазы и АЛК–синтезирующего комплекса в клетках штаммов дикого типа и ХОМ хламидомонады. Эти эксперименты позволили установить, что у мутанта по гену *CHLI* МХ практически не функционирует. МХ – это энзиматический комплекс, состоящий из трех субъединиц: Н, D, и I, кодируемых, соответственно, генами: *CHLH*, *CHLD* и *CHLI*. Чтобы найти субъединицу, контролируемую геном *CHLI*, был осуществлен иммуноблоттинг белков, выделенных из анализируемых штаммов, с гетерологичными антителами ко всем трем субъединицам. Результаты показали отсутствие одного белка – субъединицы Н в клетках *chlI*-мутантов.

Первая информация о генах, кодирующих МХ, была получена после обнаружения геномного фрагмента хромосом бактерий *Rhodobacter (R.) capsulatus* и *R. sphaeroides* размером ок. 46 тпн, названного “фотосинтетический генный кластер”, который содержит если не все, то основные гены, контролирующие магниевую ветвь биосинтеза бактериохлорофилла и каротиноидов [Yen and Marrs, 1976; Marrs 1981].

К моменту начала описанных выше экспериментов (1996 год, Гатерслебен) уже было известно, что МХ *Rhodobacter capsulatus* кодируют 3 гена: *bchH*, *bchI* и *bchD* [Bollivar et al., 1994]. Изучение экспрессии этих генов в *E.coli* показало, что все три белковых продукта (с молекулярной массой: 120, 40, 70 kDa, соответственно) необходимы для ферментативной активности [Gibson et al., 1995; Willows et al., 1996]. Подобная работа была выполнена и для генов-ортологов *ChII*, *ChID* и *ChIH* цианобактерии *Synechocystis PCC6803* [Jensen et al., 1996a]. Их

белковые продукты, хорошо различимые на SDS-полиакриламидном геле, имели молекулярную массу примерно 40, 70 и 150 kDa, соответственно, которая полностью совпадала с таковой, рассчитанной по нуклеотидной последовательности. Авторы также показали, что для ферментативной активности требуется наличие белковых продуктов всех трех генов и АТФ. Первый ген растений, контролирующий биосинтез ХЛ, был обнаружен при изучении

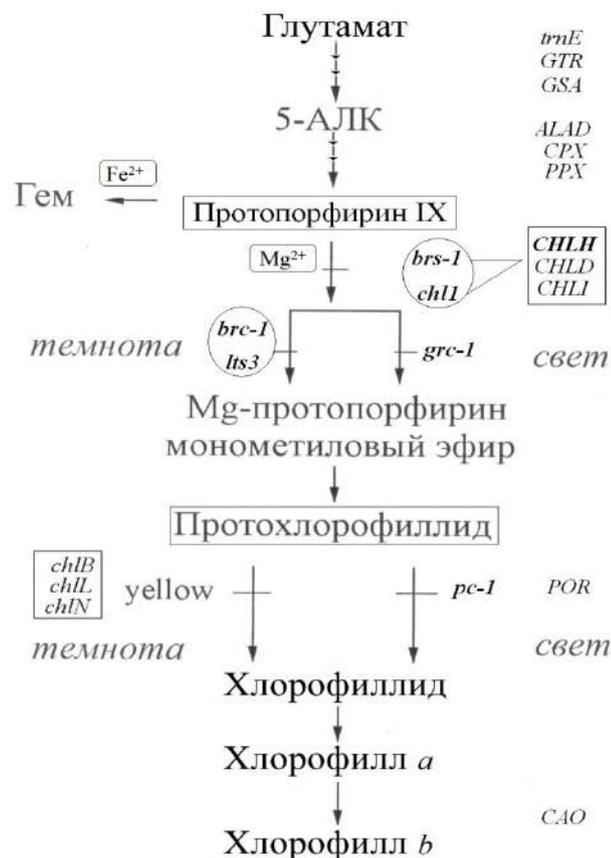


Рисунок 3.9. Схема биосинтеза хлорофиллов (ХЛ). Строчными буквами указаны мутации, блокирующие этапы биосинтеза. Заглавными буквами обозначены ядерные гены ферментов: *GTR* – глутамил-тРНК-редуктазы; *GSA* – глутамат-1-полуальдегидаминотрансферазы; *ALAD* – АЛК-дегидратазы, *CPX* – копропорфириноген III-оксидазы; *PPX* – протопорфириноген IX-оксидазы; субъединиц магний-хелатазы: *CHLH*, *CHLD*, *CHLI*; *POR* – светозависимой НАДФН: ПХЛД-оксидоредуктазы (сПОР); *CAO* – ХЛ*a*/хлорофиллид *a*-оксидоредуктазы. Хлоропластные гены: *trnE* кодирует глутаминовую тРНК, а гены: *chlB*, *chlL* и *chlN* – субъединицы тПОР. В овалах - мутации, исследуемые в настоящей работе

бесхлорофильного мутанта арабидопсиса, у которого инактивированный инсерцией Т-ДНК ген *Ch42 (cs)* оказался гомологичным (49%) гену *bchI Rhodobacter* [Koncz et al., 1990]. У бесхлорофильного мутанта *Antirrhinum majus* (львиный зев), полученного в результате Tam3-транспозонного мутагенеза, блокированный ген *olive* кодировал большую субъединицу МХ *bchH* [Hudson et al., 1993]. Фенотип бесхлорофильных, накапливающих ПП мутантов хламидомонады по гену *CHL1* свидетельствовал, что этот ген также кодирует большую (Н) субъединицу МХ. Его клонирование позволило бы найти первый «водорослевой» ген *CHLH*. Описанию этой работы посвящен следующий подраздел (3.2) настоящей работы.

Способность мутантов хламидомонады по гену *CHL1* накапливать химически-чистый протопорфирин IX (ПП) выгодно отличает их от «порфириновых» мутантов других микроорганизмов и делает перспективной основой для создания штаммов-продуцентов этого пигмента. В процессе вышеописанных экспериментов был разработан экспресс-метод оценки продуктивности мутантов по ПП, и получены штаммы-продуценты. Аллельные мутанты по гену *LTS3*, выращенные в темноте, не имеют ХЛ и накапливают: ПП и его магниевые производные (от Mg-ПП, до протохлорофиллида). При освещении, синтез ХЛ в их клетках частично восстанавливается, - наличие хлорофиллида (ХЛД), свидетельствует о дестабилизации комплекса ферментов, синтезирующих ХЛ, поскольку в норме этот промежуточный продукт не накапливается. В световых культурах мутантов *Lts3* и *Brc-1* содержание ХЛ сходно с таковым у штамма дикого типа, выращенного в темноте, и составляет примерно 50-60% от уровня его накопления в световой культуре штамма дикого типа. Содержание гема – второго конечного продукта биосинтетической цепи, начинающейся с ПП, в темновых культурах мутантов вдвое превышает уровень его содержания у штамма дикого типа в сходных условиях выращивания, по-видимому, за счет избыточного содержания его субстрата - ПП. Возможно, что

мутации *lts3* и *brc1* в гене *LTS3* нарушают темновые реакции превращения ПП в ХЛ.

Клетки штаммов дикого типа *C. reinhardtii* способны синтезировать ХЛ фотототрофно (на свету) и в условиях гетеротрофного роста (в темноте), формируя на агаризованной среде колонии зеленого цвета. Мутации, нарушающие светонезависимый (темновой) синтез ХЛ ведут к появлению бесхлорофильных в темноте клеток, формирующих колонии желтого (благодаря наличию каротиноидов) или оранжевого (в случае накопления помимо каротиноидов красных пигментов – протопорфиринов) цвета. При освещении они зеленеют. Такой фенотип демонстрируют штаммы, несущие мутантные аллели гена *LTS3*: *lts3* и *brc-1*. Подобный фенотип характерен и для хорошо известного класса желтых в темноте (*yellow*) мутантов, у которых заблокирован процесс темнового синтеза хлорофиллида (ХЛД) из ПХЛД - протохлорофиллида [Ford et al., 1980; 1981]. Для ответа на вопрос, не относятся ли мутанты *C. reinhardtii* по гену *LTS3* к типу «*yellow*», был проведен сравнительный анализ пигментного состава их клеток, наряду с *yellow*-мутантами генотипа: *y-7* и *y-7,pc-1* (табл.3.18). В результате, между ними были выявлены существенные различия. Клетки желтых мутантов (генотипа *y-7*) при росте в темноте содержат следовые количества ХЛ и накапливают только один его предшественник – протохлорофиллид (ПХЛД), свидетельствуя о дисфункции темновой ПХЛД-оксидоредуктазы (тПОР), - фермента, превращающего ПХЛД в ХЛД независимо от света. Мутация *pc-1* блокирует светозависимую ПХЛД-оксидоредуктазу (сПОР), которая осуществляет фотоконверсию ПХЛД до ХЛД, а у двойного мутанта генотипа: *y-7,pc-1* это превращение заблокировано как на свету, так и в темноте. Мутанты по гену *LTS3* накапливают более ранний, чем ПХЛД предшественник ХЛ – протопорфирин IX, и, по-видимому, нарушение темнового биосинтеза у них имеет иную, нежели у *yellow*-мутантов, генетическую основу. Данные биохимических исследований не позволили определить функции продукта гена *LTS3*. Они показали, что мутационные нарушения этого гена

блокируют в темноте конверсию ПП и ведут к дестабилизации работы ферментов ранних его этапов (от ПП до ПХЛД). Таким образом, ген *LTS3* *C. reinhardtii* контролирует темновой биосинтез ХЛ на этапе, предшествующем конверсии ПХЛД. Это означало, что редукция ПХЛД – не единственный процесс в цепи биосинтеза ХЛ, осуществляемый двумя путями: светонезависимо и светонезависимо. Ко времени начала работы не существовало никаких данных о генетическом контроле темнового синтеза ХЛ кроме информации о генах, ответственных за превращение ПХЛД. В этом отношении ген *LTS3* оказался уникальным, и анализ мутантов по этому гену, его идентификация и клонирование обещали понять неизвестные к тому времени механизмы наиболее древнего в эволюционном отношении темнового биосинтеза ХЛ у *C. reinhardtii*.

3.1.5. Выводы

1. Установлено, что у зеленой водоросли *C. reinhardtii*, рецессивные мутации, которые блокируют биосинтез ХЛ, приводя к накоплению его интермедиатов – порфиринов, принадлежат двум генетическим локусам *CHL1* и *LTS3*, представленным рядом аллелей: *chl1*, *brs-1*, *or3*, *or2/5*, *or5*, *lts7* и *lts3-122*, *brc-1*, *or13*, *or69*, соответственно.

2. Гибридологический анализ, проведенный как на диплоидном, так и на полиплоидном (триплоидном) уровнях, показал отсутствие сцепления мутаций в гене *LTS3* с маркерами VI, X, XI групп сцепления, позволил оценить расстояние ген-центромер в 30 сМ, и локализовать его в группе сцепления I. Для гена *CHL1* расстояние ген-центромер определено как 5-8,7 сМ, и показано отсутствие сцепления с маркерами I, IV, X и XI хромосом.

3. Анализ митотической рекомбинации гетерозигот по мутации *or13* в гене *LTS3* обнаружил высокую частоту совместной сегрегации этой мутации и маркера *ery3* хромосомы I, что позволило предположить тесное сцепление этих мутаций, и подтвердить локализацию гена в хромосоме I.

4. Биохимические исследования показали, что мутационные нарушения генов *CHL1* и *LTS3* хламидомонады ведут к генетическому блокированию биосинтеза ХЛ на стадии конверсии протопорфирина IX(III) в магний-III ферментом магний-хелатаза.

5. Светочувствительные мутанты по гену *CHL1* в условиях гетеротрофного роста не синтезируют хлорофилл и накапливают его интермедиат – протопорфирин IX. В их клетках фермент магний-хелатаза не активен и не детектируется белок, гомологичный белкам большой (H) субъединицы магний-хелатазы арабидопсиса и табака. У мутантов по гену *LTS3* блокированы темновые реакции синтеза ХЛ.

3.2. Идентификация гена *CHLH* *S. reinhardtii*, кодирующего большую субъединицу магний-хелатазы

В цепи биосинтеза тетрапирролов последним общим предшественником хлорофиллов (ХЛ) и гема является протопорфирин IX (ПП). Далее, в зависимости от того, с ионом какого металла: железа (Fe^{2+}) или магния (Mg^{2+}) связываются молекулы ПП, запускаются, соответственно, ветви, ведущие к образованию гема или ХЛ. Магний хелатаза (МХ) осуществляет первый специфический шаг пути биосинтеза ХЛ - встраивает магний в молекулу ПП с образованием Mg-ПП. Фермент представляет собой белковый комплекс, состоящий из 3-х субъединиц: H, I, и D, размер которых, составляет примерно 140, 40 и 70 kDa, соответственно. Гены, кодирующие эти белки, у большинства синтезирующих хлорофилл/бактериохлорофилл организмов, обозначают: *CHLH/VchH*, *CHLI/VchI* и *CHLD/VchD*. Исключением из этого правила стал ячмень, - субъединицы его МХ кодируются генами: *Xantha-f*, *Xantha-h*, *Xantha-G*, а их белковые продукты обозначаются как: *XAN-F*, *XAN-H*, *XAN-G*. Детальная картина функционирования МХ описана в разделе «Обзор литературы». Настоящая глава посвящена молекулярно-генетическим исследованиям гена, кодирующего большую (H) субъединицу магний-хелатазы у одноклеточной зеленой водоросли *S. reinhardtii*.

Культуры бесхлорофильных мутантов *S. reinhardtii* по ядерному гену *CHLI* светочувствительны, а в гетеротрофных условиях роста формируют на твердой агаризированной среде желто-оранжевые колонии (рисунок 3.10). Анализ пигментного состава клеток аллельных мутантов *chl1* и *brs-1* по этому гену показал, что они накапливают только один интермедиата биосинтеза ХЛ – протопорфирин IX – субстрат МХ (3.1.2). Резко сниженная активность этого фермента у мутантов указывала, что продукт гена *CHLI* необходим для функционирования МХ, и, возможно, является одной из 3-х её



Рисунок 3.10. Фенотип мутантов по гену *CHL1*. Культуры штаммов дикого типа - CC124 и 137(+) *C. reinhardtii* и мутантов по гену *CHL1* (*chl1* и *brs-1*) растущие на агаризованной среде ТАР в темноте (dark) и на свету (light) в течение пяти дней.

субъединиц. Предварительные эксперименты по Western blot анализу белков, экстрагированных их клеток мутантов по гену *CHL1* и штаммов дикого типа, с гетерологичными антителами для субъединиц МХ табака и арабидопсиса, свидетельствовали, что у мутантов отсутствует белок большой (Н) субъединицы МХ (3.1.3). Поняв, что ген *CHL1*, по-видимому, кодирует эту субъединицу, мы приступили к его идентификации. Молекулярно-генетические подходы позволили клонировать ген большой (Н) субъединицы МХ, который, в соответствии с общепринятой номенклатурой, получил название *CHLN* (вместо *CHL1*), и определить его интрон-экзонную структуру. Секвенирование мутантных аллелей показало, что мутации *chl1* и *brs-1* являются вставками (+1) в экзонах 9 и 10 гена *CHLN*, соответственно [Chekunova et al., 2001]. Работы по клонированию этого гена выполнялись на базе лаборатории проф. Бека в Германии (Beck Ch., Freiburg University, Germany) при поддержке немецких фондов фундаментальных исследований DFG и DAAD.

3.2.1. Клонирование гена *CHLH*. Выбор стратегии и результаты

Генетико-биохимические исследования мутантов по гену *CHL1* *C. reinhardtii* позволили с высокой степенью вероятности установить, что его продукт - большая (Н) субъединица магний-хелатазы (МХ) – фермента, осуществляющего превращение протопорфирина IX в магний-протопорфирин IX в процессе биосинтеза ХЛ. Для решения задачи идентификации этого гена, была выбрана стратегия, учитывающая имеющиеся в нашем распоряжении информацию, методы и материалы (рисунок 3.11А, Б). В 1996 году, на момент начала работы, такие гены были идентифицированы у нескольких объектов: бактерий *Rhodobacter capsulatus* (*BchH*) и *Synechocystis PCC6803* (*chlH*), ячменя (ген *Xantha-f*) и львиного зева (ген *Olive*). При сравнении аминокислотных последовательностей белковых продуктов этих генов выбрали 2 консервативный участка: FGYEGDPM (624-631) и LEFMPGRQ (670-677), которые стали основой для создания дегенеративных праймеров (в скобках указаны позиции аминокислот в соответствии с сиквенсом гена *CHLH* ячменя):

5'-TT(CT)GG(ACTG)TA(CT)GAGGG(ATGC)GA(CT)CC(AGCT)-3;

5'-CTG CTТА(ACGT)CC(ACGT)GGCAT(AG)AA(CT)TC-3'.

Эти праймеры использовали для ПЦР на матрице тотальной ДНК, выделенной из клеток штамма дикого типа хламидомонады. Полученный фрагмент ДНК размером 162 нп был клонирован в TA-cloning вектор PCRII (*Invitrogen*) и секвенирован. Нуклеотидная последовательность этого ПЦР-фрагмента оказалась гомологичной (100%) последовательности фрагмента гена *Xantha-f* ячменя, соответствующей последовательности аминокислот 624-677. Этот фрагмент ДНК (162 пн) послужил зондом при скрининге кДНК библиотеки, сконструированной на основе мРНК, выделенных из вегетативных клеток штамма дикого *C. reinhardtii*, в составе λНМ149, которую любезно предоставил проф. Роше (J-D. Rochaix, University of Geneva, Switzerland). В результате были отобраны 2 позитивных фаговых клона, содержащих фрагменты ДНК размером 1,4 тпн и

3,1 тпн. Они были амплифицированы методом ПЦР и субклонированы в вектор pGEM-T (*Promega*) для секвенирования. Нуклеотидная последовательность фрагмента размером 3,1 тпн содержала короткий поли-А хвост и в непосредственной близости от него сигнал полиаденилирования TGТАА. Последовательность длиной 800 нуклеотидов «выше по течению» от этого сигнала была гомологична генам, кодирующим Н-субъединицу МХ. Фрагмент размером 1,4 тпн на своем 3'-конце содержал 200 пн, перекрывающихся с началом первого фрагмента, и область кДНК гена МХ «выше по течению», однако не включал начала гена. Для поиска 5'-конца кДНК гена *CHLN* был предпринят повторный скрининг кДНК библиотеки, который не дал положительных результатов, после чего была использована система 5'RACE (*rapid amplification cDNA ends*), позволяющая амплифицировать 5'-концевые участки кДНК. Используя 2 специфических праймера, синтезированных по 5'-концевому участку фрагмента размером 1,4 тпн: 5'СТССАГСТТСТССАГТТАСС-3' и 5'-АГСАГГТТСТССАГГТТГТСС-3', и анхор-праймер 5'-GGCCACGCGCCGTCGACTAGTACGGGIIIGGGIIIGGGIIIG-3', был получен кДНК фрагмент размером 605 пн, содержащий последовательность, лежащую «выше по течению» фрагмента размером 1,4 тпн кДНК гена *CHLN*. Этот фрагмент был субклонирован в pBluescriptII SK+ (*Stratagene*) и секвенирован.

Для проверки того предположения, что фрагмент ДНК размером 605 пн содержит 5'-конец гена *CHLN*, был осуществлен скрининг геномной библиотеки хламидомонады, сконструированной в λ EMBL3 (Goldschmidt-Clermont, 1986), с этим фрагментом в качестве зонда. Фаговые ДНК из 3-х позитивных клонов были порезаны рестриктазами: SalI/PstI и SalI/SmaI, перенесены на нейлоновую мембрану и гибридизированы сначала с 5'-RACE фрагментом, а, затем, после отмывки мембран, с пробами из кДНК фрагментов размером 1,4 и 3,1 тпн. Рестрикционный фрагмент размером 1,75 тпн, который гибридизовался с 5'-RACE фрагментом, но не с остальными двумя зондами, был выделен из агарозного геля, очищен, (*JET sorb kit, Genomed*), и субклонирован в pBluescript

Получение ПЦР-фрагмента кДНК гена *CHLH* *C. reinhardtii*

Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей четырех известных белков Н-субъединицы магний-хелатазы из бактерий *Rhodobacter capsulatus* (*BchH*) и *Synechocystis PCC6803* (*chlH*), ячменя (ген *Xantha-f*) и львиного зева (ген *Olive*). Выбор 2-х консервативных участков: FGYEGDPM (624-631)* и LEFMPGRQ (670-677)* для создания дегенеративных праймеров



ПЦР на тотальной ДНК из клеток штамма дикого типа хламидомонады с синтезированными дегенеративными праймерами



Получение ПЦР-фрагмента кДНК размером 162 нп.

Его субклонирование в TA-cloning вектор PCRII (Invitrogen) и секвенирование показало 100% гомологию с участком кДНК гена *Xantha-f*, соответствующего последовательности аминокислот фрагмента (624-677)*.



Поиск кДНК фрагментов гена *CHLH* в библиотеке кДНК *C. reinhardtii*

Скрининг кДНК библиотеки с ПЦР-фрагментом размером 162 нп. Отбор позитивных фаговых клонов.



ПЦР-амплификация фрагментов ДНК хламидомонады из позитивных фаговых клонов, их субклонирование в вектор рGEM-T (Promega) для секвенирования.

Нуклеотидные последовательности двух фрагментов ДНК размером 1,4 тпн и 3,1 тпн имели область перекрывания (200 нп) и показали высокую степень гомологии с известными сиквенсами генов Н-субъединицы магний хелатазы.



Клонирование 5'-конца кДНК гена *CHLH*

(5'RACE - rapid amplification cDNA ends). Получен ДНК-фрагмент размером 601 пн., субклонирован в pBluescriptII SK+ (Stratagene) и секвенирован.



Поиск 5'-конца геномного сиквенса *CHLH*

Скрининг геномной библиотеки (λEMBL3), с 5'RACE-с фрагментом (605 пн) в качестве зонда.

Фаговые ДНК из 3-х позитивных клонов порезаны рестриктазами: Sall/PstI и Sall/SmaI, перенесены на нейлоновую мембрану и гибридизованы, сначала с 5'-RACE фрагментом, а, затем, после отмывки мембран, с пробами кДНК фрагментов размером 1,4 и 3,1 тпн.

Выделение из агарозного геля рестрикционного фрагмента размером 1,75 тпн, который гибридизовался с 5'-RACE фрагментом, но не с остальными двумя зондами, очистка с использованием JETsorbkIt (Genomed), субклонирование в pBluescriptII SK+ (Stratagene) и секвенирование.

Нуклеотидная последовательность 1,75 пн-фрагмента содержит ОРС, гомологичную субъединице *CHLH*, прерываемую множеством интронов.



Определение интрон-экзонной структуры 1,75 пн-фрагмента гена *ChlH* при сравнении его сиквенса и EST-фрагмента размером 445 нп, из EST-библиотеки /AccessionNAV394213; Asamizu et al., 1999/



Получение полного нуклеотидного сиквенса кДНК гена *CHLH* хламидомонады (5054 пн)

в результате комбинирования нуклеотидных последовательностей всех ДНК-фрагментов (рис.1б).



Получение полного геномного сиквенса гена *CHLH* хламидомонады (7035 пн).

ПЦР-амплификация фрагментов ДНК гена *ChlH*, по матрице геномной ДНК дикого типа с (proofreading) ДНК-полимеразы (*Pfu-TurboDNA polymerase*, Stratagene) и 6-ти пар праймеров, синтезированных по нуклеотидной последовательности кДНК *ChlH*, их субклонирование и секвенирование.

Рисунок. 3.11А. Схема реконструкции гена *CHLH* и его интрон-экзонной структуры.

* - В скобках - позиции аминокислот в соответствии с сиквенсом гена *Xantha-f* ячменя

II SK+ (Stratagene) для секвенирования. Его нуклеотидная последовательность содержала ОРС, гомологичную последовательности гена *CHLH*, прерываемую

интронами. Области экзонов и интронов в этом фрагменте были установлены путем сравнения нуклеотидных последовательностей его геномной ДНК и EST-фрагмента размером 445 пн (Accession N AV 394213), из EST-библиотеки, созданной к тому моменту [Asamizu et al., 1999]. Этот EST-фрагмент имел общие участки с 5'-RACE фрагментом. Основываясь на их последовательностях, определили начало кодирующей последовательности и установили стартовый кодон транскрипции. Комбинируя нуклеотидные последовательности всех ДНК-фрагментов, получили полную кДНК гена *CHLH* хламидомонады (5054 пн).

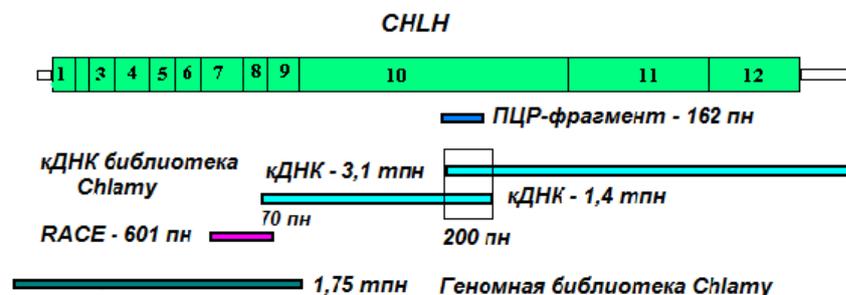


Рисунок 3.11Б. Стратегия клонирования гена *CHLH* большой субъединицы магний-хелатазы *C. reinhardtii* – реконструкция.

Геномная ДНК гена *CHLH* хламидомонады была амплифицирована в виде ПЦР-фрагментов, полученных на матрице геномной ДНК штамма дикого типа СС124 хламидомонады с использованием безошибочной (*proofreading*) ДНК-полимеразы (*Pfu-Turbo DNA polimerase, Stratagene*). По последовательности кДНК были синтезированы праймеры для получения 6-ти перекрывающихся фрагментов геномной ДНК (таблица 3.20). Эти ДНК-фрагменты, размеры которых варьировали от 0,7 тпн до 1,6 тпн, были субклонированы в рGEM-T вектор, секвенированы, и использованы для реконструкции гена *CHLH*. Выявление его интрон-экзонной структуры осуществляли путем сравнения последовательностей ДНК и кДНК (рисунок 3.12). Отсутствие интронов в 3'UTR также было установлено методом ПЦР. Полученные нуклеотидные последовательности кДНК и геномной ДНК гена *CHLH*, кодирующего большую

субъединицу МХ *C. reinhardtii*, были депонированы в базе данных EMBL под номерами: AJ307054 (*CHLH* cDNA) и AJ307055 (*CHLH* gene).

Таблица 3.20. Праймеры, использованные для секвенирования гена *CHLH*

ПЦР-фрагмент		Праймеры	Дли-на (пн)	Полоде-ние на кДНК	Длина ПЦР-фрагмента (пн)	
					cDNA	genomic
1	→	AACTAGGGAGGGGCAACA	21	- 23	508	943
	←	ATGAAGATGTTGGCAGAGGCC	18	+485		
2	→	GCCAACATCTTCATCGGCTCGC	22	+454	729	1535
	←	TGTTGACGGGGTCGGAGAA	19	+1153		
3	→	TCCGACCCCGTCAACAAGT	19	+1133	780	965
	←	GGCTGCACGCCGATGAAGACG	21	+1913		
4	→	CGTCTTCATCGGCGTGCAGCC	21	+1893	1163	1335
	←	GCGGCCTGAGTGCCAATC	18	+3056		
5	→	ACGGACGCCCTGGACCCTCAGT	18	+3020	1224	1376
	←	CAACCACAACCCGCCAACT	19	+4244		
6	→	CGTGGAGGACAAGATTG	17	+4170	797	797
	←	TCCGAGGGAGCCGTGAG	17	+4967		

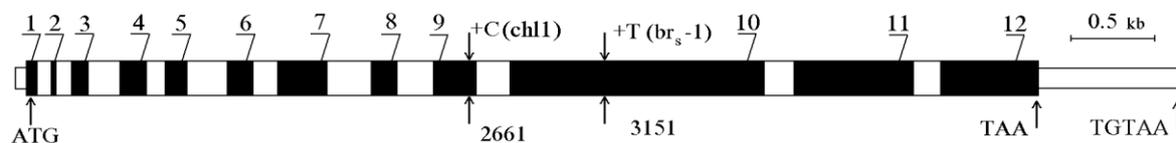


Рисунок 3.12. Структура гена *CHLH* *C. reinhardtii* (7035 пн). Темные области - экзоны, белые – интроны. 5'UTR и 3'UTR –прямоугольники меньших размеров. Указаны положения иницирующего кодона (ATG), стоп-кодона (TAA), сигнала полиаденилирования (TGТАА) и мутаций (+1 frameshift) chl1 и brs-1

Проверку копияности гена *CHLH* осуществляли методом Саузерн-блот анализа (рисунок 3.13). Геномная ДНК, выделенная из штамма дикого типа, была порезана 4-мя ферментами рестрикции, которые не имеют сайтов в последовательности гена *CHLH*, или этот сайт расположен на концевом его участке, перенесена на мембраны и гибридизована с фрагментами кДНК этого

гена. Единичные сигналы гибридизации демонстрируют, что в геноме хламидомонады существует одна копия гена *CHLH*.

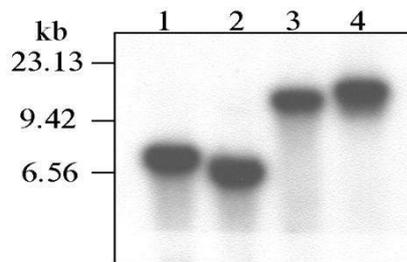


Рисунок 3.13. Анализ геномной ДНК *C. reinhardtii* по Саузерну. 800 нг геномной ДНК, выделенной из штамма дикого типа CC124, обработано рестриктазами: SalI – дорожка 1; HindIII – дорожка 2; BamHI – дорожка 3; SmaI – дорожка 4. Для гибридизации использовали ^{32}P -меченые фрагменты кДНК гена *CHLH* *C. reinhardtii*

3.2.2. Идентификация мутантных аллелей: *chl1* и *brs-1* гена *CHLH*

Для поиска мутаций *chl1* и *brs-1* фрагменты гена *CHLH* были амплифицированы методом ПЦР на матрицах ДНК, выделенных из мутантных штаммов CC1482-2e (генотипа *chl1*) и *brs-1*, 6-ти пар праймеров, которые применялись для амплификации аллели дикого типа этого гена (таблица 3.20), и “безошибочной” ДНК-полимеразы (*Pfu-Turbo DNA polymerase*, Stratagene).

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей гена *CHLH* у штамма дикого типа мутантов обнаружил у мутанта *chl1* инсерцию одного нуклеотида (С) в позиции 2661 в экзоне 9 (рисунок 3.12). Эта вставка приводит к мутации типа “*fraimshift*” - сдвиг рамки считывания, обуславливая появление стоп-кодона через 22 триплета нуклеотидов. В результате, в клетках мутанта синтезируется короткий пептид размером 479 ак (52 kDa). Он не детектируется при Вестерн-блот анализе, по-видимому, из-за нестабильности этого белка.

Поскольку в потомстве зигот скрещиваний мутантов *chl1* и *brs-1* не наблюдали появления рекомбинантов среди более чем 10^4 проанализированных клонов (подраздел 3.1.2), мы ожидали обнаружить мутацию *brs-1* на расстоянии, не

превышающем 1 тпн от мутации *chl1*. В геноме *C. reinhardtii* на 2 сМ единиц рекомбинации приходится 150 – 200 тпн генома. Поскольку в единицах рекомбинации расстояние между мутациями оценивается как $< 0,01$ сМ, в единицах генома оно не должно превышать 1000 пн. Частичное секвенирование ДНК гена *CHLN* из штамма *brs-1* выявило мутацию – вставку нуклеотида (+T) в экзоне 10 (позиция 3151) на расстоянии 490 нп «ниже по течению» от мутации *chl1*. Также как и в случае *chl1*, эта инсерция приводит к сдвигу рамки считывания и появлению стоп-кодона после 164 триплетов нуклеотидов. В результате – синтез короткого нестабильного пептида размером 721 ак.

Помимо двух мутаций типа «сдвиг рамки считывания», приведших к блокированию синтеза целого белка CHLN большой субъединицы магний-хелатазы *C. reinhardtii*, были обнаружены 7 случаев полиморфизма в экзонах; 10, 11 и 12 при сравнении сиквенсов кДНК и геномной ДНК гена *CHLN*. В пяти случаях замены нуклеотидов не приводили к изменению аминокислотного состава белкового продукта гена, а в двух случаях они обуславливали появление новых аминокислотных остатков в молекуле белка. Так, замена T-C, в позиции 1050 кДНК ведет к замене лейцина на пролин, а замена G-C в позиции 1226 приводит к замене серин-треонин. Поскольку штамм дикого типа 137C+, который был использован для создания кДНК-библиотеки и штамм CC124, на основе которого был получен мутант *chl1*, демонстрируют нормальный биосинтез ХЛ, мы пришли к выводу, что эти замены аминокислот не являются значимыми для функционирования CHLN белка. Аминокислотные последовательности продуктов мутантных аллелей гена *CHLN*: *chl1* и *brs-1*, также как и белка CHLN дикого типа представлены на рисунке 3.14.

Chlamydomonas reinhardtii CHLH protein

Wild type

SQ SEQUENCE 1399 AA; 154289 MW; 2BBBC305AB8806E1 CRC64.
 MQTSSLLGRR TAHPAAGATP KPVAPSPRVA STRQVACNVA TGPRPPMTTF TGGNKGPAKQ
 QVSLDLRDEG AGMFTSTSP E MRRVVPDDVK GRVKVKVVYV VLEAQYQSAI SAAVKINAK
 NSKVCFEVVG YLLEELRDQK NLDMLKEDVA SANIFIGSLI FIEELA EKIV EAVSPLREKL
 DACLIFFSMP AVMKLNKLG T FSMAQLGQSK SVFSEFIKSA RKNNDNFEEG LLKLVRTLPK
 VLKYLPSDKA QDAKNFVNSL QYWLGGNSDN LENLLLNTVS NYVPALKGVD FSVAEPTAYP
 DVGIIWHPLAS GMYEDLKEYL NWDYDTRKDMV FAKDAPVIGL VLQRSHLV TG DEGHYSGVVA
 ELESRGAKVI PVFAGGLDFS DPVNKFFYDP LGSGRTFVDT VVSLTGFALV GGPARQDAPK
 AIEALKNLNV PYLVSLPLVF QTTEEWLDSE LGVHPVQVAL QVALPELDGA MEPIVFAGRD
 SNTGKSHSLP DRIASLCARA VNWANLRKKR NAEKKLAVTV FSFPDKGNV GTAAYLNVFG
 SIYRVLKNLQ REGYDVGALP PSEEDLIQSV LTQKEAKFNS TDLHIAYKMK VDEYQKLCPY
 AEALEENWVG PPGLTNTNGQ ELLVYGRQYG NVFIGVQPTF GYEGDPMRL FSKSASPHHG
 FAAYYTFLEK IFKADAVLHF GTHGSLEFMP GKQVGMMSGVC YPDSLIGTIP NLYYYAANNP
 SEATIAKRRS YANTISYLTP PAENAGLYKG LKELKELISS YQGMRESGRA EQICATIIET
 AKLCNLDRDV TLPDADAKDL TMDMRDSVVG QVYRKLMEIE SRLLPCGLHV VGCPTAEEA
 VATLVNIAEL DRPNNPPIK GMPGILARAI GRDIESIYS NKNKGLADVD QLQRITEASR
 TCVREFVKDR TGLNGRIGTN WITNLLKFTG FYVDPWVRGL QNGEFASANR EELITLFNYL
 EFCLTQVVKD NELGALVEAL NGQYVEPGPG GDPIRNPVNL PTGKNIHALD PQSIPTQAAL
 KSARLVVDR LDRERDNGG KYPETIALVL WGTDNIKTYG ESLAQVMMV GVKPVADALG
 RVNKLEVIPL EELGRPRVDV VVNC SGVFRD LEV NQMLLLD RAIKLAAEQD EPDEMNFVRK
 HAKQQAELG LQSLRDAATR VFSNSSGSYS SNVNLA VENS SWSDESQLE MYLKRKSYAF
 NSDRPGAGGE MQRDVFETAM KTVDV SFQNL DSSEISLTDV SHYFSDPTK LVASLRNDGR
 TPNAYIADTT TANAQVRTLG ETVRLDARTK LLNPKWYEGM LASGYEGVRE IQKRMNTMGM
 WSATSGMVDN WVYDEANSTF IEDAAMAERL MNTNPNSEFRK LVATFLEANG RGYWDAKPEQ
 LERLRQLYMD VEDKIEGVE

chl1 mutant

SQ SEQUENCE 479 AA; 52156 MW; 30F4AB9927D991DD CRC64.
 MQTSSLLGRR TAHPAAGATP KPVAPSPRVA STRQVACNVA TGPRPPMTTF TGGNKGPAKQ
 QVSLDLRDEG AGMFTSTSP E MRRVVPDDVK GRVKVKVVYV VLEAQYQSAI SAAVKINAK
 NSKVCFEVVG YLLEELRDQK NLDMLKEDVA SANIFIGSLI FIEELA EKIV EAVSPLREKL
 DACLIFFSMP AVMKLNKLG T FSMAQLGQSK SVFSEFIKSA RKNNDNFEEG LLKLVRTLPK
 VLKYLPSDKA QDAKNFVNSL QYWLGGNSDN LENLLLNTVS NYVPALKGVD FSVAEPTAYP
 DVGIIWHPLAS GMYEDLKEYL NWDYDTRKDMV FAKDAPVIGL VLQRSHLV TG DEGHYSGVVA
 ELESRGAKVI PVFAGGLDFS DPVNKFFYDP LGSGRTFVDT VVSLTGFALV GGPARQDAPK
 AIEALKNLNV PYLVSLPLVF QTTEEWLDSE LGVHPVQAGS AGCPARAGWC HGAHRVRWP

brs-1 mutant

SQ SEQUENCE 721 AA; 78522 MW; A1A850F72C99E887 CRC64.
 MQTSSLLGRR TAHPAAGATP KPVAPSPRVA STRQVACNVA TGPRPPMTTF TGGNKGPAKQ
 QVSLDLRDEG AGMFTSTSP E MRRVVPDDVK GRVKVKVVYV VLEAQYQSAI SAAVKINAK
 NSKVCFEVVG YLLEELRDQK NLDMLKEDVA SANIFIGSLI FIEELA EKIV EAVSPLREKL
 DACLIFFSMP AVMKLNKLG T FSMAQLGQSK SVFSEFIKSA RKNNDNFEEG LLKLVRTLPK
 VLKYLPSDKA QDAKNFVNSL QYWLGGNSDN LENLLLNTVS NYVPALKGVD FSVAEPAAYP
 DVGIIWHPLAS GMYEDLKEYL NWDYDTRKDMV FAKDAPVIGL VLQRSHLV TG DEGHYSGVVA
 ELESRGAKVI PVFAGGLDFS DPVNKFFYDP LGSGRTFVDT VVSLTGFALV GGPARQDAPK
 AIEALKNLNV PYLVSLPLVF QTTEEWLDSE LGVHPVQVAL QVALPELDGA MEPIVFAGRD
 SNTGKSHSLP DRIASLCARA VNWANLRKKR NAEKKLAVTV FSFPDKGNV GTAAYLNVFG
 SIYRVLKNLQ REGYDVGALP ALGGGSDPVG ADPEGGQVQL DRPAHRLQDE GGRVPEAVPL
 RRGAGGELGQ APRHPEHQRP GAAGVRPPVR QRLHRRAAHL RLRGRPDAPA VLEVGQPPPR
 LRRLLHLPGE DLQGRRAAL RHPRLAGVHA RQAGRHVGCV LPRLADRHP QPLLLRRQQP
 V

Рисунок 3.14. Аминокислотные последовательности белка CHLH из штамма дикого типа и мутантов по гену *CHLH*: *chl1* и *brs-1*

3.2.3. Вестерн-блот анализ белков магний-хелатазы *C. reinhardtii*

Первоначально, для иммунодетекции белковых субъединиц магний-хелатазы *C. reinhardtii* применяли неспецифические антитела, узнающие белки Н и I субъединицы табака и арабидопсиса (см. подраздел 3.1.3). Позднее, после амплификации кДНК фрагментов гена *CHLN* *C. reinhardtii*, были получены специфические антитела, которые появились в нашем распоряжении к осени 2000 года. Эти антитела были использованы для Вестерн-блот анализа, результаты которого (рисунок 3.15) подтвердили более ранние данные об отсутствии CHLN в белковых экстрактах мутантов: *chl1* и *brs-1* *C. reinhardtii*, позволив получить более “чистую” картинку.

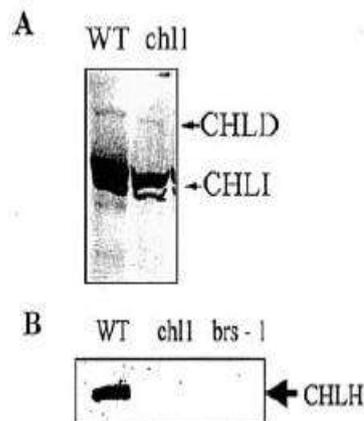


Рисунок 3.15. Вестерн-блот анализ белков, выделенных из клеток штамма дикого типа и мутантов *chl1* и *brs-1* *C. reinhardtii*, выращенных в темноте.

А. 10 μg белка фракционированы электрофорезом в полиакриламидном геле.

Иммунодетекцию проводили с поликлональными антителами для рекомбинантного белка малой субъединицы МХ CHLI табака (*Nicotiana tabacum*), которые также реагируют с белками средней субъединицы CHLD.

В. Белки экстрагированы из клеток штамма дикого типа и мутантов *chl1* и *brs-1*, выращенных в темноте, после 2-х часов освещения. Вестерн-блот анализ этих белков проводили с поликлональными антителами для белка CHLN субъединицы Н магний-хелатазы хламидомонады, полученные в ходе работы

3.2.4. Геномная комплементация мутантного фенотипа

Для подтверждения данных о генетической природе мутаций *chl1* и *brs-1*, как мутаций в гене *CHLH*, нарушающих синтез большой Н субъединицы магний-хелатазы у *C. reinhardtii*, были предприняты эксперименты по комплементации мутантного фенотипа. Мутантные штаммы: 1482-2e и *brs-1* трансформировали геномной ДНК, содержащей аллель дикого типа гена *CHLH*, и вели поиск трансформантов, способных синтезировать ХЛ на свету. Также, была осуществлена ко-трансформация, когда геномную ДНК трансформировали совместно с плазмидой, содержащей ген устойчивости к паромомицину *aphYIII*, и селектировали устойчивые к паромомицину клоны в темноте. Поскольку мутантные штаммы не ревертируют спонтанно, все зеленые клоны, появившиеся в результате такой трансформации, мы считали результатом комплементации. “Зеленые” трансформанты были получены при трансформации обоих мутантов (*chl1* и *brs-1*), и по содержанию ХЛ они не отличались от штаммов дикого типа. В случае ко-трансформации, 2% паромомицин-устойчивых трансформантов были зелеными в темноте (то есть имели восстановленный синтез ХЛ). Результаты этих экспериментов свидетельствовали, что геномный фрагмент, содержащий ген *CHLH* комплементировал обе рецессивные мутации: *chl1* и *brs-1*, доказывая тем самым, что исследуемые мутации затрагивают именно ген *CHLH*.

3.2.5. Экспрессия гена *CHLH* *C. reinhardtii*. Регуляция светом

Экспрессию гена *CHLH* изучали, анализируя содержание его мРНК в клетках штаммов дикого типа и мутантов, выращенных в темноте, и в условиях переноса культур из темноты на свет методом Нозерн-блот анализа (рисунок 3.16). В клетках темновых культур дикого типа уровень экспрессии гена *CHLH* очень низок, и он значительно увеличивается при постоянном освещении. Перенесение растущих в темноте культур на свет ведет к увеличению уровня транскриптов гена уже после двух часов освещения, который достигает

максимума (увеличения более чем в 10 раз) после 4-х часов освещения. Матричная РНК гена *CHLH* накапливается и в обоих мутантных штаммах: СС1482-2е (генотипа *chl1*) и *brs-1* (рисунок 3.16). Как и в случае клеток дикого типа, свет стимулирует ее накопление, свидетельствуя, что мутации типа *frimshift* (сдвига рамки считывания) не влияют на транскрипцию гена *CHLH*, - ни на её регуляцию светом, ни на стабильность самих транскриптов.

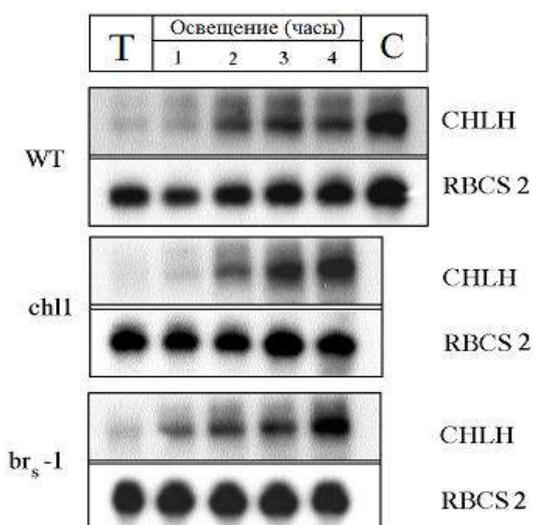


Рисунок 3.16. Транскрипция гена *CHLH*. 10 μ г суммарной РНК из клеток штамма дикого типа и мутантов *chl1* и *brs-1* в фазе экспоненциального роста использовали для Нозерн-блот гибридизации с фрагментами кДНК гена *CHLH* *C. reinhardtii*. Уровень синтеза мРНК гена *CHLH* определяли в клетках, выращенных на свету (С), в темноте (Т), и после перенесения на свет в течение 1, 2, 3, и 4-х часов темновых культур. В качестве контроля, мембраны гибридизовали с радиоактивными пробами ядерного гена *RBCS2* малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы

Экспрессию гена *CHLH* исследовали и на уровне трансляции. В клетках дикого типа (рисунок 3.17), перенесенных из темноты на свет, содержание белка *CHLH* увеличивается уже после 2-х часов освещения, и к 6-ти часам достигает максимума, более чем в 9 раз превосходящего минимальный уровень.



Рисунок 3.17. Экспрессия гена *CHLH* на уровне трансляции. Вестерн-блот анализ белков с использованием поликлональных антител, полученных к белку *CHLH* *C. reinhardtii*. Каждая линия содержит 20 μg белков, выделенных из клеток штамма дикого типа CC124 *C. reinhardtii*, выращенных в темноте (Т) и после их переноса на свет

В целом, характер накопления белков *CHLH* в клетках *C. reinhardtii* отражает динамику накопления транскриптов гена *CHLH*, свидетельствуя, что свет регулирует его экспрессию на уровне транскрипции. Ранее мы показали, что в клетках хламидомонады, выращенных на свету, по сравнению с темновыми культурами повышены активность МХ (на 60%) и суммарное содержание хлорофиллов (на 35-40%). По-видимому, индукция светом активности МХ связана с увеличением количества молекул этого фермента, появившихся в результате активации синтеза их мРНК. Таким образом, результаты изучения экспрессии гена *CHLH* в клетках *C. reinhardtii* свидетельствуют, что свет является фактором позитивной регуляции транскрипции этого гена, а мутации *chl1* и *brs-1* не оказывают заметного влияния на эту регуляцию.

3.2.6. Структурно-функциональные характеристики гена *CHLH*

3.2.6.1. Компьютерный анализ последовательности гена *CHLH*

Структурно-функциональные особенности гена изучали, используя ресурсы баз данных генетической информации и компьютерные программы сравнительного анализа структуры и функций молекул ДНК, РНК и белков, доступные в интернете (NCBI, ExPASy-tool). Матричная РНК нормального гена *CHLH* *C. reinhardtii* (номер регистрации AJ-307054) представляет собой молекулу длиной 5049 нуклеотидов с коротким 5' нетранслируемым сиквенсом (25 пн) на

5' конце и длинным – на 3' конце (828 пн). Эта мРНК имеет на своем 3' конце сигнал полиаденилирования TGТAA, типичный для генов *C. reinhardtii*, кодирующих белки, и короткий поли-А хвост. Стартовый кодон АТG окружен нуклеотидами: АGAAАТGСАG, типичными для участков начала транскрипции хламидомонады: (А/С)А(А/С)(А/С)АТG(Г/С)С(Г/С) (Silflow, 1998). ОРС гена кодирует белок протяженностью 1399 аминокислот. Анализ этого белка с использованием программных ресурсов молекулярно-биологических серверов (NCBI, MBI, ExPazy-tool, и других) показал, что большая субъединица магний-хелатазы *C. reinhardtii* – белок с молекулярной массой 154,29 kDa, индексом гидрофобности –0,267 и алифатическим индексом 87,12. Аминокислотный сиквенс не содержит гидрофобных районов, предполагая, что это растворимый или слабо связанный с мембранами белок.

3.2.6.2. Сравнительный анализ белка CHLN *C. reinhardtii*

При сравнительном анализе (BLAST, CLUSTALW) аминокислотного состава белка CHLN *C. reinhardtii* (рис. 3.18) была установлена высокая степень его гомологии с субъединицами Н из других биологических объектов. Такие последовательности, обнаруженные в молекулярно-биологических базах данных программой BLUST2, принадлежат представителям как прокариот: Archae (8) и Bacteria (80), в числе которых представители фил: *Cyanobacteria* – 23 и *Proteobacteria* – 19, так и эукариот. Идентичность аминокислотной последовательности CHLN *C. reinhardtii* варьирует от 37% (для белка *Rhodobacter capsulatus*) до 65% (для его гомологов у львиного зева *Antirrhinum majus*, арабидопсиса *Arabidopsis thaliana*, и сои *Glycine max*).

Белок CHLN *C. reinhardtii* имеет самый длинный из известных ортологичных ему белков N-концевой сиквенс, который на 15 ак превышает аналогичные последовательности, кодируемые генами эукариот и на 62 аминокислоты длиннее продуктов генов прокариот (*Synechocystis PCC6803*, *Rhodobacter sphaeroides*). Эта N-концевая последовательность содержит

хлоропластный транзитный пептид. Предполагаемый (по результатам программы ChloroP) сайт протеолитического отщепления, которое удаляет транзитный пептид длиной 36 ак, лежит между аминокислотными остатками V (валина) и A (аланина).

Функции субъединицы Н МХ предполагают наличие сайтов связывания с ионами магния и с молекулами протопорфирина IX, и консервативные районы в молекуле белка могут быть существенны для реализации этих функций. Было высказано предположение [Walker and Willows. 1997], что Mg^{2+} связывается с субъединицей Н через остатки гистидина (Н), формируя гистидин- Mg^{2+} -протопорфирин IX комплексы. В последовательности белка CHLN оказалось три остатка гистидина, которые сохраняются у всех известных объектов: Н⁶⁶⁴, Н⁶⁶⁸ и Н⁸¹³ (рисунок 3.18).

Филогенетический анализ белков большой субъединицы МХ показал, что их общим предшественником является CobN – кобальт-хелатаза прокариот (рисунок 3.19). Молекула белка CHLN содержит общий для всех изученных аналогичных белков консервативный домен, идентичный субъединице CobN кобальт-хелатазы из *Pseudomonas denitrificans*. Она необходима для синтеза кобириновой кислоты – кобальт-содержащего циклического тетрапиррола, - предшественника витамина В12. Этот домен занимает большую часть молекулы - от аминокислоты 338 до ее С-конца. Еще в 1992 году было показано [Laurent et al, 1992], что CobN имеет строгое сродство к гидрогенобиридовой кислоте – производной протопорфирина IX. Позднее выяснилось, что VchN из *Rhodobacter sphaeroides* имеет строгое сродство к протопорфирину IX (ПП) [Willows et al., 1996]. Первое указание на то, что субъединица Н имеет свойство связывания с ПП, было получено в экспериментах по исследованию каталитической активности фермента *in vitro* с использованием трех субъединиц: Н, I, и D из *Synechocystis* sp. PCC6803 [Jensen et al., 1998]. Преинкубирование белка CHLN с ПП до начала ферментативной реакции приводило к укорочению lag-фазы в процессе

```

1  MQTSSLLGRR TAHPAAGATP KPVAPSPRVA STRQVACNVA TGPRPMTTF TGGNKGPAKQ
61  QVSLDLRDEG AGMFTSTSP E : : * * : : * * : : * * : : * * : :
: : : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
121 NSKVCFEVVG YLLEELRDQK NLDMLKEDVA SANIFIGSLI FIEELAELKIV EAVSPLREKL
: : * : : * * * : : * * : : * * : : * * : :
181 DACLIFPSMP AVMKLNKLG F SMAQLGQSK SVFSEFIKSA RKNNDNFEEG LLKLVRTLPK
* * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
241 VLKYLPSDKA QDAKNFVNSL QYWLGGNSDN LENLLLNTVS NYVPALKGVD FSVAEPTAYP
: : : : * * * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
301 DVGIIWHPLAS GMYEDLKEYL NWDTRKDMV FAKDAPVIGL VLQRSHLVTG DEGHYSGVVA
: * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
361 ELESRGAKVI PVFAGGLDFS DPVNKFFYDP LGSGRTEFVDV VVSLTGFALV GGPARDAPK
* * * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
421 AIEALKNLNV PYLVSLPLVF QTTEEWLDSE LGVHPVQVAL QVALPELDGA MEPIVFAGRD
* : * * : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
481 SNTGKSHSLP DRIASLCARA VNWANLRKKR NAEKKLAVTV FSFPDPKGNV GTAAAYLNVFG
* * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
541 SIYRVLKLNQ REGYDVGALP PSEEDLIQSV LTQKEAKFNS TDLHIAYKMK VDEYQKLCPY
* * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
601 AEALEENWGK PPGTLNTNGQ ELLVYGRQYG NVFIGVQPTF GYEGDPMRLL FSKSASPHHG
* * * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
661 FAAYTFLEK IFKADAVLH F GTGGSLEFMP GKQVGMGVC YPDSLIGTIP NLYYYAANNP
* : * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
721 SEATIAKRRS YANTISYLTP PAENAGLYKG LKELKELISS YQGMRESGRA EQICATIIET
* * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
781 AKLCNLRDV TLPDADAKDL TMDMRDSVVG QVYRKLMEIE SRLFPCGLH V VGCPTAEEA
* : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
841 VATLVNIAEL DRPDNNPPIK GMPGILARAI GRDIESIYSG NNGKVLADVD QLQRITEASR
* : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
901 TCVREFVKDR TGLNGRIGTN WITNLLKFTG FYVDPWVRGL QNGEFASANR EELITLFNYL
: : : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
961 EFCLTQVVKD NELGALVEAL NGQYVEPGPG GDPIRNPVL PTGKNIHALD PQSIPTQAAL
* : : * * * * : : * * * * : : * * * * : : * * * * : :
1021 KSARLVVDRL LDRERDNGG KYPETIALVL WGTDNIKTYG ESLAQVMMV GVKPVADALG
: : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
1081 RVNKLEVIPL EELGRPRVDV VVNCSGVFRD LFNQMLLLD RAIKLAAEQD EPDEMNFVRK
* : : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
1141 HAKQQAELG LQSLRDAATR VFSNSSGSYS SNVNLAVENS SWSDSQLQE MYLKRKSYAF
* * * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
1201 NSDRPGAGGE MQRDVFETAM KTVDSVFQNL DSSEISLTDV SHYFSDPTK LVASLRNDGR
: : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
1261 TPNAYIADTT TANAQVRTLG ETVRLDARTK LLNPKWYEGM LASGYEGVRE IQKRMTNTMG
* : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
1321 WSATSGMVDN WVYDEANSTF IEDAAMAERL MNTNPNSFRK LVATFLEANG RGYWDAKPEQ
* * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
1381 LERLRQLYMD VEDKIEGVE
: : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :

```

Рисунок 3.18. Сравнительный анализ аминокислотной последовательности белка CHLH *C. reinhardtii*. Элаймент белка CHLH *C. reinhardtii* с ортологами из следующих объектов: *Synechocystis PCC6803* (chlH, acc. S75000), *Rhodobacter sphaeroides* (bchH, acc. CAM38723), *Antirrhinum majus* (Olive, acc. S37310), *Arabidopsis thaliana* (CHLH, acc. S71288), *Nicotiana tabacum* (CHLH, acc. T01789), *Hordeum vulgare* (Xantha-f, acc. S64721), *Glycine max* (CHLH, acc. T07126). Условные обозначения: (*) - остаток, консервативный для всех изученных объектов; (:) - консервативный остаток аминокислоты. Аминокислоты, между которыми происходит отрезание транзитного пептида, - подчеркнуты; Стартовый кодон – метионин в молекуле белка chlH у *Synechocystis PCC6803* выделен полужирным шрифтом. Три консервативных остатка гистидина (H) выделены рамкой, а три консервативных цистеина (C) - полужирным шрифтом

формирования продукта реакции. Затем было показано, что связывание с ПП изменяет флуоресцентные свойства белка [Karger et al., 2001]. К настоящему времени сайты связывания протопорфирина IX в молекуле CHLH магний-хелатазы окончательно не определены. Данные о том, что модификации остатков цистеина нарушают связывание, послужили основой предположения о важной роли этой аминокислоты во взаимодействии с субстратом [Jensen et al., 2000]. Наиболее консервативными (то есть встречаются у всех известных гомологов) в аминокислотной последовательности CHLH оказались три остатка: C⁷⁸⁴, C⁹⁶³ и C¹¹⁰⁴.

Используя программные ресурсы для анализа белков, мы исследовали влияние мутаций *chl1* и *brs-1* на структуру белков CHLH. Мутация *chl1* представляет собой инсерцию одного нуклеотида (C) в положении 2661 геномного сиквенса в экзоне 9 (что соответствует позиции 1577 мРНК), которая приводит к сдвигу рамки считывания и появлению стоп-кодона через 22 триплета (рисунок 3.14). В результате трансляции мутантный белок с молекулярной массой 52,16 kDa содержит 479 ак, из которых последние 22 ак не гомологичны белку дикого типа, и консервативному домену CobN. Область их гомологии составляет 118 аминокислот и находится между аминокислотами 338 и 457.

Мутация *brs-1* представляет собой инсерцию нуклеотида в позиции 3151 экзона 10 геномного сиквенса (соответствующей позиции 1776 мРНК). В результате сдвига рамки считывания стоп-кодон появляется через 164 триплета после вставки нуклеотида. Трансляция этой мРНК ведет к образованию укороченного полипептида длиной 721 ак и молекулярной массой 78,6 kDa. Мутантный белок гомологичен CoN-домену в области между позициями 338 и 559 ак. По-видимому, укороченные белки, транслируемые с мутантных мРНК (479 ак и 721 ак, соответственно, вместо 1388 ак у дикого типа) нестабильны и быстро деградируют после своего появления.

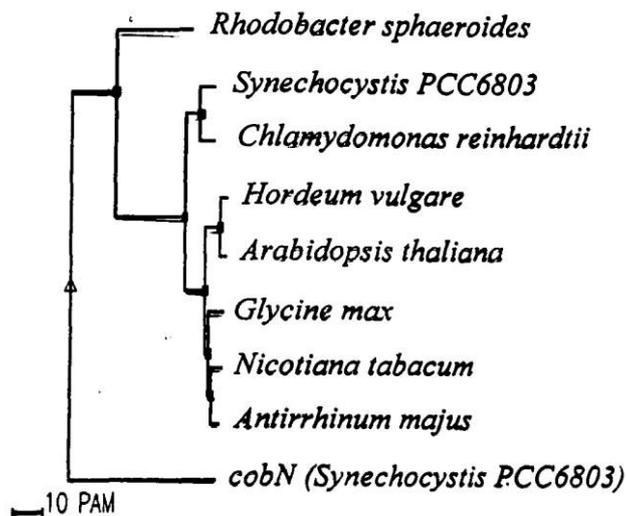


Рисунок 3.19. Филогения белков большой субъединицы магний-хелатазы. Элаймент последовательностей аминокислотных остатков белков субъединицы CHLH магний-хелатазы проводили с помощью программы Multaline (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>)

3.2.7. Обсуждение результатов

Мутации в генах большой субъединицы магний-хелатазы. Основная информация о генетическом контроле и функциях ключевого фермента биосинтеза хлорофилла (ХЛ) магний-хелатазы (МХ) была получена при изучении бесхлорофилльных мутантов растений и микроорганизмов. Мутации, блокирующие функции большой субъединицы этого фермента описаны для многих объектов (табл.3.21). Наиболее масштабными стали работы по анализу пигментных (бесхлорофилльных) мутантов ячменя (*Hordeum vulgare*). В общей сложности, было изолировано 357 пигментных мутантов, изучение которых длится уже более 40 лет. В гене *Xantha-f*, кодирующем Н-субъединицу МХ было описано 8 мутаций, молекулярно-генетическая природа которых была установлена к 2005 году. Не все мутации в гене большой субъединицы МХ (таблица 3.21), приводят к отсутствию функционального белка CHLH.

Таблица 3.21. Мутации в гене, кодирующем большую субъединицу МХ

Мутации	фенотип		Молекулярная природа	*
	ХЛ	белок		
Ячмень (<i>Hordeum vulgare</i>), CHLN – 1381 ак				
<i>xanth-f-10</i>	нет	-	Делеция 3-х нуклеотидов – потеря E434	Olsson et al., 2004
<i>xanth-f-26</i>	10%	+	Замена M632R	
<i>xanth-f-27</i>	-	-	Делеция 14 нп-frameshift, белок - 1104ак	
<i>xanth-f-40</i>	-	-	Делеция 2 нп frameshift, белок - 899 ак	
<i>xanth-f-41</i>	-	+	Делеция 12 нп – потеря ALQV(439-442)	
<i>xanth-f-58</i>	-	-	Крупная делеция	
<i>xanth-f-60</i>	следы	+	Миссенс мутация – замена P393L	
<i>xanth-f-68</i>	-	-	Миссенс мутация – замена G794E	
Арабидопсис (<i>Arabidopsis thaliana</i>), CHLN - 1381 ак				
<i>cch</i>	≈20%	-	Замена (С-Т), - P642L	Mochizuki et al., 2000
<i>gun5</i>	≈60%	+	Замена (С-Т) – A990V	
Хламидомонада (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>) CHLN – 1399 ак				
<i>brs-1</i>	-	-	Вставка (+С) - frameshift, белок 721ак	Chekunova et al., 2001
<i>chl1</i>	-	-	Вставка (+Т) - frameshift, белок 479 ак	

*- Ссылки на литературу даны в последней графе; ак – аминокислотные остатки; (+) - означает наличие пигмента или белка, а (-) – отсутствие.

В клетках изучаемых нами мутантов *chl1* и *brs-1* *C. reinhardtii* вместо полноценного белка CHLN из 1399 аминокислотных остатков синтезируются короткие пептиды, содержащие только первые 457 и 559 аминокислотных остатков, соответствующих последовательности белка CHLN дикого типа. Согласно современным представлениям о функционировании фермента МХ и каталитических свойствах белка большой (Н) субъединицы, для связывания ионов магния Mg²⁺ и молекул субстрата – протопорфирина IX существенными могут быть следующие остатки гистидина: Н⁶⁶⁴, Н⁶⁶⁸, Н⁸¹³, и цистеина: С⁷⁸⁴, С⁹⁶³, С¹¹⁰⁴, соответственно [Jensen et al., 2000]. Все они отсутствуют в мутантных белках. Вероятно, потеря функционально значимых участков в этих белках и обуславливает их быструю деградацию в клетке хламидомонады и, соответственно, наблюдаемый фенотип мутантов *chl1* и *brs-1*. В гене *Xantha-f* ячменя к мутациям, препятствующим формированию белка CHLN относятся: потеря аминокислоты в позиции 343 (f-10), синтез укороченных белков (f-27 и f-

40), а также замена аминокислоты в позиции G794E. У арабидопсиса для блокирования функций МХ оказались существенны замены аминокислот в позициях Р642L и А990V, которые также привели к формированию GUN-фенотипа, возникающего в результате нарушения ретроградной регуляции биосинтеза ХЛ.

У всех фотосинтезирующих эукариот процессы хлорофиллообразования находятся под комплексной регуляцией. Один из основных ее механизмов состоит в координации экспрессии ядерных и хлоропластных генов, продукты которых участвуют в фотосинтезе. Полагают, что ядро и хлоропласт «обмениваются информацией» через систему передачи сигнала (*plastid-to-nucleus signal transduction*). В норме, блокирование биогенеза хлоропластов приводит к генерации «хлоропластного сигнала», который, попадая в ядро, подавляет экспрессию ядерных генов. Искусственное блокирование биогенеза хлоропласта достигается путем обработки растений арабидопсиса норфлюразоном – ингибитором биосинтеза каротиноидов. В отсутствие каротиноидов, в хлоропластах на свету начинаются процессы фотоокисления или фотообесцвечивания, которые ведут к подавлению экспрессии ядерного гена *LHCBI*, кодирующего белок светособирающего комплекса фотосистемы 1. Таким образом, в норме, у растений, обработанных норфлюразоном, на свету репрессирована экспрессия этого гена в результате функционирования “системы передачи сигнала хлоропласт-ядро”. Для выяснения вопроса, - какова природа “пластидного сигнала”, блокирующего экспрессию ядерных генов в ответ на дисфункцию хлоропласта, - были изолированы мутанты арабидопсиса с нарушениями этого “сигнального пути”, названные GUN – *genomes uncoupled* [Susek et al., 1993]. Фенотип этих мутантов состоит в высоком уровне транскрипции ядерных генов *LHCBI* и *RBCS* в условиях освещения обработанных норфлюразоном растений, или отсутствии нормальной репрессии генов фотосинтетического аппарата хлоропласта в условиях его деструкции, и обусловлен мутациями в 5-ти генетических локусах: GUN1-GUN5. Мутации *gun5*

и *csh* оказались аллелями гена *CHLH* арабидопсиса у которого замены A990V и P642L, соответственно, обеспечили «GUN-фенотип», то есть отсутствие хлоропластного сигнала, блокирующего экспрессию генов ядра. Идентификация GUN-локусов позволила установить, что большая субъединица CHLH MX играет определяющую роль в функционировании сигнальной системы между хлоропластом и ядром [Mochizuki et al., 2001]. Имеют ли мутанты *C.reinhardtii* по гену CHLH, нарушения в сигнальной системе ретроградной регуляции (хлоропласт-ядро) выяснить еще предстоит.

Копийность гена *CHLH* *C. reinhardtii*. В последнее десятилетие геном *C.reinhardtii* исследовался очень интенсивно [Grossman et al., 2003; Lohr et al., 2005]. Сиквенирование хлоропластного и митохондриального геномов было полностью завершено к концу 2007 года. Описание ее ядерного генома в рамках геномного проекта [Merchant et al., 2007] выдержало уже 5 версий. Помимо нуклеотидных последовательностей, огромный объем информации о транскриптоме *C. reinhardtii* был получен при формировании библиотеки EST (*expression sequence tag*), первоначально созданной в Японии (www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/est). Затем, американский национальный научный фонд NSF (*National Science Foundation*) профинансировала проект, реализация которого позволила не только получить более 200000 EST сиквенсов, но и осуществить их сравнительный анализ. В ходе этой работы было обнаружено более 10000 уникальных кДНК (www.biology.duke.edu/chlamy_genome). Microarrays для всех пластидных генов и около 3000 генов ядра могут быть использованы для изучения генной экспрессии. Более того, существует библиотека ВАС-клонов, большинство из которых, удалось совместить с генетической картой объекта. Наибольшее количество генетической информации о хламидомонаде собрано на геномном портале Института геномов (*JGI, Joint Genome Institute*). Порции геномных сиквенсов, которые удалось реконструировать из перекрывающихся концов отдельных геномных “shotgun”

клонов, носят название досок (*scaffolds*) и являются основной формой подачи геномной информации. Сейчас насчитывается более 300 скаффолдов, пронумерованных по размерам – от самого крупного до самого короткого. После окончания работы в рамках геномного проекта каждая из 17 хромосом хламидомонады должна быть представлена в виде отдельной последовательности. Удобная программа просмотра (Genome Viewer) позволяет увидеть не только последовательности нуклеотидов в отдельных хромосомах, но и получать информацию (как в графическом виде, так и в виде последовательностей) о многих известных и «предсказанных» генах, их интрон-экзонной структуре и предполагаемых функциях. Осуществляется «привязка отдельных ВАС и EST клонов к геномным последовательностям *C. reinhardtii*. Таким образом, созданные к настоящему времени богатые сетевые ресурсы геномной информации позволяют осуществлять компьютерный анализ генома хламидомонады, получая ответы на вопросы, которые ранее требовали экспериментального подтверждения. К ним относятся и вопросы о «копийности» гена интереса. Некоторое время назад был описан ген–паралог *CHLH* [Lohr et al., 2005], однако не было найдено его транскриптов. Наша экспериментальная работа – Саузерн-блот гибридизация геномной ДНК (рис. 3.13) - позволила сделать вывод о существовании одной копии гена *CHLH* в геноме хламидомонады. Его паралоги мы не нашли и при использовании компьютерной программы BLASTII, тем самым подтвердив правильность полученных результатов.

3.2.8. Выводы

1. Осуществлено клонирование гена *CHLH* хламидомонады, кодирующего большую *H* субъединицу магний-хелатазы – первого специфического фермента биосинтеза хлорофилла. С использованием широкого спектра молекулярно-генетических методов (ПЦР, скринирование кДНК и геномных библиотек, RACE систему обнаружения концевых участков кДНК и др.), получена полная нуклеотидную последовательность этого гена и определена его интрон-экзонная структура. Ген *CHLH* содержит 12 экзонов и 11 интронов. Его нуклеотидная последовательность включает промоторную область (180 пн), кДНК размером 5049 пн, содержит короткий (25 пн) 5'UTR, ОПС длиной 4186 пн, кодирующую 1399 аминокислотных остатков, и длинный (827 пн) 3'-UTR.

2. Секвенирование мутантных аллелей гена *CHLH* показало, что мутации *chl1* и *brs-1* являются вставками (+1) в экзонах 9 и 10, соответственно. Мутации вызывают сдвиг рамок считывания и, при трансляции мутантных мРНК, появляются короткие нефункциональные пептиды длиной 457 и 559 аминокислотных остатков, соответственно.

3. Ген *CHLH* уникален – в геноме *S. reinhardtii* не обнаружено его паралога. Филогенетический анализ кодируемого им белка показал, что общим предшественником для всех известных у про- и эукариот ортологов белка *CHLH* является *CobN* – кобальт-хелатаза прокариот.

4. Наиболее функционально-значимым является С-концевой участок белка *CHLH*. Высказано предположение, что Mg^{2+} связывается с *H*-субъединицей через остатки гистидина: H^{664} , H^{668} и H^{813} , формируя комплексы: гистидин- Mg^{2+} -протопорфирин IX. Связывание с субстратом – протопорфирином IX, по-видимому, происходит за счет трех остатков цистеина: C^{784} , C^{963} и C^{1104} .

3.3. Идентификация гена *LTS3* зеленой водоросли *C. reinhardtii*

Генетический контроль светонезависимых процессов формирования пигментов в растительной клетке изучали на модели мутантов по гену *LTS3* одноклеточной зеленой водоросли *C. reinhardtii*, у которых темновой биосинтез хлорофилла нарушен на этапе, предшествующем конверсии протохлорофиллида в хлорофиллид. В условиях гетеротрофного роста эти мутанты не синтезируют хлорофилл и накапливают протопорфирины, а при переносе на свет – зеленеют. Фенотипическое проявление мутаций в гене *LTS3* изучено на уровне пигментного состава, активности ферментов биосинтеза хлорофилла и экспрессии генов, кодирующих эти ферменты. Осуществлено позиционное клонирование гена *LTS3*, и установлено, что он кодирует фактор транскрипции семейства *ZnF_GATA*, который в темноте активирует экспрессию генов ферментов биосинтеза хлорофилла: магний-хелатазу и глутамат-полуальдегидаминотрансферазу, и, по-видимому, необходим для адаптации фотосинтезирующей клетки к фототрофным условиям [Чекунова и Савельева, 2010].

3.3.1. Введение

Растения и фототрофные микроорганизмы могут синтезировать хлорофилл (ХЛ) двумя путями – на свету и в темноте. Известно, что эту способность определяют две ферментные системы, катализирующие превращение протохлорофиллида (ПХЛД) в хлорофиллид (ХЛД) в процессе биосинтеза пигмента [Forreiter, 1993 Reinbothe, 1996]. На свету превращение ПХЛД обеспечивает фотофермент НАДФН: ПХЛД-оксидоредуктаза (сПОР), кодируемый ядром. Темновой синтез ХЛД из ПХЛД осуществляет ферментный комплекс тПОР, состоящий из трех полипептидов, кодируемых хлоропластными генами: *chlB*, *chlN*, и *chlL*. Светозависимый и темновой биосинтезы ХЛ сосуществуют у многих организмов, включая цианобактерии, водоросли и голосеменные [Armstrong, 1998]. Покрытосеменные растения не способны зеленеть в темноте в результате утраты тПОР, тогда как большинство групп

эубактерий (*Eubacteriophyta*) – древних фотосинтезирующих организмов, образуют хлорофилл исключительно светонезависимым путем.

Одноклеточная зелёная водоросль *C. reinhardtii* – уникальный модельный объект генетики фотосинтеза [Rochaix, 1995]. Её клетки образуют ХЛ на свету и в гетеротрофных условиях, используя в качестве источника углерода ацетат натрия. Такая способность позволяет получать мутанты по обоим путям биосинтеза: темновому и, индуцируемому светом [Ford, 1981; Choquet, 1992].

В течение последних 50 лет у зеленых водорослей *Chlamydomonas*, *Chlorella* и *Scenedesmus* были изолированы и изучены десятки мутантов с нарушенным светонезависимым синтезом ХЛ – неспособные зеленеть в темноте [Александрова, 1979; Квитко, 1983; Timko, 1998]. Все они могут быть отнесены к одному фенотипическому классу, называемому «yellow». В темноте их клетки не синтезируют ХЛ, накапливают ПХЛД, и, благодаря присутствию каротиноидов, формируют колонии желтого цвета, зеленеющие на свету. У хламидомонады известно 3 хлоропластных и более десятка ядерных генов, нарушения в которых приводят к подобному фенотипу [Timko, 1998]. Хлоропластные гены: *chlB*, *chlN*, и *chlL* кодируют субъединицы фермента тПОР [Choquet, 1992], роль же ядерных генов *yellow* до сих пор остается предметом дискуссий. Полагают, что они кодируют белки, регулирующие темновую редукцию ПХЛД [Cahoon and Timko, 2000].

Среди штаммов, зеленеющих на свету, но неспособных синтезировать ХЛ в темноте, у *C. reinhardtii* наряду с «yellow» были описаны мутанты, клетки которых в темноте накапливают более ранние, чем ПХЛД, красные предшественники хлорофилла – протопорфирины (ПП) и формируют колонии оранжевого цвета (рис. 3.9). Сравнительно-генетический анализ таких фенотипически-сходных мутантов (бесхлорофильные, накапливающие ПП в темноте, зеленеющие на свету) из Петергофской генетической коллекции [Столбова, 1971; Квитко, 1983] показал, что их фенотип обусловлен мутациями в одном ядерном гене, названном *LTS3* [Чекунова, 1986]. Подобные мутанты: *brc-1* и *brc-2* были описаны в США

Энди Вангом [Wang, 1974] как штаммы, несущие рецессивные, аллельные мутации, которые генетически и функционально отличаются от мутации *y-1*, блокирующей темновое превращение ПХЛД. Поскольку двойной мутант генотипа: *brc-1,y-1* имел фенотип штамма *brc-1*, автор предположил, что локус «*Brc*» контролирует более ранний, чем конверсия ПХЛД, шаг биосинтетического пути [Wang, 1974]. Сходные результаты были получены и в России при анализе взаимодействия мутаций *lts3* и *y-1*, а в результате функционального и рекомбинационного тестов была установлена аллельность мутаций *lts3* и *brc-1* [Чекунова, 1990; Шалыго, 1990]. Таким образом, генетический анализ позволил обнаружить у *C.reinhardtii* ген *LTS3*, контролирующий темновой биосинтез ХЛ на этапе, предшествующем конверсии протохлорофилида в хлорофиллид (подраздел 3.1).

Существование накапливающих протопорфирины мутантов, способных зеленеть в условиях фотоавтотрофного роста, свидетельствует, что редукция ПХЛД – не единственный шаг в цепи биосинтеза ХЛ, реализация которого зависит от света. Ген *LTS3* уникален, и изучение мутантов по этому гену, его идентификация и клонирование открывают возможность понять неизвестные к настоящему времени генетические механизмы наиболее древнего в эволюционном отношении темнового синтеза ХЛ. Настоящая глава посвящена комплексному молекулярно-генетическому анализу штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*, мутантных по гену *LTS3*.

3.3.2. Пигментный состав клеток *C. reinhardtii*, мутантных по гену *LTS3*

Сравнительный анализ пигментного состава клеток мутантов по темновому биосинтезу хлорофилла: *lts3*, *brc-1*, *y-7* и штамма дикого типа СС124 (таблица 3.22) обнаружил существенные различия в содержании предшественников ХЛ у мутанта *yellow* и штаммов, мутантных по гену *LTS3*.

Таблица 3.22. Содержание хлорофилла и его предшественников

Штамм	Условия роста культур	Генотип	Содержание пигментов (nMol/10 ⁹ клеток)©						
			ПП	Mg-ПП	ПМЭ	ПХЛД	ХЛД	ХЛ	Гем
СС124	свет	<i>wt</i>	0,19	0,20	0,18	н	н	3680	**
Lts3	свет	<i>lts3</i>	0,41	0,54	0,56	н	89-529*	2450	**
Brc1	свет	<i>brc1</i>	0,37	0,67	0,39	н	54-385*	2100	**
Y-7	свет	<i>y-7</i>	0,2	н	н	н	н	3280	-
СС124	темнота	<i>wt</i>	0,3	0,20	0,08	0,8	н	2350	47
Lts3	темнота	<i>lts3</i>	12,0	0,77	0,62		н	187	94
Brc1	темнота	<i>brc1</i>	14,0	0,54	0,82	17,0	н	85	82
Y-7	темнота	<i>y-7</i>	0,43	н	н	42,0	н	н	-

© - в таблице даны средние значения величин, полученных в 3-6 повторностях. Во всех случаях ошибки не превышают 5%.

Условные обозначения: ПП – протопорфирин IX, Mg-ПП – магний-протопорфирин IX, ПМЭ – магний протопорфирин IX-монометилловый эфир, ПХЛД – протохлорофиллид, ХЛД – хлорофиллид, ХЛ – хлорофиллы (a+b); н – наличие пигмента не регистрируется;

* - содержание пигмента измеряли в условиях переноса культуры из темноты на свет, так как при постоянном освещении протохлорофиллид не накапливается.

** - содержание гема измеряли в культурах клеток, растущих в темноте, так как на свету он практически не накапливается.

Клетки «желтого» мутанта *y-7* при росте в темноте не содержат ХЛ и накапливают только протохлорофиллид, что указывает на блокирование процесса превращения ПХЛД в ХЛД. В условиях постоянного освещения, по пигментному составу они практически не отличаются от штамма дикого типа СС124. Мутанты по гену *LTS3*: *lts3* и *brc-1* в темноте накапливают протопорфирин IX (ПП) и последующие в цепи биосинтеза ХЛ пигменты: магний-протопорфирин IX (Mg-ПП), Mg-ПП-монометилловый эфир (ПМЭ) и ПХЛД. При освещении, в их культурах появляется промежуточный продукт - хлорофиллид, который в норме не накапливается, что указывает на дестабилизацию комплекса ферментов, осуществляющих превращение ПХЛД в хлорофилл. Клетки световых культур мутантов: *lts3* и *brc-1* синтезируют ХЛ на уровне штамма дикого типа, выращенного в темноте, и, примерно, на 40% ниже, чем клетки световой

культуры СС124. Содержание гема в гетеротрофных условиях выращивания у мутантов оказалось вдвое выше, чем у дикого типа. По-видимому, в результате мутаций: *lts3* и *brc-1* в темноте происходят нарушения в цепи биосинтетических реакций превращения ПП в ХЛ, которые ведут к накоплению его промежуточных продуктов. Повышение уровня гема у мутантов может быть обусловлено наличием в их клетках свободных молекул ПП, которые, не будучи задействованы синтезе ХЛ, участвуют в образовании гема.

3.3.3. Активность ферментов биосинтеза хлорофилла

Анализ эффективности работы ферментов биосинтеза ХЛ: магний-хелатазы (МХ), магний-протопорфирин IX-метилтрансферазы и АЛК–синтезирующего комплекса (таблица 3.23) показал, что у мутанта активность МХ сильно снижена в темноте (22% от уровня клеток дикого типа на свету) и восстанавливается на свету (76%) до уровня таковой у клеток дикого типа, выращенных в темноте (79%). Активности Mg-ПП-метилтрансферазы у мутанта практически одинаковы на свету и в темноте, и мало отличаются от штамма дикого типа СС124. В норме (у штамма СС124) работа обоих последовательно-действующих ферментов: МХ и Mg-ПП-метилтрансферазы активируется светом, а у мутанта такой активации не наблюдали для второго фермента.

Таблица 3.23. Активность ферментов биосинтеза хлорофилла

Штамм, (условия роста)	Генотип	Активность ферментов:				
		Магний-хелатаза		Mg-ПП- метилтрансфераза		АЛК
		(нМоль/10 ⁹ кл)	(%)	(μ kat/g)	(%)	(%)
СС124 (свет)	<i>wt</i>	3,23 ± 0,34	100	3,5 ± 0,11	100	100
СС124 (темн.)	<i>wt</i>	2,57 ± 0,18	79	2,7 ± 0,08	77	60
Lts3 (свет)	<i>lts3</i>	2,46 ± 0,72	76	3,2 ± 0,06	91	91
Lts3 (темн.)	<i>lts3</i>	0,72 ± 0,1	22	3,3 ± 0,07	94	7

Таким образом, у мутанта по гену *LTS3* снижена активность МХ в темноте и отсутствует световая индукция фермента Mg-ПП-метилтрансферазы, типичная для клеток дикого типа. Относительная активность АЛК-синтезирующего комплекса мутантов в отсутствие света также значительно снижена и составляет 4-7% от нормы. Подобный эффект описан и для мутантов *yellow* [Wang et al., 1974]. В обоих случаях, эти данные можно объяснить наличием в клетках мутантов протохлорофиллида - ретроингибитора синтеза АЛК [Timko, 1998; Armstrong, 1998].

3.3.4. Зеленение мутантов: *y-7*, *brc-1* и *lts3*

Зеленение - индуцированный светом процесс биосинтеза ХЛ, характерный для покрытосеменных растений, изучали у бесхлорофильных в темноте мутантов хламидомонады: *lts3*, *brc-1* и *y-7*, измеряя содержание пигмента в их клетках каждые два часа после перенесения культур из темноты на свет (рисунок 3.20А). В течение первых 8 часов после освещения темновых культур, ресинтез ХЛ наблюдался только у мутанта *y-7*. Хлорофиллы появляются в его клетках после 4 часов пребывания на свету, и их содержание быстро увеличивается, достигая за сутки 90% от обычного уровня световой культуры. Динамика накопления пигмента у мутантов *brc-1* и *lts3* оказалась иной. Их клетки, выращенные в темноте, содержат около 8% ХЛ. После освещения уровень ХЛ несколько снижается, вместе с уменьшением уровня ПП [Wang et al, 1974], а затем начинает медленно возрастать после 48 часов пребывания на свету в культурах штамма *lts3* и 72 часов - у *brc-1*. Далее, кинетика синтеза ХЛ становится сходной с таковой у клеток *y-7*. Таким образом, для мутантов, накапливающих ПП в темноте, характерна задержка индуцированного светом синтеза ХЛ. Учитывая, что в этих условиях время одной генерации для штаммов: *y-7*, *lts3*, и *brc-1* составляет 20, 23 и 27 часов, соответственно, очевидно, что свет активирует синтез ХЛ у мутантов по гену *LTS3* только после первого деления - уже во вновь образованных в условиях освещения клетках.

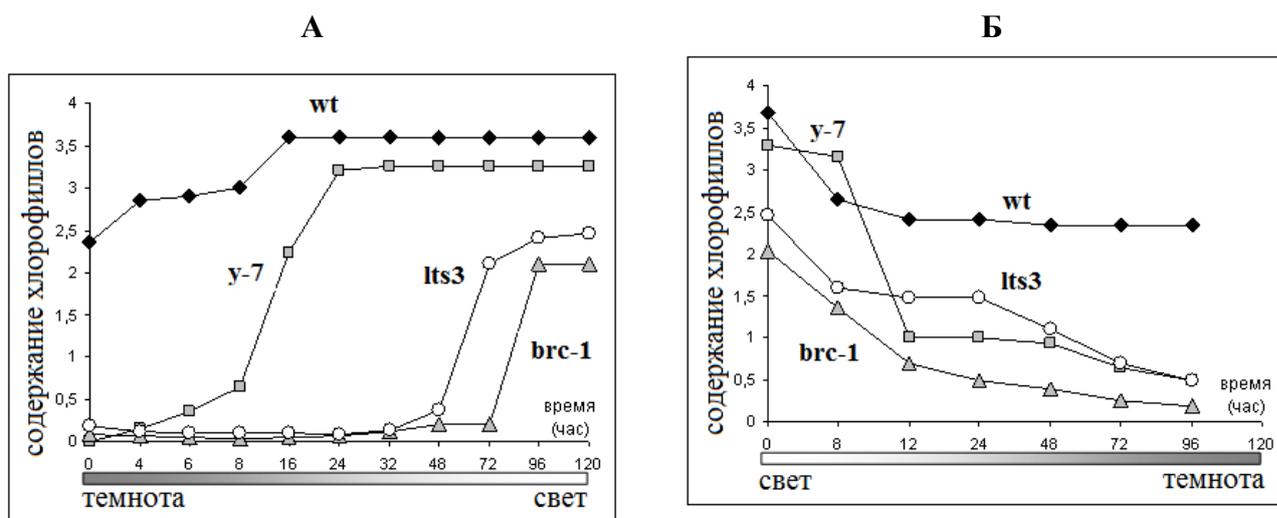


Рисунок 3.20. Динамика накопления хлорофиллов ($\mu\text{M} \times 10^9$ клеток) в культуре клеток мутантов и дикого типа при изменении условий освещенности.

А - выращенные в темноте клетки были перемещены на свет; **Б** – световые культуры перемещены в темноту. Длительность освещения указана в часах. Эксперименты были проведены в 5-ти повторностях, и ошибки средних не превышают 5%

При перемещении в темноту световых культур, кинетика снижения содержания ХЛ у изучаемых штаммов схожа: в течение первых 12 часов темноты их уровень практически достигает значений, характерных для темновых культур (рис. 3.20Б). По-видимому, прекращение светозависимого синтеза ХЛ в гетеротрофных условиях происходит одинаково у мутантов и штамма дикого типа, и анализируемые мутации не влияют на этот процесс.

3.3.5. Экспрессия генов ферментов биосинтеза хлорофиллов

Результаты изучения транскрипционной активности генов, кодирующих ферменты ранних этапов синтеза ХЛ: глутамил-тРНК-редуктазы (ген *GTR*), глутамат-полуальдегидаминотрансферазы (ген *GSA*), АЛК-дегидратазы (ген *ALAD*) и магний-хелатазы (гены: *CHLH*, *CHLD* и *CHLI*) в культурах мутантов и штамма дикого типа, растущих в разных условиях освещения, представлены на рисунке 3.21. В отличие от дикого типа, у темновых культур мутанта *lts3* не удается обнаружить транскрипты генов: *GSA*, *CHLH*, *CHLI* и *CHLD*, а у штамма

у-7 их уровень снижен. Перенос на свет темновых культур, в норме (штамм СС124) уже через 1,5-2 часа вызывает индукцию экспрессии этих генов, которая к четверем часам достигает своего максимума. Для мутантов же характерна временная задержка активации транскрипции (у штамма у-7 она составляет примерно 1-2 часа, тогда как у *lts3* – более 2-х часов). Уровень экспрессии анализируемых генов в световых культурах мутанта сходен с таковым у штамма дикого типа, а в случае генов: *GTR*, *CHLH* и *CHLD*, - превышает его.

Синтез белков большой (Н) и малой (I) субъединиц МХ у штамма дикого типа и мутанта *lts3* (рисунок 3.22) полностью соответствует динамике накопления мРНК этих генов, свидетельствуя, что регуляция их экспрессии происходит на уровне транскрипции. Таким образом, у мутанта по гену *LTS3* по сравнению с клетками

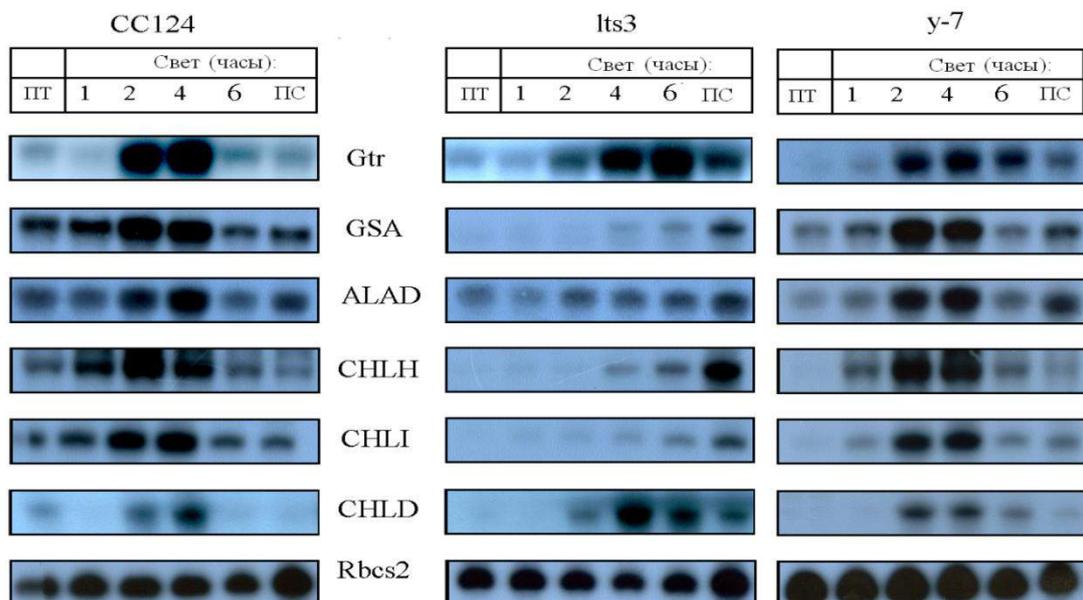


Рисунок 3.21. Транскрипция генов, контролирующих биосинтез хлорофилла у мутантов с нарушениями темнового синтеза. Аликвоты (10 μ g) тотальных РНК из штамма дикого типа СС124 и мутантов: *lts3* и *y-7*, использовали для Нозерн-блот гибридизации с фрагментами кДНК анализируемых генов. Уровень транскрипции этих генов определяли в культурах, выращенных в темноте (ПТ), на свету (ПС) и в условиях освещения растущих в темноте культур. Контроль - пробы к гену *Rbcs2* малой субъединицы рибулозобифосфаткарбоксилазы

дикого типа в темноте снижена транскрипция генов, кодирующих МХ и фермент глутамат-полуальдегидаминотрансферазу (GSA-AT), входящего в состав АЛК-синтезирующего комплекса. Также, у неспособных синтезировать ХЛ в темноте мутантов хламидомонады (*lts3* и *y-7*) транскрипция ядерных генов, кодирующих ферменты биосинтеза ХЛ, в темноте репрессирована как у большинства покрытосеменных растений.

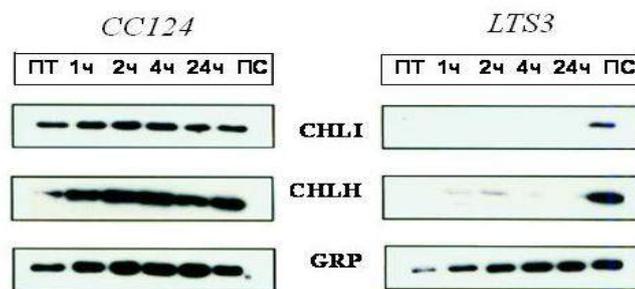


Рисунок 3.22. Иммуноблоттинг белков CHLH и CHLI магний-хелатазы *C. reinhardtii*. Клетки штамма CCI24 дикого типа и мутанта *Lts3* выращены в темноте (ПТ), при освещении темновых культур и на свету (ПС). Контроль – CRP - пробы к белку pIRpL1 рибосом хлоропластов

3.3.6. Картирование гена *LTS3*

Для локализации *LTS3* на генетической карте *Chlamydomonas reinhardtii* мутанты по этому гену скрещивали с маркерами различных групп сцепления (ГЦ) и анализировали потомство методом тетрадного анализа. Ранее полученные данные (подраздел 3.1), указывали на независимое наследование мутации *lts3* и маркеров VI, X и XI ГЦ и ее слабом сцеплении с дистальным маркером *msr1* первой ГЦ (29PD:7ND:30T), далее именуемой хромосомой. Картирование гена *LTS3* было осуществлено по результатам тетрадного анализа расщеплений в потомстве скрещиваний мутанта на штаммы-маркеры правого плеча хромосомы I (таблица 3.24). Оценки их сцепления позволили локализовать ген *LTS3* в хромосоме I хламидомонады на расстоянии 0,34 сМ от маркера *ac115*, в 28-30 сМ от центромеры (рисунок 3.23).

Таблица 3.24. Тетрадный анализ зигот скрещиваний мутанта *lts3* с маркерами группы сцепления I *C. reinhardtii* и центромерными маркерами

Пары маркеров	P:N:T	D (cM)	Пары маркеров: ген - центромера		
			маркеры	PD:ND:T	D (cM)
<i>lts3 / arg7</i>	72:2:12	9,3	<i>lts3/pf2*</i>	7:7:18	28,1
<i>lts3/ac14</i>	13:0:7	17,5	<i>lts3/n+1**</i>	6:11:26	30,2
<i>lts3/pab2</i>	173:1:2	1,1	<i>arg7/y-6*</i>	45:0:40	23,5
<i>lts3/ac115</i>	145:0:1	0,3			

**pf2* –центромерный маркер ГЦ XI; *y-6* – центромерный маркер ГЦ I.

D- расстояние между маркерами, определенное по формуле:

$D(cM) = (N+0,5T)/(P+N+T) \times 100$, где: *P*, *N*, *T* – родительский дитип, неродительский дитип и тетратип, соответственно (Harris, 1989).**Приведены результаты расщепления трисомика (++-) по ГЦ I. Анеуплоидия используется как центромерный маркер и позволяет оценить расстояние ген-центромер как $\frac{1}{2}$ частоты тетратипов.

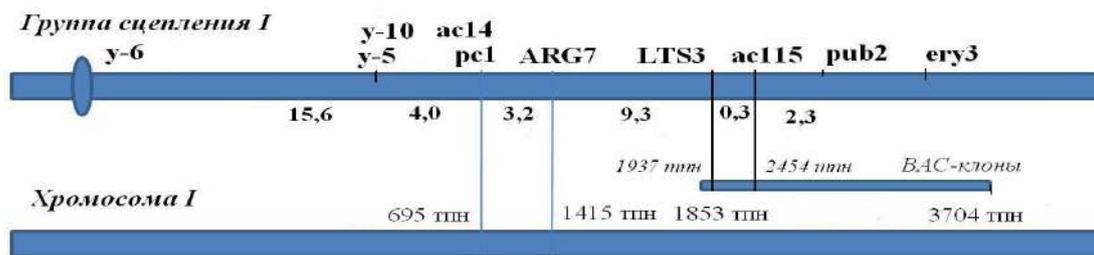


Рисунок 3.23. Генетическое и молекулярное картирование гена *LTS3* в группе сцепления I и в геноме хламидомонады. Расстояние между маркерами на фрагменте генетической карты (группа сцепления I) указаны в сантиморганах. Положение маркеров на участке ДНК хромосомы I обозначены порядковым номером нуклеотидов скаффолда I. Фрагменты геномной ДНК из библиотеки BAC-клонов, использованные в работе, перекрывают участок скаффолда 1 (позиции: 1853 - 3704 тпн). Позиции фрагментов, содержащих аллели дикого типа генов *LTS3* и *Ac115* указаны курсивом

3.3.7. Позиционное клонирование гена *LTS3*

Поиск гена *LTS3* в геноме *Chlamydomonas reinhardtii* был осуществлен методами позиционного клонирования и геномной комплементации, применение которых возможно в случае известной локализации искомого гена на генетической карте

объекта. Метод состоит в использовании фрагментов геномной ДНК из штамма дикого типа в составе библиотеки ВАС-клонов для трансформации мутантных культур [Rymarquis, 2005]. У трансформантов фенотипа дикого типа компенсация мутантной аллели происходит за счет привнесенного фрагмента ДНК, который, затем, служит предметом поиска гена интереса. Практически все фрагменты ДНК из геномной библиотеки ВАС-клонов хламидомонады имеют «привязку» к конкретным участкам генетической и физической карт *C. reinhardtii*, и, зная положение гена на этих картах, можно подобрать клоны, которые с большой долей вероятности содержат фрагмент ДНК, соответствующий искомому участку хромосомы. Мы картировали ген *LTS3* в группе сцепления I, и в базе данных геномного проекта хламидомонады (<http://genome.jgi-psf.org/>) провели поиск ВАС-клонов, которые могут нести ДНК участка хромосомы I, содержащего ген *LTS3*. Для экспериментов по трансформации были выбраны 25 клонов (таблица 3.25), суммарно перекрывающих (по геномной ДНК) область вероятной локализации гена *LTS3* длиной ок. 1850 тпн приблизительно равную 15 сМ. Зеленые в темноте устойчивые к хлорамфениколу трансформанты были получены только в экспериментах, где в качестве трансформируемого материала использовали геномную ДНК двух ВАС-клонов: РТQ9626 и РТQ4402. Частоты их появления оказались сходными при трансформации мутантов ВАС-ДНК обоих клонов и в среднем составили $0,7 \times 10^{-7}$ и $1,4 \times 10^{-7}$ для мутантов *brc-1* и *lts3*, соответственно. Два ВАС-клона, ДНК которых компенсировала мутантные аллели гена *LTS3*, несли перекрывающиеся последовательности. Это означало, что общий для обоих клонов фрагмент ДНК размером 11900 пн, содержит аллель дикого типа гена *LTS3*. При сопоставлении нуклеотидных последовательностей геномной ДНК, мРНК и EST-клонов в составе этого фрагмента хромосомы I было обнаружено три открытые рамки считывания (рисунок 3.24).

Таблица 3.25. Клоны из библиотеки ВАС-клонов *C. reinhardtii*, использованные в работе

PTQ	№ клона	граница	граница	Размер (тпн)
9626	26m5	1853496	1949182	95689
4402	12c22	1937413	2012699	75286
7079	19m18	2100142	2249357	149215
3828	10h11	2421403	2511909	90506
14544	38p12	2453648	2555787	102176
6480	17p12	2537569	2608200	70631
7247	19n12	2588329	2664468	76179
2380	7g19	2665338	2751600	86262
11174	30k9	2703376	2774837	71461
2769	8a21	2772603	2873176	100573
6797	18j19	2812005	2866622	54617
7911	21n9	2845300	2912365	67065
3158	9k21	2866826	2978807	111981
7156	19h13	2997671	3052605	54934
10208	27p7	3039229	3161492	122263
4727	13m6	3077547	3161505	83956
3288	9p5	3141794	3188241	46447
10734	28l20	3188252	3229167	40915
12782	34k4	3280117	3360784	80667
11273	30a12	3391655	3423603	31948
3060	8h22	3391640	3456971	65316
14506	38d4	3407874	3467932	60058
6788	18h17	3473846	3562269	88423
14290	38c21	3563194	3591002	27808
14282	38c19	3587669-	3703690	106021

PTQ - нумерация ВАС-клонов в каталоге JGI

№ клона в библиотеке клонов, представленных на 40 чашках, каждая из которых содержит 384 клон. Нумерация клонов определяется номером чашки, буквенным обозначением ряда (от А до Р) и номером колонки (1-24). Жирным шрифтом выделены ВАС-клоны, содержащие аллель дикого типа гена *LTS3* (PTQ: 9626? 4402) и аллель дикого типа гена *Ac115* (PTQ14544).

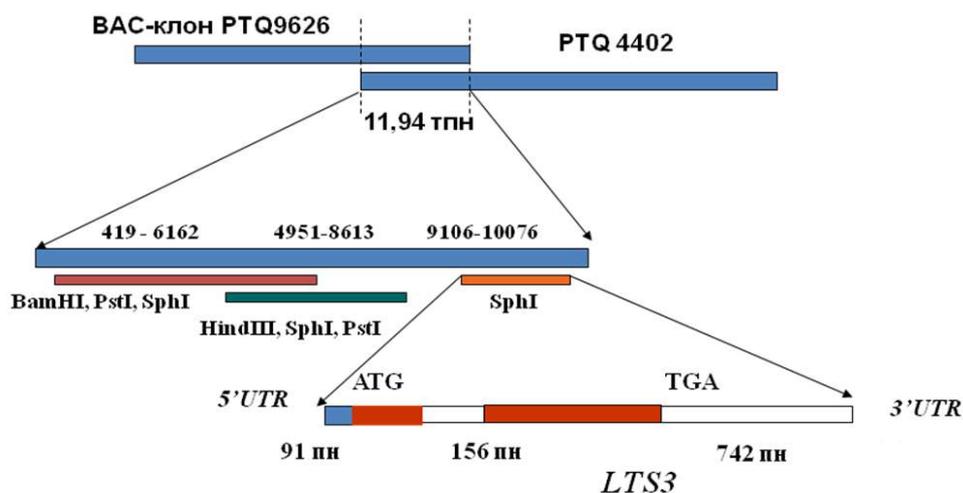


Рисунок 3.24. Область перекрытия ВАС-клонов (фрагмент ДНК размером 1,9 тпн), и структура гена *LTS3* (длина - 815 пн, включает 1 интрон (156 пн). На схеме указаны иницирующий кодон (ATG) и стоп-кодон (TGA)

В результате анализа рестрикционных карт генов-кандидатов были выбраны эндонуклеазы рестрикции, специфически режущие их ДНК, и, далее, мутанты по гену *LTS3* трансформировали материалом ДНК ВАС-клонов: PTQ9626 и PTQ4402, обработанные рестриктазами: HindIII, BamHI, PstI, SphI (таблица 3.26). Отсутствие зеленых в темноте трансформантов было установлено только в экспериментах, в которых использовали ВАС-ДНК,

Таблица 3.26. Трансформация мутантов по гену *LTS3*

ДНК ВАС клонов PTQ9626 и PTQ4402, обработанных рестриктазами *

<i>Рестриктазы</i>	<i>Положение сайтов рестрикции</i>	<i>Результаты</i>
HindIII	118, 6228, 11914	+
BamHI	164, 1968, 110010	+
PstI	451, 1559, 1815, 5804, 7183, 8221, 8660	+
SphI	2082, 6458, 7854, 9015, 9256, 10040, 11227	-

*- знак (+) в графе результаты означает, что при трансформации появлялись зеленые в темноте клоны, свидетельствуя, что данные эндонуклеазы рестрикции не нарушают целостности аллели дикого типа гена *LTS3*.

порезанную рестриктазой SphI. Эти результаты давали основание предположить, что ген *LTS3* на фрагменте ДНК размером 11.9 тпн соответствует транскрипту, занимающему положение: 9106-10076 (рисунок 3.24).

3.3.8. Структура гена *LTS3* и кодируемого им белка

Анализ структуры гена *LTS3* (рисунки: 3.24, 3.25) был проведен путем сопоставления нуклеотидной последовательности геномного фрагмента и соответствующих ему последовательностей мРНК и EST-клонов, из базы данных геномного проекта хламидомонады (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/dispCeneModel/>). Поиск открытой рамки считывания (ОРС) вели также с помощью адаптированной для хламидомонады программы GreenGenie2 (<http://bifrost.wustl.edu/GreenGenie2>), которая находит ОРС в геномном сиквенсе. В результате, по данным компьютерного анализа установлено, что ген *LTS3* содержит 2 экзона (58 пн и 257 пн) и 1 интрон (156 пн). Его транскрипт размером 815 пн включает короткий (33 пн) 5'- нетранслируемый район (5'UTR), открытую рамку считывания ОРС (315 пн), кодирующую белок размером 104 ак, и длинный (467 пн) 3'нетранслируемый участок (3'UTR). Его стоп кодон – TAG встречается в 15% исследованных генов хламидомонады (также как и TGA), тогда как у большинства из них в качестве нетранслируемого кодона выступает триплет TAA. Сигналом полиаденилирования транскрипта *LTS3* служит последовательность TGTTG, тогда как наиболее типичными для *C. reinhardtii*. являются: TGТАА, TGТАG и TGTTA [Rochaix et al., 1998]. Молекулярное клонирование гена *LTS3* позволило установить его местоположение на хромосоме I (рис. 3.25). В соответствии с версией 4 геномного сиквенса *C. reinhardtii* (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/Chlre4.home.html>), он локализован в положении: [chromosome_1:3697097-3698067](http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/Chlre4.home.html#chromosome_1:3697097-3698067). Иницирующий кодон (ATG) гена находится в позиции: 3697129-31.

>Chlre4	chromosome_1:3696006-3698466	5'pad=0	3'pad=0	strand=+
3,696,126	GCTCATTTCAGCTGCGTGGCCACCGACACGCTGCC	GATA	GACTTCAGCCTGGGCTACGGCG	3,696,185
3,696,186	ACGGCGCGCTCATGGGCGCTAGCTGCAGCGGGCGGCGCCTTGCCTTCGGCTCGCGCGGCC			3,696,245
3,696,246	GCAGCGCCAGCCTGAACGAGACGCACCTGCGGGCGGACAGCTGGCTGCACGAGGGCGAGC			3,696,305
3,696,306	TATTGGCGCCGAGCTGCCACCCAGCGTCAGCGAGCTGGAGCTGCTGGAGCTGCCGGAGG			3,696,365
3,696,366	ACCCAGTGCCGCTGCGGCCCTCAAGTGCAGCTCCTTCCTCGGGCCCTCAACACCATGG			3,696,425
3,696,426	CCGATA	GCTCGCTGACCCGAGCGGCGGCGGCGGCAACGCCGCCGCGGTGCCCCCA		3,696,485
3,696,486	TGACGTCT	GGCATGATGAGTTCAAGGGCGCTGGCGCCGCGGCCGCGTGGACGCGGGCG		3,696,545
3,696,546	CTGCTGCCGCGGTGGCCACCACGACCACCACCACCACGACTACCAACAACGGCGTCAACGG			3,696,605
3,696,606	TGACCGTGAAGCGTAAGAT	TATC	ACCTCGCCAGCCCGCTTCTGCAGCAGGGAAAGGGCA	3,696,665
3,696,666	AGACGCGCCAGCCTGCCGGGCCCCGCCCGTGGCCCCCGCGGGCGTAAACTTGCAAAGCC			3,696,725
3,696,726	CTAAGCGCGCAAGGTGGGCGGCAGCAGCGGCTTCGGCGGCTGGCAGCAGCCGGGTGCCG			3,696,785
3,696,786	GCGGCATGAAGTGGTACGCAGCGTGCAGCAACATGAACAACCTTCCTTGAGGGCGTGG			3,696,845
3,696,846	AGGTGACGGTTACGCCCATGGGACGCGCCGCGCAGACTCGGTGTTAGCCCAACGCCA			3,696,905
3,696,906	GCTCCATTTCCGCATCCACGCCAACGCGCAGTTTGGCGCCGGCCCCATTCTTTGACCCGG			3,696,965
3,696,966	CTGCTGCTGCGCGCGGAGGCTCCGCGTTGGCCGCCGGCATGCTCGCGCCGACAGGCGGTGG			3,697,025
3,697,026	CATCCGCCCGCGGACAGGGGCAGCAAGAGCAAGGTGGCCGTGCCGCCTACCGCGTTCAG			3,697,085
3,697,086	TGCCGGTGCCG	CCGGTGCAGGGCGTGGGGCCGGTACCGCCTGGC	ATCCCTGGCCTGG	3,697,145
3,697,146	TGCCCGGCACTTTTCATGGCTCCTGGCATGGCCTTCCCCGAGGGTGAGCGAATGTTATTTT			3,697,205
3,697,206	GACACCTGTACGGTTGGTTGCCTTGTTCACAGCATGGCATGCTGTGCCAGGAAGGGCCG			3,697,265
3,697,266	CCGATTGGTATGCCTTGTCAACAGCATGTCTTTGCGGATACCTAACCCAGCATTGCCG			3,697,325
3,697,326	TGCCTTCTGACCCCGCAGCCAAGCGCCCTGTGCCGTGCGGTGCCGAAGCCGCGCAAGCGCG			3,697,385
3,697,386	CCTCGCCCAATGGCAACCCGCCGAAGGCGCCTGCACCCAACCCGAACGGCCACTGCTGCA			3,697,445
3,697,446	CCCAGTGCGGCACGCAGACCACGCCGTTTGGCGCGCGGGCCCGCACGGCCCCAAGACCG			3,697,505
3,697,506	TCTGCAACGCCTGCGGTGTCCGGTATATGAAGGTTGCCAAGTCGGGCGCCACGCAGCCGG			3,697,565
3,697,566	CTCCGAGGCGGCAGCAGCAGCATACCAAG	TAG	CACGCTGTGGCGGGCTACATGGCCG	3,697,625
3,697,626	GCAGCGATAGTACGGAGCGTGCGGCGTCTGCGGGCAGCGGCACGGCTTCCCAAATGCAC			3,697,685
3,697,686	AGCGGTTGTCCTCCGCGACATGCCCTGAATGGGTGCTGGTCAAGGCAGAGCAACTGAGC			3,697,745
3,697,746	GCGGTTGTAGGTTACGGGATGTGCATGTGGACTAAACTGGTGAGGCCTGAATGGTGGGT			3,697,805
3,697,806	TGTGCCAAAGGCCGTGCAGGAGTGCTTGACGCGCGCTCCACGTTGATGGTCTGTCACCG			3,697,865
3,697,866	ACAATACGGTGGGGCCGGGGCAACATGTGTTGTTGGTTGCCGCGTTTGGCAACGTGGTGG			3,697,925
3,697,926	TTGTTTGGATGGCTGTGGGCGCGATTTGTTTCGTATGCGCCAGTAACAACAGGAAAGCGTG			3,697,985
3,697,986	CACGTGTATGATTTACGACAACCGGGATTAACATTACCACCGCATGCAGCTGGGGACCCA			3,698,045
3,698,046	TATGAACTGGCGTGCATCTT	TGTTG	CTCCTTGCCTTACAGCGCACCATGCGCGCGCATGA	3,698,105
3,698,106	GGTGTGGCGCAACTCCGCTAGCCGCTGGATTGGGCGTTGGACTTAGACGGAACCTCGGCTG			3,698,165

Рисунок 3.25. Нуклеотидная последовательность гена *LTS3*. Синим цветом обозначены нетранслируемые участки: 5'UTR и 3'UTR; фиолетовым – интрон, красным – кодирующая последовательность. Стартовый кодон и стоп кодон – в рамке; сигнал полиаденилирования – подчеркнут. Мотивы GATA и TATC (вторая цепь) – желтым и малиновым, соответственно. CRE-элемент (TGACGTCT) – выделен зеленым

Белок *LTS3* в базе данных геномного проекта *C. reinhardtii* (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/dispCeneModel/Chlre3.home.html>) обозначен как ID 171659. Он состоит из 104 аминокислотных остатков (ак), и имеет молекулярную массу 11,067 kDa. Виртуальный анализ структуры этого белка, осуществленный с использованием программ, доступных на сайте ExPasy tool (<http://expasy.org/tools/scanprosite>, together with ProRule-based predicted intra-domain features) позволил обнаружить в его составе один ДНК-

связывающий домен (рисунок 3.26) со структурой «цинкового пальца», сходный с доменами транскрипционных факторов, относящихся к семейству GATA (ZnF_GATA). Цинковый палец, расположенный ближе к С-концу молекулы (54 aa – 78 aa), имеет каноническую конфигурацию: Cys-X2-Cys-X18 – Cys-X2-Cys, петля которого, состоит из 18 аминокислотных остатков. Он узнает консенсусную последовательность ДНК: WGATAR (где W-A/T, а R – A/G).

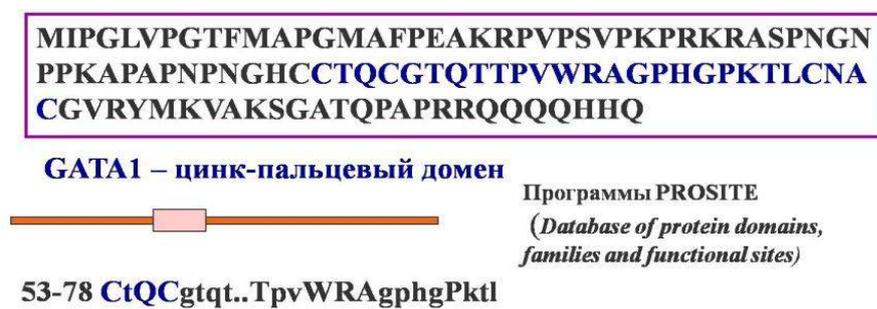


Рисунок 3.26. Доменная структура белка **LTS3** (104 ак.). Аминокислоты, формирующие структуру цинкового пальца, выделены синим цветом.

Анализ нуклеотидной последовательности 5'фланкирующего района ДНК выше по течению от точки начала транскрипции гена *LTS3* (рисунок 3.25) позволил обнаружить цис-действующие элементы: GATA-последовательности, характерные для промоторов светоиндуцируемых генов, и последовательность CRE (*cAMP response element*) соответствующую палиндрому: 5' TGACGTCT 3', которые участвуют в регуляции экспрессии генов в ответ на ограничение по источникам азота и углерода [Соколовский и Белозерская, 2000]. Первый GATA-мотив найден выше по течению в положении: 3696160 – 3696163, на расстоянии в 926 нуклеотидов от точки начала транскрипции. Второй GATA-мотив (CGATAG) - обнаружен в положении: -668-655 выше по течению и один мотив TATC (комплементарный GATA –вторая цепь) – в позиции: -461-458. Начало CRE-элемента лежит в положении 3696486, на расстоянии 610 нуклеотидов выше

по течению. Наличие GATA-элементов в промоторной области гена *LTS3* позволяет предположить его способность к авторегуляции, а мотив CRE свидетельствует о том, что его экспрессия может зависеть от источников азота и углерода.

3.3.9. Мутантные аллели гена *LTS3*

Секвенирование мутантных аллелей *brc-1* и *lts3* гена *LTS3* позволило установить мутационные нарушения в их нуклеотидных последовательностях. Мутантные аллели гена *LTS3* были амплифицированы с использованием ген-специфичных праймеров (таблица 3.27). Матрицами служили геномная ДНК (gDNA) и кДНК (cDNA) из клеток мутантов *brc-1*, *lts3* и штамма дикого типа. Полученные ДНК-фрагменты были клонированы в составе плазмид pJET1 и секвенированы. Секвенирование обеих мутантных аллелей: *brc1* и *lts3* показало, что они несут мутации во втором экзоне гена

Таблица 3.27. Праймеры, использованные для амплификации гена *LTS3*

<i>Шифр</i>	<i>5' - 3' последовательность</i>	<i>tm</i>	<i>Матрица</i>	<i>Ампликон</i>
Lts3-1f	GAGCAAGGTGGCCGTGCCG	66	Геномная ДНК	1,080 пн (1f-1)
Lts3-1r	CATGGTGCCTGTAAAGCAAG	64		
Lts3-1f	GAGCAAGGTGGCCGTGCCG	66	кДНК	401 пн (1f-2r)
Lts3-r2	CAGCGTGCTACTGGTGATG	64	Геномная ДНК	557 пн (1f-2r)
Lts3-f2	CGGCACTTTCATGGCTCGTG	64	кДНК	300 пн (f2-r2)
Lts3-r2	CAGCGTGCTACTGGTGATG	64		
Z-Lts- JOE	AGCCGCGCAAGCGCGCCTCGC BHQ2	76		
*Cblp-f	GCCACACCGAGTGGGTGTCGTGCG	74	кДНК	291 пн
*Cblp-r	CCTTGCCGCCCGAGGCGCACAGCG	78		
**Tub1	GAGTTCCTGAGGCCGAGTC	64	кДНК	200 пн
**Tub2	TCCTTTGTCCAGGGTCAGTC	62		

***CBLP** - референсный ген, используемый в качестве контроля при ОТ-ПЦР; он кодирует компонент цитоплазматических 40S рибосом RACK1 (XM_001698013).

****Tub2** – (beta-2 tubulin) референсный ген, используемый в качестве контроля при ОТ-ПЦР *Chlamydomonas reinhardtii*.

LTS3. Мутация *brc1* является вставкой нуклеотида Т в позиции 119+, а мутация *lts3* представляет собой делецию 2-х нуклеотидов в положении 160-163 на кДНК гена *LTS3*. Обе мутации приводят к сдвигу рамки считывания и синтезу белков, не содержащих GATA-домен (таблица 3.28).

Таблица 3.28. Результаты виртуальной трансляции аллеля дикого типа (wt) и мутантных аллелей *lts3* и *brc-1* гена *LTS3*

Белок <i>LTS3</i>	Аминокислотная последовательность	GATA-мотив*
wt	MIPGLVPGTFMAPGMAFPEAKRPVPSVPKPRKRASPNNGNPPK APAPNPNGHCCTQCGTQTTPVWRAGPHGPKTLCNACGVRY MKVAKSGATQPAPRRQQQHHQ	есть
<i>brc-1</i>	MIPGLVPGTFMAPGMAFPEAKRPVPSVPNAAQARLAQWQPA EGACTQPERPLLHPVRHADHARLARGPARPQDALQRLRCPVY EGCQVGRHAAGSEAAAAAASPVARCGGLHGRQR	нет
<i>lts3</i>	MIPGLVPGTFMAPGMAFPEAKRPVPSVPKPRKRASPNNGNPPKPC TQPERPLLHPVRHADHARLARGPARPQDALQRLRCPVYEGCQV GRHAAGSEAAAAAASPVARCGGLHGRQR	нет

*GATA-мотив – C-X(2)-C-X(17/18)-C-X2-C

3.3.10. Экспрессия гена *LTS3*

После молекулярной идентификации гена *LTS3* ставилась задача изучения его экспрессии на уровне транскрипции. Из клеток мутантов (*brc-1* и *lts3*), и штамма дикого типа (CC124), культивируемых в различных условиях освещения: в темноте, на постоянном свете и при переносе клеток из темноты на свет, была выделена РНК. На ее основе, методами обратной транскрипции с использованием олиго-dT-праймеров были получены кДНК, которые служили матрицами для амплификации с ген-специфичными праймерами фрагментов кДНК гена *LTS3*. При использовании праймеров, один из которых соответствовал началу кДНК гена (по данным моделирования), а второй – его поли-А концу, был получен ДНК фрагмент,

размер которого соответствовал ожидаемому размеру транскрипта гена *LTS3* (рисунок 3.27).

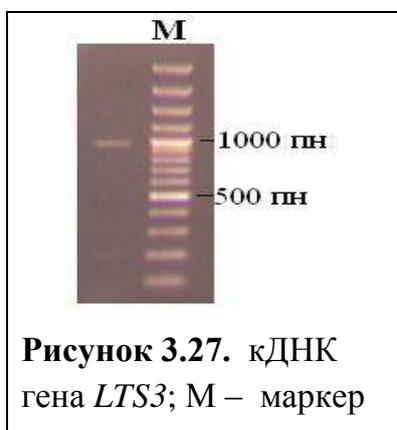


Рисунок 3.27. кДНК гена *LTS3*; М – маркер

Результаты изучения экспрессии методом ОТ-ПЦР (рисунок 3.28) свидетельствуют, что в норме, транскрипция гена *LTS3* негативно регулируется светом. В клетках штамма дикого типа уровень *LTS3*-транскриптов падал после освещения темновых культур и хорошо детектировался в клетках, выращенных на постоянном свете. В условиях фототрофного роста (свет, отсутствие источника углерода - ацетата) экспрессия гена *LTS3* снижалась (рисунок 3.28). Уровень экспрессии *LTS3* у мутанта *brc1* снижен как при выращивании их клеток в темноте, так и на свету.

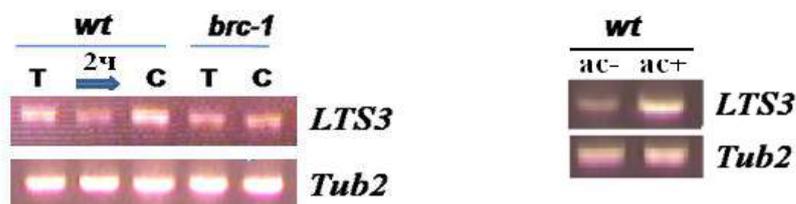


Рисунок 3.28. Транскрипция гена *LTS3* в клетках штамма дикого типа (wt), и мутанта *brc-1*, выращенных в темноте (Т), на свету (С) и после двух часов освещения (2ч) темновых культур. Контроль – экспрессия гена *TUB2*. 500 нг матричной кДНК использовали для ПЦР-амплификации гена *LTS3* с ген-специфичными праймерами: LTS-F2 - gggcactttcatggctcgtg; LTS-R2 - cagcgtgctactggatg.

Условия амплификации: 94 °С - 5 мин — 1-й цикл; 94 °С - 20 с, 63 °С - 30 с, 72 °С – 40 с — 35 циклов; 72 °С 6 мин — последний цикл.

Ампликоны (10 мкл) анализировали методом гель-электрофореза в 1,2% агарозном геле в буфере TBE.

3.3.11. Филогения гена *LTS3*

Поиск гомологов белка *LTS3*, среди имеющихся в настоящее время в базах данных *nr* (*All non-redundant GenBank CDS translations +PDB+SwissProt+PIR+PRF excluding environmental samples from WGS projects*) последовательностей аминокислот был проведен с использованием программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?>).

В результате этой работы удалось установить, что ортологи белка *LTS3* (219 белков) имеются только у эукариот. Их гомология основана на сходстве цинк-пальцевых ДНК-связывающих доменов GATA и позволяет отнести изучаемый белок к семейству ZnF_GATA (рисунок 3.29). Среди объектов, протеом которых содержит подобные *LTS3* белки, найдены зеленые водоросли, грибы, зеленые мхи и высшие растения (рисунки: 3.29; 3.30). Около 30 таких белков обнаружено у грибов, а остальные принадлежат объектам из царства Зелёных растений (*Viridiplantae*). У грибов, белки-

```

Ricinus_communis_GATA- -SKKSCTDCKTTETPLWRAGPAGPKSLCNACGIRYRKTKRDILSFHK
Picea_sitchensis      ----VPRVCVDCKTTKTPLWRSQPQPKSLCNACGIRYRKARRALSAFGN
Sorghum_bicolor       - ---AVRRCTHCQIEKTPQWRAGPLGPKTLCNACGVRYKSGR-----
Zea_mays              ----AVRRCTHCQIEKTPQWRAGPLGPKTLCNACGVRYKSGR-----
Oryza_sativa_GATA1-TF ----TVRRCTHCQIEKTPQWRAGPLGPKTLCNACGVRYKSGR-----
Nicotiana_tabacum_AGP1 ----TIRKCQHCIEITKTPQWRAGPMGPKTLCNACGVRYKSGR-----
Arabidopsis_thaliana_G -MGRKCQHCGAEKTPQWRAGPAGPKTLCNACGVRYKSGR-----
Glycine_max           -TRRCSHCLAQRAPQWRAGPLGPKTLCNACGVRYKSGR-----
Medicago_truncatula_G --TRRCTHCLSQRTTPQWRAGPLGPKTLCNACGVRYKSGR-----
Populus_trichocarpa   NGQQQPRRCTHCLAQRTTPQWRAGPSGPKTLCNACGVRYKSGR-----
Chlamydomonas_reinhardtii - NGHCCTQCGTQTPVWRAGPHGPKTLCNACGVRYMKVA-----
Phaeosphaeria_nodorum_LKIADEYVCTDCGTLDSPWRKGPNGPKTLCNACGRLWAKKE-----
PhycomyceswctC--     --DEFVCADCGTTTSPWRKGPNGPKTLCNACGRLWAKKN-----
Arabidopsis_th. GATA1 - -VIRVCSDCNTTKTPLWRSQPRGPKSLCNACGIRQRKARRAAMAAAA
Ostreococcus_lucimarinus CLHCGTVKTPQWRMGPEGKKTCNACGVRYMK ..

```

Рисунок 3.29. Множественный элаймент белка *LTS3 C. reinhardtii* (выделен голубым цветом). ([CLUSTALWResult](http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw) - <http://align.genome.jp/sit-bin/clustalw>). Зеленым выделены аминокислоты, формирующие ZnF_GATA –домен.

ортологи *LTS3* относятся к транскрипционным факторам, участвующим в световой регуляции роста и развития этих организмов - WC1 (white collar) и

WC2, также называемых LreB [Idnurm .and Heitman, 2005]. Одиннадцать подобных предсказанных белков были найдены у зеленых водорослей (*Chlorophyta*), способных как к фототрофному, так и к гетеротрофному типу питания: *Volvox*, *Chlorella*, у одноклеточных микроводорослей *Micromonas* и *Ostreococcus* класса прازیнофитов (*Prasinophytes*) - самых мелких представителей эукариот размером меньше микрона, населяющих океан с в составе фитопланктона [Zubkov et al., 2007]. Остальные, – около 190 белков, подобных LTS3, обнаружены у представителей подцарства высших (зародышевых) растений (*Embryophyta*). Десяток - у зеленого мха фискомитрелла отклоненная (*Physcomitrella patens*), который считается первым представителем царства зеленых растений, вышедшим на сушу. В подавляющем большинстве (169 белков), они принадлежат семенным растениям (*Spermatophyta*), среди которых 168 - у покрытосеменных (*Magnoliophyta*) и один белок был идентифицирован у представителя голосеменных – ели *Picea sitchensis*. В геноме модельного объекта генетики растений - арабидопсиса найдено 30 генов, кодирующих транскрипционные факторы, имеющие домены ZnF_GATA [Manfield et al., 2007], среди которых наиболее близкими по структуре и функциям гену *LTS3* являются гены: *GATA-2*, *GNC* (*GATA-21*) и *CGA1* (*GATA-22*). Недавно установлено, что фактор *GATA-2* – позитивный регулятор фотоморфогенеза, является ключевым компонентом системы световой регуляции транскрипции генов растения [Luo et al., 2010]. Он связывается с промоторами светозависимых генов, контролируя их активность в ответ на свет и брасиностероиды, и регулирует активность собственного гена по механизму обратного ингибирования в темноте. Гены *GNC* [Bi et al, 2005] и *CGA1* [Naito, et al., 2007] имеют сходные профили экспрессии, - они нитрат-индуцибельны, экспрессируются только в зеленых фотосинтезирующих тканях (но не в корнях), и их активность регулируется светом, циркадными ритмами и цитокининами. Мутации в гене *GNC* нарушают скотоморфогенез (развитие

растений в условиях гетеротрофного роста в темноте) снижают уровень биосинтеза хлорофилла и редуцируют экспрессию генов углеродного метаболизма [Manfield et al., 2007].

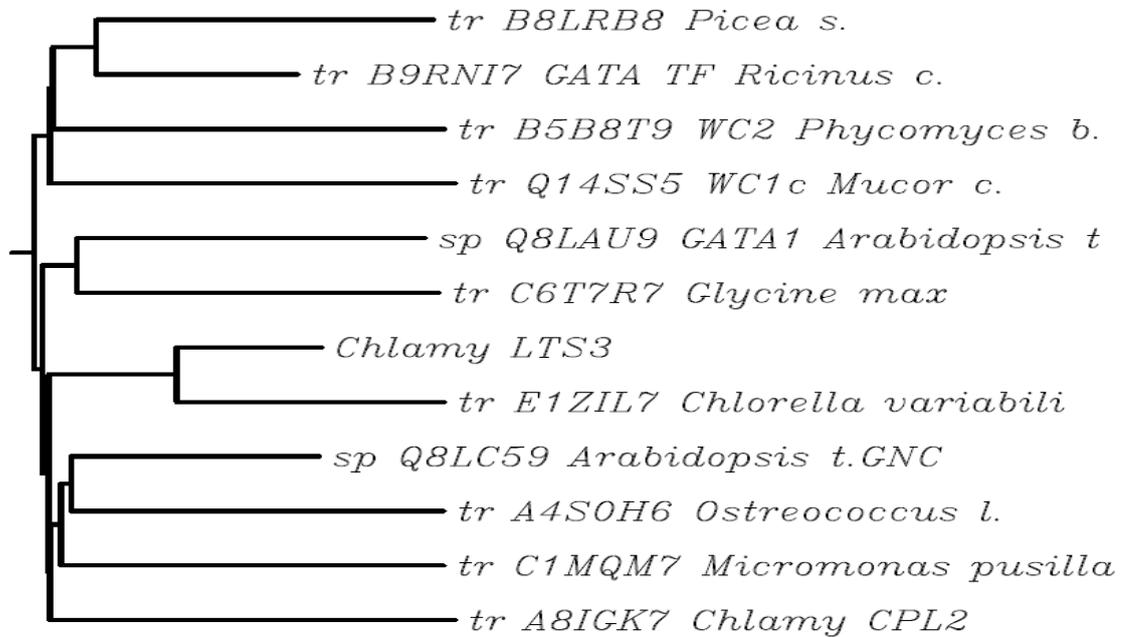


Рисунок 3.30. Филогения белка LTS3 (по результатам поиска гомологов, программа BLAST - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)

В результате поиска парпалогов гена *LTS3* (ID:171659, [chr. 1:3697130-3697600](http://genome.jgi-psf.org/annotator/servlet/jgi)) в геноме *C.reinhardtii* удалось обнаружить еще 3 ОРС, кодирующих GATA- факторы ([http://genome.jgi-psf.org/annotator/servlet/jgi.](http://genome.jgi-psf.org/annotator/servlet/jgi)). В хромосоме 7 ([chromosome 7:1055038-1056306](http://genome.jgi-psf.org/annotator/servlet/jgi)) - это ОРС, кодирующая белок ID:127044, на скаффолде 28 (scaffold_28:241075-243926) - ID:154888, и ген *CPL2* в хромосоме 10 ([chromosome 10:2370115-2372043](http://genome.jgi-psf.org/annotator/servlet/jgi)), кодирующий белок ID:205871. Выяснение их функций еще предстоит.

3.3.12. Поиск GATA-мотивов в промоторных областях генов *C. reinhardtii*, кодирующих ферменты биосинтеза хлорофиллов

Установление структуры белка LTS3 позволило отнести его к факторам транскрипции, узнающих GATA-мотивы в промоторах светорегулируемых

генов и, тем самым, дало основание предположить механизм его функционирования. Поскольку изучение экспрессии генов, кодирующих биосинтез хлорофилла, показало, что *LTS3* необходим для транскрипции генов магний-хелатазы: *CHLH*, *CHLI*, *CHLD* и *GSA* в темноте и на ранних этапах их световой активации, в промоторных областях этих генов был осуществлен поиск цис-элементов, узнаваемых ДНК-связывающими доменами (ZnF_GATA): GATA, TATC (комплементарный вариант – вторая цепь) и G-боксов (CACGTG) – последовательностей, существенных для световой регуляции транскрипции (таблица 3.29). Анализ нуклеотидной последовательности 5' фланкирующих районов ДНК размером более 1тпн выше по течению от точки начала транскрипции этих генов позволил установить, что все они содержат GATA-элементы (от одного – у *ALAD* и *CHLI*, до пяти – у *GSA*). G-боксы найдены у трех из 7 анализируемых генов: *GSA*, *CHLH* и *CHLD*.

Таблица 3.29. Цис-действующие элементы в 5' нетранслируемых районах генов, кодирующих ферменты биосинтеза хлорофилла у *S. reinhardtii*

Гены	Х *.	Положение на хромосоме	Наличие элементов**:		
			TATC	GATA	G-box
<i>GTR</i>	7	4045502-4048772	1 (-1047)	3 (-1174; -888; +22)	0
<i>GSA</i>	3	1302583-1306013	2 (-5; -390)	5 (1323; -854; -789; -490; -477)	2 (-1331; -1192)
<i>ALAD</i>	2	2268307-2271903	0	1 (-917)	0
<i>CHLH</i>	7	1696490-1703356	4 (-1272; -1012; -818; -339)	2(-1232; -715)	1 (-195)
<i>CHLD</i>	5	2231874-2238015	3 (-286; -276; -746)	2 (-761; +141)	2 (-216; -969)
<i>CHLI-1</i>	6	7012904-7016978	3 (-135; -956; -1265)	1 (-148)	0
<i>CHLI2</i>	12	3134690-3138645	2 (-973; -846;	2 (-107; +99)	0
<i>CHLM</i>	12	1834748-1838168	0	1	1

*Х – хромосома; ** цифры указывают на количество обнаруженных элементов, в скобках – положение первого нуклеотида элемента по отношению к точке начала транскрипции

3.3.13. Обсуждение результатов

В настоящей главе описаны мутанты хламидомонады по гену *LTS3*, которые стали предметом изучения генетической детерминации механизмов темнового биосинтеза хлорофиллов (ХЛ) - наименее изученной области исследований процессов хлорофиллообразования. Анализ пигментного состава показал, что мутации: *lts3* и *brc-1* в этом гене приводят к его блокированию и накоплению интермедиата ранних этапов биосинтеза ХЛ - протопорфирина IX (ПП) и в следовых количествах его магниевых производных. На свету, мутанты зеленеют и синтезируют ХЛ до уровня, характерного для клеток дикого типа, выращенных темноте.

Свет в норме индуцирует ферменты биосинтеза ХЛ у высших растений, повышая их активность на 20-50% [Reinbothe, 1996]. Уровень их активности у организмов, способных к образованию хлорофиллов в темноте и на свету, составляет ок. 60% и 40%, соответственно. Проверка функций ферментов: магний-хелатазы (МХ), магний-ПП-метилтрансферазы и АЛК-синтезирующего комплекса показала, что у мутантов *C. reinhardtii* по гену *LTS3* в темноте резко снижены активности МХ и АЛК-синтезирующего комплекса. Они составляют 22% и 7% от уровня световых культур штамма дикого типа. На свету происходит восстановление их активности до уровня, характерного для темновых культур дикого типа. Фермент магний-ПП-метилтрансфераза утратил способность к регуляции светом. *Эти данные позволили предположить, что активности МХ и АЛК-синтезирующего комплекса в темноте зависят от наличия продукта гена LTS3.*

Выращенные в темноте проростки высших растений - желтые. Они имеют недифференцированные пластиды, называемые этиопластами, не синтезируют хлорофилл и накапливают протохлорофиллид (ПХЛД). После освещения в их клетках запускается процесс зеленения: активируется экспрессия генов, кодирующих белки, задействованные в процессах

фотосинтеза, из этиопластов формируются хлоропласты, и образуется хлорофилл [Armstrong, 1998]. Клетки штаммов дикого типа хламидомонады, растущие гетеротрофно, обладают хорошо развитой системой хлоропластных мембран и способны к образованию хлорофилла, а мутанты *yellow* подобны этиолированным проросткам высших растений. Выращенные в темноте, их клетки содержат слабо структурированные хлоропластные мембраны и накапливают ПХЛД, а после освещения, синтез хлорофилла, также как и структура тилакоидных мембран у них полностью восстанавливаются в течение 6-8 часов [Li, 1996]. Штаммы хламидомонады *brc-1* и *lts3*, имеют сходное с *yellow* строение хлоропластных мембран [Wang, 1978; Grimm, личное сообщение]. Для ответа на вопрос, сохраняется ли сходство мутантов при зеленении, мы изучили этот процесс и показали, что для мутантов по гену *LTS3* характерна временная задержка индуцированного светом синтеза ХЛ. По-видимому, освещение сначала ведет к уменьшению содержания порфириновых интермедиатов, после чего начинается процесс биосинтеза хлорофиллов. Такая последовательность событий, описанная ранее для мутанта *brc-1* [Wang et al., 1974], оказалась характерной для мутанта *lts3*. Очевидно, свет снимает эффект мутаций, - выращенные в темноте мутанты по гену *LTS3* перестают накапливать протопорфирины, и их клетки, вновь образованные в результате деления, становятся способны к синтезу хлорофиллов. *На основании этих наблюдений предположили, что продукт гена LTS3 необходим для работы магний-хелатазы в темноте, и участвует в световой регуляции ферментов биосинтеза хлорофилла.*

В этой связи возникла необходимость изучить влияние мутации в гене *LTS3* на экспрессию генов, кодирующих МХ и другие ферменты биосинтеза хлорофилла. У покрытосеменных растений гены, кодирующие белки фотосинтеза (БФ), регулируются светом на уровне транскрипции. Уровень их мРНК крайне низок в тканях, культивируемых в темноте, и быстро увеличивается при освещении. У голосеменных, способных к темновому

синтезу хлорофиллов, такая зависимость выражена слабо. В их клетках мРНК целого ряда генов БФ активно нарабатываются в отсутствие света, и их количество лишь слегка увеличивается при переносе растений на свет [Ohad, 1967]. Методом Нозерн-блот анализа мы показали, что у мутанта по гену *LTS3* по сравнению с клетками дикого типа в темноте снижена транскрипция генов, кодирующих МХ и фермента GSA-AT, входящего в состав АЛК-синтезирующего комплекса. Синтез белков большой (Н) и малой (П) субъединиц МХ у штамма дикого типа и мутанта *lts3* полностью соответствует динамике накопления мРНК этих генов, свидетельствуя, что регуляция их экспрессии происходит на уровне транскрипции. Установленный нами характер экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза хлорофилла, соответствует уровню активности анализируемых ферментов и отражает динамику синтеза хлорофиллов в процессе зеленения культур мутантов хламидомонады. Световая индукция транскрипции этих ядерных генов наблюдается как в клетках штамма дикого типа, так и бесхлорофильных в темноте мутантов. Различия состоят в снижении их экспрессии у мутанта *lts3* в темноте и на ранних стадиях зеленения.

Результаты исследований пигментного состава, процесса зеленения, активности ферментов биосинтеза хлорофиллов и экспрессии кодирующих их генов у анализируемых мутантов хламидомонады позволяли предположить, что мутации в гене *LTS3* влияют на регуляцию биосинтеза хлорофиллов на уровне транскрипции. *Продукт гена LTS3 в темноте активирует экспрессию ядерных генов, кодирующих МХ (CHLH, CHLD и CHLI) и глутамат-полуальдегидаминотрансферазу (GSA-AT).*

Для поиска гена *LTS3* в геноме хламидомонады была выбрана стратегия позиционного клонирования, которая применяется в случаях, когда ген картирован, но неизвестны функции кодируемого им белка. Полученные нами данные о локализации *LTS3* были использованы в экспериментах по геномной комплементации. В результате, в библиотеке ВАС-клонов

хламидомонады был найден фрагмент ДНК, содержащий аллель дикого типа гена *LTS3*. Компьютерный анализ структуры гена и аминокислотной последовательности кодируемого им белка позволили установить, что он кодирует транскрипционный фактор семейства GATA. В этой связи, наши предположения о функциях белка *LTS3* как регулятора транскрипции нашли свое подтверждение. Дальнейшие исследования - анализ промоторной области гена *LTS3*, секвенирование мутантных аллелей этого гена и изучение его экспрессии – были направлены на выяснение функций кодируемого им белка. Было установлено, что результатом мутаций *brc-1* и *lts3* в гене *LTS3* стало отсутствие GATA-цинк-пальцевых структур у мутантных белков. По-видимому, утрата функции ДНК-связывания белков *LTS3* и является причиной мутантного фенотипа – неспособности клеток к темновому биосинтезу хлорофилла, а основная работа фактора *LTS3* состоит в связывании цис-действующих участков ДНК в промоторных областях ядерных генов.

Методом ОТ-ПЦР изучена экспрессия гена *LTS3* в клетках мутантов по этому гену и штамма дикого типа (рисунок 3.28), и показано, что свет в норме репрессирует, а наличие ацетата в среде - активирует его транскрипционную активность. По-видимому, продукт гена *LTS3* необходим клетке в условиях гетеротрофного роста. У мутантов экспрессия этого гена снижена и в темноте и на свету, свидетельствуя, что мутации в гене *LTS3* нарушают регуляцию его собственной экспрессии. По-видимому, фактор *LTS3* обладает свойством авторегуляции - контролирует экспрессию кодирующего его гена на уровне транскрипции. Для поиска элементов связывания Zn-F_GATA домена был проведен анализ ДНК 5' фланкирующего района от точки начала транскрипции гена *LTS3*. Он позволил обнаружить цис-действующие элементы: две GATA-последовательности, характерные для промоторов свето-индуцируемых генов, и последовательность CRE (*cAMP response element*, - 5' TGACGTCA 3"), для которой показано участие в

регуляции экспрессии генов в ответ на ограничение по источникам азота и углерода [Соколовский В.Ю., Белозерская Т.А., 2000]. Наличие в промоторе гена *LTS3* участков связывания кодируемого им белка наряду с результатами изучения экспрессии этого гена свидетельствуют о возможности саморегуляции его транскрипции. Авторегуляция описана для значительного числа транскрипционных факторов [Bateman E., 1998], и ее существование у гена *LTS3* также позволяет отнести кодируемый им белок к факторам транскрипции, обладающим свойством авторегуляции. Отвечая на вопрос, - каким образом фактор *LTS3* влияет на экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза хлорофилла: *MX* и *GSA-AT*, мы предположили, что он выступает в роли активатора экспрессии кодирующих их генов: *CHLH*, *CHLD*, *CHLI* и *GSA* в темноте, и необходим для их световой индукции.

Белки семейства GATA являются регуляторными факторами транскрипции. Они есть только у эукариот, включая позвоночных, беспозвоночных, растения и грибы [Brewer, 2006; Manfield et al., 2007; Соколовский, 2000]. Впервые они были обнаружены у позвоночных как эритроид-специфичные транскрипционные факторы. Эти белки содержат два цинковых пальца конфигурации: Cys-X2-Cys-X17-Cys-X2-Cys (где X — любая аминокислота), которые взаимодействуют с мотивом WGATAR (W = TorA; R = GorA) по большой бороздке ДНК [Evans and Felsenfeld, 1988; Martin and Orkin, 1990].

У модельного объекта биохимической генетики гриба нейроспоры *Neurospora crassa* к семейству GATA-факторов относятся такие жизненно-важные белки, как: NIT2, WC1 и WC2. Все они имеют один цинковый палец с консенсусной последовательностью: Cys-X2-Cys-X18-Cys-X2-Cys [Соколовский и Белозерская, 2000]. Ген *NIT2* кодирует фактор транскрипции NIT2 - основной регулятор азотного метаболизма у *N. crassa*. Мутации по этому гену приводят к частичному или полному ингибированию дерепрессии генов азотного цикла при недостатке первичных источников азота: нитратов,

солей аммония и аминокислот [Marshall and Timberlake, 1991]. Эти факты позволили заключить, что *NIT2* кодирует транс-действующий регуляторный белок *NIT2*, активный в условиях азотного голодания, который отвечает за селективную индукцию многих генов, и функционирует через cis-действующие элементы GATA в их промоторах. Уровень активации экспрессии зависит, по-видимому, от организации и числа элементов узнавания *NIT2* в промоторах регулируемых генов [Fu and Marzluf, 1990; Marzluf, 1997]. Нативные *NIT2*-связывающие участки в промоторных районах регулируемых им генов значительно отличаются по ориентации, локализации и нуклеотидной последовательности. Большинство *NIT2*-связывающих районов содержат два или более близко расположенных копий основного (core) элемента – GATA, который обычно узнается белками семейства GATA-факторов. Одиночные последовательности GATA являются участками слабого связывания для *NIT2*. Два (или более) элемента GATA, локализованные на расстоянии до 30 пар нуклеотидов друг от друга и направленных в одном или противоположных направлениях, составляют участок сильного связывания *NIT2*. Замена любого из нуклеотидов основного элемента GATA значительно уменьшает или уничтожает связывание *NIT2* за одним исключением – последовательность GATT сохраняет около 50% связывающей активности родительского элемента GATA [Marzluf, 1997].

Видимый свет является экологическим фактором, регулирующим жизненно важные функции для многих гетеротрофных микроорганизмов, включая грибы. У оранжевой хлебной плесени нейроспоры свет сине-фиолетовой области спектра регулирует индукцию синтеза каротиноидов, половой процесс и циркадные ритмы [Idnurm and Heitman, 2005]. Поиски мутантов с нарушениями процессов рецепции и передачи светового сигнала привели к выделению мутантов *wc* (white collar), которые образуют пигментированные конидии и белый мицелий [Linden et al., 1997]. Все мутанты *white collar* разделяются на две группы комплементации – *wc-1* и

wc-2 и имеют плейотропный слепой фенотип в отношении ответов *N. crassa* на синий свет. У них нарушен биосинтез каротиноидов, в мицелии и не наблюдается сдвига циркадного ритма под действием света, а, также, заблокирована индукция экспрессии светорегулируемых генов [Liu et al., 2003; Соколовский, 2000]. Полагают, что белки WC1 и WC2 являются важными, если не основными, элементами в цепи трансдукции светового сигнала. Будучи базовыми структурами светоспецифичных транскрипционных комплексов, регулирующих экспрессию фотозависимых генов, они, наряду с белком FRQ, определяют функционирование биологических часов гриба, - присутствие этих белков в мицелиях грибов, растущих в темноте, может индуцировать быструю транскрипцию генов-мишеней в ответ на свет [Соколовский, 2000]. В промоторных районах генов, кодирующих белки WC1 и WC2, присутствуют регуляторные элементы GATA, что делает возможным их авторегуляцию на уровне транскрипции или взаимодействие с белком NIT2. Также, там обнаружены регуляторные элементы CRE, которые свидетельствуют, что экспрессия этих генов может контролироваться уровнем глюкозы через систему цАМФ.

История изучения ДНК-связывающих GATA-факторов растений началась с находки консервативных мотивов GATA в промоторах светорегулируемых генов *RBCS1* и *CAB* у нескольких видов растений [Anderson and Kay, 1995]. Это позволило предположить существование у растений фактора, названного CGF-1 (for – CAB GATA factor), необходимого для регуляции экспрессии светозависимых генов. Обнаружение в геноме табака (*Nicotiana tabacum*) гена *NTL1* (*NIT2*-like protein), гомологичного гену *NIT2* грибов, стало первым доказательством наличия GATA-подобных регуляторных факторов у растений [Daniel-Vedele and Caboche, 1993]. База данных табака (http://compsysbio.achs.virginia.edu/tobfac/browse_family.), включающая факторы транскрипции, в настоящее время содержит информацию о 28 генах, кодирующих транскрипционные факторы GATA-

типа, имеющие один «цинковый палец» с консенсусом «растительного типа»: Cys–X₂–Cys-(18)-Cys–X₂–Cys. Свойственные животным домены ZnF_GATA, содержащие 17 аминокислотных остатков между вторым и третьим остатками цистеинами, у растений не обнаружено.

В геноме арабидопсиса найдено 30 генов, кодирующих транскрипционные факторы, имеющие домены ZnF-GATA [Manfield et al., 2007]. Среди них наиболее близкими по структуре и функциям гену *LTS3* являются гены: *GNC (GATA-21)* [Li et al, 2005] и *CGA1 (GATA-22)* [Naito et al., 2007]. Оба этих гена имеют сходные профили экспрессии. Они нитрат-индуцибельны и экспрессируются только в зеленых фотосинтезирующих тканях (но не в корнях), и их активность регулируется светом, циркадными ритмами и цитокинами. Мутации в гене *GNC* ведут к нарушениям скотоморфогенеза (развитию растений в условиях гетеротрофного роста в темноте) снижают уровень биосинтеза ХЛ и редуцируют экспрессию генов, контролирующих углеродный метаболизм [Manfield et al., 2007]. По-видимому, фактор *GNC* (*GATA*, *nitrate-inducible*, *carbon metabolism-involved*) необходим для темнового роста растений и участвует в координации метаболизмов: азота, углерода, и хлорофиллов во время фотоморфогенеза, - при переходе от гетеротрофного к фототрофному росту на свету. Критическая роль в фотоморфогенезе еще одного фактора транскрипции арабидопсиса *GATA2* была установлена в 2010 году [Luo et al., 2010]. Сверхэкспрессия гена *GATA2* приводила к укорочению гипокотилей в темноте, а его замолкание в результате введения антисенс-конструкций вело к удлинённым гипокотилиям на свету, свидетельствуя, что ген кодирует активатор фотоморфогенеза. Белок *GATA2* светозависимо регулирует экспрессию кодирующего его гена через механизм обратной связи – светоиндуцированное накопление белка ведет к подавлению транскрипции кодирующего его гена.

В геноме хламидомонады *C. reinhardtii* нами обнаружено 4 ОРС, включая ген *LTS3*, кодирующие ZnF_GATA-подобные факторы. Выяснение их функциональной роли еще предстоит.

Филогенетический анализ белков, гомологичных *LTS3*, позволил установить, что ортологичные ему GATA-факторы встречаются только у эукариот. В базе данных NCBI наиболее сходными по структуре с *LTS3* оказались факторы транскрипции грибов: WC-1 муко́ра *Mucor circinelloides*, WC-2 гриба-зигомицета *Phycomyces blakesleeanus*, способного к фототрофному росту, и растительного патогена - гриба аскомицета *Septoria nodorum* (*Phaeosphaeria*). Подобные факторы найдены зеленых водорослей (*Chlorophyta*), способных как к фототрофному, так и к гетеротрофному типу питания. В их числе – микроводоросли *Micromonas* и *Ostreococcus* класса прازیнофітов (*Prasinophytes*), обитающие в океане в составе фитопланктона [Zubkov et. al., 2007]. Эти зеленые водоросли, имеющие всего один хлоропласт и одну митохондрию, возникли в раннем кембрии примерно 542 млн. лет назад [Moustafa et al., 2009]. Десять подобных белков найдено у зеленого мха фискомитрелла отклоненная *Physcomitrella patens*, который считается первым представителем царства зеленых растений, вышедшим на сушу около 450 млн лет назад. Его геном, содержащий около 36 тысяч генов, был «прочитан» в 2007 году [Rensing et al, 2007], и, с тех пор, фискомитрелла является популярным объектом в генетико-эволюционных исследованиях процессов адаптации растительной клетки к безводной среде. Ортологи гена *LTS3* найдены у представителя голосеменных растений - ели *Picea sitchensis*, но большинство их обнаружено в уже секвенированных геномах высших растений. Среди них - вечнозеленый кустарник клещевина обыкновенная *Ricinus communis*; сорго *Sorghum bicolor* люцерна *Medicago truncatula*, соя *Glycine max*, тополь *Populus trichocarpa*, рис *Oryza sativa*, кукуруза *Zea mays*, табак *Nicotiana tabacum* и арабидопсис *Arabidopsis thaliana*.

Следует заметить, что поиск белков, гомологичных LTS3, ограничен информацией, имеющейся к настоящему времени в молекулярно-биологических базах данных. При этом, аминокислотные последовательности белков прокариотических организмов представлены в них наиболее полно, и отсутствие среди них белков, подобных LTS3, свидетельствует о том, что факторы транскрипции ZnF_GATA типа появились в процессе эволюции только у эукариот, способных к гетеротрофному питанию. Возможно, первыми обладателями этих молекул стали самые примитивные морские одноклеточные зеленые водоросли *Micromonas* и *Ostreococcus*. Далее, они сохраняются в протеоме у организмов, способных зеленеть в темноте и на свету: мхов, голосеменных и вечнозеленого кустарника клещевины и у покрытосеменных растений, геном и протеом которых изучены к настоящему времени. У представителей царства грибов такие белки оказались основными регуляторами транскрипции в цепи передачи светового и метаболических сигналов. WC1 и WC2 являются центральными компонентами системы передачи светового сигнала у *N. crassa*, принимая участие в его рецепции, трансдукции, а также регулируя в качестве факторов транскрипции экспрессию фотозависимых генов. Оба белка WC1 и WC2 также задействованы в регуляции экспрессии генов метаболизма азота и углерода, что позволяет предполагать их роль как факторов, необходимых для перехода от гетеротрофного к фототрофному росту. Гомологичный LTS3 белок арабидопсиса GNC (*GATA*, *nitrate-inducible*, *carbon metabolism-involved*) выполняет подобные функции. Изучение этих белков у остальных представителей высших растений еще предстоит.

Во всех изученных к настоящему времени организмах, включая грибы и растения, ZnF_GATA факторы, к которым относится белок LTS3 хламидомонады, выполняют функции светозависимой регуляции экспрессии ядерных генов. По-видимому, в процессе эволюции они появились у

эукариотических организмов как регуляторные белки, обеспечивающие адаптацию организмов к свету. У грибов, они стали функционировать как транскрипционные факторы, регулирующие азотный и углеродный метаболизм, а растениям они оказались необходимы для обеспечения перехода от гетеротрофного (в темноте) к фототрофному (на свету) типу питания и связанной с этим перенастройкой метаболизма.

3.3.14. Выводы

1. Клетки мутантов *C. reinhardtii* по ядерному гену *LTS3*, растущие в темноте, накапливают предшественник хлорофиллов (ХЛ) протопорфирин IX (ПП) и его магниевые производные и формируют на твердой среде оранжевые колонии, зеленеющие на свету. Содержание ХЛ в световых культурах мутантов *lts3* и *brc-1* по этому гену соответствует таковому у темновых культур штамма дикого типа *CC124*.

2. Для мутантов по гену *LTS3* характерна задержка индуцированного светом синтеза ХЛ. Процесс зеленения запускается после первого деления - уже во вновь образованных в условиях освещения клетках.

3. Активность фермента магний-хелатазы (МХ) у мутантов по гену *LTS3* подавлена в темноте и составляет 22% от уровня световых культур дикого типа. На свету она восстанавливается до 76% - уровня темновых культур дикого типа (79%). Относительная активность АЛК-синтезирующего комплекса у мутантов составляет 4-7% от нормы.

4. У мутантов по гену *LTS3* в темноте подавлена транскрипция генов, кодирующих МХ и фермент GSA-AT, из АЛК-синтезирующего комплекса. Синтез белков большой (Н) и малой (I) субъединиц МХ у штамма дикого типа и мутанта *lts3* соответствует динамике накопления мРНК кодирующих их генов, означая, что регуляция их экспрессии происходит на уровне транскрипции.

5. По данным тетрадного анализа ген *LTS3* картирован в хромосоме I

C. reinhardtii на расстоянии 0,34 сМ от маркера *ac115*, в 30 сМ от центромеры.

6. Осуществлено позиционное клонирование гена *LTS3* и установлена его структура: ген содержит 2 экзона (58 пн и 257 пн) и 1 интрон (156 пн). Его транскрипт (815 пн) включает короткий (33 пн) 5'-нетранслируемый район (5'UTR), открытую рамку считывания (315 пн), кодирующую белок из 104 аминокислотных остатков, и длинный (467 пн) 3'UTR. Ген *LTS3* локализован на хромосоме I *C. reinhardtii* в положении: chromosome_1:3697097-3698067.

7. Компьютерный анализ (<http://expasy.org/tools/scanprosite>) обнаружил в структуре виртуального белка, кодируемого геном *LTS3*, один ДНК-связывающий домен со структурой «цинкового пальца», типичный для транскрипционных факторов семейства GATA (ZnF_GATA).

8. 5'-фланкирующая последовательность гена *LTS3* содержит cis-действующие элементы GATA и CRE (cAMP response element) - палиндром: 5' TGACGTCT 3', который участвует в регуляции экспрессии генов в ответ на ограничения по источникам азота и углерода. Наличие GATA-элементов в промоторной области гена *LTS3* свидетельствует о его способности к авторегуляции, а мотив CRE – зависимости его экспрессии от источников азота и углерода.

9. Секвенирование мутантных аллелей гена *LTS3* показало, что мутация *brc-1* является вставкой нуклеотида T в позиции 119+, а мутация *lts3* представляет собой делецию 2-х нуклеотидов в положении 160-163 на кДНК гена *LTS3*. Обе мутации приводят к сдвигу рамки считывания и синтезу белков, не содержащих GATA-домен.

10. Транскрипция гена *LTS3* в норме негативно регулируется светом, и позитивно – источником углерода ацетатом натрия. В клетках мутанта *brc-1* уровень экспрессии *LTS3* значительно ниже нормы.

11. Поиск белков, гомологичных *LTS3*, в базах данных nr (All pop-

redundant GenBank CDS translations) с использованием программы BLAST показал, что ортологи белка *LTS3* (более 200), встречаются только у эукариот. Их гомология основана на сходстве цинк-пальцевых ДНК-связывающих GATA-доменов и позволяет отнести белок *LTS3* к семейству факторов транскрипции *ZnF_GATA*. В геноме *S. reinhardtii* обнаружено 3 паралога гена *LTS3*, функции которых, выяснить еще предстоит.

12. Нуклеотидные последовательности 5'фланкирующих районов (более 1тпн выше по течению от точки начала транскрипции) генов *S. reinhardtii*, кодирующих ферменты биосинтеза ХЛ, содержат GATA-элементы (от одного – у *ALAD* и *CHL1*, до пяти – у *GSA*). G-боксы найдены у трех из 7 анализируемых генов: *GSA*, *CHLH* и *CHLD*. Наличие сайтов связывания с факторами транскрипции *ZnF_GATA* в промоторных областях этих генов подтверждает гипотезу об их регуляции фактором *LTS3*.

3.4. Супрессия мутаций в гене *LTS3 C. reinhardtii*

Супрессия (лат. *suppressio*, от *supprimo* - задерживаю, подавляю) – генетическое явление, препятствующее проявлению у организма признака, возникшего в результате мутации; приводит к частичному или полному восстановлению нормального фенотипа...

Большая Советская Энциклопедия

Генетическую детерминацию механизмов темнового биосинтеза хлорофиллов (ХЛ) и его регуляции светом у модельного объекта генетики фотосинтеза – водоросли *C. reinhardtii* изучали на модели мутантов по гену *LTS3*, кодирующему фактор транскрипции семейства GATA. Предмет исследования – бесхлорофилльные, накапливающие в темноте ПП, мутанты по гену *LTS3*, их ревертанты и обратные мутанты. В культуре клеток ауксотрофного по аргинину мутанта по гену *LTS3* генотипа: *arg7,brc-1* был отобран зеленый в темноте спонтанный ревертант *Brc-8*. Причиной восстановления темнового синтеза ХЛ у него стала рецессивная мутация *sup-3* в ядерном гене *SUP-3*, сцепленном с геном *LTS3*. Мутация *sup-3* также супрессировала проявление другой мутантной аллели *lts3* этого гена, демонстрируя отсутствие аллелоспецифичности [Савельева и Чекунова, 2005]. В результате инсерционного мутагенеза зеленого в темноте ревертанта *Brc-8* был получен обратный мутант *T8-3*, у которого произошел возврат к фенотипу исходного оранжевого в темноте мутанта *Brc-1*. Ниже представлены результаты исследований полученных штаммов: ревертанта *Brc-8* и трансформанта *T8-3* методами биохимии, генетики и молекулярной биологии. Идентифицирован ген *SUP-1*, разрушенный инсерцией в геноме штамма *T8-3*, продукт которого активирует транскрипцию гена *LTS3* и является элементом системы транскрипционной регуляции ядерных генов, контролирующей процессы темнового биосинтеза хлорофилла у хламидомонады [Чекунова с соавт., 2014].

3.4.1. Получение ревертанта Brc-8 и характеристика его фенотипа

Исследования гена *LTS3* *C. reinhardtii* позволили установить, что кодируемый им белок является важным компонентом транскрипционных комплексов, регулирующих экспрессию фотозависимых генов ферментов биосинтеза ХЛ: магний-хелатазу (МХ) и АЛК-синтезирующий комплекс (раздел 3.3). Для обнаружения других элементов этой системы была выбрана стратегия, предусматривающая изучение ревертантов, полученные от мутантов по гену *LTS3*. Одним из подходов к поиску альтернативных путей биосинтеза является изучение супрессии мутантных признаков. Для выявления факторов, обеспечивающих синтез ХЛ у хламидомонады в условиях отсутствия функционального белка *LTS3*, из клеточной культуры штамма, несущего мутацию *brc-1* в гене *LTS3* был отобран спонтанный ревертант Brc-8, способный синтезировать ХЛ в темноте (рисунок 3.31).

Мутанты хламидомонады, несущие аллельные мутации: *lts3* и *brc-1* в гене *LTS3*, синтезируют ХЛ только на свету. В темноте, в условиях гетеротрофного роста их клетки накапливают предшественники ХЛ протопорфирины и формируют желто-коричневые колонии. В культуре рекомбинантного штамма генотипа: *brc-1, arg-7, mt+*, полученного в потомстве скрещивания штаммов Brc-1 и Arg7, был отобран спонтанный ревертант Brc-8, способный синтезировать хлорофилл и в темноте. В условиях постоянной освещенности содержание ХЛ в клетках ревертанта Brc-8 и мутанта Brc-1 практически одинаково и составляет примерно 60% от уровня штамма дикого типа (таблица 3.30). При выращивании в темноте ревертант синтезировал то же количество ХЛ, что и на свету, и не отличался по этому показателю от световых культур исходного мутанта Brc-1 и штамма дикого типа, выращенного в темноте. Таким образом, темновой синтез ХЛ у ревертанта оказался восстановленным до уровня штамма дикого типа. По-видимому, супрессорный эффект касался прежде всего светонезависимого синтеза ХЛ, и не повлиял на его световую регуляцию – у обоих штаммов – мутанта Brc-1 и

Получение ревертанта Brc-8 от мутанта Brc-1

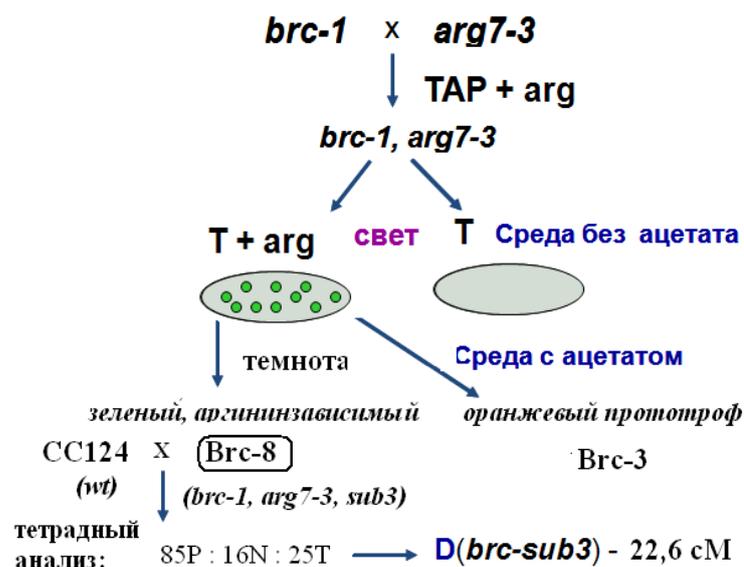


Рисунок 3.31. Схема получения спонтанного ревертанта Brc-8. В потомстве скрещивания оранжевого в темноте мутанта Brc-1(+) и аргинин-зависимого штамма CF 32 (*arg7-3, mt-*) в гетеротрофных условиях был отобран оранжевый аргинин-зависимый рекомбинант генотипа: *brc-1, arg7-3*. Его клетки были высеяны на свет на среду без ацетата (T) в двух вариантах: с аргинином и без него. Зеленые колонии выросли только на среде с аргинином, свидетельствуя, что исходный рекомбинант ауксотрофен по аргинину и способен к фотоавтотрофному росту (на среде без источника углерода – ацетата натрия). Зеленые фототрофные колонии далее были распечатаны на среду с ацетатом и аргинином и помещены в темноту. Среди выросших в гетеротрофных условиях оранжевых клонов был отобран зеленый ауксотроф Brc-8, который стал предметом изучения

Таблица 3.30. Содержание хлорофиллов (ХЛ) в клетках мутантов по гену LTS3

Штамм	Фенотип	Генотип	ХЛ ($\mu\text{моль}/10^9$ клеток)	
			Свет	Темнота
CC124	зеленый	wt	3,2	2,48
Lts3	оранжевый в темноте, на свету зеленеющий	<i>lts3</i>	2,21	0,09
Brc-1		<i>brc-1</i>	2,42	0,08
Brc-8	зеленый, аргининзависимый	<i>brc-1, arg7, sup-3</i>	2,51	2,32

его ревертанта Brc-8, практически отсутствует активация светом процесса хлорофиллообразования.

3.4.2. Гибридологический анализ ревертанта Brc-8

Для ответа на вопрос, является ли восстановление темнового синтеза ХЛ у штамма Brc-8 модификацией, или наследуемым свойством, был осуществлен его гибридологический анализ. В тетрадах мейотического потомства скрещивания штамма Brc-8 и исходного мутанта Brc-1 расщепление по окраске колоний в темноте было моногенным (2 зеленых : 2 оранжевых). Это означало, что признак наследуется, и реверсия произошла в результате единичной ядерной мутации. Способность синтезировать ХЛ в темноте у ревертанта Brc-8 могла появиться или в случае обратной мутации в гене *LTS3*, либо, с большей вероятностью, в результате мутации другого гена, супрессирующей мутантную аллель *brc-1*. Для определения генетической природы реверсии штамм Brc-8 скрещивали с зеленым в темноте штаммом CC38, несущим аллель дикого типа по гену *LTS3*. Выживаемость зигот и спор в этом скрещивании CC1792 была достаточно высока (выше 50%), что позволило проанализировать потомство методом тетрадного анализа (таблица 3.31). Появление сегрегантов мутантного фенотипа (формирующих в темноте колонии оранжевой окраски) в потомстве скрещивания двух зеленых штаммов (CC1792) свидетельствует, что мутация *brc-1* сохранилась в генотипе ревертанта Brc-8, а восстановление темнового биосинтеза ХЛ произошло в результате еще одной (супрессорной) мутации в гене, который был назван *SUP-3*. Анализ 126 тетрад скрещивания CC1792 показал, что количество тетрад родительского дитипа (P) фенотипа: 4 зеленых : 0 оранжевых (4 зел. : 0 ор.) значительно превосходит число тетрад неродительского дитипа (N) (фенотипа: 2 зел. : 2 ор.) и тетратипов (T) (фенотипа: 3 зел. : 1 ор.). Расщепление 85P:16N:25T достоверно, с вероятностью большей 99,999%, отличается от соотношения 1P:1N:4T,

характерного для случая независимого наследования генов. Данные эксперимента позволяют сделать заключение о сцеплении мутаций *brc-1* и *sup3* и оценить расстояние между ними, которое составило 22,6 сМ.

Таблица 3.31. Тетрадный анализ мейотического потомства скрещивания СС 1792

Шифр скрещивания	Родители		Генотипы родителей		P:N:T* маркеры: <i>brc1/sup3</i>	Расстояние (D) <i>brc-1 - sup3</i>
	mt+	mt-	mt+	mt-		
СС1792	Brc-8	СС 38	<i>brc-1, sup-3 arg7</i>	<i>pab2, ac14</i>	85:16:25	22,6 сМ

Таким образом, восстановление темнового синтеза ХЛ у спонтанного ревертанта Brc-8 произошло в результате возникновения мутации в супрессорном гене, сцепленном с исходной мутацией *brc-1*.

Основным критерием определения типа генной супрессии является выявление аллельной специфичности супрессоров. Из тетрады неродительского дитипа (N) в потомстве скрещивания СС1792 был выделен зеленый в темноте и на свету сегрегант 1792-39а, содержащий супрессорную мутацию *sup3* на фоне аллели дикого типа гена *LTS3*. Этот штамм был подвергнут генетическому анализу для выяснения аллелоспецифичности супрессорной мутации и уточнения данных по локализации гена *SUP-3*.

3.4.3. Тетрадный анализ мутации *sup-3*

Штамм 1792-39а (генотипа *sup-3*) скрещивали с мутантами, несущими аллельные мутации в гене *LTS3*: *brc-1* и *lts3*, соответственно, и анализировали потомство этих скрещиваний методом тетрадного анализа (таблицы: 3.32, 3.33). Сопоставление данных тетрадного анализа скрещиваний СС1810 и СС1811 позволяет получить информацию об аллелоспецифичности супрессорного эффекта мутации *sup-3*. При её отсутствии в потомстве

скрещиваний с участием обеих аллелей гена *LTS3* (*lts3* и *brc-1*) ожидается сходное дигенное расщепление с появлением трех типов тетрад: родительского дитипа (2 зел. : 2 ор.), неродительского дитипа (4 зел.: 0 ор.) и тетратипов (3 зел.:1 ор.). В случае, если эта мутация супрессирует только одну из двух анализируемых аллелей – *brc-1*, расщепление по окраске колоний в темноте в потомстве СС1811 (с участием аллели *lts3*) будет моногенным (2 зел : 2 ор.).

Таблица 3.32. Характеристика скрещиваний СС1810 и СС1811

<i>Шифр скрещивания</i>	<i>Родители</i>		<i>Генотипы родителей</i>		<i>Выживаемость, %</i>	
	<i>mt-</i>	<i>mt+</i>	<i>mt-</i>	<i>mt+</i>	<i>зигот</i>	<i>спор</i>
СС1810	Brc-3	1792-39a	<i>brc-1</i>	<i>sup3, arg7 pab2</i>	66,0	88,0
СС1811	Lts3	1792-39a	<i>lts3</i>	<i>sup3, arg7 pab2</i>	54,0	72,0

Таблица 3.33. Тетрадный анализ потомства скрещиваний СС1810 и СС1811

<i>Шифр скрещивания</i>	<i>Число типов тетрад в расщеплении по маркерам <i>brc1/sup-3</i></i>			<i>Дистанция <i>brc-1 - sup3</i></i>
	<i>P</i> (2 ор.:2 зел.)	<i>N</i> (0 ор.:4 зел.)	<i>T</i> (1 ор.:3 зел.)	
СС1810	28	21	17	44,7 сМ
СС1811	33	18	3	36,1 сМ

Данные таблицы 3.33 демонстрируют наличие класса зеленых тетрад (4 зеленых : 0 оранжевых) в потомстве обоих скрещиваний, свидетельствуя, что мутация *sup-3* способна подавлять фенотипическое проявление обеих анализируемых мутантных аллелей гена *LTS3*, т.е. ее супрессорный эффект не аллелоспецифичен. Отсутствие аллелоспецифичности при межгенной супрессии позволяет предполагать, что восстановление темнового синтеза ХЛ у ревертанта Brc-8 могло произойти в результате включения дополнительного пути биосинтеза, альтернативного тому, который оказался нарушенным исходной мутацией *brc-1*. Хотя по данным тетрадного анализа

скрещиваний СС1810 и СС1811 дистанция между генами *LTS3* и *SUP3* несколько больше, чем генетическое расстояние, рассчитанное ранее (табл. 3.31), они подтверждают прежние результаты об их сцеплении. Соотношения тетрад в обоих случаях достоверно, с вероятностью 99,999%, отличаются от соотношения 1Р:1N:4Т, характерного для независимо наследуемых генов. Увеличение значений, определяющих расстояния между этими генами, в частности может быть результатом недостаточно большого объема выборки по сравнению со скрещиванием СС1792 или преимущественным выживанием тетрад неродительского дитипа (фенотипа: 4 зел. : 0 ор.).

3.4.4. Анализ доминантности/рецессивности супрессорного эффекта мутации *sup-3*

Вегетативные клетки хламидомонады имеют гаплоидный набор хромосом, поэтому для выяснения доминантности/рецессивности супрессорного эффекта мутации *sup-3* по отношению к исходной мутации *brc-1* были сконструированы гетерозиготные диплоиды, по методу, описанному В.Эберсольдом, с модификациями [Ebersold, 1967]. Для этого скрещивали ауксотрофные по аргинину штаммы Вrc-8 и Вrc-3а, несущие помимо *brc-1* и *sup3* комплементирующие мутации в гене *ARG7* (*arg7* и *arg7-8*), локализованном в первой группе сцепления хламидомонады, а затем на среде ТАР отбирали прототрофные вегетативные диплоиды, колонии которых появлялись через 5 дней после начала эксперимента. Критериями плоидности служили: размер клеток, который контролировали под микроскопом, и тип спаривания - аллель *mt-* локуса типа спаривания доминирует в гетерозиготе генотипа: *mt+ / mt-*. Диаметр диплоидных клеток приблизительно вдвое превышал диаметр клеток гаплоидных штаммов хламидомонады, и все они имели тип спаривания *mt-*. Ожидалось, что в случае доминантного эффекта мутации *sup3* у диплоидов, гомозиготных по мутации *brc-1*, и гетерозиготных по *sup3*, светонезависимый биосинтез хлорофилла будет восстановлен, то

есть колонии таких диплоидов будут зелеными как в темноте, так и на свету. Если же супрессорный эффект мутации окажется рецессивным, то диплоидные колонии сохранят фенотип исходного мутанта *Brc-3* (оранжевая окраска в темноте, зеленая на свету). В наших экспериментах колонии диплоидов, гетерозиготных по мутации *sup3*, и гомозиготных по мутации *brc-1* имели оранжевую окраску в темноте, демонстрируя, что супрессорный эффект мутации *sup-3* рецессивен по отношению к исходной мутации *brc-1*. Таким образом, генетические исследования ревертанта *Brc-8*, полученного от накапливающего порфирины, неспособного синтезировать ХЛ в темноте мутантного по гену *LTS3* штамма *C. reinhardtii*, генотипа: *brc-1*, показало, что восстановление светонезависимого синтеза ХЛ у этого ревертанта произошло в результате рецессивной ядерной мутации *sup-3*. Эта мутация также супрессировала фенотипическое проявление другой мутантной аллели гена *LTS3* – *lts3*, демонстрируя отсутствие аллелоспецифичности. Данные тетрадного анализа позволяют сделать заключение о сцеплении мутаций *sup-3* и *brc-1*, и, следовательно, гены *LTS3* и его супрессор *SUP3* локализованы в одной хромосоме. Эта генная супрессия, по-видимому, связана с возникновением альтернативного, заблокированного у мутанта *Brc-1* пути темнового синтеза ХЛ. Возможно, что ген *SUP-3* в норме репрессирует включение дополнительного, существующего в клетке пути светонезависимого синтеза ХЛ, а мутация *sup3* включает этот альтернативный механизм. С учетом полученных нами сведений о природе мутаций в гене *LTS3*, кодирующем фактор транскрипции семейства GATA, можно предположить, что в отсутствие нормально-функционирующего регулятора транскрипции *LTS3* появляется иной путь активации транскрипции генов биосинтеза ХЛ в темноте, который может быть индуцибельным и связанным с метаболизмом азота и углерода в клетке водоросли. Для поиска таких факторов был применен генетический подход. В результате инсерционного мутагенеза зеленого в темноте спонтанного

ревертанта Brc-8 был получен обратный мутант T8-3, у которого в результате инсерции произошел возврат к фенотипу исходного бесхлорофильного в темноте мутанта Brc-1. Ниже представлены результаты изучения этого трансформанта T8-3 методами биохимии, генетики и молекулярной биологии. Локализация инсерции в ядерном геноме *C. reinhardtii* позволила обнаружить ген, экспрессия которого была блокирована вставкой, и предположить функции кодируемого им белка.

3.4.5. Получение инсерционного мутанта T8-3

Культуру клеток спонтанного аргинин-зависимого ревертанта Brc-8 генотипа: *arg7-3, brc-1, sup-3* подвергли инсерционному мутагенезу (рисунок 3.32). В результате трансформации клеток штамма Brc-8 вектором pCB412, содержащим аллель дикого типа гена ARG7, на среде TAP в темноте было отобрано 5148 клонов прототрофных трансформантов. Из них 5144 клон были зелеными в темноте и на свету как и трансформируемый штамм, а 4 клон - имели желто-оранжевую окраску, сходную с окраской мутанта Brc-1. Мы предположили, что у них в результате инсерции произошло либо выключение супрессорного гена *SUP-3* (восстанавливающего темновой синтез ХЛ у ревертанта Brc-8), либо разрушение гена, продукт которого также необходим для супрессии эффекта мутации *brc-1* в гене *LTS3* в темноте. Оранжевые прототрофные трансформанты в этом случае могли нести исходную мутацию *brc-1*. Один из этих четырех трансформантов, названный T8-3 и стал предметом дальнейшего изучения. Наличие вставки в геноме штамма T8-3 было подтверждено гибридизацией по Саузерну (данные не приводятся) и в дальнейшем, прямым секвенированием. Если трансформант T8-3 является обратным мутантом, то есть в геноме ревертанта Brc-8 инсерцией оказалась инактивированной мутантная аллель гена *Sup-3*, продукт которого супрессировал эффект мутации *brc-1*, то фенотип штамма



Рисунок 3.32. Схема получения трансформанта T8-3

T8-3 будет определяться наличием этой мутации в гене *LTS3*. Для выяснения вопроса, произошел ли в клетках трансформанта T8-3 возврат к фенотипу исходного штамма Врс-1, изучали его фенотип и генотип.

3.4.6. Фенотип инсерционного мутанта T8-3

Темновые культуры клеток мутанта T8-3 желто-оранжевые, и по окраске неотличимы от культур исходного мутанта Врс-1. Различия между ними были выявлены в условиях освещения. Оказалось, что трансформант утратил способность расти и зеленеть на свету в фототрофных (рисунок 3.33). Результаты изучения пигментного состава клеток трансформанта T8-3, исходного ревертанта Врс-8, мутанта Врс-1 и штамма дикого типа CC124, представлены в таблице 3.34. Установлено, что клетки трансформанта, также

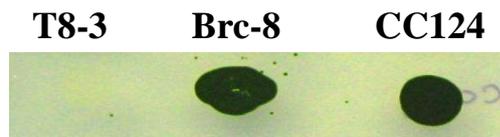


Рисунок 3.33. Рост культур клеток мутанта T8-3, ревертанта Врс-8 и штамма дикого типа CC124 на свету на среде без ацетата (Т)

как и клетки мутанта *Brc-1*, в темноте накапливают протопорфирин IX (ПП) и его магниевые производные: Mg-протопорфирин IX (Mg-ПП) и Mg-протоморфирин IX-монометилловый эфир и следовые количества хлорофиллов. Таким образом, фенотип трансформанта в темноте соответствовал фенотипу исходного мутанта *brc-1* по гену *LTS3*.

Таблица 3.34. Содержание пигментов в клетках анализируемых штаммов *C. reinhardtii**

Штамм	Генотип	Условия роста культур	Пигменты (нМоль/10 ⁹ клеток)			
			ПП	МПЭ	Пд	Хл
CC124	<i>wt</i>	свет	0,19	0,20	н	3280
<i>Brc-1</i>	<i>brc-1</i>	свет	0,37	0,67	н	2420
<i>Brc-8</i>	<i>brc-1, arg7, sup-3</i>	свет	0,2	-	н	2510
CC124	<i>wt</i>	темнота	0,3	0,20	0,8	2480
<i>Brc-8</i>	<i>brc-1, arg7, sup-3</i>	темнота	н	н	14,5	2320
<i>Brc-1</i>	<i>brc-1</i>	темнота	12,30	0,54	3,4	12,9
T8-3	<i>brc-1, arg7, sup-3, Sup-1</i>	темнота	7,5	0,35	3,5	9,3

* - в таблице даны средние значения величин, полученных в 3-6 повторностях. Во всех случаях ошибки не превышают 5%.

Обозначения (ПП – протопорфирин IX; МПЭ – магний-протопорфирин IX и его монометилловый эфир; Пд – протохлорофиллид; Хл – хлорофиллы.

н – наличие пигмента не регистрируется.

3.4.7. Гибридологический анализ штамма T8-3

Для выяснения характера наследования мутаций, обуславливающих фенотип трансформанта T8-3, были осуществлены скрещивания этого штамма на исходный мутант генотипа *brc-1* и штаммы дикого типа. Результаты изучения потомства этих скрещиваний методами тетрадного и семейного анализов представлены в таблице 3.35. Все 12 полных тетрад потомства зигот скрещивания T8-3 на штамм дикого типа CC124 в темноте демонстрировали моногенное (2 зеленых : 2 оранжевых) наследование мутации «оранжевости». Методом семейного анализа было установлено, что

в мейотическом потомстве 531 зиготы от скрещивания двух оранжевых в темноте культур: трансформанта Т8-3 и мутанта генотипа *brc-1*, все сегреганты оказались желто-оранжевыми в темноте. Отсутствие зеленых рекомбинантов свидетельствует, что штамм Т8-3 несет в своем генотипе мутацию *brc-1*, и гибриды (зиготы) гомозиготны по этой мутации.

Таблица 3.35. Гибридологический анализ штамма Т8-3*

Родители: штамм (генотип)		Семейный анализ			Тетрадный анализ				
mt-	mt+	о.	з.	о/з	2о:2з	1о:3з	3о:1з	о	з
СС124 (<i>wt</i>)	Т8-3	0	0	348	12	0	0	0	0
Вrc-3 (<i>brc-1</i>)	(<i>brc-1, sup-3, Sup-1</i>)	531	0	0	0	0	0	21	0

*указано количество выросших в темноте колоний фенотипа: о – оранжевые, з – зеленые, о/з – секторные колонии

Изучение комплементации мутантных аллелей, обуславливающих оранжевый фенотип (таблица 3.36), показало, что зеленые в темноте диплоиды формировались только при объединении в составе гибрида генома штамма Т8-3 и штаммов, несущих аллель дикого типа гена *LTS3*: СС124 и СС38. Поскольку мутантные аллели *brc-1* и *lts3* рецессивны по отношению к аллелю дикого типа, такие результаты означают, что в штамм Т8-3 несет мутантную аллель *brc-1* гена *LTS3*. В случаях, когда трансформант скрещивали с мутантами по гену *LTS3*: Вrc-1 и 62-2е, диплоиды имели мутантный фенотип, и, при этом, не росли на свету, как и штамм Т8-3. Светочувствительность таких гибридов свидетельствует о доминантном характере проявления инсерционной мутации.

Мутантные аллели гена *LTS3* не комплементируют с аллелем, обуславливающим оранжевую окраску культур трансформанта Т8-3. Наряду с отсутствием рекомбинации, эти данные свидетельствуют, что трансформант Т8-3 является обратным мутантом по гену *LTS3* (то есть несет исходную мутантную аллель *brc-1*). У штамма Т8-3 в результате инсерции оказался

Таблица 3.36. Штамм Т8-3. Комплементация инсерционной аллели

<i>Штаммы, использованные для создания диплоидов</i>					<i>Фенотип диплоидов</i>	
<i>mt (+)</i>	<i>mt (-)</i>				<i>Темнота, Среда TAP</i>	<i>Свет, среда T</i>
<i>Штамм, фенотип</i>	<i>Штамм</i>	<i>Генотип</i>	<i>Фенотип</i>			
			<i>темнота</i>	<i>свет</i>		
Т-8-3 оранжевый в темноте, не зеленеет на свету	СС124	<i>wt</i>	зеленый	зеленый	зеленый	зеленый
	Brc-1	<i>brc-1</i>	оранжевый	зеленый	оранжевый	-
	СС38	<i>ac14</i>	зеленый	зеленый, ас- *	зеленый	зеленый

*- ас- культуры не растут на среде T (без ацетата).

выключенным ген, продукт которого, по-видимому, необходим для процесса зеленения – светоиндуцированного синтеза хлорофилла. На фоне гомозиготы по мутациям в гене *LTS3* проявление инсерционной аллели, обуславливающей потерю способность к зеленению мутантов по гену *LTS3*, носит доминантный характер, - признак сохранялся у диплоидов, в геноме которых эта аллель находилась в гетерозиготном состоянии. В случае гетерозиготности по мутации в гене *LTS3*, проявление инсерционной мутации носит рецессивный характер – диплоиды, гетерозиготные по инсерции, также как и по мутации ацетатзависимости *ac-14*, способны расти на свету фотоавтотрофно - без ацетата. Вероятно, характер проявления инсерционной мутации (доминантный или рецессивный) зависит от контекста - наличие в клетке нормально функционирующего продукта гена *LTS3* – фактора транскрипции меняет характер взаимодействия аллелей гена-мишени. По-видимому, продукт гена, нарушенного вставкой (названный SUP-1), функционально активен только при наличии нормального белка *LTS3*.

Таким образом, установленное в ходе гибридологического анализа отсутствие комплементации и рекомбинации между мутацией *brc-1* и мутацией, обуславливающей оранжевую в темноте окраску клонов штамма Т8-3, свидетельствуют, что геномы обоих штаммов Brc-1 и Т8-3 содержат одну и ту же мутантную аллель гена *LTS3* – *brc-1*. Сходство пигментного

состава клеток этих штаммов служат тому подтверждением. По-видимому, у трансформанта Т8-3 инсерцией был разрушен либо ген *SUP-3*, продукт которого супрессирует мутации в гене *LTS3*, либо другой ген, продукт которого действует на более ранней, чем *SUP-3*, стадии активации зеленения. Неспособность трансформанта зеленеть на свету позволяла предполагать, что этот регуляторный фактор *SUP-1* участвует в передаче светового сигнала и необходим для адаптации клеток хламидомонады к фотоавтотрофным условиям существования. Доминантное проявление мутантной аллели *Sup-1* на фоне гомозиготы по мутациям в гене *LTS3*, свидетельствует, что оба белка – *LTS3* и *SUP-1* взаимодействуют, и белок *LTS3* необходим для реализации функции фактора *SUP-1*. Для молекулярной идентификации этого фактора, осуществили локализацию инсерции в ядерном геноме *C. reinhardtii*.

3.4.8. Поиски гена *SUP-1* в геноме трансформанта Т8-3

В поисках гена *SUP-1* в геноме *C. reinhardtii* осуществлена локализация инсерции – найдено место вставки плазмидной ДНК в геном трансформанта Т8-3. Нуклеотидные последовательности, фланкирующие инсерцию, идентифицировали методом LMS-PCR (*Ligation-mediated suppression-PCR*) (рисунок 3.34А), предложенным Олафом Крузом с соавторами [Strauss et al., 2001]. В результате экспериментов был получен фрагмент ДНК размером около 250 пн (рисунок 3.34Б), который в дальнейшем был клонирован в вектор pGEM-T (Promega, USA) и секвенирован. Геном хламидомонады расшифрован (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/Chlre4.home>), и участок ядерной ДНК, соответствующий фланкирующей инсерцию нуклеотидной последовательности AP, был обнаружен по гомологии (программа BLASTN 2.2.21). Клонированный фрагмент AP оказалась участком хромосомы 13, а инсерция в геноме штамма Т8-3 была встроена в хромосому 13 между нуклеотидами, занимающими положение: 1,194740 и 1,194741.

содержит 327 нуклеотидов ОРС и кодирует белок из 108 аминокислотных остатков.

Виртуальный белок, кодируемый геном *SUP-1*, в базе данных геномного проекта хламидомонады обозначен как ID 514329 (рисунок 3.35б). Он содержит 108 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 11,436 kDa. Для предсказания его структуры и свойств, аминокислотная последовательность белка была проанализирована с помощью программного обеспечения, доступного на сайтах NCBI, ExPASy-tool (<http://www.expasy.ch/cgi-bin/protparam>) и PBI (http://pbil.univ-lyon1.fr/). Такая «прогонка» не дала однозначных ответов на вопрос о возможных функциях SUP-1. Суммируя полученные данные, можно считать установленным, что в структуре белка много (56%) альфа спиралей (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_sopm.pl), и нет трансмембранных районов (<http://topcons.cbr.su.se>). В его последовательности не найдено хлоропластных (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP>) и митохондриальных (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot>) транзитных последовательностей, и имеется сайт фосфорилирования (в позиции 92) протеинкиназой С (PKC) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK>).

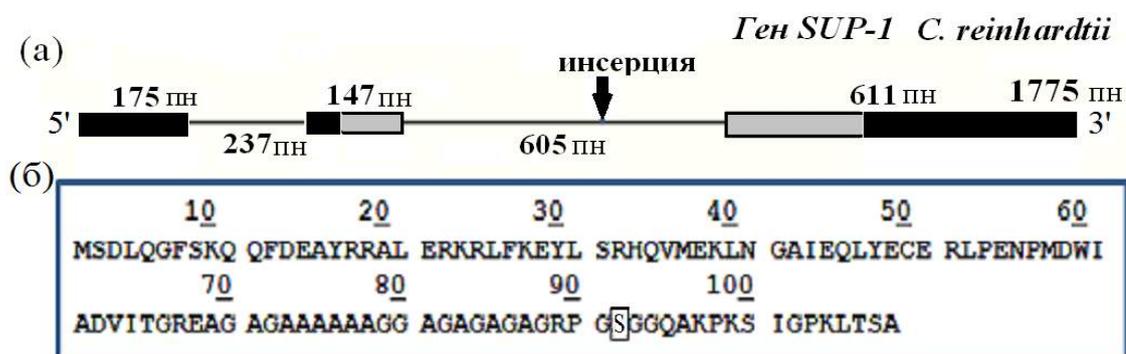


Рисунок 3.35. Структура гена *SUP-1 C. reinhardtii* - (а), и кодируемый им белок - (б). Стрелка - место инсерции в геноме штамма Т8-3. Прямоугольники - экзоны, линия - интроны. Цифры указывают размеры (пн) экзонов (вверху) и интронов (снизу). Рамкой обведен сайт фосфорилирования PKC.

Выше по течению от начала гена *SUP-I*, нуклеотидная последовательность ДНК содержит несколько GATA-элементов (рисунок 3.36), свидетельствующих о возможной регуляции транскрипции этого гена факторами транскрипции семейства GATA. Отсутствие G-боксов (CACGTG) и CRE-элементов (TGACGTCT) позволяет предполагать, что транскрипция гена не регулируется светом и источниками азота и углерода.

```
>Chlre4      chromosome_13:1192971-1193990      5'pad=0      3'pad=0      strand=+
1,192,971   TGCCTGCCCGGTCAGCGACGCTGCGCAAGTGGTGAGGCTCACGCACTAGGAGCCCCCAT      1,193,030
1,193,031   GAGCCAGACTACTAGTCTAGCACTCCTTGCCTGCGACAGCTGCTGTGCGCCTGCGCCAA      1,193,090
1,193,091   AGGCTCGCGTGGCTGTTGGCGAGGACTGGAAGCTTTCTCCTTAGGCTAAGTGGGGCAGC      1,193,150
1,193,151   GCGCCGACTGTGCTTGGGTCACTAGAATGAGCTCAAAGGATTCAAGTGGGCCAGCTTGG      1,193,210
1,193,211   ACACCAGCTGCGGTGCGGACGGAGCTCTGGCCAGCGACCGTGATAACTCTCAGGTACCG      1,193,270
1,193,271   AGTATTGCGAGTCAGGTCTATGCTATTGATAAATACCAAAGTGTCCCATCCATGGCTGTGA      1,193,330
1,193,331   GCGGCAAGTTGGTCAAGGCGCTGCGAAGCTCCGGCCGAGATGGGCTGTCCCTGAGACC      1,193,390
1,193,391   CTGAC[GATA]GACGACCAGCTCAGGGAAGCTCTGTGGCGCGCCAGCACATAATAACAGCAA      1,193,450
1,193,451   CAATAAAAGCGCACGCGGATTTTTCGCGCCACAGCCTGGTTCGTGCCAGTTCGTGAAAGACA      1,193,510
1,193,511   GCGCTGGTCTTGTGCTCCGTTTTTTCGGGCCAGCCTTCTGTGCAACCCAGCTGGGCTTTG      1,193,570
1,193,571   CGCAACCAGTGCAACTGCAAATGTTTGAAGT[GATA]TGACATTTGCATTCGCGTTGTGCGC      1,193,630
1,193,631   TTAGGCTGCTTAAATGCGGCTGCTCTGTCCGTGCCCGGTCACAAACCGGCCCTGCTT      1,193,690
1,193,691   ACCAGTCTTAGCCCATGTTACCATATGTGTTTAAAGGACAGCCGTTGGCGGGCATGGTGGAG      1,193,750
1,193,751   TTGGCAGGTTGGCACAGGTTGGATCGGTGGGGCAAAGGTGGGGTCGCTAAAAGTCCGTTGG      1,193,810
1,193,811   GGATGACACGGCCAGATTTCATGCAACTTATCCTGGTTCGCGCAGTCTAAACAGT[GATA]CC      1,193,870
1,193,871   CATCTCAACAGTAGTGACCAAATGCTTGCAGTTCAGAACTTGAAGAAGTACAAA      1,193,930
1,193,931 GTGTCCGACGGACATATAAATTTGCATTACGTAATAATCTCGCAGCTATAGCAAGTTG1,193,990
```

Рисунок 3.36. ДНК 5'-фланкирующего района выше по течению от точки начала транскрипции гена *SUP-I* (в соответствии с версией 4 геномного проекта - Chlre4). Подчеркиванием отмечены первые нуклеотиды гена. Мотивы GATA и TATC (вторая цепь) – помечены скобками.

При поиске белков, гомологичных SUP-I (программы BLASTP) в основных базах данных (nr, uniprot) удалось обнаружить только один его ортолог – предсказанный белок (D8TRZ4, EMBL GL378334) вольвокса *Volvox carteri* размером 100 аминокислотных остатков (11,49 kD) с высокой степенью сходства – более 50% идентичности. Все остальные немногочисленные (в основном, предсказанные) последовательности, найденные с помощью различных вариаций программы BLAST, имели менее 20% сходства с анализируемым белком. Среди них оказались белки-триггеры

бактерии *Legionella* и регуляторы транскрипции *AMY-1* – маленькие белки (массой 11 kDa,) – активаторы транскрипции протоонкогена - *c-Myc*, играющего ключевую роль в пролиферации клеток и апоптозе. Экспрессия гена *AMY-1*, регулируется фактором транскрипции семейства GATA [Furusawa et al., 2003]. Исходя из имеющейся информации, трудно предположить функции продукта гена *SUP-1*. Сравнение фенотипов ревертанта *Brc-8* и трансформанта *T8-3*, полученного на его основе, свидетельствует, что он необходим для реализации механизма супрессии мутантной аллели гена *LTS3*. Для ответа на вопрос, влияет ли белок *SUP-1* на транскрипцию гена *LTS3*, был проведен анализ экспрессии этого гена у трансформанта *T8-3*.

3.4.9. Экспрессия гена *LTS3* в клетках инсерционного мутанта *T8-3*

Транскрипцию гена *LTS3* в различных условиях освещения (рисунок 3.37) изучали методом ОТ-ПЦР у штамма дикого типа *CC124*, мутанта *Brc-1* по гену *LTS3* (генотипа *brc-1*), его ревертанта *Brc-8* (генотипа *brc-1,sup3*), и трансформанта *T8-3* (генотипа *brc-1,sup3,Sup-1*). В клетках штамма дикого типа, свет подавлял экспрессию гена *LTS3*, - уровень его транскриптов падал после освещения темновых культур и хорошо детектировался в клетках, выращенных на постоянном свете. Наличие ацетата в среде вело к усилению его транскрипции. Экспрессии гена *LTS3* у мутанта *Brc-1* ниже, чем у штамма дикого типа и его ревертанта *Brc-8*. У трансформанта *T8-3* в темноте и при его двухчасовой экспозиции на свету *LTS3*-транскрипты не детектировались. Более продолжительное освещение приводило к гибели клеток, что указывало на их светочувствительность.

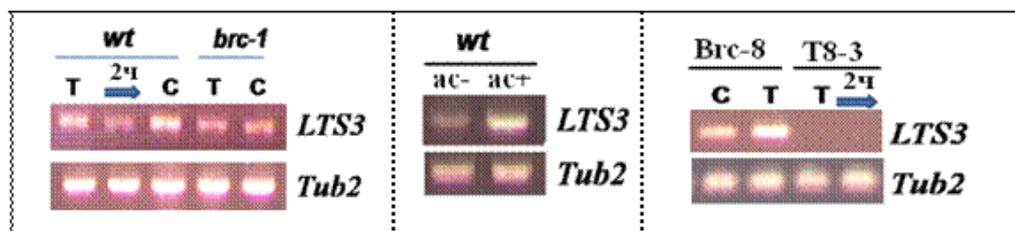


Рисунок 3.37. Экспрессия гена *LTS3* в клетках штаммов *C. reinhardtii*: Brc-8, T8-3, CC124 (wt) и Brc-1, выращенных в темноте (Т), после их освещения в течение 2 часов, и на свету (С). Контроль – экспрессия гена *Tub2*. Тотальную РНК из клеток обрабатывали ДНК-зой и проводили обратную транскрипцию ферментом М-MLV (РНК-зависимой ДНК-полимеразой) с праймерами oligo-dT. Полученные кДНК (500 нг) служили матрицами для ПЦР-амплификации гена *LTS3* с праймерами: LTS-F2 - ggg cac ttt cat ggc tcg tg; LTS-R2 - cac cgt gct act ggt gat g . Условия амплификации: 94 °С - 5 мин — 1_й цикл; 94 °С - 20 с, 63 °С - 30 с, 72 °С – 40 с — 35 циклов; 72 °С 6 мин — последний цикл. Ампликоны (10 мкл) визуализировали гель-электрофорезом в 1,2% агарозном геле в буфере TBE.

3.4.10. Активность магний-хелатазы в клетках штаммов Brc-8 и T8-3

Мутации в гене *LTS3* приводят к неспособности мутантных клеток в темноте синтезировать ХЛ и накоплению его интермедиата – протопорфирина IX (ПП) - субстрата фермента магний-хелатазы (МХ). Причиной такого фенотипа явилось резкое снижение активности этого ключевого фермента биосинтеза ХЛ. Для ответа на вопрос, как функционирует МХ в клетках анализируемых мутантов, была осуществлена оценка активности этого фермента в культурах исходного мутанта Brc-1, спонтанного ревертанта Brc-8 генотипа: *brc-1, sup-3* и обратного мутанта T8-3 генотипа: *brc-1, sup-3, sup-1* (рисунок 3.38). В клетках штамма Brc-1 отмечен низкий уровень темновой активности МХ. У ревертанта он оказался резко повышен (в 6,8 раза) по сравнению с исходным мутантом и практически вдвое (1,9 раза) по сравнению со штаммом дикого типа, растущего в темноте. Высокий уровень активности МХ сохранялся и у трансформанта T8-3. Световые культуры мутанта Brc-1 и ревертанта имели сходный уровень

активности этого фермента. Полученные результаты свидетельствуют, что у зеленого ревертанта *Brc-8* в темноте резко повышен (по сравнению с исходным мутантом *brc-1* и штаммом дикого типа) уровень активности МХ, который сохраняется у обратного мутанта Т8-3.

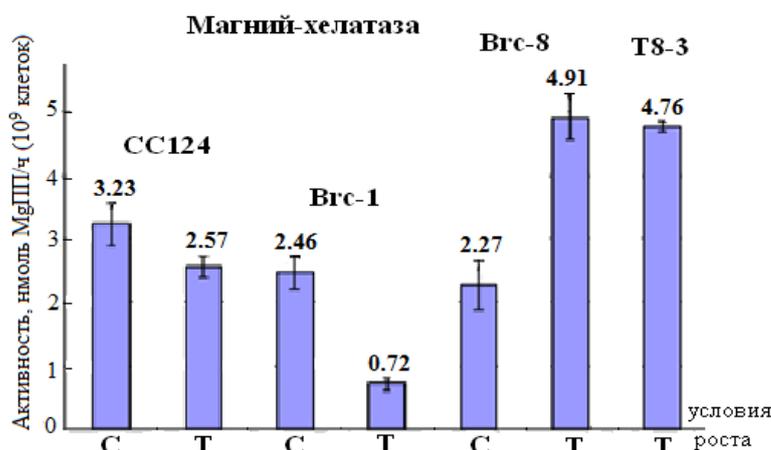


Рисунок 3.38. Активность магний-хелатазы в клетках исследуемых штаммов. Культуры штамма дикого типа CC124 и мутантов по гену *LTS3* выращивали в условиях темноты (Т) или на постоянном свете (С)

3.4.11. Обсуждение результатов

Биосинтез функциональных тетрапирролов в фотосинтезирующей клетке начинается с образования из глутамата 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), которая через серию энзиматических реакций превращается в протопорфирин IX (ПП) – общий предшественник гема и ХЛ. Первый специфический фермент биосинтеза ХЛ – магний-хелатаза (МХ) – обеспечивает превращение ПП в магний-протопорфирин IX (Mg-ПП), и представляет собой комплекс, состоящий из трех субъединиц: CHLI, CHLD и CHLN. Метилирование Mg-ПП и формирование циклопентанонового кольца завершаются последовательным образованием протохлорофиллида (ПХЛД), хлорофиллида (ХЛД) и ХЛ. До недавнего времени полагали, что способность растений и фототрофных микроорганизмов синтезировать ХЛ на свету и в

темноте зависит только от наличия двух ферментных систем, обеспечивающих превращение протохлорофиллида (ПХЛД) в хлорофиллид (ХЛД). Светозависимый катализ осуществляет НАДФН: ПХЛД-оксидоредуктаза (сПОР), находящаяся под контролем ядерного генома. Темновую реакцию катализирует ферментный комплекс тПОР, субъединицы которого кодируют 3 гена хлоропласта: *chlB*, *chlN* и *chlL*, ведущие свое происхождение от нитрогеназ эубактерий. В процессе эволюции высшие растения утратили тПОР, а более древние фотосинтетики, к числу которых принадлежит одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas (C.) reinhardtii* – модельный объект генетики фотосинтеза [Rochaix, 1995], сохранили способность синтезировать ХЛ в темноте, используя в качестве источника углерода ацетат натрия. Таким образом, независимое от света восстановление ПД у хламидомонады осуществляют продукты трех хлоропластных генов, кодирующих тПОР, и не менее восьми ядерных генов, функции которых до сих пор не ясны [Ford, 1981; Zhang, 2007]. Мутации в этих генах блокируют способность синтезировать ХЛ в темноте и обуславливают “yellow” фенотип, - бесхлорофилльные клетки водоросли, подобно этиолированным проросткам высших растений накапливают ПД, и, благодаря каротиноидам, формируют желтые колонии, зеленеющие на свету.

Клетки *C. reinhardtii*, несущие аллельные мутации (*brc-1* и *lts3*) в гене *LTS3* в темноте накапливают более ранние, чем ПХЛД, красные предшественники ХЛ – ПП и Mg-ПП, и формируют колонии оранжевого цвета, но способны зеленеть на свету. Фенотип *lts3*-мутантов свидетельствовал о наличии независимого от ПХЛД контроля темнового биосинтеза ХЛ. Молекулярная идентификация и анализ структуры гена *LTS3* показали, что он кодирует ДНК-связывающий белок семейства GATA, позволив предположить, что белок *LTS3* является фактором транскрипции, активирующим экспрессию генов магний-хелатазы в гетеротрофных условиях роста (раздел 3.3). Это означало, что у *C. reinhardtii* регуляция

темнового биосинтеза Хл осуществляется не только на этапе превращения ПХЛД, но и на более ранней стадии синтеза пигмента – путем транскрипционной регуляции генов магний-хелатазы.

С целью исследования новых, еще неизвестных молекулярно-генетических механизмов регуляции темновых процессов биосинтеза ХЛ у *C. reinhardtii* изучали супрессию мутантных признаков у спонтанного ревертанта и обратного мутанта, полученных от пигментных мутантов по гену *LTS3*. Из клеточной культуры бесхлорофильного мутанта по гену *LTS3* был отобран зеленый в темноте спонтанный ревертант Brc-8. По содержанию ХЛ его клетки практически не отличались от клеток дикого типа, выращенных в темноте (таблица 3.36). По-видимому, супрессия компенсировала потерю функций фактора *LTS3*. Она восстанавливала темновой биосинтез ХЛ, не влияя на его световую регуляцию – у ревертанта Brc-8 практически отсутствовала активация светом процесса хлорофиллообразования. Причиной способности синтезировать ХЛ у ревертанта Brc-8 стало резкое повышение активности МХ в темноте (рис. 3.38). Она семикратно превышала активность этого фермента у исходного мутанта *brc-1* и оказалась вдвое выше таковой у штамма дикого типа. На свету активность МХ у ревертанта снижалась, означая, что дополнительный путь темновой регуляции биосинтеза ХЛ репрессируемый в норме фактором SUP3, негативно регулировался светом.

Генетический анализ выявил мутационную природу супрессии – способность синтезировать ХЛ у ревертанта восстановилась в результате мутации в ядерном гене *SUP-3*, сцепленном с геном *LTS3* в хромосоме 1 *C. reinhardtii*. Наличие межгенной супрессии свидетельствовало о включении альтернативного механизма регуляции. По-видимому, фактор SUP-3 в норме репрессирует синтез ХЛ в темноте, а мутация *sup-3* блокирует эту функцию. Поскольку, по нашим данным, белок *LTS3* является транскрипционным активатором генов магний-хелатазы, мы предположили, что в случае его

дисфункции в клетках водоросли включается альтернативный механизм темновой активации экспрессии этих генов, в норме, находящийся под негативным контролем белка SUP-3. Репрессирующая активность SUP-3 чрезвычайно велика, - мутация в гене *SUP3* вела к двухкратному повышению активности МХ в темноте даже по сравнению с диким типом.

Для обнаружения дополнительных факторов активации синтеза ХЛ в темноте на основе зеленого ревертанта *Brc-8* был получен мутант *T8-3*, у которого инсерция привела к возврату фенотипа исходного мутанта *Brc-1*. Генетический анализ и изучение пигментного состава клеток *T8-3* позволили идентифицировать его генотип: *brc-1,sup-3,sup-1*, подтвердив, что оранжевый в темноте фенотип клеток *T8-3* обязан мутации *brc-1* в гене *LTS3*. Высокий уровень активности МХ, выявленный у трансформанта, сопоставимый с таковым у ревертанта *Brc-8*, указал, что эффект мутации *sup-3* сохранен в его клетках, но, при этом, инсерция заблокировала способность к зеленению.

Локализация инсерции в хромосоме 13 ядерного генома *C. reinhardtii* позволила найти ген, названный *SUP-1*, экспрессия которого была нарушена вставкой. Методами биоинформатики не удалось установить функции кодируемого им белка, состоящего из 108 аминокислотных остатков. Наличие сайта фосфорилирования протеинкиназой С (PKC) в его структуре свидетельствовало, что SUP-1 является элементом системы регуляции процессов биосинтеза ХЛ у *C. reinhardtii*. Его отсутствие у мутанта *T8-3* ведет к снижению транскрипции гена *LTS3* (рисунок 3.37) и потере способности зеленеть на свету. Взаимодействие генов *LTS3* и *SUP-1* было установлено в комплементационном тесте. Оказалось, что эффект проявления инсерционной мутации (доминантный или рецессивный) зависел от контекста, – наличие в клетке нормально функционирующего продукта гена *LTS3* меняло характер взаимодействия аллелей гена-мишени. Доминантный эффект мутантной аллели *Sup-1* на фоне гомозиготы по мутациям в гене *LTS3*, свидетельствует, что оба белка – *LTS3* и *SUP-1*

взаимодействуют, и фактор транскрипции *LTS3* необходим для реализации функции фактора *SUP-I*. Результаты измерения активности магний-хелатазы в клетках Т8-3 свидетельствуют, что в условиях *in vitro* фермент высокоактивен, но живые клетки *in vivo* не способны синтезировать ХЛ. Такой эффект можно ожидать в случае, если белок, кодируемый геном *SUP-I*, регулирует МХ на посттрансляционном уровне и для её активности необходима целостность хлоропластных мембран. Подобный эффект описан для белка *GUN4* арабидопсиса, который взаимодействует с ПП и Mg-ПП – субстратом и продуктом МХ. Он активирует этот фермент, связывая его с тилакоидными мембранами хлоропласта, и участвует в передаче сигналов из хлоропласта в ядро [Larkin et al., 2003]. Его ортолог - ген *GUN4 C. reinhardtii*, локализован в хромосоме 6 и кодирует белок размером 260 аминокислотных остатков [Formighieri et al., 2012]. Обнаруженный нами ген *SUP-I* по своей локализации в хромосоме 13 и структуре не соответствует *GUN4*, и, по-видимому, является еще одним компонентом регуляторной системы, обеспечивающей функционирование комплекса МХ в клетках *C. reinhardtii*.

Для ответа на вопрос, влияет ли белок *SUP-I* на транскрипцию гена *LTS3*, был проведен сравнительный анализ экспрессии этого гена у трансформанта Т8-3. В норме ген *LTS3* негативно регулируется светом в первые несколько часов экспозиции темновых культур, и позитивно – ацетатом, свидетельствуя о том, что функционирование его продукта необходимо клеткам *C. reinhardtii* в гетеротрофных условиях роста. Выключение гена *SUP-I* у штамма Т8-3 ведет к резкому снижению уровня *LTS3*-транскриптов (рисунок 3.37). Такой фенотип свидетельствует, что белок *SUP-I*, отсутствующий у трансформанта, по-видимому, вместе с фактором *LTS3* входит в состав регуляторной системы, контролирующей работу МХ в темноте. Продукт гена *SUP-3*, в норме подавляет иной путь активации этого фермента у хламидомонады.

3.4.12. Выводы

1. От мутанта хламидомонады *Brc-1* по гену *LTS3*, клетки которого в темноте накапливают протопорфирины и формируют оранжевые колонии, получен зеленый спонтанный ревертант *Brc-8*. Восстановление темнового биосинтеза хлорофилла у ревертанта обусловлено рецессивной ядерной мутацией в гене *SUP-3*, сцепленном с геном *LTS3*. Супрессорный эффект мутации не аллелоспецифичен.

2. Ген *SUP-3* кодирует фактор негативной регуляции активности магний-хелатазы, - эффект мутации *sup-3* состоит в усилении активности этого фермента.

3. В результате инсерционного мутагенеза ревертанта *Brc-8* генотипа: *brc-1, sup3* получен обратный мутант *T8-3*, фенотип которого в темноте соответствовал фенотипу исходного мутанта *Brc-1* по гену *LTS3*, но штамм *T8-3* утратил способность зеленеть на свету. Гибридологический анализ показал, что геномы обоих штаммов *Brc-8* и *T8-3* содержат одну и ту же мутантную аллель гена *LTS3* – *brc-1*, что подтверждается и сходством пигментного состава их клеток.

4. В геноме штамма *T8-3* инсерция картирована в хромосоме 13, и установлено, что разрушенный вставкой ген *SUP-1* размером 1775 пн, содержит два интрона – 236 пн и 605 пн. Его транскрипт размером 933 пн, включает 327 нуклеотидов ОРС и кодирует белок из 108 аминокислотных остатков. Промоторная область гена *SUP-1* содержит несколько GATA-элементов, свидетельствуя о возможной регуляции экспрессии этого гена фактором транскрипции семейства GATA - *LTS3*. Отсутствие G-боксов (CACGTG) и CRE-элементов (TGACGTCT) позволяет предполагать, что транскрипция гена не регулируется светом и источниками азота и углерода.

5. Ядерный белок, кодируемый геном *SUP-1*, участвует в поддержании высокого уровня транскрипции гена *LTS3* в темноте.

3.5. Изучение генетической регуляции биосинтеза хлорофилла на модели мутантов *C. reinhardtii* по гену *CHLH*

Мутации *chl1* и *brs-1* в ядерном гене *CHLH* большой субъединицы магний-хелатазы (МХ), блокируют работу этого фермента, приводя к накоплению небольших количеств его субстрата - протопорфирина IX (ПП) [Чекунова и Квитко, 1986; Chekounova et al., 2001]. Неспособность к синтезу значительных количеств ПП обусловлена механизмами регуляции биосинтеза хлорофилла (ХЛ), которые предотвращают накопление в клетках зеленых водорослей и высших растений свободных фотоактивных порфиринов путем ретроингибирования или репрессии первого интермедиата ХЛ 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК) гемом или ПХЛД. Для поиска новых регуляторных механизмов, контролирующих уровень содержания фототоксичных интермедиатов ХЛ у хламидомонады, исследованы мутанты с нарушениями такой регуляции. Они были получены на основе оранжевых в темноте, не имеющих ПХЛД мутантов по гену *CHLH* как двойные мутанты, клетки которых накапливают ПП в количестве, сравнимом с уровнем содержания ХЛ у штаммов дикого типа, и формируют тёмно-коричневые клоны. В результате их генетико-биохимических исследований найдена новая хлоропластная мутация *mod-u-25*, которая приводит к сверхпродукции по ПП в клетках двойных мутантов *C.reinhardtii* генотипа: *chl1,mod-u-25* за счет усиления синтеза АЛК [Чекунова и др., 1993]. Отсутствие в клетках коричневых мутантов характерной для *chl1*-мутантов темновой репрессии транскрипции генов: *CHLH*, *GTR* и *SABII*, кодирующих белки МХ, АЛК-синтезирующего комплекса и светособирающего комплекса ФС2 свидетельствует, что продукт гена *Mod-u-25* задействован в регуляции пути передачи сигналов из хлоропласта в ядро.

3.5.1. Получение и описание коричневых мутантов хламидомонады

После обработки УФ-лучами (254 нм) мутантов по гену *CHLH* *S. reinhardtii* и последующего многоступенчатого отбора, направленного на селекцию наиболее темно-окрашенных коричневых клонов, были получены штаммы, клетки которых содержали в условиях гетеротрофного роста более чем в 20 раз больше протопорфирина IX (ПП), чем одиночный мутант *chl1* (таблица 3.37). Из этой группы для дальнейших исследований выбрали штамм Н-19-25, способный накапливать максимальное количество ПП (рисунок 3.39). Для выяснения генетической природы мутации, приведшей к избыточному накоплению ПП - фототоксичного интермедиата биосинтеза ХЛ, был осуществлен его гибридологический анализ.

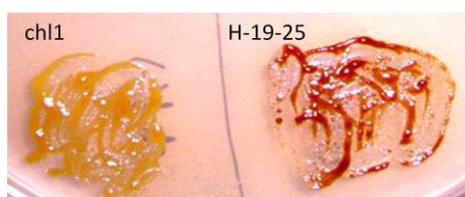


Рисунок 3.39. Культуры исследуемых мутантов, растущие гетеротрофно

Таблица 3.37. Продуктивность по протопорфиру IX (ПП) коричневых мутантов хламидомонады

Шифр штамма	Генотип исходного штамма	Доза УФ-лучей (дж/м ²)	Продуктивность по ПП (μмоль/10 ⁹ кл)
1515-19В	<i>chl1-19,mt -</i>	0	0,194±0,093
Н-19-4	- // -	20	3,142±0,0123
Н-19-5	- // -	25	3,215±0,0107
Н-19-10	- // -	50	3,543±0,0145
Н-19-25	<i>mt-</i>	250	4,593±0,0321
1514-7В	<i>chl1,mt+</i>	0	0,177±0,0041
К-1514-7В	- // -	250	3,940±0,0068

3.5.2. Гибридологический анализ коричневых мутантов

Наследование мутации, определяющей высокий уровень синтеза ПП у мутантов по гену *CHLH*, изучали методом гибридологического анализа – исследуя потомство зигот, сформированных при скрещивании коричневых мутантов со штаммами дикого типа и исходными мутантами генотипа *chl1* (таблицы: 3.38, 3.39). В тетрадном анализе потомства скрещивания коричневого мутанта Н-19-25 (*mt-*) на штамм дикого типа (С1525) только 2 из 42 полных тетрад содержали коричневые клоны (табл. 3.38). Сегреганты большинства тетрад (30 из 42) демонстрировали отсутствие коричневой окраски и менделевское расщепление по мутации *chl1* (2 ор. : 2 зел.). Напротив, в составе большинства тетрад (20 из 24) реципрокного скрещивания (С1712) появлялись коричневые колонии. Исчезновение в потомстве признака, который нес родитель типа спаривания *mt(-)*, и преимущественная его передача от родителя *mt(+)* давали основание предположить внеядерную – хлоропластную локализацию изучаемой мутации, получившей название *mod-u-25*. Характер ее наследования проверяли и методом семейного анализа, когда мейотическое потомство зиготы формирует одну колонию (табл. 3.39). Этот метод был использован при учете расщепления в потомстве скрещиваний коричневого мутанта с исходными мутантами по гену *CHLH*, поскольку низкая выживаемость зигот (0,6 % – 1.1%) не позволяла применить тетрадный анализ. Штамм Н-19-25 *mt(-)* передает по наследству маркер *mod-u-25* с низкой частотой – исключительные зиготы (зиготы, в которых цитоплазматические маркеры передаются от родителей обоих типов спаривания) составляют 0,46% - 0,56% (таблица 3.38). В случае реципрокного скрещивания (С1531) мутация *mod-u-25* передается потомству в 86% зигот. Тетрады, в которых все 4 потомка формировали зеленые колонии, оказались митотическим потомством вегетативных диплоидов - средний объем их клеток (около 208

мкм) и единообразие по типу спаривания - все *mt(-)* соответствовали критериям диплоидности клеток хламидомонады [Harris, 1989].

Таблица 3.38. Тетрадный анализ мейотического потомства зигот скрещиваний коричневых мутантов хламидомонады на штаммы дикого типа

Номер скрещивания	Генотипы родителей		Число полных тетрад с расщеплением:					Передача признака от <i>mt(+)</i>
	<i>mt(+)</i>	<i>mt(-)</i>	2 зел : 2 ор	2 зел : 2 кор	4 зел	2 зел : 1 ор : 1 кор.	∑	
1525	<i>wt</i>	<i>chl1, mod-u-25</i>	30	2	10	0	42	4,75%
1712	<i>chl1, mod-u-25</i>	<i>wt</i>	1	20	4	0	25	96%

Таблица 3.39. Семейный анализ потомства зигот от скрещиваний коричневых мутантов на штаммы дикого типа и мутанты по гену *CHLH*

Номер скрещиван	Выживаемость (%)	Генотипы родителей		Число колоний:							Исключительные
		<i>mt(+)</i>	<i>mt(-)</i>	ор.	кор.	зел.	секторные			∑	
							кор./ор.	кор./зел.	ор./зел.		
1525	34	<i>wt</i>	<i>chl1, mod-u-25</i>	1	1	51	0	0	391	455	0,46
1527	0,6	<i>chl1</i>	<i>chl1, mod-u-25</i>	8520	38	0	10	0	0	8568	0,56
1531	1,1	<i>chl1, mod-u-25</i>	<i>chl1</i>	84	630	0	18	0	0	732	13,9

Из потомства исключительной зиготы - тетрады 1712-1, в которой наблюдали расщепление по окраске колоний: 2 кор. : 2 зел., были отобраны для дальнейших исследований зеленые клоны: 1712-1б и 1712-1в, которые, в соответствии с правилами однородительского наследования хлоропластных маркеров, должны нести мутацию *mod-u-25* на фоне аллели дикого типа гена *CHLH*.

3.5.3. Влияние мутации *mod-u-25* на синтез АЛК

Приступая к изучению регуляторных коричневых мутантов хламидомонады, мы, прежде всего, предполагали выяснить, влияет ли мутация *mod-u-25*, приводящая к усиленному накоплению ПП клетками мутанта *chl1* хламидомонады, на синтез АЛК. Относительную активность ферментов, синтезирующих АЛК, у мутантов и штамма дикого типа определяли, измеряя количества АЛК, которые клетки накапливают при обработке их сублетальными дозами левулината кальция (ЛК) – конкурентного ингибитора АЛК-дегидратазы, по известной методике [Milleret. al., 1979], предварительно адаптировав её для хламидомонады. Для подбора сублетальных для *C. reinhardtii* доз ЛК, мы оценили его ингибирующее действие (таблица 3.40) на штаммы хламидомонады в условиях гетеротрофного роста, и установили, что для одиночных мутантов генотипа: *chl1* и *lts3* по генам *CHLH* и *LTS3*, соответственно, а также штамма дикого типа, сублетальный эффект достигается при концентрации

Таблица 3.40. Влияние левулината кальция (ЛК) на штаммы хламидомонады

Шифр штамма (тип спаривания)	Генотип	Рост клеток на среде TAP с ЛК в концентрации (mM):						
		0	0,1	1	2	4	8	10
137C(+)	<i>wt</i>	+	+	+	+	+/-	-	-
1482-2e (+)	<i>chl1-19</i>	+	+	+	+	+ -	-	-
1515-19В (-)	<i>or2/5</i>	+	+	+	+	+/-	-	-
H-19 (-)	<i>chl1-19</i>	+	+	+	+	+/-	-	-
H-19-25 (-)	<i>chl1-19</i>	+	+	+	+	+/-	+/-	+/-
1481-1В	<i>lts3</i>	+	+	+	+	+/-	-	-
1486-18В	<i>lts3,ery3</i>	+	+	+	+	+/-	-	-
Brs-1 (+)	<i>brs-1</i>	+	-	-	-	-	-	-
Brc-1 (+)	<i>brc-1</i>	+	-	-	-	-	-	-

*Примечания: (+) – означает наличие роста, (-) – его отсутствие; (+/-) – слабое ингибирование; *wt.* – дикий тип; * - штамм несет ещё мутацию *mod-u-25*

ЛК равной 4 мМ. Мутанты *brs-1* и *brc-1* оказались наиболее чувствительными к ЛК и гибнут при его концентрации в 0,1 мМ.

Измерения относительной активности АЛК-синтезирующих ферментов (таблица 3.41) показали, что в клетках коричневых штаммов с высоким уровнем накопления ПП примерно вдвое (по сравнению с одиночным мутантом *chl1* и штаммом дикого типа) увеличено содержание АЛК. Мутантная аллель *mod-u-25* на фоне мутации *lts3* по гену *LTS3* и в отсутствии других мутаций также ведет к усилению синтеза АЛК. Таким образом, эффект мутации *mod-u-25* состоит в усилении активности комплекса ферментов, синтезирующих АЛК.

Таблица 3.41. Относительная активность АЛК-синтезирующих ферментов и накопление хлорофилла (ХЛ) и протопорфирина IX (ПП) у анализируемых штаммов хламидомонады

Генотип	Фенотип	Накопление ХЛ и его предшественников:		
		АЛК (нМ/10 ⁷ кл)	ПП (μМ/10 ⁹ кл)	Хлорофилл (μМ/10 ⁹ кл)
<i>wt</i> (свет)	зеленая	3,01±0,041	н.о.	4,12±0,046
<i>wt</i>	зеленая.	2,14±0,041	н. о.	3,46±0,002
<i>chl1</i>	оранжевая	2,58±0,054	0,182±0,0037	0,001
<i>chl1,mod-u-25</i>	коричневая	5,33±0,058	4,593±0,0321	0,007
<i>chl1,mod-u-25</i>	коричневая	5,18±0,012	4,314±0,0042	0,005
<i>mod-u-25</i>	зеленая	3,10±0,035	н.о.	3,516±0,008
<i>lts3</i>	оранжевая	1,70±0.014	0,049±0,002	0,015
<i>lts3,mod-u-25</i>	коричневая	3,36±0.027	1,337±0,016	0,017

Примечания: относительная АЛК-синтезная активность определяется количеством АЛК, которое клетки накапливают при обработке сублетальными дозами ЛК (4мМ); обозначения: зел. – зеленая, ор. – оранжевая, кор. – коричневая окраска колоний; н. о. – не обнаружено.

Метаболическая регуляция биосинтеза хлорофилла у высших растений и зеленых водорослей осуществляется гемом и протохлорофиллидом (ПХЛД) путем обратного ингибирования или

репрессии АЛК – первого общего специфического интермедиата биосинтеза порфиринов [Tanaka, 2007]. Клетки мутантов по гену *CHLH* не содержат ПХЛД. Рассматривая другие возможности изменения регуляции, мы предположили, что мутация *mod-u-25* либо снижает чувствительность АЛК-синтетазной системы клетки к другому его ингибитору – гему, ослабляя регуляторное воздействие последнего, либо блокирует синтез гема из молекулы ПП, уменьшая, тем самым, уровень содержания этого ингибитора. Для проверки первого предположения определяли зависимость относительной активности АЛК-синтезирующих ферментных систем анализируемых клеток от дозы ингибитора, оценивая, тем самым, их чувствительность к гему. На рисунке 3.40 видно, что экзогенный гем в концентрации 5 μM вызывает снижение примерно на 50% АЛК-синтетазной активности клеток всех анализируемых штаммов. По-видимому, синтез АЛК у двух проверенных мутантов генотипа: *chl1* и *chl1,mod-u-25*, также как и у штамма дикого типа, одинаково чувствителен к подавлению гемом. Следовательно, действие мутации *mod-u-25* не связано с понижением чувствительности АЛК-синтезирующих ферментов в клетках хламидомонады, мутантных по гену *CHLH*, к ингибированию гемом. Причиной ослабления ингибирующего действия гема на комплекс ферментов, синтезирующих АЛК, может быть и уменьшение его количества в клетке. Гем (протогем) синтезируется непосредственно из ПП ферментом гем-синтетазой (Fe-хелатазой), который осуществляет включение железа в молекулу ПП. Измерение накопления протогема у штамма дикого типа и анализируемых мутантов показало (таблица 3.42), что относительное содержание гема в клетках дикого типа и двух одиночных мутантов одинаково. Это означает, что мутация *mod-u-25* не влияет на активность ферментных систем, контролирующих уровень гема в клетках хламидомонады. У двойного мутанта уровень свободного протогема увеличен вдвое, как и уровень накопления АЛК (таблица 3.42).

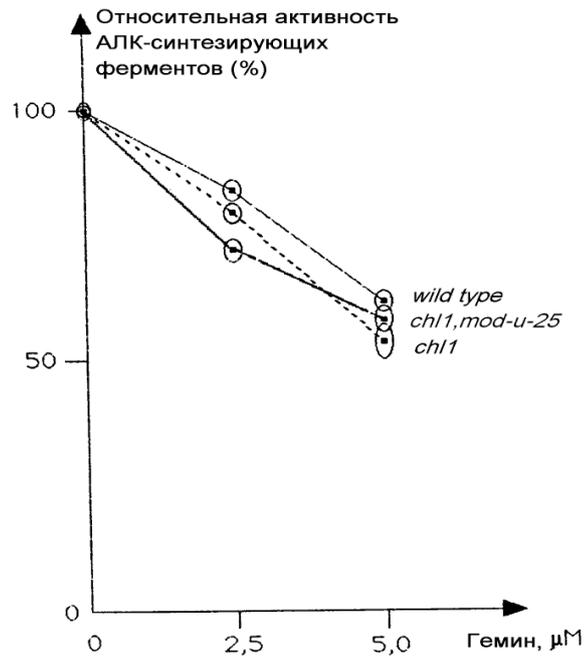


Рисунок 3.40. Зависимость активности АЛК-синтезирующих ферментов от концентрации гема. Клетки мутантов и дикого типа обрабатывали гемином (Sigma), вводя его экзогенно в культуральную среду в виде 2,5 μM раствора в смеси: 0,05М КОН- 96% этанол (1 : 1 по объему) [Hoover et. al., 1981], и измеряли содержание в них АЛК после 24 часов культивирования в темноте

Таблица 3.42. Содержание протогема в клетках мутантов *S. reinhardtii*

<i>Генотип</i>	<i>Фенотип</i>	<i>Гем</i> ($\text{nM}/10^9 \text{ кл}$)
<i>wt</i>	зеленая	12,625 \pm 2,265
<i>chl1</i>	оранжевая	11,215 \pm 0,225
<i>chl1, mod-u-25</i>	коричневая	25,345 \pm 2,115
<i>mod-u-25</i>	зеленая	11,038 \pm 1,256

3.5.4. Фенотипический эффект мутации *mod-u-25*

В поисках самостоятельного фенотипического проявления мутации *mod-u-25*, которая приводит к усилению синтеза АЛК, мы исходили из предположения, что мутанты хламидомонады, имеющие повышенную АЛК-синтетазную активность, должны обладать и повышенной устойчивостью к

левулиновой кислоте (ЛК). Проверка изучаемых штаммов хламидомонады на устойчивость к этому конкурентному ингибитору АЛК показала, что мутация *mod-u-25* обуславливает устойчивость к 10 мМ ЛК, губительной для клеток дикого типа и одиночных мутантов по генам *CHLH* и *LTS3* (таблица 3.43). Коричневые двойные мутанты (*chl1,mod-u-25*), сегрегант зеленого диплоида 1525-1а, имеющий гибридный хлоропласт (*mod-u-25/+*), и зеленые гаплоиды: 1712-1б и 1712-1в (генотипа: *mod-u-25*) – все оказались устойчивы к ЛК в концентрации 10 мМ.

Таблица 3.43. Устойчивость к леулинату (ЛК) штаммов, несущих мутацию *mod-u-25*

Шифр штамма (mt)	Фенотип	Генотип	Рост культур на среде с ЛК(мМ)			
			1 мМ	4мМ	10мМ	15мМ
137С(+)	зеленый	<i>wt</i>	+	+/-	-	-
1482-2е (+)	оранжевый	<i>chl1</i>	+	+ -	-	-
1515-19в (-)	оранжевый	<i>chl1</i>	+	+/-	-	-
*Н-19-25 (-)	коричневый	<i>chl1,mod-u-25</i>	+	+/-	+/-	-
1528-2 (+)	коричневый	<i>chl1,mod-u-25</i>	+	+/-	+/-	-
1712-1а (+)	коричневый	<i>chl1,mod-u-25</i>	+	+/-	+/-	-
1712-1б (-)	зеленый	<i>mod-u-25</i>	+	+/-	+/-	-
1712-1в (+)	зеленый	<i>mod-u-25</i>	+	+/-	+/-	-
1525 -1а (-)	зеленый	<i>chl1/+,mod-u-25/+</i>	+	+/-	+/-	-

Наследование признака устойчивости к 10 мМ ЛК изучали методом гибридологического анализа. Потомство зигот скрещиваний зеленых, устойчивых к ЛК штаммов: 1712-1б и 1712-1в (генотипа: *mod-u-25*) на штаммы дикого типа (таблица 3.44) было проверено на устойчивость к леулинату кальция (ЛК+), и выяснилось, что этот признак наследуется по однородительской схеме – от родителя *mt(+)* как хлоропластный детерминант. Результаты гибридологического анализа свидетельствуют, что *mod-u-25*–мутантная аллель хлоропластного гена. Эта мутация приводит к

усилению синтеза АЛК - первого общего интермедиата биосинтеза ХЛ и гема, и может быть тестирована по устойчивости клеток к 10 mM ЛК.

Таблица 3.44. Тетрадный анализ потомства скрещиваний устойчивых к левулилату (ЛК) мутантов (*mod-u-25*) на штаммы дикого типа

Номер скрещивания	генотип родителей		Число полных тетрад с расщеплением:				Передача признака от <i>mt(+)</i>
	<i>mt(+)</i>	<i>mt(-)</i>	4ЛК-	2ЛК+ : 2ЛК-	4ЛК+	Σ	
1715	<i>wt</i>	<i>mod-u-25</i>	9	1	0	10	10%
1717	<i>mod-u-25</i>	<i>wt</i>	0	5	20	25	80%

клоны, устойчивы к ЛК - ЛК+; чувствительные к ЛК - ЛК- .

3.5.5. Влияние *mod-u-25* на экспрессию генов *HSP70A* и *CabII*

На модели изучения индуцированной светом экспрессии гена *CABI* (другое название – *LHCBP*) белка светособирающего хлорофилл *a/b* комплекса хлоропласта, установлено, что в норме, при деструкции хлоропласта экспрессия ядерных генов, кодирующих белки хлоропласта, подавляется [Mayfield and Taylor, 1984]. У хорошо изученных регуляторных мутантов арабидопсиса, названных *gun(1-5)* (*genomes uncoupled*), транскрипция этих ядерных генов сохраняется (в отличие от нормальных растений) в условиях фотодеструкции хлоропластов – при освещении проростков, обработанных норфлуроазоном (НФ) - ингибитором биосинтеза каротиноидов [Larkin and Ruckle, 2008]. Тетрапирролы: гем и магний-протопорфирин IX рассматриваются в качестве сигнальных молекул хлоропласта, влияющих на экспрессию генов ядра. Довольно подробно изучено влияние света и порфиринов на экспрессию ядерного гена *HSP70A* белка теплового шока – одного из 9 белков хламидомонады, подобных *HSP70* [Müller et al., 1992]. Установлено, что транскрипция *HSP70A* в клетках дикого типа хламидомонады, выращенных в темноте, активируется

магний-протопорфирином IX и гемом также, как и в случае их переноса на свет [Kropat et al., 1997; von Gromoff, 2008]. Изучение влияния света на экспрессию этого гена (рисунок 3.43) в клетках мутантов по гену *CHLH* показало, что у двойного мутанта генотипа: *chl1,mod-u-25* в отличие от одиночного (*chl1*) и штамма дикого типа в темноте уровень транскриптов гена *HSP70A* сходен с таковым при световой индукции. Такая же картина наблюдается и в клетках мутанта *brs-1*.

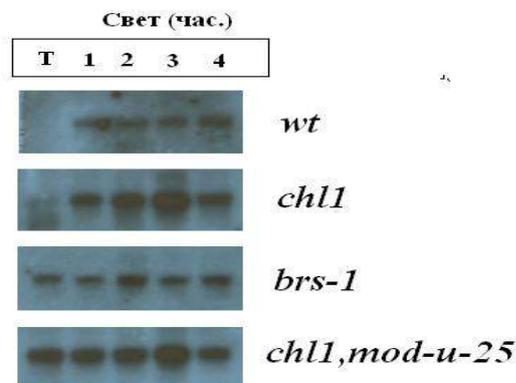


Рис. 3.43. Экспрессия гена *HSP70A* у штаммов *C. reinhardtii* указанных генотипов. Нозерн блот гибридизация проведена с пробой, специфичной для гена *HSP70A*, описанной как *HSP70-2* (von Gromoff, et al., 1989)

Подобная закономерность (отсутствие темновой репрессии) характерна и для транскриптов гена *CABII* (в современной номенклатуре - *LHCBP1* – GeneID: 5725483), кодирующего хлорфилл *a/b*-связывающие белки, ассоциированные с фотосистемой 2 [Savard et al., 1996]. Введение экзогенного магний-протопорфирина IX в условиях темнового роста не оказывает видимого влияния на экспрессию гена *CAB2* (рисунок. 3.44) Таким образом, изучение влияния мутации *mod-u-25* на транскрипцию генов: *HSP70A* и *CABII* показало, что в отличие от штаммов дикого типа и мутанта *chl1*, экспрессия этих генов у двойного мутанта *chl1,mod-u-25*,

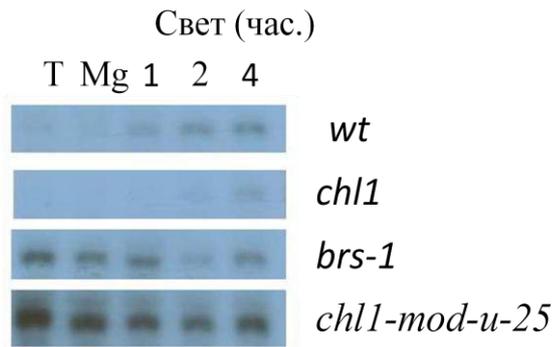


Рис. 3.44. Влияние магний-протопорфина IX (Mg) и света на экспрессию гена *CABII*. Аликвоты РНК (20 мкг) из клеток штамма дикого типа (*wt*) и мутантов, растущих в темноте (Т), после добавления экзогенного Mg-ПП (8 мМ) в течение 1 часа (Mg), и после переноса их на свет. Нозерн-блот гибридизацию проводили с пробой PHS16, специфичной для РНК гена *CabII*.

также как и у мутанта *brs-1* не подавлена в темноте, то есть они имеют *gun*-фенотип. Поскольку *gun*-фенотип характеризует нарушения в системе передачи сигналов из хлоропласта в ядро, предположили, что фактор, кодируемый хлоропластным геном *Mod-u-25*, по-видимому, задействован в регуляции транскрипции анализируемых генов, - в условиях деструкции хлоропласта, он участвует в подавлении экспрессии генов биосинтеза ХЛ и HSP70A.

Тот факт, что клетки двойных мутантов генотипа *chl1,mod-u-25* в темноте демонстрируют сверхпродукцию АЛК и ПП, послужили поводом проверить в них уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты синтеза этих интермедиатов биосинтеза ХЛ: *GTR* (глутамил-тРНК-редуктазы) и *CHLH*—большой субъединицы МХ (рисунок 3.45). У штамма дикого типа (*wt*) экспрессия обоих генов активируется светом, а экзогенный Mg-ПП усиливает в темноте транскрипцию гена *GTR*, но не *CHLH*. Уровень содержания транскриптов этих генов в клетках двойного мутанта (*chl1,mod-u-25*) в условиях темнового роста оказался не ниже такового в условиях освещения.

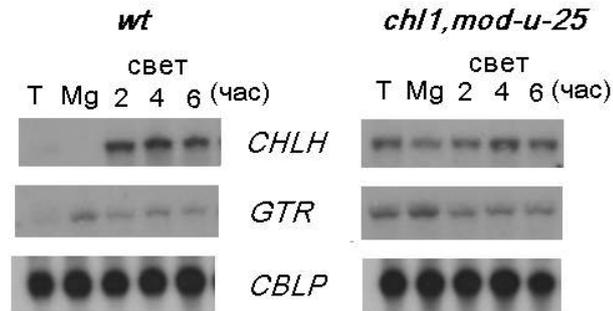


Рис. 3.45. Экспрессия генов: *CHLH* и *GTR* в клетках дикого типа (*wt*) и двойного мутанта (*chl1,mod-u-25*). Нозерн блот гибридизация проведена с пробами, специфичными для РНК указанных генов. *CBLP* - контроль

Подобные результаты можно трактовать либо как отсутствие световой индукции анализируемых генов (как часто трактуется в литературе), или как отсутствие репрессии (в норме) транскрипции этих генов в темноте. Вторым вариантом, нам представляется, более точно отражает наблюдаемую картину. Влияние изучаемой аллели хлоропластного гена *mod-u-25* на экспрессию анализируемых генов состоит, по-видимому, в блокировании механизма регуляции, направленного на снижение накопления фототоксичных протопорфиринов в фотосинтезирующих клетках путем репрессии транскрипции генов, ферментов синтеза ХЛ.

3.5.6. Обсуждение результатов

Центральную роль в регуляции биосинтеза ХЛ играют механизмы контроля функциональной активности ферментов, синтезирующих АЛК. Анализ пигментных мутантов фотосинтезирующих организмов позволил выяснить, что эта регуляция осуществляется порфириновыми интермедиатами (протохлорофиллидом и гемом) путем ретроингибирования и репрессии синтеза АЛК. Хлорофильные оранжевые мутанты *C. reinhardtii*, накапливающие протопорфирин IX (ПП) удобны для изучения такой

регуляции, поскольку возможность накопления у них достаточно высоких уровней ПП обусловлена генетическим блоком превращения ПП в протохлорофиллид (ПХЛД) и, как следствие, отсутствием в их клетках ПХЛД – ретроингибитора синтеза АЛК. У полученного нами в результате УФ-мутагенеза мутанта *chl1* коричневого штамма Н-19-25 усиление продуктивности по ПП связано с увеличением уровня накопления АЛК, и, по-видимому, является следствием нарушения регуляции её синтеза. Мутация *mod-u-25*, приводящая к усилению активности синтеза АЛК (вдвое) на фоне мутантных аллелей генов *CHLH* и *LTS3*: *chl1* и *lts3*, имеет фенотипическое проявление – окраска колоний изменяется от оранжевой (у одиночных мутантов) до коричневой (у двойных мутантов). Также, мутантная аллель *mod-u-25* обуславливает устойчивость несущих ее клеток к левулиновой кислоте (ЛК) в концентрации 10 mM - летальной для клеток с аллелью дикого типа.

Энди Ванг [Wang, et al., 1975, 1977, Huang and Wang, 1986], изучая регуляцию синтеза АЛК у хламидомонады, использовал мутант *brs-1*, накапливающий ПП, для получения более продуктивных по ПП штаммов, с нарушенной регуляцией. Были обнаружены два типа коричневых двойных мутантов: равно чувствительные (как дикий тип или одиночный мутант) – *brs-1, r1* и менее чувствительные – *brs-1, db10* к ингибированию гемом, что и позволило выделить два типа регуляции - аллостерическая и генетическая [Huang and Wang, 1986]. Мы показали, что мутаций: *brs-1* и *chl1* аллельны и затрагивают ген *CHLH* большой субъединицы магний-хелатазы (МХ). Однако, мутанты *brs-1* и *chl1* различаются по устойчивости к ЛК, отражающей уровень накопления АЛК (таблица 3.44). Так, мутант *brs-1* обладает пониженным уровнем активности АЛК-синтезирующих ферментов (24%) по сравнению со штаммом дикого типа, а у двойного мутанта: *brs-1, r1* он восстанавливается до уровня дикого типа [Wang, et al., 1975]. Мутация *mod-u-25* по нашим данным не влияет на чувствительность

ферментов синтеза АЛК к ингибированию гемом и не затрагивает реакцию образования гема из ПП в отличие от описанных Э. Вангом мутаций: *r1* и *db10* [Wang et al., 1977]. Сцепленное повышение в клетках двойного мутанта уровней накопления АЛК и гема может свидетельствовать об увеличении в результате этой мутации числа полиферментных комплексов, участвующих в синтезе порфиринов.

В отличие от ядерной локализации мутации *r1*, осуществленный нами гибридологический анализ двойных мутантов *chl1,mod-u-25* выявил хлоропластную природу мутации *mod-u-25*. В отсутствие мутаций в ядерном гене *CHLH*, хлоропластный детерминант *mod-u-25* усиливает активность АЛК-синтезирующих ферментов на 40%, не влияя на содержание ХЛ. У одиночного мутанта *chl1* синтез АЛК немного увеличен (по сравнению с диким типом), что может быть связано с отсутствием в их клетках ПХЛД – ингибитора синтеза АЛК. Сам факт локализации мутации, затрагивающей регуляцию синтеза АЛК, в хлоропластном геноме представляется крайне интересным в плане формирования представлений о роли ядерных и хлоропластных генов в процессе биосинтеза ХЛ и биогенеза хлоропластов. Известен один пластидный детерминант, непосредственно участвующий в синтезе АЛК - это ген, кодирующий глутаминовую тРНК (*trnE*). Все организмы, утилизирующие глутамат с образованием АЛК делают это с использованием тРНК^{Glu} [Kannangara et al., 1988]. Роль этой транспортной РНК состоит в обеспечении координированной регуляции хлоропластного и цитоплазматического белкового синтезов во время формирования пластид. Геном хлоропласта *S. reinhardtii* секвенирован, и локализация мутации *mod-u-25* в её хлоропластной ДНК в дальнейшем еще предстоит.

Взаимодействие ядра и хлоропластов фотосинтезирующей клетки обеспечивается двойной системой генетической регуляции: кодируемые ядром белки и цитоплазматические факторы, поступая в хлоропласт, влияют

на экспрессию генов хлоропласта, а сигналы, генерируемые хлоропластом, регулируют экспрессию генов ядра (ретроградный контроль). Многочисленные исследования посвящены изучению кодируемых ядром молекул, влияющих на экспрессию генов хлоропласта. Активно ведутся поиски факторов пластид, так называемых «сигнальных молекул» хлоропластного происхождения, которые регулируют экспрессию ядерных генов [Кулаева, 2001; Юрина и Одинцова, 2012; Ruckle, et al., 2007]. У мутантов растений и зеленых водорослей с нарушениями функций хлоропластов, экспрессия ядерных генов, кодирующих белки фотосинтеза, репрессирована [Mayfield and Taylor, 1984]. Впервые этот феномен был описан при изучении пигментных мутантов ячменя *albostrains* и *Saskatoon*, листья которых имели белую или крапчатую (с белыми участками) окраску [Bradbeer et al., 1979]. Их хлоропласты были лишены рибосом, а активность кодируемых ядром генов биосинтеза ХЛ, - подавлена. Мутанты растений, лишённые каротиноидов, - основных фотопротекторов клетки, демонстрировали сходный фенотип: под воздействием света у них, в результате индуцированного хлорофиллами фотоокисления, разрушаются тилакоидные мембраны хлоропластов, и резко снижается уровень транскрипции ядерных генов: *CAB* и *RBCS* - малой субъединицы *Rubisco* [Oelmuller, 1989]. Тот же эффект наблюдали при освещении растений дикого типа, обработанных норфлюразоном (НФ) - ингибитором биосинтеза каротиноидов [Taylor, 1989] или антибиотиком линкомицином, который подавляет трансляцию в хлоропластах [Ruckle et. al., 2007].

Факты подавления экспрессии ядерных генов биосинтеза ХЛ в ответ на блокирование функций хлоропластов объясняли существованием пластидных факторов - сигнальных молекул, которые продуцирует хлоропласт для регуляции (позитивно или негативно) транскрипции ядерных генов [Batschauer et. al., 1989]. В роли «пластидного фактора» могут выступать предшественники ХЛ. Впервые эта гипотеза была

проверены при сравнительном изучении экспрессии гена *CAB1* у бесхлорофильных мутантов зеленой водоросли хламидомонады: *brs1*, *brc1* и *y-1*, накапливающих интермедиаты биосинтеза ХЛ: протопорфирин IX (ПП), Mg-ПП и ПХЛД, соответственно [Johanningmeier and Howell, 1984]. В экспериментах также использовали штаммы дикого типа, которые после обработки ингибиторами: левулиновой кислотой и α,α -дипиридиллом накапливали, соответственно, аминолевулиновую кислоту (АЛК) и Mg-ПП-монометилловый эфир (Mg-ППМЭ). Результаты экспериментов демонстрировали, что избыточное содержание только одного интермедиата - Mg-ПП вело к ингибированию световой индукции экспрессии гена *CAB1*. Мутанты хламидомонады *brs1* и *brc1* также были использованы в экспериментах Я. Кропат при изучении влияния ПП и Mg-ПП на экспрессию генов белков теплового шока: *HSP70A* и *HSP70B* [Kropat et. al., 1997]. В работе было показано, что экзогенный ПП подавляет индуцированную светом транскрипцию этих генов, а накопление Mg-ПП в темноте напротив, стимулировало (подобно свету) их экспрессию.

У растений и водорослей биосинтез ХЛ осуществляется в хлоропласте, а большинство энзимов, вовлеченных в этот процесс, кодируются ядром и синтезируются в цитоплазме. Для оптимизации этого процесса необходим строго координированный контроль уровня экспрессии ядерных генов в ответ на метаболические сигналы и факторы внешней среды. Механизмы взаимодействия геномов ядра и хлоропласта изучали на мутантах арабидопсиса по ретроградному контролю, названных *gun(1-5)* (*genomes uncoupled*) [Susec et. al., 1993]. У этих мутантов транскрипция ядерных генов, кодирующих белки хлоропласта: *CAB* и *RBCS*, сохраняется (в отличие от нормальных растений) в условиях фотодеструкции хлоропластов – при освещении обработанных УФ проростков. Гены, затронутые *gun*-мутациями, кодируют белки, участвующие в биосинтезе тетрапирролов. Мутация *gun5* представляет собой замену нуклеотидов (С-Т)

в гене *CHLH* большой (Н) субъединицы МХ которая ведет к замене аминокислот А990V в белке CHLH [Mochizuki et al., 2001]. Продукт гена *GUN4* оказался способен *in vitro* связывать ПП и стимулировать активность МХ, а в структуре белка GUN4 был обнаружен специфический сайт связывания и молекул Mg-ПП [Adhikari et al., 2011]. В экспериментах по изучению теневой экспрессии генов *CABII*, *HSP70A*, также как и *CHLH* и *GTR*, кодирующих компоненты комплексов МХ и синтеза АЛК выяснилось, что мутация *brs-1* *C. reinhardtii*, подобна *gun5* арабидопсиса. Функции продукта хлоропластного гена *Mod-u-25* по-видимому, состоят в блокировании механизма регуляции, направленного на предотвращение накопления фототоксичных протопорфиринов в фотосинтезирующих клетках путем репрессии транскрипции генов, ферментов синтеза ХЛ.

3.5.7. Выводы

1. В результате УФ-мутагенеза оранжевого светочувствительного мутанта по гену *CHLH* генотипа *chl1*, и дальнейшего многоступенчатого отбора темно-коричневых клонов получен двойной мутант Н-19-25 генотипа *chl1,mod-u-25*, накапливающий в 20 раз более протопорфирина IX (ПП) чем исходный мутант.

2. Мутация *mod-u-25*, приводит к усилению активности синтеза АЛК (вдвое) на фоне мутантных аллелей генов *CHLH* и *LTS3*: *chl1* и *lts3*, и имеет фенотипическое проявление – окраска колоний меняется от оранжевой (у одиночных мутантов) до коричневой (у двойных мутантов). Также, мутантная аллель *mod-u-25* обуславливает устойчивость несущих ее клеток к левулиновой кислоте (ЛК) в концентрации 10 mM - летальной для клеток с аллелью дикого типа.

3. Мутация *mod-u-25* наследуется как хлоропластный детерминант, и

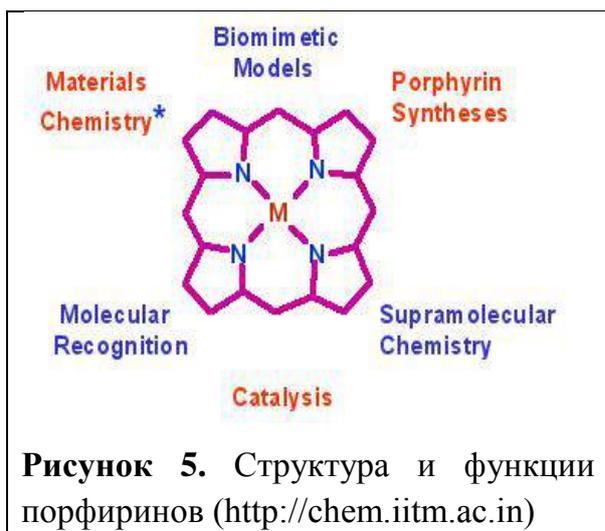
является мутантной аллелью хлоропластного гена *Mod-u-25*.

4. Хлоропластная мутация *mod-u-25* не снижает чувствительность АЛК-синтезирующих ферментов к угнетению гемом и не влияет на процесс синтеза протогема в клетках хламидомонады. Эффект мутации выявлен на уровне транскрипции генов, кодирующих белки *CHLH* и *GTR* ферментов биосинтеза ХЛ – магний-хелатазы и АЛК-синтезирующего комплекса, соответственно.

5. Фактор, кодируемый хлоропластным геном *Mod-u-25* *S.reinhardtii* является элементом регуляторной системы, препятствующей накоплению в рвстительной клетке фототоксичных свободных порфиринов, и задействован в ретроградном контроле, - регуляции экспрессии ядерных генов белков фотосинтеза в ответ на сигналы хлоропласта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

*«Наука всегда оказывается не права.
Она никогда не решит вопроса,
не поставив, при этом, десятка новых»
Бернард Шоу*



Порфирины – молекулы циклических тетрапирролов, созданные природой для осуществления важнейших биологических функций (рисунок 5). Они широко представлены на Земле в виде хлорофиллов, обеспечивающих фотосинтез, гемов, которые задействованы в транспорте электронов и переносе молекулярного

кислорода, и корриноидов, функции которых связаны с переносом метильных групп и реакциями изомеризации. Функционально значимы и тетрапирролы с открытой цепью – фикобилины (дополнительные пигменты фотосинтеза у водорослей, фитохром у высших растений), сирогем (восстановление сульфита и нитрита), и фактор метаногенеза у метанобразующих бактерий [Быховский, 1997].

Синтез тетрапирролов у растений и водорослей происходит в пластидах, откуда они транспортируются к месту своей локализации: хлорофиллы (ХЛ) остаются в хлоропластах, гемы и сирогемы работают во всех клеточных компартментах, а фитохромы – в цитоплазме и ядре. Метаболизм фотосинтезирующей клетки зависит от функциональной активности всех тетрапирролов, биосинтез которых необходимо регулировать. Механизмы такой регуляции обеспечивают в первую очередь следующие процессы: утилизацию световой энергии, поддержание оптимального баланса

содержания гемов и хлорофиллов, предотвращение накопления свободных фототоксичных порфиринов, координацию биосинтезов белков и пигментов (тетрапирролы функционирует в составе пигмент-белковых комплексов). На сегодняшний день известно, что метаболизм тетрапирролов в фотосинтезирующей клетке регулируется как на уровне транскрипции генов белков фотосинтеза, так и посттрансляционно [Tanaka, 2008, Czarneski and Grimm, 2012, Юрина и др., 2012]. Все известные факторы транскрипционной регуляции были найдены при изучении влияния света на фотоморфогенез.

В контроле метаболических и сигнальных путей широко задействован механизм обратного ингибирования (рисунок 6А). Он реализован в цепи биосинтеза тетрапирролов для обеспечения баланса между ранними и поздними этапами метаболического пути и предотвращения накопления фототоксичных интермедиатов ХЛ. Основная точка приложения регуляторных петель - это синтез первого предшественника всех тетрапирролов – 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), который ведут три фермента: GluTS (глутамил-тРНК-синтетаза), GluTR (глутамил-тРНК-редуктаза) и GSA-AT (глутамат-полуальдегидаминотрансфераза), последние два из которых, физически связаны [Nogaj and Beale, 2005]. Активность АЛК-синтезирующего комплекса посттрансляционно регулируется продуктами двух ветвей тетрапиррольного метаболизма – Fe^{2+} - и Mg^{2+} -содержащими:

1. Гем - железосодержащий порфирин. Накапливаясь в избытке, гем подавляет синтез АЛК, напрямую ингибируя активность фермента GluTR [Czarneski and Grimm, 2012].
2. Магниева ветвь – протохлорофиллид (ПХЛД). Путь негативной регуляции синтеза АЛК протохлорофиллидом был обнаружен благодаря исследованиям мутантов Flu арабидопсиса [Lee et al., 2003]. Белок FLU в ответ на избыточное накопление ПХЛД в темноте (у покрытосеменных растений фермент ПОР, конвертирующий ПХЛД в ХЛД активен только на

свету) связывает фермент GluTR находящийся в строме пластид, с мембранами тилакоидов, тем самым прекращая синтез АЛК.

Хлоропласты арабидопсиса содержат около 3000 белков, большинство из которых (более 95%), включая ферменты биосинтеза ХЛ, кодируются ядерными генами. Процессы формирования и функционирования фотосинтетических мембран зависят от координированной экспрессии генов ядра и пластид в ответ на воздействия факторов внешней среды (свет, питание, температура) и внутриклеточных сигналов (активные формы кислорода, сахара, интермедиаты синтеза ХЛ и редокс-активные молекулы) [Kleine et al., 2009]. Взаимодействие ядра и хлоропластов фотосинтезирующей клетки обеспечивается двойной системой генетической регуляции: кодируемые ядром белки и цитоплазматические факторы, поступая в хлоропласт, влияют на экспрессию генов хлоропласта, а сигналы, генерируемые хлоропластом, регулируют экспрессию генов ядра. Для выяснения природы этих сигнальных молекул наиболее эффективным оказался генетический подход. Регуляторный белок GUN4 был обнаружен при поиске мутантов арабидопсиса с нарушенной регуляцией синтеза ХЛ, – способных сохранять высокий уровень транскрипции хлорофилл-связывающих САВ-белков при деструкции хлоропластов [Susek et al., 1993]. Наличие этого белка необходимо для активации магний-хелатазы (МХ) и АЛК-синтезирующего комплекса [Larkin et al., 2003; Adhikari et al., 2011]. В ядерном геноме *C. reinhardtii* обнаружено два гена, кодирующих GUN4-подобные белки, и показано, что продукты этих генов посттрансляционно регулируют передачу ретроградных сигналов (из хлоропласта в ядро) [Brzezowski et al., 2014]. *GUN4* взаимодействует с субъединицей Н МХ и связывает ее с тилакоидными мембранами, тем самым, активируя фермент. Почему при этом усиливается работа АЛК-синтезирующих ферментов? – до сих пор неизвестно. Как неизвестными до последнего времени оставались механизмы регуляции биосинтеза ПХЛД из

пропопорфирина IX.

Приступая к работе по идентификации и клонированию новых генов зеленой водоросли хламидомонады, вовлеченных в светонезависимый синтез хлорофиллов, мы намеревались понять, – каким образом осуществляется генетический контроль биосинтеза ХЛ, и какую роль эти гены играют в регуляции процессов хлорофиллообразования и функционирования фотосинтезирующей клетки?

Представленная работа посвящена исследованиям малоизученных механизмов контроля ранних этапов биосинтеза ХЛ (до формирования молекул ПХЛД) у модельного объекта генетики фотосинтеза – одноклеточной зеленой водоросли *C. reinhardtii* методами генетики, молекулярной биологии и геномики. Предмет исследований – бесхлорофилльные мутанты, накапливающие протопорфирин IX (ПП), - субстрат фермента МХ, их ревертанты и обратные мутанты.

Фенотип бесхлорофилльных, накапливающих ПП в темноте, мутантов *C. reinhardtii*, оказался обусловлен мутациями в двух ядерных, несцепленных между собой генах – *CHL1* и *LTS3*. Штаммы, мутантные по гену *CHL1*, были светочувствительны (гибли на свету), а мутанты по гену *LTS3* сохраняли способность зеленеть при освещении. В терминах формальной генетики, ген *CHL1* мог быть отнесен к структурным генам, а *LTS3* – к регуляторным. Все исследуемые мутации приводят к подавлению активности фермента МХ, встраивающего магний в молекулы ПП в цепи биосинтеза ХЛ.

Молекулярно-генетические исследования мутантов первой группы (оранжевых, светочувствительных), позволили установить, что ген *CHL1*, переименованный позднее в *CHLH*, кодирует большую субъединицу МХ. Осуществлено его клонирование - получена полная нуклеотидная последовательность этого гена (7035 пн), и определена его интрон-экзонная структура - ген *CHLH* содержит 12 экзонов и 11 интронов. Его кДНК размером 5049 пн содержит ОРС длиной 4186 пн, кодирующую 1399

аминокислотных остатков, и длинный (827 пн) 3'-нетранслируемый конец. По данным секвенирования мутации *chl1* и *brs-1* являются вставками (+1) в экзонах 9 и 10 гена *CHLH*, соответственно. Они вызывают сдвиг рамок считывания и, в результате трансляции мутантных мРНК, появляются короткие нефункциональные пептиды длиной 457 и 559 аминокислотных остатков, соответственно. Ген *CHLH* уникален – в геноме *C. reinhardtii* не обнаружено его паралога. Он кодирует хлоропластный, слабо связанный с мембранами белок с молекулярной массой 154,29 kDa. По данным филогенетического анализа, общим предшественником для всех известных у про- и эукариот ортологов белка CHLH является CobN – кобальт-хелатаза прокариот. Экспрессия гена *CHLH* в клетках хламидомонады позитивно регулируется светом на уровне транскрипции, и мутации *chl1* и *brs-1* в гене *CHLH* не оказывают заметного влияния на эту регуляцию.

Все особенности фенотипа мутантов хламидомонады по гену *LTS3*, свидетельствовали, что продукт этого гена регулирует транскрипцию генов, кодирующих фермент МХ в темноте:

- a) *lts3*-мутанты в темноте накапливают субстрат МХ - ПП и следовые количества его магниевых производных (Mg-ПП Mg-ППМЭ и ПХЛД), На свету –они зеленеют. Процесс зеленения запускается во вновь образованных в условиях освещения клетках;
- b) активность МХ у *lts3*-мутантов подавлена в темноте (она составляет 22% от уровня таковой в световых культурах дикого типа). На свету она восстанавливается. Относительная активность АЛК-синтезирующего комплекса мутантов в отсутствие света также редуцирована и составляет 4-7% от нормы;
- c) транскрипция генов, кодирующих МХ и фермента GSA-АТ, входящего в состав АЛК-синтезирующего комплекса, снижена в темноте. На свету она восстанавливается с временной задержкой. Синтез белков большой (H) и малой (I) субъединиц МХ у штамма дикого типа и мутанта *lts3*

соответствует динамике накопления мРНК этих генов, означая, что их экспрессия регулируется на уровне транскрипции.

Осуществлено картирование и позиционное клонирование гена *LTS3*. Он локализован в ядерной группе сцепления (хромосоме) I *C. reinhardtii* на расстоянии 29 сМ от своей центромеры. В соответствии с версией 4 геномного сиквенса *C. reinhardtii*, ген *LTS3* занимает положение: 3697097-3698067 пн на хромосоме I (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre4/>). Ген содержит 2 экзона (58 пн и 257 пн) и 1 интрон (156 пн). Его транскрипт, размером 815 пн включает короткий (33 пн) 5'-нетранслируемый район (5'UTR), открытую рамку считывания ОРС (315 пн), и длинный (467 пн) 3'-нетранслируемый конец (3'UTR). Белок, кодируемый геном *LTS3*, по-видимому, состоит из 104 аминокислотных остатков (ак) и имеет молекулярную массу 11,067 kDa. Методами биоинформатики в его составе обнаружен один ДНК-связывающий домен со структурой «цинкового пальца», типичный для транскрипционных факторов семейства GATA (ZnF_GATA). Секвенирование мутантных аллелей *brc-1* и *lts3* гена *LTS3* показало, что они несут мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания и синтезу белков, не содержащих GATA-домен. По-видимому, функциональная активность *LTS3* определяется его доменной структурой, и он является регулятором транскрипции.

Транскрипция гена *LTS3* в норме негативно регулируется светом и позитивно – источником углерода ацетатом, свидетельствуя, что продукт этого гена необходим клетке в условиях гетеротрофного роста. В результате поиска белков, гомологичных *LTS3*, в базах данных *nr* (BLAST) удалось установить, что ортологи белка *LTS3* (219 белков), имеются только у эукариот. Их гомология основана на сходстве цинк-пальцевых ДНК-связывающих доменов GATA типа и позволяет отнести изучаемый белок к семейству факторов транскрипции ZnF_GATA. В геноме хламидомонады обнаружено 3 паралога *LTS3*, выяснение функций которых еще предстоит.

Анализ 5'-фланкирующих районов генов *C. reinhardtii*, кодирующих ферменты биосинтеза ХЛ, показал, что они содержат GATA-элементы - сайты связывания с ZnF_GATA факторами (от одного – у *ALAD* и *CHL1*, до пяти – у *GSA*). G-боксы (CACGTG) – последовательности, существенные для световой регуляции транскрипции, найдены у трех из 7 анализируемых генов: *GSA*, *CHLH* и *CHLD*. Наличие сайтов связывания с факторами транскрипции семейства Zn_F GATA в промоторных областях генов, кодирующих ферменты синтеза АЛК и МХ, подтверждает гипотезу об их регуляции фактором LTS3. В целом, результаты исследований свидетельствуют, что новый ядерный регуляторный ген хламидомонады *LTS3* кодирует фактор транскрипции семейства GATA. Его функции состоят в активации экспрессию генов ключевых ферментов синтеза ХЛ - МХ и АЛК-синтезирующего комплекса (ген *GSA* фермента *GSA-AT*) в гетеротрофных условиях выращивания, и он, также, необходим для ранних этапов световой регуляции этих генов (рисунок 6Б).

От бесхлорофильных, накапливающих ПП в темноте, мутантов хламидомонады по гену *LTS3*, был получен ревертант Brc-8 генотипа *brc-1*, *sup-3*. Восстановление темнового биосинтеза ХЛ у него произошло в результате активации фермента магний-хелатазы, подавленного у мутантов. Молекулярно-генетические исследования супрессии мутаций в гене *LTS3* позволили найти два новых ядерных гена хламидомонады *SUP3* и *SUP-1*. В отсутствие нормально-функционирующего регулятора транскрипции *LTS3*, фактор *SUP3* контролирует дополнительный путь активации магний-хелатазы в темноте, который может быть индуцибельным и связан с метаболизмом азота и углерода в клетке водоросли. Ядерный ген *SUP-1* размером 1775 пн локализован в хромосоме 13 хламидомонады. Он содержит два интрона – 236 пн и 605 пн. Его транскрипт размером 933 пн, включает 327 нуклеотидов ОРС и кодирует белок, содержащий 108 аминокислотных остатков. Промоторная область гена *SUP-1* содержит несколько GATA–

элементов, свидетельствующих о возможной регуляции транскрипции этого гена фактором *LTS3*. Виртуальный белок SUP-I функционирует в ядре (он не имеет трансмембранных районов, а, также, хлоропластных и митохондриальных транзитных последовательностей) и участвует в поддержании высокого уровня транскрипции гена *LTS3* в темноте, то есть является активатором его транскрипции. Наличие сайта фосфорилирования протеинкиназой С (PKC) в его последовательности указывает, что SUP-I представляет собой важный элемент системы транскрипционной регуляции ядерных генов, контролирующих процессы темнового биосинтеза хлорофилла у хламидомонады. Взаимодействие генов *LTS3* и *SUP-I* было установлено в комплементационном тесте. Оказалось, что эффект проявления инсерционной мутации (доминантный или рецессивный) зависел от контекста – наличие в клетке нормально функционирующего продукта гена *LTS3* менял характер взаимодействия аллелей гена-мишени. Доминантный эффект мутантной аллели *Sup-I* на фоне гомозиготы по мутациям в гене *LTS3*, свидетельствует, что оба белка – *LTS3* и SUP-I взаимодействуют, и фактор транскрипции *LTS3* необходим для реализации функции фактора SUP-I. По-видимому, они оба в составе регуляторной системы, контролируют работу МХ в темноте через активацию транскрипции кодирующих её генов. Продукт гена SUP-3, в норме подавляет иной путь активации активности МХ у хламидомонады.

*Таким образом, помимо протохлорофиллид-оксидоредуктазы (ПОР), у C. reinhardtii первый специфический фермент биосинтеза ХЛ – магний-хелатаза является важнейшим компонентом системы регуляции процессов его формирования в гетеротрофных условиях роста. Нам удалось обнаружить два пути активации МХ в темноте. В первом пути задействованы факторы регуляции транскрипции *LTS3* и SUP-I. В случае его блокирования, возможно переключение на альтернативный путь, в норме репрессированный продуктом гена SUP3.*

В результате УФ-мутагенеза оранжевого светочувствительного мутанта генотипа *chl1* по гену *CHLN*, и дальнейшего многоступенчатого отбора темно-коричневых клонов получен двойной мутант с нарушенной регуляцией биосинтеза ХЛ, накапливающий в 20 раз более ПП, чем исходный мутант. Хлоропластная мутация *mod-u-25*, усиливает (вдвое) накопление АЛК у двойных мутантов генотипа: *chl1, mod-u-25*, не снижает чувствительность АЛК-синтезирующих ферментов к угнетению гемом, и не влияет на процесс синтеза протогема в клетках хламидомонады. Мутация тестируется по устойчивости к 10 мМ леволиновой кислоты. Эффект мутации состоит в отсутствии темновой репрессии транскрипции генов: *CHLN*, *GTR* и *CABII*, кодирующих белки МХ, АЛК-синтезирующего комплекса и светособирающего комплекса фотосистемы II, соответственно. Сохранение высокого уровня транскрипции гена *CABII* в условиях деструкции хлоропласта характерно для GUN-мутантов арабидопсиса, у которых нарушена система передачи регуляторных сигналов из хлоропласта в ядро. Gun-фенотип (отсутствие темновой репрессии гена *CABII*) демонстрировали мутанты по гену *CHLN* большой субъединицы МХ генотипа: *brs-1*, и *chl1, mod-u-25*, но не *chl1*, что позволяет отнести продукт гена *Mod-u-25* хламидомонады к факторам, задействованным в пути передачи сигнала из хлоропласта в ядро. В отличие от уже известных GUN-белков, фактор *Mod-u-25* кодируется хлоропластным геномом.

В целом, проведенные исследования свидетельствуют, что темновые реакции биосинтеза ХЛ у хламидомонады регулируются на уровне первого фермента этого пути - МХ, и её функционирование в большей степени определяется большой (*CHLN*) субъединицей этого комплекса. В работе впервые был клонирован и исследован ген *CHLN* большой субъединицы МХ хламидомонады. Также, нам удалось обнаружить несколько, до сих пор неизвестных генов, продукты которых задействованы в регуляции активности МХ. Ядерный ген *LTS3* кодирует фактор транскрипции, который

активирует экспрессию генов ферментов биосинтеза ХЛ: МХ и АЛК-синтезирующего комплекса (белок GSA-AT) в темноте. Это первый фактор транскрипции, описанный у хламидомонады, который задействован в регуляции генов, контролирурующих темновые процессы хлорофиллообразования. Изучение супрессии мутаций в гене *LTS3* позволило найти два ядерных гена: *SUP-1* и *SUP3*. Продукт *SUP-1*, вместе с *LTS3* задействован в транскрипционной регуляции темновых процессов биосинтеза ХЛ. Ген *SUP3* контролирует альтернативный *LTS3*-пути механизм их регуляции.

В случае мутационного блокирования магний-хелатазы, усиление активности АЛК-синтезирующих ферментов ведет к избыточному накоплению его субстрата – ПП. В работе удалось обнаружить новый механизм, препятствующий накоплению этого сильного фотосенсибилизатора, губительного для клетки в условиях освещения. Он контролируется хлоропластным геном, названным *Mod-u-25*. Это первый, обнаруженный у хламидомонады, хлоропластный детерминант, регулирующий активность АЛК-синтезирующего ферментативного комплекса. Gun-фенотип мутации *mod-u-25* позволяет предполагать, что продукт этого гена задействован в ретроградной регуляции, – контроле хлоропластом экспрессии ядерных генов белков фотосинтеза. Молекулярная природа гена *Mod-u-25* и его продукта пока остается неизвестной. Становится все более очевидно, что в регуляции светонезависимого биосинтеза хлорофиллов магний-хелатаза играет ключевую роль. Исследования, представленные в работе, позволили установить, что, помимо гена *GUN4*, кодирующего позитивный регулятор активности фермента на посттрансляционном уровне [Formighieri et al., 2012], у хламидомонады функционирование МХ на транскрипционном уровне контролируют продукты ядерных генов *LTS3* и *SUP-1* и хлоропластный детерминант *Mod-u-25* (рисунок 6).

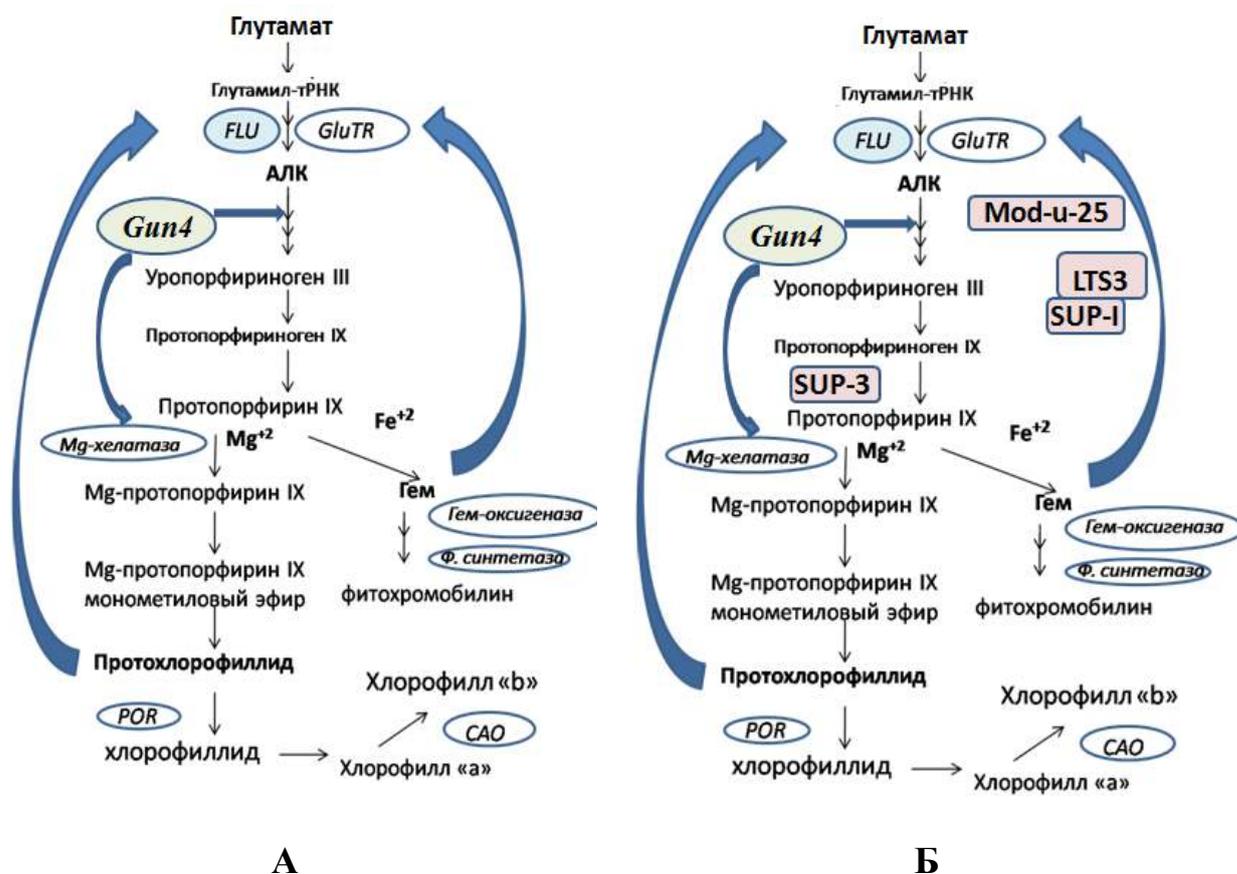


Рисунок 6А. Посттрансляционная регуляция синтеза ХЛ в растительной клетке. Синтез АЛК репрессируют (стрелки): протохлорофиллид, связываясь с белком FLU, и гем, взаимодействуя с ферментом Glu-TR. Белок Gun4 связывает магний-хелатазу (МХ) с мембранами хлоропласта, активируя её активность.

6Б. Новые факторы регуляции Mg-хелатазы (МХ), обнаруженные в работе. Темновой биосинтез ХЛ обеспечивается путем транскрипционной активации генов, кодирующих МХ и АЛК-комплекс. Фактор LTS3 активирует транскрипцию генов МХ и GSA-AT; фактор SUP-3 репрессирует МХ; фактор SUP-I – активатор транскрипции LTS3; Mod-u-25 – репрессор синтеза АЛК и МХ. Гены, обнаруженные в работе, – в розовых прямоугольниках.

Результаты представленных исследований позволяют говорить о существовании в системе регуляции биосинтеза ХЛ у хламидомонады механизмов, координирующих работу двух основных ферментативных комплексов – МХ и синтеза АЛК. В отличие от хорошо известного механизма обратного ингибирования «feedback» синтеза АЛК протохлорофиллидом и гемом, действующими на посттрансляционном уровне, регуляторный контур магний-хелатаза (МХ) – АЛК, по-видимому,

представляет собой систему «feedforward», когда усиление активности МХ ведет к активации АЛК–синтезирующего комплекса. На посттрансляционном уровне модулятором этого контура может служить белок GUN4, а транскрипционная активация генов обоих ферментных комплексов осуществляется продуктами генов *LTS3* и *SUP-I*, описанных в работе.

Обнаружение новых генов, контролирующих регуляцию процессов хлорофиллообразования у зеленой водоросли *C. reinhardtii* поставило новые вопросы, ответы на которые еще предстоит отыскать. Регулирует ли фактор транскрипции *LTS3* только гены ферментов биосинтеза хлорофилла, или он контролирует и процессы азотного и углеродного метаболизма в фотосинтезирующей клетке? Как функционирует транскрипционный комплекс, в составе которого работают продукты генов *LTS3* и *SUP-I*? Какова генетическая природа хлоропластного гена, кодирующего фактор ретроградной регуляции Mod-u-25? Ответы на эти, и многие другие вопросы приблизят нас к пониманию механизмов, которые позволяют хлорофилл-содержащей клетке, живущей в гетеротрофных условиях, адаптироваться к свету, и как эти механизмы формировались в процессе эволюции.

Фундаментальные исследования, представленные в настоящей работе, имеют несомненную практическую значимость. Изучение мутантов хламидомонады, дефектных по гену *CHLH* с нарушенной регуляцией, привело к получению штаммов-продуцентов химически-чистого протопорфирина IX (ПП). ПП – природный циклический тетрапиррол, общий биосинтетический предшественник гема и хлорофилла, является сильным природным фотосенсибилизатором и индуктором апоптоза. Уникальные фотохимические свойства этого соединения состоят в способности его молекул адсорбировать световую энергию. При поглощении фотона молекула переходит в кратковременное возбужденное состояние, из которого может вернуться в основное синглетное состояние, отдав энергию в виде флуоресценции, либо перейти в возбужденное триплетное состояние.

Взаимодействие с кислородом приводит к появлению активных форм кислорода (АФК), которые и запускают процессы разрушения липидов клеточных мембран. Пигмент флуоресцирует в красной области спектра ($\lambda=606$ нм и 604 нм при возбуждении светом с длиной волны 405 нм) и способен накапливаться в пролиферирующих тканях, что позволяет использовать его в целях флуоресцентной диагностики канцерогенеза. Являясь сильным фотосенсибилизатором (веществом, способным при освещении генерировать АФК), накопленный в тканях ПП при освещении вызывает быструю деструкцию окружающих тканей и применяется в фотодинамической терапии (ФДТ). Еще одна, совсем новая область применения ПП, связана с нанотехнологиями - созданием порфирин-содержащих полимеров - основных компонентов сенсоров, позволяющих выявлять широкий спектр токсичных элементов в окружающей среде [Asano et al., 2010]. Технологические перспективы будущего связаны с созданием синтетических энергопреобразующих структур на основе порфиринов. В этих трехкомпонентных системах (безметалльный порфирин — Zn порфирин — хинон) осуществлена последовательность событий, реализуемых в фотосинтезирующих организмах: поглощение света → миграция энергии → разделение зарядов. Такие синтетические структуры могут стать прообразом искусственных энергопреобразующих устройств будущего. Таким образом, перспективы применения ПП (как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте) связаны с возможностью создания гибридных наноразмерных биоэнергетических и биосенсорных устройств. Результаты работы могут быть использованы при подготовке материалов по новым курсам лекций «Генетика фотосинтеза» и «Генетика микроводорослей», на кафедре генетики и биотехнологии СПбГУ, и аналогичных курсов в других университетах России.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ

1. Идентифицировано два ядерных гена *Chlamydomonas(C) reinhardtii*: *CHLH* и *LTS3*, рецессивные мутации в которых блокируют биосинтез хлорофилла (ХЛ), приводя к накоплению его интермедиата протопорфирина IX (ПП) в темноте. Мутанты по гену *CHLH* светочувствительны, а *LTS3*-мутанты способны зеленеть на свету.

2. Клонирован и секвенирован ядерный ген *CHLH* *C. reinhardtii*, кодирующий большую Н субъединицу магний-хелатазы (МХ) – первого специфического фермента биосинтеза ХЛ. Охарактеризованы его структура и функции, идентифицированы мутантные аллели.

3. Осуществлено позиционное клонирование гена *LTS3* *C. reinhardtii*, Он кодирует фактор транскрипции семейства GATA, который активирует экспрессию генов ферментов биосинтеза ХЛ - МХ и АЛК-синтезирующего комплекса в гетеротрофных условиях.

4. Результатом исследования супрессии *lts3*-мутаций стало обнаружение двух новых ядерных генов *SUP-3* и *SUP-1* *C. reinhardtii*, кодирующих факторы регуляции активности МХ. Продукт *SUP-1*, вместе с *LTS3* задействован в транскрипционной активации темновых процессов биосинтеза ХЛ и необходим для зеленения. Ген *SUP3* контролирует альтернативный *LTS3*-пути механизм регуляции.

5. Описана новая хлоропластная мутация *mod-и-25*, которая приводит к сверхпродукции по ПП в клетках двойных мутантов *C. reinhardtii* генотипа: *chl1*, *mod-и-25* за счет усиления синтеза АЛК. Эффект мутации состоит в отсутствии темновой репрессии транскрипции генов: *CHLH*, *GTR* и *SABII*, кодирующих белки МХ-хелатазы, АЛК-синтезирующего комплекса и светособирающего комплекса ФСII. Продукт гена *Mod-и-25* является первым из хлоропластных детерминант, задействованным в регуляции пути передачи сигнала из хлоропласта в ядро.

ЛИТЕРАТУРА

1. Александрова Н.Н., Крэла Л.П., Тугаринов В.В. Генетическая детерминация признаков хлоропласта у хламидомонады. Сообщ. I. Создание множественно-маркированных линий // Исследования по генетике. – 1979. – Вып. 8. – С. 139 - 149.
2. Аверина Н.Г., Шалыго Н.В., Фрадкин Л.И. Определение Mg-протопорфирин IX монометилового эфира в листьях ячменя и пшеницы // Вести Белорусской АН. Сер. Биологические науки. – 1980. – N 6. – С. 25-29.
3. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. Фотоактивные пигмент-ферментные комплексы предшественника хлорофилла в листьях растений // Успехи биологической химии. – 2007. – Т. 47. – С. 189-232.
4. Бояджиев П. Цитогенетический анализ пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardi*: диссертация на соискание уч. степени кбн. Л.: ЛГУ, 1974. – 180 с.
5. Бояджиев П., Смирнов А.Ф., Квитко К.В. Микроспектрофотометрия пигментных мутантов хламидомонады: сборник: “Управление биосинтезом микроорганизмов”. – Красноярск: Наука, 1973. – С. 97-99.
6. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
7. Быховский В.Я. Тетрапирролы: разнообразие, биосинтез, биотехнология: сборник «Успехи химии порфиринов»; под ред. О.А. Голубчикова. – Санкт-Петербург: СПбГУ, 1997. – Том. 1. – С. 27-51.
8. Галкин А. П., Лешина Л. Г., Медведева Т.В., Булко О.В., Кухарь В.П. Регуляторные области промоторов генов растений и белки – регуляторы промоторной активности // Биополимеры и клетка, 2004. –Т. 20(5). –С. 363-379.
9. Гайцхоки В.С. Взаимоотношение генотип-фенотип как проблема молекулярной генетики наследственных болезней человека // СОЖ. –1998. –№ 8. –С. 36-41.
10. Глотов Н. В., Животовский Л. А., Хованов Н. В., Хромов-Борисов Н. Н. Биометрия: учебное пособие, Ленинград: ЛГУ, 1982. – 214 с.
11. Горденин Д.А., Кваша В.В. Внутригенная рекомбинация и методы построения генных карт у грибов // Исследования по генетике. –1976. –Вып. 7. –С. 73-88.

12. Захаров И.А. Курс генетики микроорганизмов, - Минск: Высшая школа, 1978. – 113 с.
13. Инге-Вечтомов, Ницай О.В., Тер-Аванесян М.Д. Анализ расщепления у полиплоидов петергофских генетических линий дрожжей // Генетика. – 1971. – Т. VII. – № 12. – С. 65-73.
14. Иорданский Н.Н. Эволюция жизни. - М.: Академия, 2001. –425 с.
15. Квитко К. В., Борщевская Т. Н. и др. Петергофская генетическая коллекция штаммов зеленых водорослей *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas*: сб.: «Культивирование коллекционных штаммов водорослей», Л., 1983. –С. 28-56.
16. Косиков К.В., Раевская О.Г., Хорошутина Э.Б. Полиплоидные гибриды производственных расс дрожжей и перспективы применения их в производстве. // Микробиология. 1975. – Т. 44. – С. 682-688.
17. Красновский А.А. Синглетный кислород и механизм фотодинамического действия порфиринов: сборник «Успехи химии порфиринов»; под ред. О.А. Голубчикова. – СПб: НИИ химии СПбГУ, 2001. –Т. 3. –С. 191–216.
18. Кулаева О.Н. Как свет регулирует жизнь растений // СОЖ. – 2001. – Т.7. №4. – С.6-12.
19. Ладыгин В.Г. Получение и отбор мутантов одноклеточных водорослей с нарушениями цепи фотосинтетического переноса электронов // Физиология растений. – 1976. – Т. 23. – Вып. 5. –С. 877-884.
20. Матюшина Н.М. Содержание ДНК в штаммах дрожжей разной пloidности. // Цитология. – 1964. –Т.6. – № 1. – С 91-94.
21. Мирная О.Н., Фомина-Ещенко Ю.Г., Чунаев А.С. Локализация мутации *cbn1* в первой группе сцепления ядерных генов *Chlamydomonas reinhardtii* // Генетика. – 1990. – Т.26. – С. 958-960.
22. Миронов А.Ф. Биосинтез природных тетрапирролов // СОЖ – 1998. – № 7. – С. 35-42.
23. Одинцова М.С., Юрина Н.П. Генетика и эволюция клеточных органелл // Генетика. – 2005. – Т.41. – С. 1170 – 1182.
24. Осипенкова О.В., Рахимбердиева М.Г., Карапетян Н.В Юрина Н.П. Участие двух пластидных сигналов в регуляции экспрессии ядерного гена

- хлоропластного белка ELIP // Доклады РАН. – 2007. – Т. 416. – № 4. – С. 546–549.
25. Пиневиц А.В., Аверина С.Г. Оксигенная фототрофия. – СПб: СПбГУ, 2002. – 236 с.
26. Погульская, Е.Н., Юрина Н.П., Карапетян Н.В. Участие тетрапирролов в регуляции экспрессии ядерного гена низкомолекулярного пластидного белка ELIP // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т.42. – С. 362-367.
27. Синещев В.А. Фитохромная система растений: сборник материалов IV съезда фотобиологов России; под ред. В.В.Тучина. – 2005. – С. 193-196.
28. Скулачев В.П. Эволюция биологических механизмов запасания энергии // СОЖ. – 1997. – № 5. – С. 11–19.
29. Соколовский В.Ю., Белозерская Т.А. Действие стрессоров на дифференциальную экспрессию генов в ходе развития *Neurospora crassa* // Успехи биологической химии. – 2000. – Т. 40. – С. 85-152
30. Столбова А.В. Генетический анализ пигментных мутаций у *Chlamydomonas reinhardtii*. I. Идентификация основных пигментов и описание коллекции мутантных форм // Генетика. – 1971. – Т. 7. – № 9. – С. 90-124.
31. Терентьев П.В., Ростова Н.С. Практикум по биометрии. – Ленинград: ЛГУ. 1977. – С. 20-34.
32. Тимирязев К.А. Избранные работы по хлорофиллу и усвоению света растением. – М: АН СССР, 1948. – 352 с.
33. Тихонов А.Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза // СОЖ. – 1999. – № 11. С. – 8-15.
34. Цвет М.С. Хроматографический адсорбционный анализ. – М.: АН СССР. 1946. – 274 с.
35. Цыганкова В.А., Галкина Л.А., Мусатенко Л.И., Сытник К.М. Генетический контроль роста и развития растений. Гены фотоморфогенеза и регуляция их экспрессии светом // Биополимеры и клетка. – 2004. – Т. 20. – № 6. – С. 451-471.
36. Чекунова.Е.М., Квитко К.В. Генетическое изучение мутантов хламидомонады, накапливающих протопорфирин IX // Исследования по генетике. – 1986. – №

10. – С. 104-112.
37. Чекунова Е.М., Чунаев А.С. Взаимодействие генов, контролирующих биосинтез хлорофилла в зигоспорах *Chlamydomonas reinhardtii*: в сборнике «Молекулярные механизмы генетических процессов». – М: Наука, 1990. – С. 291 - 292.
38. Чекунова Е.М., Савельева Н.В. Ген LTS3 контролирует светонезависимый биосинтез хлорофилла у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Экологическая Генетика. – 2010. – Т. VIII. – №2. – С.35-44.
39. Чемерилова В.И. Изучение модифицирующих пигментацию мутаций штаммов *Chlamydomonas reinhardtii* разной ploидности. Сообщ. 2. Компаунды по мутациям *Its1* и их использование для получения триплоидных культур // Генетика. – 1978. – Т. 14. – № 1. – С. 154-162
40. Чемерилова В.И. Использование полиплоидии в генетическом анализе пигментных светочувствительных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*: дисс. на соиск. уч. ст. кбн.: 03.00.15. – Л.: ЛГУ, 1979. – 174 с.
41. Чемерилова В.И., Квитко К.В. Изучение модифицирующих пигментацию мутаций у штаммов *Chlamydomonas reinhardtii* разной ploидности. Сообщ. I. Диплоиды, гетерозиготные по мутации *Its-31* // Генетика. – 1976. – Т.12. – №9. – С. 44-49.
42. Чумакова Е.В. О характере генетической детерминации признака оранжевой окраски колоний *Chlamydomonas reinhardtii*. Дипломная работа. Л., ЛГУ. – 1976 – 136 с..
43. Чунаев А.С., Столбова А.В., Квитко К.В., Алеуксандрова Н.Н., Чекунова Е.М., Мирная О.Н., Тугаринов В.В. Генетический контроль биосинтеза хлоропластных пигментов у зеленых водорослей // Генетика. – 1994. – Т.30 – № 8. – С. 1075 – 1084.
44. Шалыго Н.В., Чекунова Е.М., Чунаев А.С., Аверина Н.Г. Анализ состава порфиринов в мутантах *Chlamydomonas reinhardtii* // Изв. АНБССР., сер. Биол. Наук, 1990. – № 4. – С. 53–57.
45. Шалыго Н.В. Биосинтез хлорофилла и фотодинамические процессы в растениях – Минск: ИООО «Право и экономика», 2004. – 156 с.

46. Шестаков С.В. Молекулярная генетика фотосинтеза // СОЖ. – 1998. – № 9. – С. 22-27.
47. Шлык А.А. Метаболизм хлорофилла в зеленом растении. – Минск: Наука и техника, 1965. 396 с.
48. Юрина Н.П., Одинцова М.С. Сигнальные системы растений. Пластидные сигналы и их роль в экспрессии ядерных генов // Физиология растений. – 2007. – Т. 54. – № 4. – С. 489-498.
49. Юрина Н.П., Осипенкова О.В., Одинцова М.С. Тетрапирролы высших растений: биосинтез, его регуляция и их роль в передаче ретроградных сигналов // Физиология растений. – 2012. – Т. 59. – № 1. – С. 3-16.
50. Яронская Е.Б., Вершиловская И.В., Аверина Н.Г. Содержание зеатина и его производных в проростках ячменя (*Hordeum vulgare*L.) с повышенным уровнем 5-аминолевулиновой кислоты // Весці НАН Беларусі, сер. біял. Навук, 2004. – №3. – С.70-73.
1. Adamson H., Griffiths T., Parker N., Sutherland M. Light independent accumulation of chlorophyll a and b and protochlorophyllide in green barley (*Hordeum vulgare*) // *Plant Physiol.* – 1985. – V. 64. – P. 345–352.
 2. Adamska I. ELIPs - light-induced stress proteins // *Physiol. Plant.* – 1997. – V. 100. – P. 794-805.
 3. Adhikari N.D., Froehlich J.E., Strand D.D., Buck S.M., Kramer D.M., Larkin R.M. GUN4-Porphyrin Complexes Bind the ChlH/GUN5 Subunit of Mg-Chelatase and Promote Chlorophyll Biosynthesis in Arabidopsis // *Plant Cell.* – 2011. – V. 23(4). – P. 1449-145.
 4. Apel K., Santel H.J., Redlinger T.E., Falk H. The protochlorophyllide holochrome of barley (*Hordeum vulgare*). Isolation and characterization of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase // *Eur. J. Biochem.* – 1980. – V. 111, – P. 251–258.
 5. Aronsson H., Sundqvist Ch., Dahlin C. POR hits the road: import and assembly of a plastid protein // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – V. 51. – P. 1–7.

6. Albrecht V, Ingenfeld A, Apel K. Characterization of the snowy cotyledon 1 mutant of *Arabidopsis thaliana*: the impact of chloroplast elongation factor G on chloroplast development and plant vitality // *Plant Mol Biol.* – 2006. – V. 60(4). – P. 507-518.
7. Albrecht V, Ingenfeld A, Apel K. Snowy cotyledon 2: the identification of a zinc finger domain protein essential for chloroplast development in cotyledons but not in true leaves // *Plant Mol Biol.* – 2008. – V. 66(6). – P. 599-608.
8. Alabadi, D., Gallego-Bartolome J., Orlando L., Garcia-Carcel L., Rubio V., et al. Gibberellins modulate light signaling pathways to prevent *Arabidopsis* seedling de-etiolation in darkness.// *Plant J.* – 2008. – V. 53(2). – P. 324-335.
9. Alawady A, Reski R, Yaronkaya E, Grimm B. Cloning and expression of the tobacco CHLM sequence encoding Mg protoporphyrin IX methyltransferase and its interaction with Mg chelatase // *Plant Mol. Biol.* – 2005. – V. 57(5). – P. 679-691.
10. Alefounder P.R., Abell C., Battersby A.R. The sequence of hemC, hemD and two additional *E coli* genes // *Nucleic acid Res.* – 1988. – V. 16(20). – P. 9871.
11. Anderson S.L., Kay S.A. Functional dissection of circadian clock- and phytochrome-regulated transcription of the *Arabidopsis* CAB2 gene // *PNAS, USA.* – 1995. – V. 92(5). – P. 1500–1504.
12. Ankele E., Kindgren P., Pesquet E., Strand A. In vivo visualization of Mg-protoporphyrin IX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast // *Plant Cell.* – 2007. – V. 19(6). – P. 1964-1979.
13. Apchelinov A.A., Soldatova O.P., Ezhova T.A., Grimm B., Schestakov S.V. The analysis of the ChII 1 and ChII 2 genes using acifluorfen-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* // *Planta.* – 2007. – V. 225(4). – P. 935-943.
14. Armstead I., Donnison I., Aubry S., Harper J., Hörtensteiner S., James C., Mani J. et al. Cross-species identification of Mendel's locus // *Science.* – 2007. – V. 315. – № 5. – P. 73.
15. Armstead I., Donnison I., Aubry S., Harper J., Hörtensteiner S., James C., Mani J. et al. From crop to model to crop: identifying the genetic basis of the staygreen mutation in the *Lolium/Festuca* forage and amenity grasses // *New Phytol.* – 2006. – V. 172. – P. 592–597.

16. Armstrong G.A. Greening in the dark: light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms // *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1998. – V. 43. – P. 87-100.
17. Aronsson H., Sundqvist Ch., Dahlin C. POR hits the road: import and assembly of a plastid protein // *Plant Mol. Biol.* – 2003. – V. 51. – P. 1–7.
18. Asano T., Wang P.C., Iwasaki A. Synthesis of porphyrin-incorporated polymers and their application for simultaneous detection of multimetal components by using spectrophotometry // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2010. – V. 75. – P 305-309.
19. Ashby M.K., Houmard J. Cyanobacterial two-component proteins: structure, diversity, distribution, and evolution // *Microbiol Mol Biol Rev.* – 2006. – V. 70. – P. 472–509.
20. Astner I., Schulze J.O., van den Heuvel J.et. al. Crystal structure of 5-aminolevulinate synthase, the first enzyme of heme biosynthesis, and its link to XLSA in humans // *EMBO*. – 2005. – V. 24. – P. 3166-3177.
21. Aubry S., Mani J. and Hörtensteiner S. Stay-green protein, defective in Mendel's green cotyledon mutant, acts independent and upstream of pheophorbide a oxygenase in the chlorophyll catabolic pathway // *Plant Mol. Biol.* – 2008. – V. 67. – P. 243–256.
22. Badminton M.N. and Elder G.H. Molecular mechanisms of dominant expression in porphyria // *J. Inherit. Metab. Dis.* – 2005. – V. 28(3). – P. 277-286.
23. Barkan A. Approaches to investigating nuclear genes that function in chloroplast biogenesis in land plants // *Methods Enzymol.* – 1998. – V. 97. – P.38–57.
24. Barkan A., Goldschmidt-Clermont M. Participation of nuclear genes in chloroplast gene expression // *Biochimie*. – 2000. – V. 82. – P. 559-572.
25. Barneche F., Winter V, Crèvecoeur M., Rochaix J.D. ATAB2 is a novel factor in the signalling pathway of light-controlled synthesis of photosystem proteins // *EMBO J.* – 2006. – V. 25(24). – P. 5907-5918.
26. Barry C.S., McQuinn R.P., Chung M.-Y., Besuden A. and Giovannoni J. Amino acid substitutions in homologs of the STAY-GREEN protein are responsible for the green-

- flesh and chlorophyll retainer mutations of tomato and pepper // *Plant Physiol.* – 2008. – V. 147. – P. 179–187.
27. Batschauer A., Mosinger E., Kreuz K., Dorr I., Apel K. The implication of a plastid-derived factor in the transcriptional control of nuclear genes encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein // *Eur. J. Biochemistry.* – 1986. – V. 154. – P. 625–634.
28. Battistuzzi F.U., Feijao A., Hedges S.B. A genomic timescale of prokaryote evolution: insights into the origin of methanogenesis, phototrophy, and the colonization of land // *BMC Evol Biol.* – 2004. – V. 4. – P. 44.
29. Beale S.I. Biosynthesis of the Tetrapyrrole Pigment Precursor, delta-Aminolevulinic Acid, from Glutamate // *Plant Physiol.* – 1990. – V. 93(4). – P. 1273–1279.
30. Beale S.I. Enzymes of chlorophyll biosynthesis // *Photosynthesis research.* – 1999. – V. 60. – P. 43–73.
31. Beerling D.J., Berner R.A. Feedbacks and the coevolution of plants and atmospheric CO₂ // *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA.* – 2005. – V. 102. – P. 1302–1305.
32. Batschauer A., Santel H.J., Apel K. The presence and synthesis of the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in barley leaves with a high-temperature-induced deficiency of plastid ribosomes // *Planta.* – 1982. – V. 154, – P. 459–464.
33. Begley T. P. Photoenzymes: a novel class of biological catalysts // *Acc. Chem. Res.* – 1994. – V. 27. – P. 394–401.
34. Bennoun P., Masson A., Delosme M. A method for complementation analysis of nuclear and chloroplast mutants of photosynthesis in *Chlamydomonas* // *Genetics.* – 1980. – V. 95. – P. 39–47.
35. Birve S.J., Selstam E., Johansson L.B.A. Secondary structure of NADH: protochlorophyllide oxidoreductase examined by circular dichroism and prediction methods // *Biochemistry.* – 1996. – V. 317. – P. 549–555.
36. Bogorad L. Chlorophyll biosynthesis: in book: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*; ed.: Goodwin T.W. – New York: Acad. Press., 1976. – P. 64–148.
37. Bröcker M.J., Virus S., Ganskow S., Heathcote P., Heinz D.W., et al. ATP-driven reduction by dark-operative protochlorophyllide oxidoreductase from *Chlorobium*

- tepidum mechanistically resembles nitrogenase catalysis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – P. 10559-10567.
38. Brzezowski P., Schlicke H., Richter A., Dent R.M., Niyogi K.K., Grimm B. The GUN4 protein plays a regulatory role in tetrapyrrole biosynthesis and chloroplast-to-nucleus signalling in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant J.* – 2014. – V. 79(2). – P. 285-298.
39. Burke D.H., Alberti M., Hearst J.E. bchFNBH bacteriochlorophyll synthesis genes of *Rhodobacter capsulatus* and identification of the third subunit of light-independent protochlorophyllide reductase in bacteria and plants // *J. Bacteriol.* – 1993. – V. 175. – P. 2414–2422.
40. Berkner L.V., Marshall L.C. On the origin and rise of oxygen in the Earth's atmosphere // *J Atmosph Sci.* – 1965. – V. 22. – P. 225–261.
41. Bi Y.M., Zhang Y., Signorelli T., Zhao R., Zhu T., Rothstein S. Genetic analysis of *Arabidopsis* GATA transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity // *Plant J.* – 2005. – V. 44(4). – P. 680-692.
42. Block M.A., Tewari A.K., Albrieux C., Marechal E., Joyard J. The plant S-adenosyl-L-methionine: Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes // *Eur. J. Biochemistry*. – 2002. – V. 269(1). – P. 240-248.
43. Bock R, Timmis J.N. Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus // *Bioessays*. – 2008. – V. 30(6). – P. 556-566.
44. Bollivar D.W., Suzuki J.Y., Beatty T., Dobrowolskiy J.M., Bauer C.E. Direct mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* // *J. Molecular Biology*. – 1994. – V. 237. – P. 622-640.
45. Bou-Torrent J., Roig-Villanova I., Martinez-Garcia J.F. Light signaling: back to space // *Trends Plant Sci.* – 2008. – V. 13(3). – P. 108-114.
46. Bradbeer J.W. Atkinson Y.E., Börner T. and Hagemann R. Cytoplasmic synthesis of plastid polypeptides may be controlled by plastid-synthesized RNA // *Nature*. – 1997. – V. 279. – P. 816–817.

47. Brancaloni V., Dipierro E., Ausenda S., Besana V., Cappellini M.D. Novel human pathological mutations. Gene symbol: UROD. Disease: porphyria, cutaneous // *Hum. Genet.* – 2007. – V. 122(3-4). – P. 415.
48. Bröcker M. J., Virus S., Ganskow S., Heathcote P., Heinz D. W., Schubert W-D., Jahn D. and Moser J. ATP-driven Reduction by Dark-operative Protochlorophyllide Oxidoreductase from *Chlorobium tepidum* Mechanistically Resembles Nitrogenase Catalysis // *Journal of Biological Chemistry.* – 2008. – V. 283. – P. 10559-10567.
49. Burke D.H., Alberti M., Hearst J.E. bchFNBH bacteriochlorophyll synthesis genes of *Rhodobacter capsulatus* and identification of the third subunit of light-independent protochlorophyllide reductase in bacteria and plants // *J. Bacteriol.* – 1993. – V. 175. – P. 2414–2422.
50. Cahoon A.B., Timko M.P. Yellow-in-the-dark mutants of *Chlamydomonas* lack the CHLL subunit of light-independent protochlorophyllide reductase // *Plant Cell.* – 2000. – V. 12. – P. 559–568.
51. Choquet Y., Rahire M., Girard-Bascou J., Erickson J., Rochaix J.-D. A chloroplast gene is required for light-independent accumulation of chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii* // *J. EMBO.* – 1992. – V.11. – No. 5. – P. 1697-1704.
52. Choudhary M., Kaplan S. DNA sequence analysis of the photosynthesis region of *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 // *Nucl. Acids Res.* – 2000. – V. 28. – P. 862–867.
53. Casal J.J., Yanovsky M.J. Regulation of gene expression by light. // *The International Journal of Developmental Biology.* – 2005. – V. 49(5-6). – P. 501-511.
54. Casazza A.P., Rossini S., Rosso M.G., Soave C. Mutational and expression analysis of ELIP1 and ELIP2 in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol Biol.* – 2005. – V. 58(1). – P. 41-51.
55. Castillon A, Shen H, Huq E. Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks // *Trends Plant Sci.* – 2007. – V. 12(11). – P. 514-521.
56. Cavaleiro J.A., Kenner G.W., Smith K.M. Pyrroles and related compounds. Part XXXII. Biosynthesis of protoporphyrin IX from coproporphyrinogen III // *J. Chem.Soc.Perkin Trans.* – 1974. – V. 10. – P. 1188-1194.

57. Cavalier-Smith T. Electron microscopy of zygospore formation in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Protoplasma*. – 1976. – V. 87. – P. 297-315.
58. Cha K.W., Lee Y.J., Koh H.J., Lee B.M., Nam Y.W., Paek N.C. Isolation, characterization, and mapping of the stay green mutant in rice // *Theor. Appl Genet.* – 2002. – V. 104. – P. 526-532.
59. Chang C.S., Li Y.H., Chen L.T., Chen W.C., Hsieh W.P., et al.. LZF1, a HY5-regulated transcriptional factor, functions in Arabidopsis de-etiolation.// *Plant J.* – 2008. – V. 54(2). – P. 205-219.
60. Chattopadhyay S., Puente P, Deng X.W., Wei N. Combinatorial interaction of light-responsive elements plays a critical role in determining the response characteristics of light-regulated promoters in Arabidopsis.// *Plant J.* – 1998. – V. 15(1). – P. 69-77.
61. Chekunova E., Papenbrock J., Voronetskaya V., Grimm B., Beck C.F. Molecular characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants defective in H subunit of Magnesium chelatase // *Mol.Genet.Genomics*. – 2001. – V.266. – P. 363-373.
62. Chekunova E.M., Yaronskaya E.B., Shalygo N.V., Averina N.G., Chunaev A.S. Regulatory mutation affecting chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*: in book: “Photosynthesis: from light to biosphere”; ed.: Paul Mathis. – Kluwer Academic Publishers, 1995. – V. III. –P. 921-924.
63. Chen M, Chory J., Fankhauser C. Light signal transduction in higher plants // *Annu Rev. Genet.* – 2004. – V. 38. – P. 87-117.
64. Chen M., Schliep M., Willows R. D, Cai Zh.-L., Neilan B. A. and Scheer H.A Red-Shifted Chlorophyll // *Science*. – 2010. – V. 329. – P. 1318 – 1319.
65. Christie J.M. Phototropin blue-light receptors // *Ann. Rev. Plant Biology*. – 2008. – V. 58. – P. 21-45.
66. Choquet Y., Rahire M., Girard-Bascou J., Erickson J., Rochaix J.-D. A chloroplast gene is required for light-independent accumulation of chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii* // *J. EMBO*. – 1992. – V. 11(5). – P: 1697- 704.
67. Czarnecki O, Grimm B. Post-translational control of tetrapyrrole biosynthesis in plants, algae, and cyanobacteria // *J. Exp Botany*. – 2012. – V. 9. – P. 1-13.

68. Cripps D., Peters H. Fluorescing erythrocytes and porphyrin screening tools on urine, stool and blood/ Investigation of photosensitivity // *Arch. Derm.* – 1967. – V. 96. – N 6. – P. 712-720.
69. Dahlin C., Aronsson H., Wilks H.M., Lebedev N., Sundqvist C., M. P. Timko M.P. The role of protein surface charge in catalytic activity and chloroplast membrane association of the pea NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR) as revealed by alanine mutagenesis // *Plant Mol. Biol.* – 1999. – V. 39. – P. 309–323.
70. Demko V., Pavlovic A., Valkova D., Slovakova L., Grimm B., Hudak J. A novel insight into the regulation of light-independent chlorophyll biosynthesis in *Larix decidua* and *Picea abies* seedlings // *Planta.* – 2009. – V. 230. – P. 165–176.
71. Drumm-Herrel H., Mohr H. Regulation by light of chlorophyll synthesis in the cotyledons of Scots pine (*Pinus sylvestris*) seedlings // *Physiol. Plant.* – 1994. – V. 91. – P. 300–306.
72. Dauvillée D., Stampacchia O., Girard-Bascou J., Rochaix J.D. Tab2 is a novel conserved RNA binding protein required for translation of the chloroplast *psaB* mRNA // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – P. 6378–6388.
73. Davis, S.I., Kurepa, J., Vierstara, R.D. The *Arabidopsis thaliana* HY1 locus, required for phytochrome-chromophore biosynthesis, encodes a protein related to heme oxygenases // *PNAS USA.* – 1999. – V. 96(11). – P. 6541-6546.
74. De Santis-MacIossek G., Kofer W., Bock A., Schoch S., Maier R.M., Wanner G., Rudiger W., Koop H.U., Herrmann R.G. Targeted disruption of the plastid RNA polymerase genes *rpoA*, *B* and *C1*: molecular biology, biochemistry and ultrastructure // *Plant J.* – 1999. – V. 18. – P. 477–489.
75. Deng X.W., Caspar T., Quail P.H. Cop1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*.// *Genes Dev.* – 1991. – V. 5(7). – P. 1172-1182.
76. Deng, X.W., Masui, M., Wei, N., Wagner D., Chu, A.M., Feldmann, K.A., Quail, P.H. COP1, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain // *Cell.* – 1992. – V. 71(5). – P. 791-801.

77. Deusch O., Landan G., Roettger M., Gruenheit N., Kowallik K.V., et al. Genes of cyanobacterial origin in plant nuclear genomes point to a heterocyst-forming plastid ancestor // *Mol Biol Evol.* – 2008. – V. 25(4) – P. 748-761.
78. Duek P.D., Elmer M.V., van Oosten V.R. & Fankhauser C. The degradation of HFR1, a putative bHLH class transcription factor involved in light signaling, is regulated by phosphorylation and requires COP1 // *Current Biology.* – 2004. – V. 14. – P. 2296–2301.
79. Evans T, Reitman M, Felsenfeld G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes // *PNAS, USA.* – 1988. – V 85(16). – P. 5976-80.
80. Eves E.M. and Chiang K-S. Genetics of *Chlamydomonas* diploids. I. Isolation and characterization and meiotic segregation pattern of a homozygous diploid // *Genetics.* – 1982. – V. 100. – P. 35-60.
81. Falciatore A., Merendino L., Barneche F., Ceol M., Meskauskiene R., Apel K., Rochaix J.D. The FLP proteins act as regulators of chlorophyll synthesis in response to light and plastid signals in *Chlamydomonas* // *Genes Dev.* – 2005. – V. 19(1). – P. 176-187.
82. Falk J.-E. Chromatography of porphyrins and metalloporphyrins // *J. of Chromatography.* – 1961. – V. 5. – N. 4. – P. 277-299.
83. Falk J.-E. Porphyrins and metalloporphyrins. Their general, physical and coordination chemistry – Elsevier: Amsterdam, 1964. – 266 p.
84. Fankhauser Ch., Yeh K-C., Lagarias J.C., Zhang H., Elich T.D., Chory J. PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis* // *Science.* – 1999. – V. 284(5419). – P. 1539-1541.
85. Foley T, Dzelzkalns V, Beale S.I. Delta-Aminolevulinic acid synthase of *Euglena gracilis*: Regulation of Activity // *Plant Physiology.* – 1982. – V. 70. – P. 219-226.
86. Fong A., Archibald J.M. Evolutionary dynamics of light-independent protochlorophyllide oxidoreductase genes in the secondary plastids of cryptophyte algae // *Eukar. Cell.* – 2008. – V. 7. – P. 550–553.
87. Ford C., Mitchell S., Wang W. Y. Protochlorophyllide photoconversion mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Mol. Gen. Genet.* – 1981. – V. 184. – P. 460–464.

88. Ford C., Mitchell S., Wang W.-Y. Characterization of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in the *y-7* and *pc-1 y-7* mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. – 1983. – V. 192. – P. 290–292.
89. Ford C., Wang W.-Y. Three new yellow loci in *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. – 1980. – V. 179. – P. 259–263.
90. Ford C., Wang W.-Y. Temperature sensitive yellow mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. – 1980. – V. 180. – P. 5–10.
91. Forreiter C. and Apel K. Light-independent protochlorophyllide-reducing activities and two distinct NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase polypeptides in mountain pine (*Pinus mugo*) // Planta. – 1993. – V. 190. – P. 536 - 545.
92. Frei R., Gaucher C., Poulton S.W & Canfield D. E. Fluctuations in Precambrian atmospheric oxygenation recorded by chromium isotopes // Nature. – 2009. – V. 461. – P. 250-253.
93. Frick G., Su Q., Apel K., Armstrong G.A. An Arabidopsis *porB porC* double mutant lacking light-dependent NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases B and C is highly chlorophyll-deficient and developmentally arrested // Plant J. – 2003. – V. 35 (2). – P. 141-153.
94. Frigaard, N.-U., Larsen, K. L. and Cox, R.P. Spectrochromatography of photosynthetic pigments as a fingerprinting technique for microbial phototrophs // FEMS Microbiology Ecology. – 1996. – V. 20. – P. 69-77.
95. Fujita, Y., Bauer C.E. Reconstitution of light-independent protochlorophyllide reductase from purified BchL and BchN-BchB subunits. In vitro confirmation of nitrogen-like features of a bacteriochlorophyll biosynthesis enzyme // J. Biol. Chem. – 2000. – 275. – P. 23583–23588.
96. Fujita, Y., Matsumoto H., Takahashi Y., Matsubara H. Identification of a *nifDK*-like gene (ORF467) involved in the biosynthesis of chlorophyll in the cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell Physiol. – 1993. – V. 34. – P. 305–314.
97. Fujita, Y., Takagi H., Hase T. Identification of a *chlB* gene product essential for light-independent chlorophyll biosynthesis in the cyanobacterium *Plectonema boryanum* // Plant Cell Physiol. – 1996. – V. 37. – P. 313–323.
98. Fujita Y., Takagi H., Hase T. Cloning of the gene encoding a protochlorophyllide

- reductase: the physiological significance of the co-existence of light-dependent and -independent protochlorophyllide reduction systems in the cyanobacterium *Plectonema boryanum* // *Plant Cell Physiol.* – 1998. – V. 39. – P. 177–185.
99. Fujita, Y., Takahashi Y., Chuganji M., Matsubara H. The *nifH*-like (*frxC*) gene is involved in the biosynthesis of chlorophyll in the filamentous cyanobacterium *Plectonema boryanum* // *Plant Cell Physiol.* – 1992. – V. 33. – P. 81–92.
100. Fujita, Y., Takahashi, Y., Koschi., Ozeki H., Ohya K., Matsubara H. Identification of a novel *nifH*-like (*frxC*) protein in chloroplasts of liverwort *Marchantia polymorpha* // *Plant Mol. Biol.* – 1989. – V. 13. – P. 551–561.
101. Fujita, Y., Takahashi Y., Koschi T., Ozeki H., Ohya K., Matsubara H. Cloning, nucleotide sequences and differential expression of the *nifH* and *nifH*-like (*frxC*) genes from the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Plectonema boryanum* // *Plant Cell Physiol.* – 1991. – V. 32. – P. 1093-1106.
102. Fujiwara M., Nagashima A., Kanamaru K., Tanaka K., Takahashi H. Three new nuclear genes, *sigD*, *sigE* and *sigF*, encoding putative plastid RNA polymerase sigma factors in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.* – 2000. – V. 481. – P. 47–52.
103. Gagne G., Guertin M. The early genetic response to light in the green unicellular alga *Chlamydomonas eugametos* grown under light/dark cycles involves genes that represent direct responses to light and photosynthesis.// *Plant Mol Biol.* – 1992. – V. 18(3). – P. 429-445.
104. Garcia-Gil L., Gich F.B., Fuentes-Garcia X. A comparative study of *bchG* from green photosynthetic bacteria // *Arch. Microbiology.* – 2003. – V. 179(2). – P. 108-115.
105. Gibson L.C., Willows R.D., Kannangara C.G., von Wettstein D., Hunter C.N. Magnesium-protoporphyrin chelatase of *Rhodobacter sphaeroides*: reconstitution of activity by combining the products of the *bchH*, -I, and -D genes expressed in *Escherichia coli* // *PNAS USA.* – 1995. – V. 92(6). – P. 1941-1944.
106. Goslings D., Meskauskiene R., Kim C., Lee K.P., Nater M., Apel K. Concurrent interactions of heme and FLU with Glu tRNA reductase (HEMA1), the target of metabolic feedback inhibition of tetrapyrrole biosynthesis, in dark- and light-grown *Arabidopsis* plants // *Plant J.* – 2004. – V. 40(6). – P. 957-967.

107. Granick S. Protoporphyrin IX as a precursor of chlorophyll // *J. Biol. Chemistry.* – 1948. – V. 172. – P.717-727.
108. Granick S. Mg-protoporphyrin as a precursor of chlorophyll // *J. Biol. Chemistry.* – 1948. – V. 175. – P. 333.
109. Granick S. The structural and functional relationships between heme and chlorophyll // *Harvey lectures.* – 1950. – V 44. – P. 220-245.
110. Granick S. Magnesium porphyrin formed by barley seedlings treated with 5-aminolevulinic acid // *Plant Physiology.* – 1959. – Suppl. 34. – P. 1.
111. Gray J., Close P.S., Briggs S.P. and Johal G.S. A novel suppressor of cell death in plants encoded by the *Lls1* gene of maize // *Cell.* – 1997. – V. 89. – P.25–31.
112. Griffiths, W. T. Protochlorophyllide reduction:in: “Chlorophylls”; ed.: Scheer H. – Boca Raton: CRC Press, 1991. – P. 433–450.
113. Griffiths W.T., McHugh T., Blankenship R.E. The light intensity dependence of protochlorophyllide photoconversion and its significance to the catalytic mechanism of protochlorophyllide reductase // *FEBS Lett.* – 1996. – V. 398. – P. 235–238.
114. Grimm B. Primary structure of a key enzyme in plant tetrapyrrole synthesis glutamate 1-semialdehyde aminotransferase // *PNAS, USA.* – 1990. – V. 87. – P. 4169-4173.
115. Grimm B., Bull A., Breu V. Structural genes of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase for porphyrin synthesis in a cyanobacterium and *Escherichia coli* // *Mol.Gen.Genetics.* 1991. – V. 225. – P. 1-10.
116. Grimm B., Bull A., Welinder K.G., Gough S.P., Kannangara C.G. Purification and partial amino acid sequence of the glutamate 1-semialdehyde aminotransferase of barley and *Synechococcus* // *Carlsberg Res Commun.* – 1989. – V. 54(2). – P. 67-79.
117. Grossman A.R., Harris E.E., Hauser C., Lefebvre P.A., Martines D., et al. *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics. *Eucariotic Cell.* – 2003. – V. 2, – N 6, – P. 1137-1150.
118. Hadson A., Carpenter R., Doyle S., Coen E.S. Olive: a key gene require for chlorophyll biosynthesis in *Antirrhinum majus* // *EMBO J.* – 1993. – V.12. – P. 3711-3709.

119. Hajdukiewicz P.T., Allison L.A., Maliga P. The two RNA polymerases encoded by the nuclear and the plastid compartments transcribe distinct groups of genes in tobacco plastids // *EMBO J.* – 1997. – V. 16. – P. 4041–4048.
120. Hanaoka M., Kanamaru K., Fujiwara M., Takahashi H., Tanaka K. Glutamyl-tRNA mediates a switch in RNA polymerase use during chloroplast biogenesis.// *EMBO J.* – 2005. – V. 6(6). – P. 545-552.
121. Hansson M. and Hederstedt L. *Bacillus subtilis* HemY is a peripheral membrane protein essential for protoheme IX synthesis which can oxidize coproporphyrinogen III and protoporphyrinogen IX // *J. Bacteriology.* – 1994. – V. 176(19). – P. 5962-5970.
122. Harris E.H. *The Chlamydomonas Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use.* – San Diego: California, 1989. – 789 p.
123. Hegemann P. Algal Sensory Photoreceptor // *Ann. Rev. Plant Biology.* – 2008. – V. 59. – P 167-189.
124. Hearst J.E., Alberti R.F., Doolittle R.F. A putative nitrogenase reductase gene found in the nucleotide sequences from photosynthetic gene cluster of *R. capsulata* // *Cell.* – 1985. – V. 40. – P. 219–220.
125. Heyes D.J., Ruban A.V., Hunter C.N. Protophyllorophyllide oxidoreductase: “dark” reactions of a light-driven enzyme // *Biochemistry.* – 2003. – V. 42. – P. 523-538.
126. Holtorf H., Reinbothe S., Reinbothe R., Berezina B., Apel K. Two routes of chlorophyllide synthesis that are differentially regulated by light in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *PNAS, USA.* – 1995. – V. 92. P. – 3254–3258.
127. Huang C., Liu X-Q. Nucleotide sequence of the *frxC*, *petB* and *trnL* genes in the chloroplast genome of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Mol. Biol.* – 1992. – V. 18. – P. 985–988.
128. Hendry G.A.F., Houghton J.D., Brown S.B. The degradation of chlorophyll: a biological enigma // *New Phytology.* – 1987. – V. 107. – P. 255-302.
129. Hess W.R., Börner T. Organellar RNA polymerases of higher plants // *Int. Rev. Cytology.* – 1999. – V. 190. – P. 1–59.

130. Hill K.L. and Merchant S. Coordinate expression of coproporphyrinogen oxidase and cytochrome c6 in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in response to changes in copper availability // *EMBO J.* – 1995. – V. 14(5). – P. 857-865.
131. Hirono Y., Redei G.P. Multiple allelic control of chlorophyll b level in *Arabidopsis thaliana* // *Nature.* – 1963. – V. 197. – P.1324-1325.
132. Holtorf H, Apel K. The regulation of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductases A and B in green barley plants kept under a diurnal light/dark cycle // *Planta.* – 1996. – V.199. – P. 289–295.
133. Hooper J.K., Eggink L.L. A potential role of chlorophylls b and c in assembly of light-harvesting complexes // *FEBS Lett.* – 2001. – V. 489(1). – P. 1-3.
134. Hörtensteiner, S. Chlorophyll breakdown in higher plants and algae // *Cell. Mol. Life Sci.* – 1999. – V. 56. – P. 330–347.
135. Hörtensteiner, S. Chlorophyll degradation during senescence // *Annu. Rev. Plant Biol.* – 2006. – V. 57. –P. 55–77.
136. Huang D.-D., Wang W-Y., Gough S.P., Kannangara C.G. 5-Aminolevulinic acid-synthesizing enzymes need an RNA moiety for activity // *Science.* – 1984. – V. 225. – P. 1482-1484.
137. Hudson M., Ringli C., Boylan M.T., Quail P.H. The FAR1 locus encodes a novel nuclear protein specific to phytochrome A signaling // *Genes Dev.* – 1999. – V. 13(15). – P. 2017-2027.
138. Huq E., Al-Sady B., Hudson M., Kim .C, Apel K., Quail P.H. Phytochrome-interacting factor 1 is a critical bHLH regulator of chlorophyll biosynthesis // *Science.* – 2004. – V. 305. – P.1937-1941.
139. Ikegami A., Yoshimura N., Motohashi K., Takahashi S., Romano P.G., Hisabori T., Takamiya K., Masuda T. The CHLI1 subunit of *Arabidopsis thaliana* magnesium chelatase is a target protein of the chloroplast thioredoxin // *J. Biol Chem.* – 2007. – V. 282. – P. 19282-19291.
140. Ilag L.L., Jahn D., Eggertsson G., Söll D. The *Escherichia coli* HemL gene encodes glutamate 1-semialdehyde aminotransferase // *J. Bacteriology.* – 1991. – V. 173. – P. 3408-3413.

141. Im C.S., Eberhard S., Huang K., Beck C.F., Grossman A.R. Phototropin involvement in the expression of genes encoding chlorophyll and carotenoid biosynthesis enzymes and LHC apoproteins in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant J.* – 2006. – V. 48(1). – P. 1-16.
142. Jacobs J.M. and Jacobs N.J. Oxidation of protoporphyrinogen to protoporphyrin, a step in chlorophyll and haem biosynthesis. Purification and partial characterization of the enzyme from barley organelles // *Biochem J.* – 1987. – V. 244(1). – P. 219-224.
143. Jakob-Wilk D., Holland D., Goldschmidt E.E., Riov J. and 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.
144. Jensen P.E., Willows R.D., Petersen B.L., Vothknecht U.C., Stummann B.M., Kannangara C.G., von Wettstein D and Henningsen K.W. Structural genes for Mg-chelatase subunits of barley: Xantha-f, -g, and h // *Mol.Gen.Genet.* – 1996. – V. 250. – P. 383-394.
145. Jensen P.E., Gibson L.C.D., Hunter C.N. Determination of catalitical activity with the use of purified I, D and H subunits of magnesium protoporphyrin IX chelatase from *Synechocystis* sp. PCC6803 // *Biochemistry J.* – 1998. – V. 334 (part 2). – P. 335-344.
146. Jensen P.E., Reid J.D., Hunter C.N. Modification of cysteine residues in ChII and ChIH subunits of magnesium chelatase results in enzyme inactivation // *Biochemistry J.* – 2000. – V. 352. – P. 435-441.
147. Jiang H., Li M., Liang N., Yan H., Wei Y., Xu X., Liu J., Xu Z., Chen F. and Wu G. Molecular cloning and function analysis of the stay green gene in rice // *Plant J.* – 2007. – V. 52. – P. 197–209.
148. Johanningmeier U., Howell S.H. Regulation of light-harvesting chlorophyll-binding protein mRNA accumulation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Possible involvement of chlorophyll synthesis precursors.// *J Biol Chem.* – 1984. – V. 259(21). – P. 13541-9.

149. Jones M.C., Jenkins J.M., Smith A.G., Howe C.J. Cloning and characterisation of genes for tetrapyrrole biosynthesis from cyanobacterium *Anacystis nidulans* R2 // *Plant Mol.Biology*. 1994. V. 24(3). P. 435-448.
150. Josse E-M., Foreman J., Halliday K.J. Paths through the phytochrome network // *Plant Cell & Environment*. – 2008. – V. 31(5). – P. 667-678.
151. Karger G.A., Reid J.D., Hunter C.N. Characterization of the binding of deuteroporphyrin IX to the magnesium chelatase H subunit and spectroscopic properties of the complex // *Biochemistry*. – 2001. – V. 40. – P. 9291-9299.
152. Khrebtukova I. and Spreitzer R J. *Chlamydomonas* chloroplast trnR, trnT, and trnE genes // *Plant Physiology*. – 1994. – V. 104(3): – P. 1093–1094.
153. Kiel J.A., Ten Berge A.M., Venema G. Nucleotide sequence of the *Synechococcus* sp. PCC7942 hemE gene encoding the homologue of mammalian uroporphyrinogen decarboxylase // *DNA Sequencing Mapping*. – 1992. – V. 2(6). P– . 415-418.
154. Kim C., Apel K. Substrate-dependent and organ-specific chloroplast protein import in planta // *Plant Cell*. – 2004. –V.. 16. – P. 88-98.
155. Klein O, Senger H. Two biosynthetic pathways to delta-Aminolevulinic acid in a pigment mutant of the green alga *Scenedesmus obliquus* // *Plant Physiol*. 1– 978. – V. 62. – P. 10-13.
156. Kleine T., Voigt C., Leister D. Plastid signalling to the nucleus: messengers still lost in the mists? // *Trends Genet*. – 2009. – V. 25. – P. 185-192.
157. Kohchi T., Mukougawa K., Frankenberg N., Masuda M., Yokota A., Lagarias J.C. The *Arabidopsis* HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase.// *Plant Cell*. – 2001. – V. 13(2). – P. 425-436.
158. Koncz .C, Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Reiss B., Redei G.P., Schell J. Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana* // *EMBO J*. – 1990. – V. 9. – P. 1337–1346.
159. Koussevitzky S., Nott A., Mockler T.C., Hong F., Sachetto-Martins G., Surpin M., Lim J., Mittler R., Chory J. Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression // *Science*. – 2007. – V. 316(5825). – P. 715-719.

160. Krause K., Kilbienski I., Mulisch M., Rodiger A., Schafer A., Krupinska K. DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles // *FEBS Lett.* — 2005. — V. 579. — P. 3707–3712.
161. Kropat J., Oster U., Rudiger W., Beck C.F. Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes.// *PNAS, USA.* — 1997. — V. 94(25). — P. 14168-14172.
162. Kruse E., Mock H.P., Grimm B. Coproporphyrinogen III oxidase from barley and tobacco--sequence analysis and initial expression studies // *Planta.* — 1995. — V. 196(4). — P. 796-803.
163. Kumar A.M., Csankovszki G., Soll D. A second and differentially expressed glutamyl-tRNA reductase gene from *Arabidopsis thaliana* // *Plant Mol Biol.* — 1996. — V. 30(3). — P. 419-26.
164. Kusaba, M., Ito, H., Morita, R. et.al. Rice NON-YELLOW COLORING1 is involved in light-harvesting complex II and grana degradation during leaf senescence // *Plant Cell.* — 2007. — V. 19. — P. 1362–1375.
165. Kwok S.F., Piekos B., Misera S., Deng X.W. A complement of ten essential and pleiotropic arabidopsis COP/DET/FUS genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness. // *Plant Physiol.* — 1996. — V. 110(3). — P. 731-742.
166. Lariguet P., Schepens I., Hodgson D., Pedmale U.V., Trevisan M., et al. PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism // *PNAS, USA.* — 2006. — V. 103(26). — P. 10134-10139.
167. Larkin R.M., Alonso J.M., Ecker J.R., Chory J. GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling // *Science.* 2003. V. 299(5608). P. 902-906.
168. Larkin R.M., Ruckle M.E. Integration of light and plastid signals // *Curr Opin Plant Biol.* — 2008. — V. 11(6). — P. 593–599.
169. Laubinger, S., Fittinghoff, K., and Hoecker, U. The SPA quartet: a family of WD-repeat proteins with a central role in suppression of photomorphogenesis in *Arabidopsis* // *The Plant Cell.* — 2004. — V. 16. — P. 2293-2306.
170. Laudi G., Manzini M.L. Chlorophyll content and plastid ultrastructure in leaflets of *Metasequoia glyptostroboides* // *Protoplasma.* — 1975. — V. 84. — P. 185–190.

171. Lebedev N., Timko M. Protochlorophyllide photoreduction // *Photosynth. Res.* — 1998. — V. 58. — P. 5–23.
172. Lee R.W., Whiteway M.S., Yorke M.A. Recovery of sexually viable nondiploids from diploid *Chlamydomonas reinhardtii* // *Genetics.* — 1976. — V. 83. — S. 44.
173. Lee J., He K., Stolc V., Lee H., Figueroa P., Gao Y., Tongprasit W., Zhao H., Lee I., Deng X.W. Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development // *Plant Cell.* — 2007. — V. 19. — P. 731-749.
174. Lee K.P., Kim C., Lee D.W., Apel K. TIGRINA d, required for regulating the biosynthesis of tetrapyrroles in barley, is an ortholog of the FLU gene of *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.* 2— 003. — V. 553(1-2). — P. 119-124.
175. Lee K.P., Kim C., Landgraf F., Apel K. EXECUTER1- and EXECUTER2-dependent transfer of stress-related signals from the plastid to the nucleus of *Arabidopsis thaliana* // *PNAS, USA.* — 2007. — V. 104(24). — P. 10270-5.
176. Lermontova I., Kruse E., Mock H.-P and Grimm B. Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase // *PNAS, USA.* — 1997. — V. 94. — P.8895-8900.
177. Levicán G., Katz A., Valenzuela P., Söll D., Orellana O. A tRNA(Glu) that uncouples protein and tetrapyrrole biosynthesis // *FEBS Letters.* — 2005. — V. 579(28). — P. 6383-6387.
178. Li G-M., Russell C.S., Cosloy S.D. Cloning and structure of the hemA gene of *Escherichia coli* K-12 // *Gene.* — 1989. — V. 82. — P. 209-217.
179. Lim S.H., Witty M., Wallance-Cook A.D., Ilag L.I., Smith A.G. Porphobilinogen deaminase is encoded by a single gene in *Arabidopsis thaliana* and is targeted to the chloroplast // *Plant Mol.Biol.* — 1994. — V. 26. — P. 863-872.
180. Li J., Goldschmidt-Clermont M., Timko M.P. Chloroplast encoded chlB is required for light-independent protochlorophyllide reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Cell.* — 1993. — V. 5. — P. 1817-1829.
181. Li J., Timko M.P. The pc-1 phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* results from a deletion mutation in the nuclear gene for NADPH protochlorophyllide oxidoreductase // *Plant. Mol. Biol.* — 1996. — V. 30. — P. 15–37.

182. Lindholm J., Gustafsson P. Homologues of the green algal *gidA* and the liverwort *frxC* gene are present on the chloroplast genomes of conifers // *Plant Mol. Biol.* — 1991. — V. 17. — P. 787–798.
183. Lin C., Shalitin D. Cryptochrome structure and signal transduction // *Annu Rev Plant Biol.* — 2003. — V. 54. — P. 469-496.
184. Lin R. and Wang H. *Arabidopsis* FHY3/FAR1 Gene Family and Distinct Roles of Its Members in Light Control of *Arabidopsis* Development // *Plant Physiology.* — 2004. — V. 136(4) — P. 4010-4022.
185. Lin R., Teng Y., Park H.J., Ding L., Black C., et al. Discrete and essential roles of the multiple domains of *Arabidopsis* FHY3 in mediating phytochrome A signal transduction // *Plant Physiology.* — 2008. — V. 148(2). — P. 981-992.
186. Liu Y., He Q., Cheng P. Photoreception in *Neurospora*: a tale of two White Collar proteins // *Cell Mol Life Sci.* — 2003. — V. 60(10). — P. 2131-2138.
187. Loppes R., Matagne R. Allelic complementation between *arg7* mutants in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Genetica.* — 1972. — V. 43. — P. 422-430.
188. Lohr M., Chung-Soon Im, Grossman A.R. Genome-based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Physiology.* — 2005. — V. 138. — P. 490-515.
189. Lür C., Schauer S., Möbius K., Schulze J., Schubert W.- D, Heinz D.W., Jahn D., Moser J. Complex formation between Glutamyl-tRNA Reductase and Glutamate-1-semialdehyde 2,1-Aminomutase in *Escherichia coli* during the Initial Reactions of Porphyrin Biosynthesis // *The Journal of Biological Chemistry.* — 2005. — V. 280(19). — P 18568 – 18572.
190. Lundqvist J., Elmlund H., Wulff R.P., Berglund L., Elmlund D., et al. .ATP-induced conformational dynamics in the AAA+ motor unit of magnesium chelatase // *Structure.* — 2010. V. 18. — P. 354-365.
191. Luo X.M., Lin W.H., Zhu S., Zhu J.Y., Sun Y., et al. Integration of light- and brassinosteroid-signaling pathways by a GATA transcription factor in *Arabidopsis* // *Developmental Cells.* — 2010. — V. 19(6). — P. 872-883.
192. Ma L., Li J., Ou L., Hager J., Chen Z., Zhao H. Deng X.W. Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and

- cellular pathways // *Plant Cell*. — 2001. — V. 13(12). — P. 2589-2607.
193. MacMartin S.J., James A. P. A mathematical model of meiotic segregation in trisomics of yeast // *Genetical Research*. 1979. V. 33. P. 189-204.
194. MacCoy S.R., Kuehl J.V., Boore J. L Raubeson L. A. The complete plastid genome sequence of *Welwitschia mirabilis*: an unusually compact plastome with accelerated divergence rates // *Evol Biol*. — 2008. — V. 8. — P. 130.
195. Madsen O., Sandal L., Sandal N.N., Varcker K.A. A soybean coproporphyrinogen oxidase gene is highly expressed in root nodules // *Plant Molecular Biology*. — 1993. — V. 23(1). — P. 35-43.
196. Malnoe P., Mayfield S.P., Rochaix J-D. Comparative analysis of the biogenesis of photosystem II in wild type and y-1 mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* // *J. Cell Biology*. — 1988. — V. 106. — P. 609-616.
197. Manfield I.W., Devlin P.F., Jen C.H., Westhead D.R., Gilmartin P.M. Conservation, convergence and divergence of light-responsive, circadian-regulated, and tissue-specific expression patterns during evolution of the Arabidopsis GATA gene family // *Plant Physiol*. — 2007. — V. 143(2). — P. 941-958
198. Mariani P., De Carli M.E., Rascio N., Baldan B., Casadoro G., et al. Synthesis of chlorophyll and photobiosynthetic competence in etiolated and greening seedlings of *Larix decidua* as compared with *Picea abies* // *J. Plant Physiol*. — 1990. — V. 137. — P. 5-14.
199. Marrison J.L., Schunmann P.H.D., Oughan H.J., Leech R.M. Subcellular visualization of gene transcripts encoding key proteins of the chlorophyll accumulation process in developing chloroplasts // *Plant Physiol*. — 1996. — V. 110. — P. 1089–1096.
200. Marris B.L. Genetic recombination in *Rhodospseudomonas capsulatus*. PNAS, USA. — 1974. — V. 71. — P. 971.
201. Marris B. Mobilization of the genes for photosynthesis from *Rhodospseudomonas capsulata* by a promiscuous plasmid // *J. Bacteriology*. — 1981. — V. 146(3). — P. 1003-1012.

202. Martinek G.W., Ebersold W.T., Nakamura K. Mitotic recombination in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Genetics*. — 1970. — V. 64. — S. 41.
203. Martin D.I., Orkin S.H. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1 // *Genes Dev*. — 1990. — V. 4(11). — P. 1886-1898.
204. Marzluf G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi // *Microbiol Mol. Biol. Rev.* — 1997. — V. 61(1). — P. 17-32.
205. Masuda T, Takamiya K. Novel Insights into the Enzymology, Regulation and Physiological Functions of Light-dependent Protochlorophyllide Oxidoreductase in Angiosperms // *Photosynth Res.* — 2004. — V. 81. — № 1. — P. 1-29.
206. Masuda T., Takamiya K-I. Novel insights into the enzymology, regulation and physiological functions of light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase in angiosperms // *Photosynth. Res.* — 2005. — V. 81. — P. 1–29.
207. Masuda T. Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls // *Photosynth Res.* — 2008. — V. 96(2). — P. 121-143.
208. Masuda T., Fujita Y. Regulation and evolution of chlorophyll metabolism // *Photochem Photobiol Science*. 2008. V.7. P. 1131-1149.
209. Masuda T., Suzuki T., Shimada H., Ohta H., Takamiya K. Subcellular localization of two types of ferrochelatase in cucumber // *Planta*. — 2003. — V. 217(4). — P. 602-609.
210. Matile P., Hörtensteiner S., Thomas H., and Kräutler B. Chlorophyll breakdown in senescent leaves // *Plant Physiol.* — 1996. — V. 112. — P. 1403–1409.
211. Matters G.L., Beale S.I. Structure and expression of the *Chlamydomonas reinhardtii* *alad* gene encoding the chlorophyll biosynthetic enzyme, delta-aminolevulinic acid dehydratase (porphobilinogen synthase) // *Plant Mol Biol.* — 1995. — V. 27(3). — P. 607-617.
212. Mayfield S.P., Taylor W.C. Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCP) mRNA // *Eur J. Biochem.* — 1984. — V. 144(1). — P. 79-84.
213. McCormac A.C and Terry M.J. Loss of nuclear gene expression during the phytochrome A-mediated far-red block of greening response // *Plant Physiology*. —

2002. — V. 130. — P. 402-414.
214. McCormac A.C., Fischer A., Kumar A.M., Söll D., Terry M.J. Regulation of HEMA1 expression by phytochrome and a plastid signal during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* — 2001. — V. 25(5). — P. 549-561.
215. Meinecke L., Alawady A., Schroda M., Willows R., Kobayashi M.C., Niyogi K.K., Grimm B., Beck C.F. Chlorophyll-deficient mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* that accumulate magnesium protoporphyrin IX // *Plant Mol Biol.* — 2010. — V. 72(6). — P. 643-658.
216. Mendel G. Versuche über Pflanzen-Hybriden // *Transactions of Verhandlungen des naturforschenden Vereines in Brunn* (1885), iv 3-270 (Extracts republished. *BMJ* 1965; 1886. — P. 367-374.
217. Menkens A.E., Schindler U., Cashmore A.R. G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins // *Trends Biochem Sci.* — 1995. — V. 20(12). — P. 506-510.
218. Merchant S.S., Prochnik S.E., Vallon O., Harris E.H., Karpowicz S.J., et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions // *Science.* — 2007. — V. 318(5848). — P. 245-50.
219. Meskauskiene R., Apel K. Interaction of FLU, a negative regulator of tetrapyrrole biosynthesis, with the glutamyl-tRNA reductase requires the tetratricopeptide repeat domain of FLU // *FEBS Lett.* — 2002. — V. 532(1-2). — P. 27-30.
220. Meskauskiene R., Nater M., Goslings D., Kessler F., op den Camp R., Apel K. FLU: a negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *PNAS, USA.* — 2001. — V. 98(22). — P. 12826-31.
221. Meyer G., Kloppstech K. A rapidly light-induced chloroplast protein with a high turnover coded for by pea nuclear DNA // *Eur J Biochem.* — 1984. — V. 138(1). — P. 201-207.
222. Miller G.W., Denney A., Wood J.K., Welkie G.W. Light-induced delta-aminolevulinic acid in dark grown barley seedlings // *Plant Cell Physiology.* — 1979. — V. 20. P. — 131-143.
223. Mochizuki N., Brusslan J.A., Larkin R., Nagatani A., Chory J. *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H

- subunit in plastid-to-nucleus signal transduction.// PNAS, USA. — 2001. — V. 98(4). — P. 2053-2058.
224. Mochizuki N., Tanaka R., Tanaka A, Masuda T., Nagatani A. The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in Arabidopsis // PNAS, USA. — 2008. — V. 105(39). — P. 15184-9.
225. Mock H.P., Trainotti L., Kruse E., Grimm B. Isolation, sequencing and expression of cDNA sequences encoding uroporphyrinogen decarboxylase from tobacco and barley // Plant.Mol. Biol. — 1995. — V. 28(2). — P. 245-256.
226. Moller S.G., Kunkel T., Chua N.H. A plastidic ABC protein involved in intercompartmental communication of light signaling // Genes Dev. — 2001. — V. 15(1). —P. 90-103.
227. Monte E., Tepperman J.M., Al-Sady B., Kaczorowski K.A., Alonso J.M., et al. The phytochrome-interacting transcription factor, PIF3, acts early, selectively, and positively in light-induced chloroplast development.// PNAS, USA. — 2004. — V. 101(46). — P. 16091-16098.
228. Moon J., Zhu L., Shen H., Huq E. PIF1 directly and indirectly regulates chlorophyll biosynthesis to optimize the greening process in Arabidopsis // PNAS, USA. — 2008. — V. 105(27). — P. 9433-9438.
229. Morelli G. and Ruberti I. Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes // Plant Physiology. — 2000. — V. 122(3). — P. 621-626.
230. Mortimer R.K. and Hawthorne D.C. Genetic mapping in Saccharomyces. IV. Mapping of ts genes and use of disomic strains in localizing genes // Genetics. — 1973. — V.1. — P. 33-54.
231. Moseley J., Quinn J., Eriksson M. and Merchant S. The Crd1 gene encodes a putative di-iron enzyme required for photosystem I accumulation in copper deficiency and hypoxia in *Chlamydomonas reinhardtii* // EMBO J. — 2000. — V. 19(10). — P. 2139-2151.
232. Moser J., Schubert W.D., Beier V., Bringemeier I., Jahn D. and Heinz, D.W. V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis // EMBO J. — 2001. — V. 20. — P. 6583–6590.
233. Moulin M., McCormac A.C., Terry M.J., Smith A.G. Tetrapyrrole profiling in

- Arabidopsis seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation // PNAS, USA. — 2008. — V. 105(39). — P. 15178-83.
234. Moustafa A., Beszteri B., Maier U.G., Bowler C., Valentin K., Bhattacharya D. Genomic Footprints of a Cryptic Plastid Endosymbiosis in Diatoms // Science. — 2009. — V. 324. — P.1724-1726.
235. Müller A.H., Hansson M. The barley magnesium chelatase 150-kd subunit is not an abscisic acid receptor // Plant Physiol. — 2009. — V. 150(1). — P. 157-166.
236. Muraki N., Nomata J., Ebata K., Mizoguchi T., Shiba T., Tamiaki H., Kurisu G., Fujita Y. X-ray crystal structure of the light-independent protochlorophyllide reductase // Nature. — 2010. — V. 465. — P. 110-114.
237. Muramoto T., Kohchi T., Yokota A., Goodman H.M. The Arabidopsis photomorphogenic mutant *hyl* is deficient in phytochrome chromophore biosynthesis as a result of a mutation in a plastid heme oxygenase // Plant Cell. — 1999. — V. 11(3). — P. 335-348.
238. Nagata N., Tanaka R., Satoh S., Tanaka A. Identification of a vinyl reductase gene for chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* and implications for the evolution of *Prochlorococcus* species // Plant Cell. — 2005. — V. 17(1). — P. 233-240.
239. Naito T., Kiba T., Koizumi N., Yamashino T., Mizuno T. Characterization of a unique GATA family gene that responds to both light and cytokinin in *Arabidopsis thaliana* // Biosci Biotechnol. Biochem. — 2007. — V. 71(6) — P. 1557-1560.
240. Nakagawara E, Sakuraba Y, Yamasato A, Tanaka R, Tanaka A. Clp protease controls chlorophyll b synthesis by regulating the level of chlorophyllide a oxygenase // Plant J. — 2007. — V. 49(5). — P. 800-809.
241. Nakayama M, Masuda T, Bando T, Yamagata H, Ohta H, Takamiya K. Cloning and expression of the soybean chlH gene, encoding a subunit of Mg-chelatase and localization of the Mg²⁺ concentration-dependent ChlH protein within the chloroplast // Plant Cell Physiology. — 1998. — V. 39(3). — P. 275-284.
242. Narita S., Tanaka R., Ito T., Okada K., Taketani S., Inokuchi H. Molecular cloning and characterization of a cDNA that encodes protoporphyrinogen oxidase of *Arabidopsis thaliana* // Gene. — 1996. — V. 182(1-2). — P. 169-175.

243. Ni M., Tepperman J.M., Quail P.H. PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein // *Cell*. — 1998. — V. 95(5). — P. 657-667.
244. Ni M., Tepperman J.M. and Quail P.H. Binding of phytochrome B to its nuclear signalling partner PIF3 is reversibly induced by light // *Nature*. — 1999. — V. 400. — P. 781–784.
245. Nielsen O.F. Photoconversion and regeneration of active protochlorophyll(ide) in mutants defective in the regulation of chlorophyll synthesis // *Arch Biochem Biophys*. — 1974. V— . 160. — P. 430-439.
246. Nogaj L.A., Beale S.I. Physical and kinetic interactions between glutamyl-tRNA reductase and glutamate-1-semialdehyde aminotransferase of *Chlamydomonas reinhardtii* // *J. Biol Chemistry*. — 2005. — V. 280(26). —P. 24301-24307.
247. Nomata J, Mizoguchi T, Tamiaki H, Fujita Y. A second nitrogenase-like enzyme for bacteriochlorophyll biosynthesis: reconstitution of chlorophyllide a reductase with purified X-protein (BchX) and YZ-protein (BchY-BchZ) from *Rhodobacter capsulatus* // *J. Biol. Chemistry*. — 2006 — V. 281 (21) — P. 15021-15028.
248. Nomata J., Swem L.R., Bauer C.E., Fujita Y. Overexpression and characterization of dark-operative protochlorophyllide reductase from *Rhodobacter capsulatus* // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2005. — V. 1708. — P. 229–235.
249. Oelmuller R., Mohr Y. Photooxydative disruption of chloroplasts and its consequences for expression of nuclear genes // *Planta*. — 1986. — V. 167. — P. 106-113.
250. Oelmuller R. Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels // *Photochemistry Potobiology*. — 1989. — V. 49. — P. 229-239.
251. Ogura Y., Takemura M., Oda K., Yamatu K., Ohta E., Fukazawa H., Ohyama K. Cloning and nucleotide sequence of a frxC-ORF469 gene cluster of *Synechocystis PCC6803* conservation with liverwort chloroplast frxC-ORF465 and nif operon // *Biosci. Biotech. Biochem*. — 1992. — V. 56. — P. 788-793.
252. Ohad I., Siekevitz P., Palade G.E. Biosynthesis of chloroplast membranes II Plastid differentiation during greening of a dark grown algal mutant (*Chlamydomonas*

- reinhardtii*) // J. Cell Biology. — 1967. — V. 35. — P. 553-584.
253. Ohyama K., Fukazawa H., Kohchi T., Shirai H., Sano T., Sano S., Umesono K., Shiki Y., et al. Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* // Nature. — 1986. — V. 322. — P. 572-574.
254. Oliver R.P., Griffiths W.T. Identification of the polypeptides of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase // Biochem. J. 1980. V. 191. P. 277-280.
255. Olsson U., Sirijovvski N., Hansson M. Characterization of eight barley xantha-f mutants deficient in magnesium chelatase // Plant Physiology and Biochemistry. — 2004. — V. 42. — P. 557-564.
256. Oosawa N., Masuda T., Awai K., Fusada N., Shimada H., et al. Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana* // FEBS Lett. — 2000. — V. 474. — P. 133–136.
257. Ou K., Adamson H. Chlorophyll accumulation in cotyledons, hypocotyls and primary needles of *Pinus pinea* seedlings in light and dark // Physiol. Plant. — 1995. — V. 93. —P. 719–724.
258. O'Neill G.P., Schön A., Chow H., et al. Sequence of tRNA(Glu) and its genes from the chloroplast genome of *Chlamydomonas reinhardtii* // Nucleic Acids Res. — 1990. — V. 18(19). — P. 5893.
259. Oosawa N., Masuda T., Awai K., Fusada N., Ahimada H., Ohta H., Takamiya K. Identification and light-induced expression of a novel gene of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase isoform in *Arabidopsis thaliana* // FEBS Lett. — 2000. — V. 474 (2-3). — P. 133-136.
260. op den Camp R.G, Przybyla D., Ochsenbein C., Laloi C., Kim C., et al. Rapid induction of distinct stress responses after the release of singlet oxygen in *Arabidopsis*. // Plant Cell. — 2003. — V. 15(10) — P. 2320-2332.
261. Osanai T., Imashimizu M., Seki A. Sato S., Tabata S., Imamura S., Asayama M., Ikeuchi M., Tanaka K. ChlH, the H subunit of the Mg-chelatase, is an anti-sigma factor for SigE in *Synechocystis sp. PCC 6803* // PNAS, USA. — 2009. — V. 106(16) — . P. 6860-6865.
262. Osterlund M.T., Wei N., Deng X.W. The roles of photoreceptor systems and the

- COP1-targeted destabilization of HY5 in light control of Arabidopsis seedling development // *Plant Physiol.* — 2000. — V. 124(4). — P. 1520-1524.
263. Oswald O., Martin T., Dominy P.J., Graham I.A. Plastid redox state and sugars: interactive regulators of nuclear-encoded photosynthetic gene expression // *PNAS, USA.* — 2001. — V. 98(4). — P. 2047-2052.
264. Ouchane S., Picaud M., Therizols P., Reiss-Husson F., Astier C. Global regulation of photosynthesis and respiration by FnrL: the first two targets in the tetrapyrrole pathway // *J. Biol. Chemistry.* — 2007. — V. 282(10). — P. 7690-7699.
265. Ouchane S., Steunov AS., Picaud M., Astier C. Aerobic and anaerobic Mg-protoporphyrin monomethyl ester cyclases in purple bacteria: a strategy adopted to bypass the repressive oxygen control system // *J. Biol. Chemistry.* — 2004. — V. 279(8). — P. 6385-6394.
266. Oyama T., Shimura Y., Okada K. The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyls // *Genes Dev.* — 1997. — V. 11(22). — P. 2983-2995.
267. Pfeiffer A., Kunkel T., Hiltbrunner A., Neuhaus G., Wolf I. et al. A cell-free system for light-dependent nuclear import of phytochrome // *Plant J.* — 2009. — V. 57(4). — P. 680-689.
268. Philippar K., Geis T., Ilkavets I., Oster U., Schwenkert S., Meurer J., Soll J. Chloroplast biogenesis: the use of mutants to study the etioplast-chloroplast transition // *PNAS, USA.* — 2007. — V. 104(2). — P. 678-683.
269. Pinta V., Picaud M., Reiss-Husson F., Astier C. *Rubrivivax gelatinosus* acsF (previously orf 358) codes for a conserved, putative binuclear-iron-cluster-containing protein involved in aerobic oxidative cyclization of Mg-protoporphyrin IX monomethylester // *J. Bacteriology.* — 2002. — V. 184(3). — P. 746-753.
270. Pontier D., Albrieux C., Joyard J., Lagrange T., Block M.A. Knock-out of the magnesium Protoporphyrin IX methyltransferase gene in Arabidopsis: effects on chloroplast development and on chloroplast-to nucleus signaling. // *J. Biol. Chemistry.* — 2007. — V. 284. — P. 2297-2304.

271. Pontoppidan B., Kannangara C.G. Purification and partial characterization of barley glutamyl-tRNA(Glu) reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis // *Eur J. Biochem.* — 1994. — V. 225(2). — P. 529-37.
272. Popov K., Dilova S. On the dark synthesis and stabilization of chlorophyll / In: “Progress in Photosynthesis Research” (ed.: Metzner H.).— Inst. Union Biol. Sci.: Tubingen, 1969. — V.2. —P. 606-609.
273. Porra R.L., Thompson W.A., Kriedemann P.E. Determination of accurate extinction coefficients, simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standarts by atomic absorption spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1989. — V. 975. —P. 384 - 394.
274. R., Polglase W.J. Aerobic and anaerobic coproporphyrinogenase activities in extracts from *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol Chem.* — 1974. — V. 249(20). — P. 6367-6371.
275. Prikryl J., Watkins K.P., Friso G., van Wijk K.J., Barkan A.A. A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis // *Nucleic Acids Res.* — 2008. — V. 36(16). — P. 5152-5165.
276. Pruzinská A., Anders I., Aubry S., Schenk N., Tapernoux-Lüthi E., et al. In vivo participation of red chlorophyll catabolite reductase in chlorophyll breakdown // *Plant Cell.* — 2007. — V. 1. — P. 369-387.
277. Pružinská A., Tanner G., Anders I., Roca M. and Hörtensteiner S. Chlorophyll breakdown: pheophorbide a oxygenase is a Rieske-type iron-sulfur protein, encoded by the accelerated cell death 1 gene // *PNAS, USA.* — 2003. — V. 100. — P. 15259–15264.
278. Puthiyaveetil S., Kavanagh T.A., Cain P., Sullivan J.A., Newell C.A., et al. The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts // *PNAS, USA.* — 2008. — V. 105(29). — P. 10061-10066.
279. Randolph-Anderson B.L., Sato R., Johnson A.M., Harris E.H., Hauser C.R., et al. Isolation and characterization of a mutant protoporphyrinogen oxidase gene from

- Chlamydomonas reinhardtii* conferring resistance to porphyrin herbicides // *Plant. Mol. Biol.* — 1998. — V. 38. — P. 839- 859.
280. Raven J.A. Evolution of plant life forms /. In: «On the economy of plant form and function»; Givnish T.J, editor. — New York: Cambridge University Press, 1986. — P. 421–492.
281. Rebeiz C.A., Abou-Haidar M., Yachi M., Castelfranco P.A. Porphyrin biosynthesis in cell-free homogenates from higher plants // *Plant Physiology.* — 1970. — V. 46. — P. 57-63.
282. Rebeiz C.A., Parham R., Fasoula D.A., Ioannides I.M. Chlorophyll a biosynthetic heterogeneity / In: “The biosynthesis the tetrapyrrole pigments”, Ciba Foundation Symposium; eds.: Chadwick D.J. and Ackrill K., 1994. — V.180. — P. 177-189.
283. Reinbothe S., Runge S., Reinbothe C., van Cleve B., Apel K. Substrate-dependent transport of the NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase into isolated plastids // *Plant Cell.* — 1995. — V. 7. — P. 161–172.
284. Reinbothe S., Reinbothe Ch. Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms. // *Plant Physiology.* — 1996. — V. 111. — P. 1-7.
285. Reinbothe S. and Reinbothe C. The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis // *Eur. J. Biochem.* 1996. V 237. P. 323 - 343.
286. Reinbothe S., Quigley F., Gray J., Schemenewitz A., Reinbothe C. Identification of plastid envelope proteins required for import of protochlorophyllide oxidoreductase A into the chloroplast of barley // *PNAS, USA.* — 2004. — V. 97. — P. 9795–9800.
287. Reinbothe S., Pollmann S., Springer A., James R.J., Tichtinsky G., Reinbothe C. A role of Toc33 in the protochlorophyllide-dependent plastid import pathway of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase (POR)A // *Planta.* — 2005. — V. 42. — P. 1–12.
288. Reinbothe Ch., Bartsch S., Eggink L.L., Hooper J.K., Brusslan J., Andrade-P.R., Monnet J., Reinbothe S. A role for chlorophyllide a oxygenase in the regulated import and stabilization of light-harvesting chlorophyll a/b proteins.// *PNAS, USA.* — 2006. — V. 103(12). — P. 4777-4782.

289. Raskin V.I., Schwartz A. Experimental approach to elucidating the mechanism of light-independent chlorophyll biosynthesis in green barley // *Plant Physiol.* — 2003. — V. 133. — P. 25–28.
290. Raymond J., Siefert J.L., Staples Ch. R., Blankenship R. E. The natural history of nitrogen fixation // *Mol. Biol. Evol.* — 2004. — V. 21. — P. 541–554.
291. Rensing S.A., Lang D., Zimmer A.D., Terry A., Salamov A. et al. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants // *Science.* — 2007. — V. 319. — P. 64-69.
292. Richard M., Tremblay C., Bellemare G. Chloroplastic genomes of *Ginkgo biloba* and *Chlamydomonas moewusii* contain a chlB gene encoding one subunit of a light-independent protochlorophyllide reductase // *Curr. Genet.* — 1994. — V. 26. — P. 159–156.
293. Rochaix J.-D. Chlamydomonas as the photosynthetic yeast // *Annu. Rev. Genet.* — 1995. — V. 29. — P. 209-230.
294. Rochaix J.-D., Goldschmidt-Clermont M., Merchant S. The molecular biology of Chloroplasts and Mitochondria. — Dordrecht, the Netherland: Kluwer Academic Publishers, 1998. — 740 p.
295. Roitgrund C., Mets L.J. Localization of two novel chloroplast genome functions: trans-splicing of RNA and protochlorophyllide reduction // *Curr. Genet.* — 1990. — V. 17. P. 1– 47–153.
296. Rubio L.M., Ludden P.W. Maturation of nitrogenase: a biochemical puzzle // *J. Bacteriol.* — 2005. — V. 187. — P. 405–414.
297. Ryberg M., Dehesh K. Localization of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase in dark-grown wheat (*Triticum aestivum*) by immuno-electron microscopy before and after transformation of the prolamellar bodies // *Physiol. Plant.* — 1986. — V. 66. — P. 616-624.
298. Ren G., An K., Liao Y., Zhou X., Cao Y., Zhao H., Ge X., Kuai B. Identification of a novel chloroplast protein AtNYE1 regulating chlorophyll degradation during leaf senescence in Arabidopsis // *Plant Physioljgy.* — 2007. — V. 144. — P. 1429–1441.
299. Rochaix J.D. Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation // *FEBS Lett.* — 2007. — V. 581(15). — P. 2768-2775.

300. Ruckle M.E., DeMarco S.M., Larkin R.M. Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. — 2007. — V. 19(12). — P. 3944-3960.
301. Saijo Y., Zhu D., Li J., Rubio V., Zhou Z., Shen Y., et al. *Arabidopsis* COP1/SPA1 complex and FHY1/FHY3 associate with distinct phosphorylated forms of phytochrome A in balancing light signaling // *Mol Cell*. — 2008. — V. 31(4). — P. 607-613.
302. Sager R. Inheritance in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Genetics*. — 1955. — V 40. — P. 476 –489.
303. Sager R., Palade G.E. Chloroplast structure in green and yellow strains of *Chlamydomonas* // *Exp. Cell Res.* — 1954. — V. 7. — P. 584 - 588.
304. Săsărman A., Letowski J., Czaika G., Ramirez V., Nead M.A., Jacobs .JM., Morais R. Nucleotide sequence of the hemG gene involved in the protoporphyrinogen oxidase activity of *Escherichia coli* K12 // *Can. J. Microbiology*. — 1993. — V. 39(12). — P. 1155-1161.
305. Săsărman A., Surdenu M., Szegli G., Horodniceanu T., Greceanu V., Dumitrescu A. Hemin-deficient mutants of *Escherichia coli* K-12. // *J. of Bacteriology*. — 1968. — V. 96, — N 2. — P. 570-572.
306. Sato Y, Morita R, Katsuma S, Nishimura M, Tanaka A, Kusaba M. Two short-chain dehydrogenase/reductases, NON-YELLOW COLORING 1 and NYC1-LIKE, are required for chlorophyll b and light-harvesting complex II degradation during senescence in rice // *Plant J.* — 2009. — V.1. P. — 120-131.
307. Sato, Y., Morita R., Nishimura M., Yamaguchi H. and Kusaba M. Mendel's green cotyledon gene encodes a positive regulator of the chlorophyll-degrading pathway // *PNAS, USA*. — 2007. — V. 104. — P. 14169–14174.
308. Schaumburg A., Schneider-Poetsch H.A., Eckerskorn C. Characterization of plastid 5-aminolevulinate dehydratase (ALAD; EC 4.2.1.24) from spinach (*Spinacia oleracea* L.) by sequencing and comparison with non-plant ALAD enzymes // *Z Naturforsch [C]*. — 1992. — V. 47(1-2). — P. 77-84.
309. Schelbert S., Aubry S., Burla B., Agne B., Kessler F., Krupinska K., Hörtensteiner S. Pheophytin pheophorbide hydrolase (pheophytinase) is involved in chlorophyll

- breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. — 2009. — V. 21. — P. 767-785.
310. Schemenewitz A., Pollmann S., Reinbothe C., Reinbothe S. A substrate-independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of NADPH: protochlorophyllide oxidoreductase A // *PNAS, USA*. — 2007. — V. 104(20). — P. 8538-8543.
311. Schen N., Schelbert S., Kanwischer M., Goldschmidt E.E., Dörmann P. and Hörtensteiner 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.
312. Schneegurt M.A. and Beale S.I. Characterization of the RNA required for biosynthesis of delta-aminolevulinic acid from glutamate purification by anticodon-based affinity chromatography and determination that the UUC glutamate anticodon is a general requirement for function in ALA biosynthesis // *Plant Physiology*. — 1988. — V. 86(2). — P. 497-504.
313. Schon A., Krupp G., Gough S., Berry-Lowe S., Kannangara C.G., Söll D. The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA // *Nature*. 1–986. — V. 322. — P. 281-284.
314. Schulz R., Steinmüller K., Klaas M., Forreiter C., Rasmussen S., Hiller C., Apel K. Nucleotide sequence of a cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (PCR) of barley (*Hordeum vulgare L.*) and its expression in *Escherichia coli* // *Molecular and General Genetics*. — 1989. — V. 217. — P. 355–361.
315. Seo H.S., Watanabe E., Tokutomi S., Nagatani A., Chua N.H. Photoreceptor ubiquitination by COP1 E3 ligase desensitizes phytochrome A signaling // *Genes Dev.* — 2004. — V. 18(6). — P. 617-622.
316. Shang Y., Yan L., Liu Z., Cao Z., Mei C., Xin Q., et al. The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of transcription repressors to relieve ABA-responsive genes of inhibition // *Plant Cell*. — 2010. — V. 22. — P. 1909–1935.
317. Sharif A.L., Smith A.G., Abell C. Isolation and characterisation of a cDNA clone for a chlorophyll synthesis enzyme from *Euglena gracilis*. The chloroplast enzyme hydroxymethylbilane synthase (porphobilinogen deaminase) is synthesised with a

- very long transit peptide in *Euglena* // Eur J Biochem. — 1989. — V. 184(2) — P. 353-359.
318. Shen Y., Khanna R., Carle C.M., Quail P.H. Phytochrome induces rapid PIF5 phosphorylation and degradation in response to red-light activation // Plant Physiology. — 2007. — V. 145(3). — P. 1043-1051.
319. Shen Y., Zhou Z., Feng S., Li J., Tan-Wilson A., Qu L.J., Wang H., Deng X.W. Phytochrome A Mediates Rapid Red Light-Induced Phosphorylation of Arabidopsis far-red elongated hypocotyl1 in a low fluence response // Plant Cell. — 2009. V— . 21(2). — P. 494-505.
320. Shen Y.Y, Wang X.F, Wu F.Q, Du S.Y, Cao Z, et al. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor // Nature. — 2006. — V. 443. — P. 823-826.
321. Shlyk A.A., Averina N.G., Shalygo N.V. Methabolism and intermembrane localization of magnesium protoporphyrin IX monomethyl ester in centers of chlorophyll biosynthesis // Photobiochem. Photobioophys. — 1982. — V. 2. — N. 4/5. P. 197-223.
322. Schepens I., Boccalandro H.E., Kami C., Casal J.J. and Fankhauser Ch. Phytochrome kinase substrate 4 modulates phytochrome-mediated control of hypocotyl growth orientation // Plant Physiology. — 2008. — V. 147(2). — P. 661–671.
323. Simpson D., Machold O., Hoyer-Hansen G., von Wettstein D. Chlorina mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) // Carlsberg Research Communication. — 1985. — V. 50. — P. 223–238.
324. Sirijovski N., Lundqvist J., Rosenbäck M, Elmlund H., Al-Karadaghi S., Willows R., Hansson M.S. Substrate-binding model of the chlorophyll biosynthetic magnesium chelatase BchH subunit // J Biol Chem. — 2008. — V. 283(17). — P.11652-11660.
325. Skinner J.S. and Timko M.P. Differential expression of genes encoding the light-dependent and light-independent enzymes for protochlorophyllide reduction during development in loblolly pine. // Plant Mol Biology. — 1999. — V.39 (3) — P. 577-592.
326. Smith C.A., Suzuki J.Y., Bauer C.E. Cloning and characterization of the chlorophyll biosynthesis gene chlM from *Synechocystis* PCC 6803 by

- complementation of a bacteriochlorophyll biosynthesis mutant of *Rhodobacter capsulatus* // *Plant Mol. Biology*. — 1996. — V. 30(6). — P. 1307-1314.
327. Sobotka R., Dühring U., Komenda J., Peter E., Gardian Z., Tichy M., Grimm B., Wilde A. Importance of the cyanobacterial Gun4 protein for chlorophyll metabolism and assembly of photosynthetic complexes // *J Biol Chem*. — 2008. — V. 283(38). — P. 25794-25802.
328. Srivastava A., Lake V., Nogai L.A., Mayer S.M., Willows R.D., Beale S.I. The *Chlamydomonas reinhardtii* gtr gene encoding the tetrapyrrole biosynthetic enzyme glutamyl-trna reductase: structure of the gene and properties of the expressed enzyme // *Plant Mol Biology*. — 2005. — V. 58(5). — P. 643-658.
329. Stange-Thomann N., Thomann H.U., Lloyd A.J., Lyman H., Söll D. A point mutation in *Euglena gracilis* chloroplast tRNA(Glu) uncouples protein and chlorophyll biosynthesis // *PNAS, USA*. — 1994. — V. 91. — P. 7947-7951.
330. Stephenson P.G., Terry M.J. Light signalling pathways regulating the Mg-chelatase branchpoint of chlorophyll synthesis during de-etiolation in *Arabidopsis thaliana* // *Photochem. Photobio. Science*. — 2008. V— . 7(10). — P. 1243-1252.
331. Stephenson P.G., Fankhauser Ch., Terry M.J. PIF3 is a repressor of chloroplast development // *PNAS, USA*. — 2008. — V. 106. — No 18. — P. 7654-7659.
332. Strand A., Assami T., Alonso J., Ecker J.P., Chory J. Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg--protoporphyrin IX // *Nature*. — 2003. — V. 421. — P. 79-83.
333. Susec R.E., Ausubel F.M., Chorry J. Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development // *Cell*. — 1993. — V. 74. — P. 787-799.
334. 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 Physiology and Biochemistry*. — 2005. — V. 5. — P. 459-64.
335. Sager R. Inheritance in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Genetics*. 1955. V. 40. P. 476–489.
336. Schemenewitz A., Pollmann S., Reinbothe C., Reinbothe S. A substrate-independent, 14:3:3 protein-mediated plastid import pathway of NADPH:

- protochlorophyllide oxidoreductase A // PNAS, USA. — 2007. V. 104. — P. 8538–8543.
337. Schoefs B., Franck F. Protochlorophyllide reduction: mechanisms and evolution // Photochem. Photobiol. 2003. — V. 78. — P. 543–557.
338. Schulz R., Steinmuller K., Klaas M., Forreiter C., Rasmussen S., Hiller C., Apel K. Nucleotide sequence of cDNA coding for the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase (POR) of barley (*Hordeum vulgare* L.) and its expression in *Escherichia coli* // Mol. Gen. Genet. — 1989. — V. 217. — P. 355–361.
339. Shiba T. and Shimada K. Photosynthetic aspects of aerobic photosynthetic bacteria // Handbook of Photosynthesis / Ed. M. Pessarakli, Marcel Dekker, New York, 1997. — P. 505-512.
340. Skinner J.S., Timko M. P. Differential expression of genes encoding the light-dependent and light-independent enzymes for protochlorophyllide reduction during development in loblolly pine // Plant Mol. Biol. — 1999. — V.39. — P. 577–592.
341. Shinohara K., Murakami A., Fujita Y. Biochemical characteristics of thylakoid membranes in chloroplasts of dark-grown pine cotyledons // Plant Physiology. — 1992. — V. 98. — P. 39–43.
342. Smith J.H.C., Benitez A. The protochlorophyll-chlorophyll transformation: the nature of protochlorophyll in leaves // Carnegie Inst. Year Book. Washington, DC. 52, 1953. — P. 151-153.
343. Smith, J.H.C., French C.S. Quantum yield for the protochlorophyll conversion // Carnegie Inst. Year Book. Washington, 1958. — V. 57. — P.290-293.
344. Susek R.E., Ausubel F.M., Chory J. Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development // Cell. — 1993. — V. 74. — P. 787-799.
345. Suzuki, J. Y., Bauer C.E. Light-independent chlorophyll biosynthesis: involvement of the chloroplast gene chlL (*frxC*) // Plant Cell. 1992. V. 4. P. 929–940.
346. Suzuki, J.Y, Bauer C.E. A procaryotic origin for light-dependent chlorophyll biosynthesis of plants // PNAS, USA. — 1995. — V. 92. — P. 3749–3753.
347. Suzuki J.Y., Bollivar D.W., Bauer C.E. Genetic analysis of chlorophyll biosynthesis // Annu. Rev. Genet. — 1997. — V. 31. — P. 61 – 89.

348. Sytina O.A., Heyes D.J., Hunter C.N., Alexandre M.T., van Stokkum Ivo H. M., et al. Conformational changes in an ultrafast light-driven enzyme determine catalytic activity // *Nature*. — 2008. — V. 456. — P. 1001-1004.
349. Tait G.H. Coproporphyrinogenase activities in extracts of *Rhodospseudomonas spheroides* and *Chromatium* strain D. // *Biochemistry J.* — 1972. — V. 128. — P. 1159-1169.
350. Takio S., Satoh T. Expression patterns of chloroplast genes involved in light-independent chlorophyll synthesis in liverwort cells / In: “Photosynthesis: from Light to Biosphere”; ed: Mathi P. — Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1995. — V. III. — P. 941–944.
351. Tanaka A., Ito H., Tanaka R., Tanaka N.K., Yoshida K., Okada K. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophyll a // *PNAS, USA*. — 1998. — V. 95(21). — P. 12719-12723.
352. Tanaka R, Tanaka A. Effects of chlorophyllide a oxygenase overexpression on light acclimation in *Arabidopsis thaliana* // *Photosynth Res.* — 2005. — V. 85(3). — P. 327-340.
353. Tanaka R, Tanaka A. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants // *Annu. Rev. Plant Biology.* — 2007. — V. 58. — P. 321-346.
354. Taylor W.C. Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes // *Ann. Rev. Plant Physiology. Plant Mol. Biology.* — 1989. — V.40. — P. 211-233.
355. Timko M.P. Pigment biosynthesis: Chlorophylls, Heme, and Carotenoids. // J.-D. Rochaix et al. *The molecular biology of chloroplast and mitochondria in Chlamydomonas*. Kluwer Academic Publishers, 1998. — P. 377 - 341.
356. Thomas H., Huang L., Young M., Ougham H. Evolution of plant senescence // *BMC Evol Biol.* — 2009. — 9:163 (doi:10.1186/1471-2148-9-163).
357. Timko M.P. Pigment Biosynthesis: chlorophylls, heme and carotenoids. // In: “The Molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*” (eds: J-D Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont and S. Merchant), - Kluwer Academic Publishers, 1998. — P. 377-414.

358. Toledo-Ortiz G., Huq E., Rodríguez-Concepción M. Direct regulation of phytoene synthase gene expression and carotenoid biosynthesis by phytochrome-interacting factors // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 2010. — V. 107(25). — P. 11626-31.
359. Tottey, S., Block, M. A., Allen, M., Westergren, T., Albrieux, C., Scheller, H. V., Merchant, S. & Jensen, P. E. *Arabidopsis* CHL27, located in both envelope and thylakoid membranes, is required for the synthesis of protochlorophyllide // *PNAS USA.* — 2003. — V. 100. — P. 16119-16124.
360. Tsuchiy, T., Ohta H., Okawa K., Iwamatsu A., Shimaba H., Masuda T., and Takamiya K.I. Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate // *PNAS, USA.* — 1999. — V. 96. —P. 15362–15367.
361. Tzvetkova-Chevolleau T., Franck F, Alawady A.E., Dall'Osto L., Carrière F. et al. The light stress-induced protein ELIP2 is a regulator of chlorophyll synthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Plant J.* — 2007. — V. 50(5). — P. 795-809.
362. Yamamoto H., Kurumiya S., Ohashi R., Fujita Y. Oxygen sensitivity of a nitrogenase-like protochlorophyllide reductase from the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana*// *Plant Cell Physiol.* —2009. — V. 50. — P. 1663–1673.
363. Yamazaki S., Nomata J., Fujita Y. Differential operation of dual protochlorophyllide reductases for chlorophyll biosynthesis in response to environmental oxygen levels in the cyanobacterium *Leptolyngbya boryana* // *Plant Physiol.* — 2006. — V. 142. — P. 911–922.
364. Yang J., Chen Q. Origin and evolution of the light-dependent protochlorophyllide oxidoreductase (LPOR) genes // *Plant Biology.* — 2004. — V. 6. — P. 537–544.
365. Verdecia M.A., Larkin R.M., Ferrer J.L., Riek R., Chory J., Noel J. Structure of the Mg-chelatase cofactor GUN4 reveals a novel hand-shaped fold for porphyrin binding // *PLoS Biol.* — 2005. — V. 3(5) e151.
366. Vinti G., Hills A, Campbell S., Bowyer J.R., Mochizuki N., Chory J., Lypez-Juez E. Interactions between *hyl1* and *gun* mutants of *Arabidopsis*, and their implications for plastid/nuclear signalling // *Plant J.* — 2000. — V. 24(6). — P. 883-894.
367. Xiong J., Fischer W.M., Inoue K., Nakahara M., Bauer C.E. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis // *Science.* — 2000. — V. 289. — P.

- 1724–1730.
368. Wagner D., Przybyla D., Op den Camp R., Kim C., Landgraf F., Lee K.P., Würsch M., Laloi C., Nater M., Hideg E., Apel K. The genetic basis of singlet oxygen-induced stress responses of *Arabidopsis thaliana* // *Science*. — 2004. — V. 306(5699). — P. 1183-1185.
369. Walker C.J., Willows R.D. Mechanism and regulation of Mg-chelatase // *Biochem J*. — 1997. — V. 327. — P. 321-33.
370. Wang W.L., Boynton J.E., Gillham N.W. Genetic control of chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas*. Analysis of mutants of two loci mediating the conversion of protoporphyrin-IX to magnesium protoporphyrin // *J. Cell Biol.* — 1974. — V. 63(3). P — 806-823.
371. Wang W-Y, Wang W.L., Boynton J.E., Gillham N.E., Gouth S. Genetic Control of Chlorophyll Biosynthesis in *Chlamydomonas*: Analysis of a mutant affecting synthesis of δ -aminolevulinic acid // *Cell*. — 1975. — V.6. — P. 75-84.
372. Wang W.-Y. Genetic Control of Chlorophyll Biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Ann. review of cytology*. — 1978. — V. 8. — P. 335 - 354.
373. Whitelam G.C., Johnson E., Peng J., Carol P., Anderson M.L., Cowl J.S., Harberd N.P. Phytochrome A null mutants of *Arabidopsis* display a wild-type phenotype in white light // *Plant Cell*. — 1993. — V. 5(7). — P. 757-768.
374. Willstatter, R. and Stoll A. Die Wirkungen der chlorophyllase // In *Untersuchungen über chlorophyll*, - Berlin, Springer. — 1913. — P. 172-187.
375. Witty M, Wallace-Cook A.D., Albrecht H., Spano A.J., Michel H. et al. Structure and expression of chloroplast-localized porphobilinogen deaminase from pea (*Pisum sativum* L.) isolated by redundant polymerase chain reaction // *Plant Physiology*. — 1993. — V. 103. — P. 139 – 147.
376. Von Wettstein D. Spectrophotometric studies of chlorophyll mutants in barley. *Arnegie Institute Wash. Year Book*, 1959. — V. 59. — P. 338 –339.
377. Von Wettstein D., Gouth S., Kannangara C.G. Chlorophyll biosynthesis // *Plant Cell*. — 1995. — V. 7. — P. 1039–1057.

378. Wu Q., Vermaas W.F. Light-dependent chlorophyll a biosynthesis upon chlL deletion in wild type and Photosystem I-less strains of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *Plant Mol. Biol.* — 1995. — V. 29. — P. 933–945.
379. Wulff D.L. δ -aminolevulinic acid-requiring mutant from *Escherichia coli* // *J. Bacteriology.* — 1967. — V. 93. — P. 1473-1474.
380. Xiong J., Bauer C.E. Complex evolution of photosynthesis // *Annual Review of Plant Biology.* — 2002. — V. 53. — P. 503–521.
381. Xu K. and Elliott T. Cloning, DNA sequence, and complementation analysis of the *Salmonella typhimurium* hemN gene encoding a putative oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase. // *J. Bacteriology.* 1994. V. 176(11). P. 3196-3203.
382. Xu K. and Elliott T. An oxygen-dependent coproporphyrinogen oxidase encoded by the hemF gene of *Salmonella typhimurium* // *J. Bacteriology.* — 1993. — V. 175(16). — P. 4990–4999.
383. Yamamoto Y.Y., Deng X., Matsui M. Cip4, a new COP1 target, is a nucleus-localized positive regulator of Arabidopsis photomorphogenesis // *Plant Cell.* — 2001. — V. 13(2). — P. 399-411.
384. Yamamoto Y.Y., Matsui M., Ang L.H., Deng X.W. Role of a COP1 interactive protein in mediating light-regulated gene expression in Arabidopsis // *Plant Cell.* — 1998. — V. 10(7). — P. 1083-1094.
385. Yamasato A, Tanaka R, Tanaka A. Loss of the N-terminal domain of chlorophyllide a oxygenase induces photodamage during greening of Arabidopsis seedlings.// *BMC Plant Biol.* — 2008. — V. 8. — P. 64-76.
386. Yanagawa Y., Sullivan J.A., Komatsu S., Gusmaroli G., Suzuki G., et al.. Arabidopsis COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes.// *Genes Dev.* — 2004. — V. 18(17). — P. 2172-2181.
387. Yen H.C. and Marrs B. Map of genes for carotenoid and bacteriochlorophyll biosynthesis in *Rhodospseudomonas capsulate* // *J. Bacteriology.* — 1976. — V. 126(2). — P. 619-629.
388. Zhang Sh. Identification of Novel “Yellow-In-The-Dark” Mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. — University of Virginia, 2007. — 368 p.

389. Zsebo K.M., Hearst J.E. Genetic-physical mapping of a photosynthetic gene cluster from *R. capsulata* // *Cell*. — 1984. — V. 37. — P. 937-947.
390. Zubkov M.V., Mary I., Woodward E.M., Warwick P.E., Fuchs B.M, et al. Microbial control of phosphate in the nutrient-depleted North Atlantic subtropical gyre// *Environ. Microbiol.* — 2007. — V.9. — P. 2079–2089.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

- АЛК - 5-аминолевулиновая кислота;
- БФ – белки, необходимые для фотосинтеза;
- БХ – биосинтез хлорофилла;
- Mg-ПП – магний-протопорфирин IX;
- Mg-ППМЭ – магний-протопорфирин IX монометилловый эфир;
- МХ – магний-хелатаза;
- ПП - протопорфирин IX;
- ПХЛД – протохлорофиллид;
- РФК - реактивные формы кислорода;
- ХЛД – хлорофиллид;
- ХЛ – хлорофилл;
- хлДНК – хлоропластная ДНК;
- ХОМ – хлорофильные оранжевые мутанты;
- сПОР – светозависимая НАДФ: протохлорофиллид-оксидоредуктаза;
- тПОР – темновая протохлорофиллид-оксидоредуктаза;
- БХЛ – бактериохлорофиллы;
- ТФ – факторы транскрипции;
- НЭМ – нитрозоэтилмочевина;
- МННГ - N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин;
- РКС – протеинкиназа С.

Благодарности

Данные, представленные в диссертации, получены на кафедре генетики и селекции биолого-почвенного факультета СПбГУ, и явились результатом плодотворного сотрудничества с лабораторией Биофизики и биохимии фотосинтетического аппарата института Фотобиологии АН Республики Беларусь (д.б.н.: Н.В. Шалыго, Н.Г. Аверина и Е.Б. Яронская). Часть экспериментов была осуществлена в лабораториях Германии: у проф. Бека (*Ch. Beck, Fraiburg University*) и проф. Гримма (*B. Grimm, IPK, Gatersleben*). Автор признателен европейским фондам: DFG, DAAD и EMBO, поддерживавшим ее исследования в период с 1997 по 2002 годы. Автор также благодарит РФФИ за поддержку исследований генетики темновых процессов биосинтеза хлорофилла у хламидомонады (грант: 09-04-01646-а). Автор благодарит кафедру, своих коллег, учителей и студентов, за понимание, помощь и поддержку.