

**ИССЛЕДОВАНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МЕХАНИЗМОВ АДАПТАЦИИ  
РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ К СВЕТУ НА МОДЕЛИ БЕСХЛОРОФИЛЬНЫХ  
МУТАНТОВ ЗЕЛЕННОЙ ОДНОКЛЕТОЧНОЙ ВОДОРОСЛИ  
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

Е.М. Чекунова, А.Б. Матиив, Т.С. Юшкина

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия, [elena\\_chekunova@mail.ru](mailto:elena_chekunova@mail.ru)

**Аннотация.** Генетические механизмы адаптации фотосинтезирующей клетки к свету изучали на модели бесхлорофильных, накапливающих протопорфинин, мутантов зелёной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и их ревертантов. Мутантный фенотип обусловлен подавлением активности фермента биосинтеза хлорофилла – магний-хелатазы (МХ). Обнаружены гены, контролирующие МХ у *C. reinhardtii*: *CHLH*, *LTS3*, *SUP3* и *SUP-1*. Структурный ген *CHLH* кодирует Н-субъединицу МХ. Продукты остальных генов регулируют её активность.

**Ключевые слова:** хлорофиллы, магний-хелатаза, *Chlamydomonas reinhardtii*

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-1003-1007

Фототрофные бактерии и пластиды растений содержат бактериохлорофиллы и хлорофиллы (Хл) – тетрапиррольные пигменты фотосинтеза, – биологического процесса, определяющего развитие жизни на Земле. Понимание механизмов биосинтеза, функционирования и регуляции молекул Хл, а также закономерностей эволюционных изменений, которые они претерпели при адаптации к различным экологическим факторам, является фундаментальной проблемой современной науки.

Исследования молекулярно-генетических механизмов адаптации фотосинтезирующей клетки к условиям освещения ведутся на модели одноклеточной зелёной водоросли *Chlamydomonas (C.) reinhardtii* – модельного объекта генетики фотосинтеза. Её способность синтезировать Хл в гетеротрофных условиях позволяет получать мутанты по двум путям биосинтеза – темновому и зависимому от света [Чекунова, Ладыгин, 2014]. Уникальная генетическая коллекция пигментных мутантов *C. reinhardtii*, созданная на кафедре генетики СПбГУ, положила начало исследованиям генетики метаболизма пигментов фотосинтеза – Хл и каротиноидов.

Предмет исследований – бесхлорофильные мутанты зелёной одноклеточной водоросли *C. reinhardtii* по двум генам: *CHLH* и *LTS3*, контролирующим структуру и функции ключевого фермента биосинтеза хлорофилла (БХ) – магний-хелатазы (МХ), их ревертанты и обратные мутанты. Ген *CHLH* кодирует большую субъединицу МХ [Chekunova et al., 2001]. Молекулярная идентификация и анализ структуры гена *LTS3* показали, что он кодирует ДНК-связывающий белок семейства GATA. Эти данные позволили предположить, что белок *LTS3* является фактором транскрипции, который активирует экспрессию генов, кодирующих ферменты БХ: магний-хелатазу (МХ) и комплекса, синтезирующего 5-аминолевулиновую кислоту (АЛК) в темноте, и участвует в адаптации к свету клеток гетеротрофно-выращенных культур [Чекунова, Савельева, 2010]. Методом ОТ-ПЦР было показано, что транскрипция гена *LTS3* в норме негативно регулируется светом и позитивно – ацетатом (основным источником углерода в гетеротрофных условиях роста). У мутантов по гену *LTS3*, выращенных в темноте, нарушено формирование мембранных структур клетки, которые быстро восстанавливаются при освещении. По-видимому, плейотропный эффект мутации *brc-1* в гене *LTS3* состоит в нарушении синтеза глицеролипидов [Semenova et al., 2015].

У ревертантов, полученных на основе бесхлорофильных мутантов *C. reinhardtii*, темновой синтез Хл оказался восстановлен за счет «включения» в результате супрессорных мутаций альтернативных путей биосинтеза. На модели ревертантов, полученных от пигментных мутантов *C. reinhardtii* по гену *LTS3*, был проведен поиск новых компонентов регуляторной машины клетки *C. reinhardtii*, задействованных в контроле БХ в условиях отсутствия функционального белка *LTS3*. Для их обнаружения из клеточной культуры мутанта Вгс-1 по гену *LTS3* был отобран зеленый в темноте спонтанный ревертант Вгс-8. Сходный уровень содержания Хл в его темновых и световых культурах свидетельствовал о восстановлении темнового синтеза Хл.

Способность штамма Вгс-8 зеленеть в темноте – наследуемый признак. Тетрадный анализ показал, что реверсия произошла в результате единичной ядерной рецессивной мутации *sup-3* в гене *SUP-3*, который сцеплен с геном *LTS3* *C. reinhardtii*. Эффект мутации не аллелоспецифичен, – она супрессирует обе мутантные аллели гена *LTS3*. Наличие межгенной супрессии и отсутствие её аллельной специфичности свидетельствовало о включении альтернативного механизма регуляции. По-видимому, фактор *SUP-3* в норме репрессирует темновой БХ, а мутация *sup-3* блокирует эту функцию. Учитывая свойства продукта гена *LTS3* активировать в темноте транскрипцию генов БХ, предположили, что в случае его дисфункции в клетках водоросли включается альтернативный путь темновой активации экспрессии этих генов (W2), в норме, находящийся под негативным контролем белка *SUP-3*. Восстановление способности синтезировать Хл у ревертанта Вгс-8 связано с усилением активности МХ в темноте. Она в 7 раз превышала активность этого фермента в темновых культурах исходного мутанта Вгс-1 и снижалась на свету, означая, что путь W2 негативно регулируется светом. *SUP-3* – сильный репрессор, – мутация в гене *SUP-3* вела к двукратному повышению активности МХ в темноте даже по сравнению с диким типом.

Для обнаружения дополнительных факторов активации синтеза Хл в темноте на основе зеленого ревертанта Вгс-8 был получен мутант Т8-3, у которого инсерция *sup-1* привела к возврату фенотипа исходного, оранжевого в темноте, штамма Вгс-1. Пигментный состав темновых культур мутантов Т8-3 и Вгс-1 был одинаков – они накапливали протопорфирин IX и небольшое количество его магниевых производных, однако трансформант утратил способность расти и зеленеть на свету. Методами гибридологического анализа было установлено, что инсерция наследуется по моногенной схеме, и мутации оранжевости не рекомбинируют и не комплементируют. Генетический анализ и изучение пигментного состава клеток Т8-3 позволили определить его генотип: *brc-1, sup-3, sup-1*, подтвердив, что оранжевая в темноте окраска клеток Т8-3 обусловлена мутацией *brc-1* в гене *LTS3*. Высокий уровень активности МХ, выявленный у трансформанта, сопоставимый с таковым у ревертанта Вгс-8, указал, что эффект мутации *sup-3* сохранен в его клетках, но инсерция (*sup-1*) блокировала способность к зеленению. На фоне гомозиготы по мутациям в гене *LTS3* проявление аллели *sup-1*, – потеря способности к зеленению, носит доминантный характер, – признак сохранялся у гетерозигот *sup-1/+*. При этом, дигетерозиготы *lts3/+, sup-1/+* растут на свету фотоавтотрофно. Эффект инсерционной мутации (по доминантному/рецессивному типу) зависит от отсутствия/наличия в клетке продукта гена *LTS3*, означая, что гены *LTS3* и *SUP-1* взаимодействуют, и продукт делегированного гена, названного *SUP-1*, активен при наличии нормального белка *LTS3*. Для идентификации гена *SUP-1* *C. reinhardtii* в геноме трансформанта Т8-3 фланкирующие инсерцию нуклеотидные последовательности искали методом «*Ligation-mediated suppression-PCR*». Инсерция оказалась встроенной в хромосому 13 в положении 1194741 пн. В Базе данных геномного проекта была найдена мРНК

(au5.g4469\_t1), которая принадлежит гену *SUP-I*, локализованному на хромосоме 13 (в положении 1193966-1195740). Его структура была воссоздана путем сравнения нуклеотидных последовательностей геномной ДНК и транскрипта этого гена. Ген *SUP-I* включает 2 интрона, первый из которых расположен в 5'-некодирующей области. Транскрипт размером 933 пар оснований кодирует белок (виртуальный) из 108 аминокислотных остатков массой 11,5 kDa. Область (-800 – +1) этого гена содержит несколько элементов GATA – мишеней транскрипционной регуляции ZnF\_GATA ФТ. Отсутствие хлоропластных и митохондриальных транзитных последовательностей (программы: *ChloroP* и *mitoprot*) и наличие сайта фосфорилирования протеинкиназой С (PKC) свидетельствуют, что, белок SUP-I функционирует в ядре и задействован в сигнальной трансдукции. Оценка его влияния на экспрессию гена *LTS3* показала, что выключение гена *SUP-I* у трансформанта Т8-3 резко снижает уровень *LTS3*-транскриптов [Чекунова и др., 2014]. По-видимому, белок SUP-I участвует в активации транскрипции гена *LTS3* в темноте, и оба белка *LTS3* и SUP-I входят в состав регуляторной системы, контролирующей работу МХ. Белок SUP-3 в норме подавляет иной путь (W2) активации МХ у хламидомонады.

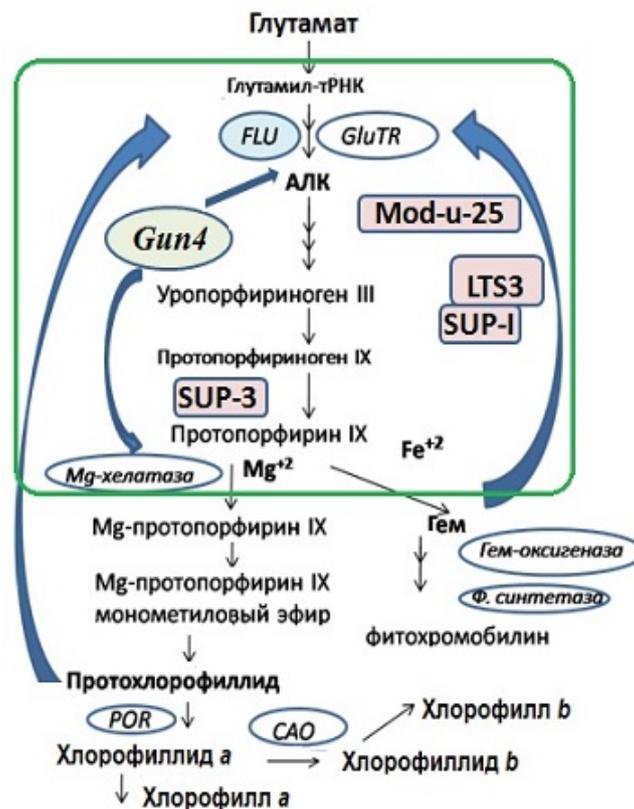


Рисунок. Факторы регуляции синтеза Хл у *C. reinhardtii*. Посттрансляционно синтез АЛК репрессируют (стрелки): протохлорофиллид, связываясь с белком FLU, и гем, взаимодействуя с ферментом глутамил-тРНК редуктазой (GluTR). Белок Gun4 связывает магний-хелатазу (МХ) с мембранами хлоропласта, активируя фермент. Новые факторы регуляции, обнаруженные в работе: темновой биосинтез Хл обеспечивается путем транскрипционной регуляции генов, кодирующих МХ и АЛК-комплекс. Фактор *LTS3* активирует их транскрипцию; фактор *SUP-3* репрессирует МХ; фактор *SUP-I* – активатор транскрипции гена *LTS3*; *Mod-u-25* – репрессор синтеза АЛК и МХ. Гены, обнаруженные в работе, – в прямоугольниках. Контур – область *feedforward*-транскрипционной регуляции.

К настоящему времени удалось обнаружить несколько генов, контролирующих функционирование МХ у *C. reinhardtii*: *CHLH*, *LTS3*, *SUP3*, *SUP-1* и *Mod-u-25*. Структурный ген *CHLH* оказался геном большой Н-субъединицы МХ. Продукты остальных генов регулируют активность этого фермента. Ген *LTS3* кодирует фактор транскрипционной регуляции – активатор генов МХ в темноте. Продукт гена *SUP-1*, по-видимому, вместе с фактором *LTS3* входит в состав регуляторной системы, координирующей работу МХ. Белок, кодируемый геном *SUP-3*, в норме подавляет иной путь активации МХ у хламидомонады. Таким образом, у *C. reinhardtii* первый специфический фермент биосинтеза Хл – МХ оказался важнейшим компонентом системы регуляции процессов хлорофиллообразования. Удалось обнаружить два пути активации МХ в темноте. В первом пути задействованы факторы транскрипционной регуляции *LTS3* и *SUP-1*. В случае его блокирования возможно переключение на альтернативный путь, в норме репрессированный продуктом гена *SUP3*.

Изучение мутантов-продуцентов протопорфирина привело к обнаружению нового механизма ретроградной (из хлоропласта в ядро) регуляции, препятствующего накоплению этого сильного фотосенсибилизатора, разрушающего клетки *C. reinhardtii* при освещении. Его контролирует ген хлоропласта, названный *Mod-u-25*, – негативный регулятор синтеза АЛК [Чекунова и др., 1993]. Полученные результаты позволяют говорить о существовании в системе регуляции БХ у хламидомонады регуляторного контура, координирующего работу двух ферментативных комплексов – МХ и синтеза АЛК (рисунок). В отличие от известного посттрансляционного механизма обратного ингибирования (*feedback*) АЛК геном и протохлорофиллидом, он, по-видимому, представляет собой систему «*feedforward*», которая осуществляет одновременную «настройку» работы этих двух ферментных комплексов. На посттрансляционном уровне модулятором этого контура служит белок *Gun4*, а за транскрипционную активацию генов обоих ферментных комплексов отвечают продукты генов *LTS3* и *SUP-1*.

#### Литература

Ладыгин В.Г., Чекунова Е.М., Семенова Г.А., Кособрюхов А.А. Структурно-функциональная организация клеток мутанта *Bgc-1 Chlamydomonas reinhardtii*, накапливающего протопорфирин IX в темноте // Биофизика. – 2014. – Т. 59, Вып. 4. – С. 692–703.

Чекунова Е.М., Ладыгин В.Г. Исследование генетического контроля биосинтеза и метаболизма хлорофилла с использованием мутагенеза и генной инженерии / коллективная монография в двух томах «Фотосинтез: открытые вопросы и что мы знаем о нем» / под ред. Алахвердиева С.И., Рубина А.Б., Шувалова А.В. – Ижевск: Издательство АНО «ИИКИ», 2014. – Т. 2. – С. 169–268.

Чекунова Е.М., Савельева Н.В. Ген *LTS3* контролирует светонезависимый биосинтез хлорофилла у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Экологическая генетика. – 2010. – № 2. – С. 35–44.

Чекунова Е.М., Шальго Н.В., Яронская Е.Б., Аверина Н.Г., Чунаев А.С. Регуляция биосинтеза предшественников хлорофилла в мутантах зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. – 1993. – Т. 58, № 9. – С. 1430–1436.

Чекунова Е.М., Яронская Е.Б., Ярцева Н.В., Аверина Н.Г. Новые факторы регуляции магний-хелатазы у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиология растений. – 2014. – Т. 61, № 2. – С. 1–9.

Chekunova E.M., Y. Papenbrock, V. Voronetskaya, B. Grimm, C.F. Beck. Molecular characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants defective in H subunit of Magnesium chelatase // Mol. Gen. Genet. – 2001. – V. 266. – P. 363–373.

Semenova G.A., Chekunova E.M., Ladygin V.G. Light-dependent synthesis of cell membranes in the *Chlamydomonas reinhardtii* mutant Brc-1 // Cell and Tissue Biology. – 2015.– V. 9, No. 5.– P. 415–421.

**INVESTIGATIONS OF THE GENETIC MECHANISMS OF PLANT CELL  
ADAPTATION TO THE LIGHT ON THE MODEL OF CHLOROPHYLL-LESS  
MUTANTS OF UNICELLULAR GREEN ALGAE  
*CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***

E.M. Chekunova, A.B. Matiiv, T.S. Ushkina

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Saint-Petersburg State University», Saint-Petersburg, Russia, *elena\_chekunova@mail.ru*

**Abstract.** Genetic mechanisms of photosynthetic cell adaptation to light have been studied on the model of chlorophyll-less, accumulating protoporphinin mutants of green alga *Chlamydomonas (C.) reinhardtii* and their revertants. The mutant phenotype is due to the suppression of the activity of the chlorophyll biosynthesis (CB) enzyme the magnesium chelatase (MCh). The genes controlling MCh in *C. reinhardtii*: *CHLH*, *LTS3*, *SUP3* and *SUP-1* were detected. The structural gene *CHLH* encodes the H-subunit of MCh. Products of other genes regulate its activity.

**Keywords:** *chlorophylls, magnesium-chelatase, Chlamydomonas reinhardtii*