

© Е. М. Чекунова,
Н. В. Савельева

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

✿ Генетический контроль светонезависимых процессов формирования пигментов в растительной клетке изучали на модели мутантов по гену *LTS3* одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas 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 GATA, который в темноте активирует экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза хлорофилла: магний-хелатазу и глутамат 1-полуальдегид аминотрансферазу, и, по-видимому, необходим для адаптации фотосинтезирующей клетки к фототрофным условиям.

✿ **Ключевые слова:** генетический контроль; темновой биосинтез хлорофилла.

Поступила в редакцию 20.11.2009
Принята к публикации 31.03.2010

ГЕН *LTS3* КОНТРОЛИРУЕТ СВЕТОНЕЗАВИСИМЫЙ БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА У ЗЕЛеноЙ ВОДОРОСЛИ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

ВВЕДЕНИЕ

Растения и фототрофные микроорганизмы могут синтезировать хлорофилл двумя путями — на свету и в темноте (рис. 1). Известно, что эту способность определяют две ферментные системы, катализирующие превращение протохлорофиллида (ПХЛД) в хлорофиллид (ХЛД) в процессе биосинтеза пигмента (Reinbothe, Reinbothe, 1996; Forreiter, Apel, 1993). На свету редукцию ПХЛД обеспечивает фотофермент НАДФ: протохлорофиллид-оксидоредуктаза (сПОР), контролируемый ядерным геномом (Беляева, 2009). Темновой синтез ХЛД из ПХЛД осуществляет ферментный комплекс тПОР, — он состоит из трех полипептидов, кодируемых хлоропластными генами: *chlB*, *chlN* и *chlL*. Светозависимый и светонезависимый биосинтез хлорофилла 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 *Chlamydomonas reinhardtii* — уникальный модельный объект генетики фотосинтеза (Rochaix, 1995). Её клетки синтезируют хлорофилл 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 et al., 1981; Choquet et al., 1992). В течение последних 50 лет у зеленых водорослей: *Chlamydomonas*, *Chlorella* и *Scenedesmus* были изолированы и изучены десятки мутантов с нарушенным светонезависимым синтезом хлорофилла — неспособные зеленеть в темноте (Александрова и др., 1979; Квитко и др., 1983; Timko, 1998). Все они могут быть отнесены к одному фенотипическому классу, называемому «yellow». В темноте их клетки не синтезируют хлорофилл, накапливают ПХЛД, и, благодаря присутствию каротиноидов, формируют колонии желтого цвета; на свету они зеленеют. У хламидомонады известно 3 хлоропластных и 7 ядерных генов, нарушения в которых приводят к подобному фенотипу (Timko, 1998). Хлоропластные гены: *chlB*, *chlN* и *chlL* кодируют субъединицы фермента тПОР (Choquet et al, 1992), роль же ядерных генов *yellow* до сих пор остается предметом дискуссий. Полагают, что они кодируют белки, регулирующие темновую редукцию ПХЛД (Sahoon, Timko, 2000).

Среди штаммов, зеленеющих на свету, но неспособных синтезировать хлорофилл в темноте, у хламидомонады наряду с «yellow» были описаны мутанты, клетки которых в темноте накапливают более ранние, чем ПХЛД, красные предшественники хлорофилла — протопорфирины (ПП) и на твердой среде формируют колонии оранжевого цвета. Сравнительно-генетический анализ трех таких фенотипически сходных мутантов (бесхлорофильные, накапливаю-

щие ПП в темноте, зеленеющие на свету) из Петергофской генетической коллекции (Столбова, 1971; Квитко и др., 1983) показал, что у них мутации затрагивают один ядерный ген, названный *LTS3* (Чекунова, Квитко, 1986). Подобные мутанты: *brc-1* и *brc-2* были описаны в США Энди Вангом (Wang et al., 1974) как штаммы, несущие рецессивные, аллельные мутации, которые генетически и функционально отличаются от мутации *y-1*, блокирующей темное 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. Сходные данные 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* (Шалыго и др., 1990). Таким образом, генетический анализ позволил обнаружить у хламидомонады ген *LTS3*, контролирующей темновой биосинтез хлорофилла на этапе, предшествующем конверсии протохлорофиллида в хлорофиллид. Существование накапливающих протопорфирины мутантов, способных зеленеть в условиях фотоавтотрофного роста, свидетельствует, что редукция ПХЛД — не единственный шаг в цепи биосинтеза хлорофилла, 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 хлорофилла. Настоящая работа посвящена комплексному молекулярно-генетическому анализу штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*, мутантных по гену *LTS3*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клетки штамма дикого типа (CC124) и мутантов хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii*) из Петергофской генетической коллекции и из коллекции генетического центра хламидомонады (*Chlamydomonas Genetic Collection* — CGC) выращивали на среде TAP в жидкой культуре или на чашках Петри (1,5% агара) при температуре 24 °C на белом свете интенсивностью 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ (флуоресцентные лампы Osram L36W/25) или в темноте (Квитко и др., 1983; Haggis, 1989). Скрещивания и тетрадный анализ потомства зигот проводили по методу, описанному А. В. Столбовой (Столбова, 1971). Хлорофиллы из клеток хламидомонады извлекали 80%-м ацетоном, и их содержание в растворе определяли по оптической плотности при длинах волн: 646 и 664 нм (Шалыго и др., 1990). Для флуоресцентной детекции протопорфирина IX (ПП), магний-протопорфирина IX (MgПП) и его монометилового эфира (MgППМЭ) в отмытых гексаном водно-ацетоновых экстрактах использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (Chekounova et al., 2001). Измерения содержания гема и 5-аминолевулиновой кислоты в клет-

ках хламидомонады проводили ранее описанным методом (Чекунова и др., 1993). Определение активности ферментов, методы экстракции РНК и Нозерн-блот анализа, также как и методика экстракции белков и Вестерн-блот анализа, подробно описаны ранее (Chekounova et al., 2001). Эксперименты по определению количественных величин (уровня содержания пигментов и активности ферментов) проводились в 3–5 повторностях, полученные данные обрабатывались статистически (Терентьев и Ростова, 1977). Время генерации культур (ВГ) рассчитывали по формуле: $\text{ВГ (час.)} = 11 + 0,75 \text{ВД}$, где ВД — время удвоения численности клеток в культуре (Haggis, 1989). Клоны геномной библиотеки ВАС-клонов *Chlamydomonas reinhardtii* получены из ресурсного центра Института генетики Университета г. Клемсон (CUGI, USA) <http://www.genome.clemson.edu>. ДНК ВАС-клонов, содержащая маркерный ген устойчивости к хлорамфениколу, была использована для трансформации мутантных клеток методом «стеклянных шариков» (Rumarquis et al., 2005). Трансформированные клетки высевали на среду TAP и выращивали в темноте при 24 °C. Зеленые в темноте трансформанты проверялись на устойчивость к хлорамфениколу. Нуклеотидные последовательности гена *LTS3* были найдены в базе данных геномного проекта (Merchant et al., 2007), а их анализ проводили с помощью программного обеспечения, доступного на сайтах: NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), ExPASy (<http://www.expasy.ch/tools>) и CGC (<http://www.chlamy.org/index.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Содержание пигментов

Сравнительный анализ пигментного состава клеток мутантов по темновому биосинтезу хлорофилла: *lts3*, *brc-1*, *y-7* и штамма дикого типа CC124 (табл. 1) позволил обнаружить существенные различия в содержании предшественников хлорофилла у мутанта *yellow* и штаммов, мутантных по гену *LTS3*. Клетки «желтого» мутанта *y-7* при росте в темноте не содержат хлорофилла 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 CC124. Мутанты по гену *LTS3*: *lts3* и *brc-1* в темноте накапливают протопорфирин IX (ПП) и последующие в цепи биосинтеза хлорофилла пигменты: магний-протопорфирин IX (Mg-ПП), магний-протопорфирин IX монометиловый эфир (Mg-ППМЭ) и ПХЛД. При освещении, в их культурах появляется ХЛД, что указывает на дестабилизацию комплекса ферментов, осуществляющих превращение ПХЛД в хлорофилл, поскольку в норме этот промежуточный продукт не накапливается. Клетки световых культур мутантов: *lts3* и *brc-1* синтезируют хлорофилл на уровне штамма дикого типа, выращенного в темноте, и, примерно, на 40% ниже, чем клетки световой культуры CC124. 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 хлорофилл (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 хлорофилла (рис. 1), участвуют в образовании гема.

Активность ферментов биосинтеза хлорофилла

Анализ эффективности работы трех ферментов биосинтеза хлорофилла: магний-хелатазы, магний-протопорфирин IX-метилтрансферазы и АЛК-синтезирующего комплекса (табл. 2) позволил установить, что у мутанта

активности двух сопряженно функционирующих ферментов: магний-хелатазы и магний-протопорфирин IX-метил-трансферазы практически одинаковы на свету и в темноте и соответствуют нормальному уровню штамма дикого типа, выращенного в темноте. Магний-хелатаза в темноте у мутанта функционирует также как и у дикого типа, а на свету, — примерно на 40 % слабее. Активность метил-трансферазы в темновых культурах мутанта на 20 % выше, чем у штамма дикого типа, и не увеличивается при освещении, тогда как у дикого типа свет активирует этот фермент на 30 %. Таким образом, у мутанта по гену *LTS3* отсутствует световая индукция Mg-хелатазы и Mg-ПП метил-трансферазы, типичная для клеток дикого типа. Относительная активность ферментов, синтезирующих 5-аминолевулиновую кислоту (АЛК) — общий

Таблица 1

Содержание хлорофилла и его предшественников

Штамм	Условия	Генотип	Содержание пигментов (пМол/10 ⁹ клеток) [#]						
			ПП	MgПП	MgППМЭ	ПХЛД	ХЛД	ХЛ	Гем
СС124	свет	<i>wt</i>	0,19	0,20	0,18	н	н	3680	**
<i>lts3</i>	свет	<i>lts3</i>	0,41	0,54	0,56	н	89–529*	2450	**
<i>brc-1</i>	свет	<i>brc1</i>	0,37	0,67	0,39	н	54–385*	2100	**
<i>y-7</i>	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
<i>lts3</i>	темнота	<i>lts3</i>	12,0	0,77	0,62	—	н	187	94
<i>brc-1</i>	темнота	<i>brc1</i>	14,0	0,54	0,82	17,0	н	85	82
<i>y-7</i>	темнота	<i>y-7</i>	0,43	н	н	42,0	н	н	—

Примечания. [#] — в таблице представлены средние значения величин, полученных в 3–6 повторностях. Во всех случаях ошибки измерений не превышают 5 %.
 Условные обозначения: ПП — протопорфирин IX, MgПП — магний-протопорфирин IX, Mg-ППМЭ — магний-протопорфирин IX монометилэтер, ПХЛД — протохлорофиллид, ХЛД — хлорофиллид, ХЛ — хлорофиллы (a + b);
 н — наличие пигмента не регистрируется;
 «—» — измерения не проводились;
 * — 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.

Таблица 2

Активность ферментов биосинтеза хлорофилла

Штамм, условия культивирования	Генотип	Активность ферментов:		
		Mg-хелатаза (fkat/g)	MgПП-метил-трансфераза (mkat/g)	АЛК *
СС124 (свет)	<i>wt</i>	144 ± 4,8	3,5 ± 0,11	100 %
<i>lts3</i> (свет)	<i>lts3</i>	107 ± 3,2	3,2 ± 0,06	91 %
СС124 (темнота)	<i>wt</i>	90 ± 4,1	2,7 ± 0,08	60 %
<i>lts3</i> (темнота)	<i>lts3</i>	90 ± 3,1	3,3 ± 0,07	7 %

*АЛК — относительная активность ферментов, синтезирующих 5-аминолевулиновую кислоту, определяется количеством АЛК, которое накапливают клетки при их обработке сублетальными (4 мМ) дозами ее конкурентного ингибитора — левулиновой кислоты.

предшественник биосинтезов хлорофилла и гема у этих мутантов в отсутствие света 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).

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

Зеленение — индуцированный светом процесс биосинтеза хлорофилла, 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 (рис. 2а). В течение первых 8 часов после освещения выращенных в темноте штаммов, ресинтез хлорофилла наблюдался только у мутанта *y-7*. Хлорофилл появляется в его клетках после 4 часов пребывания на свету и его содержание быстро увеличивается, достигая за сутки 90 % от уровня, обычного для световой культуры. Динамика накопления пигмента у мутантов *brc-1* и *lts3* оказалась иной. Их клетки, выращенные в темноте, содержат около 8 % хлорофилла. После освещения этот уровень 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 хлорофилла становится сходной с таковой у клеток *y-7*. Таким образом, для мутантов, накапливающих ПП в темноте, характерна задержка индуцированного светом синтеза хлорофилла. 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 хлорофилла у мутантов по гену *LTS3* только после первого деления — уже во вновь образованных в условиях освещения клетках (рис. 2а).

При перемещении в темноту световых культур, кинетика снижения содержания хлорофиллов у изучаемых штаммов схожа: в течение первых 12 часов темноты их уровень практически достигает значений, характерных для темновых культур (рис. 2б). По-видимому, прекращение светозависимого синтеза хлорофилла в гетеротрофных условиях происходит одинаково у мутантов и штамма дикого типа, и анализируемые мутации не влияют на этот процесс.

Экспрессия генов, контролирующих биосинтез хлорофилла

Результаты изучения транскрипционной активности генов, кодирующих ферменты ранних этапов синтеза хлорофилла: глутамил-тРНК редуктазы (*GTR*), глутамат 1-полуальдегид аминотрансферазы (*GSA*), АЛК-дегидратазы (*ALAD*) и магний-хелатазы (*CHLH*, *CHLD* и *CHLI*) в культурах мутантов и штамма дикого типа, растущих в разных условиях освещения, представлены на рисунке 3а. В отли-

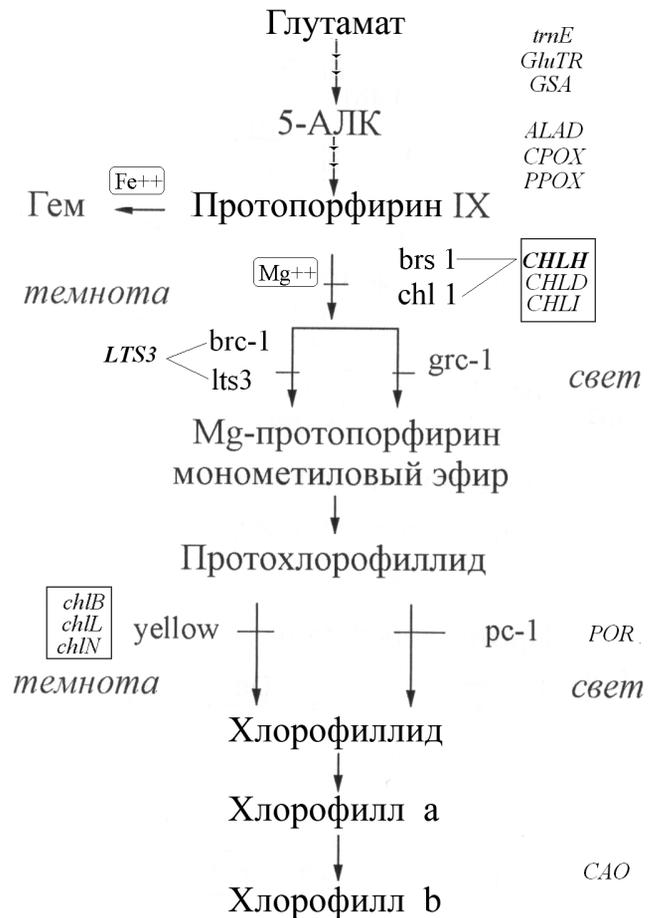


Рис. 1. Генетический контроль биосинтеза хлорофилла у хламидомонады.

На схеме строчными буквами указаны мутации, блокирующие отдельные этапы биосинтеза хлорофилла; курсивом обозначены гены. Хлоропластные гены: глутаминовой тРНК — *trnE* и субъединиц темновой ПОР: *chlB*, *chlL*, *chlN* (в рамке); и ядерные гены, кодирующие ферменты биосинтеза: *GluTR* — Glu-тРНК-редуктаза; *GSA* — глутамат 1-полуальдегид аминотрансферазу, *ALAD* — АЛК-дегидратазу, *CPOX* — копропорфириноген III-оксидазу, *PPOX* — протопорфириноген IX-оксидазу; субъединицы магний-хелатазы — *CHLH*, *CHLD*, *CHLI* (в рамке); *POR* — светозависимую НАДФ: протохлорофиллид-оксидоредуктазу; *CAO* — хлорофилл/хлорофиллид-оксидоредуктазу.

чие от дикого типа, у выращенного гетеротрофно мутанта *lts3* не удается обнаружить транскрипты генов: *GSA*, *CHLH*, *CHLI* и *CHLD*, а у штамма *y-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 четырем часам достигает максимума. Для мутантов же характерна временная задержка активации транскрипции (у штамма *y-7* она составляет примерно 1–2 часа, тогда как у *lts3* — более 2 часов). Уровень экспрессии анализируемых генов в световых культурах му-

танта сходен с таковым у штамма дикого типа, а в случае генов: *GTR*, *CHLH* и *CHLD*, — превышает его. Динамика синтеза белков большой (Н) и малой (И) субъединиц магний-хелатазы у штамма дикого типа и мутанта *lts3* (рис. 3б) соответствует динамике накопления мРНК этих генов, свидетельствуя, что регуляция их экспрессии происходит на уровне транскрипции. Таким образом, у неспособных синтезировать хлорофилл в темноте мутантов хламидомонады

(*lts3* и *y-7*) транскрипция ядерных генов, кодирующих ферменты биосинтеза хлорофилла, в темноте репрессирована как у большинства покрытосеменных растений.

Картирование гена *LTS3*

Для локализации *LTS3* на генетической карте *Chlamydomonas reinhardtii* мы скрещивали мутанты по этому гену с маркерами различных групп сцепления (ГЦ) и

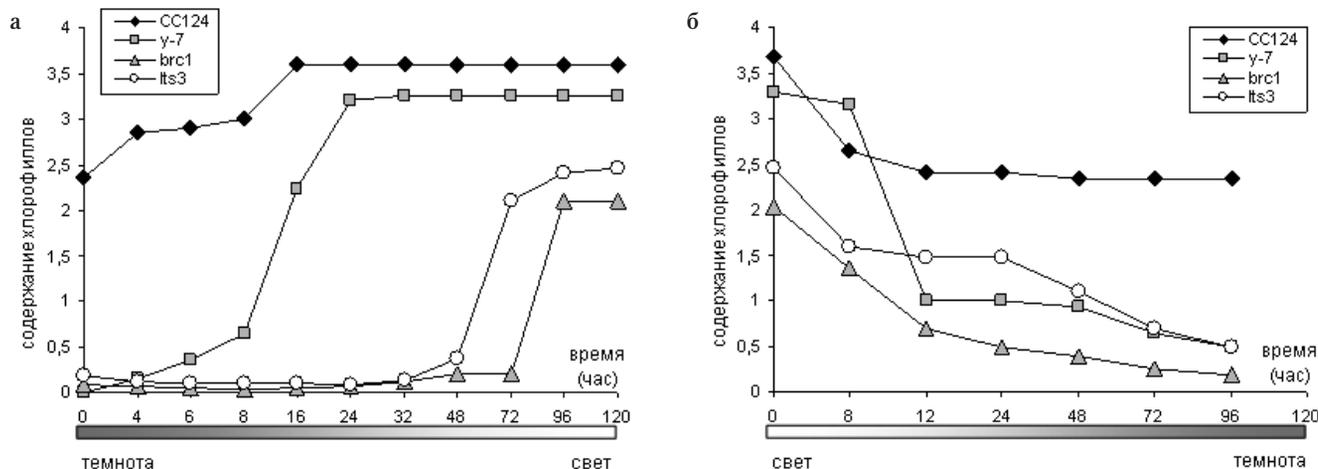


Рис. 2. Динамика накопления хлорофиллов в культуре клеток мутантов и дикого типа при изменении условий освещенности. Выращенные в темноте (ПТ) клетки были перемещены на свет (2а). Культуры, выращенные при постоянном освещении (ПС) перемещены в темноту (2б). Длительность освещения указана в часах. Содержание хлорофиллов дано в ($\mu\text{M} \times 10^9$ клеток).

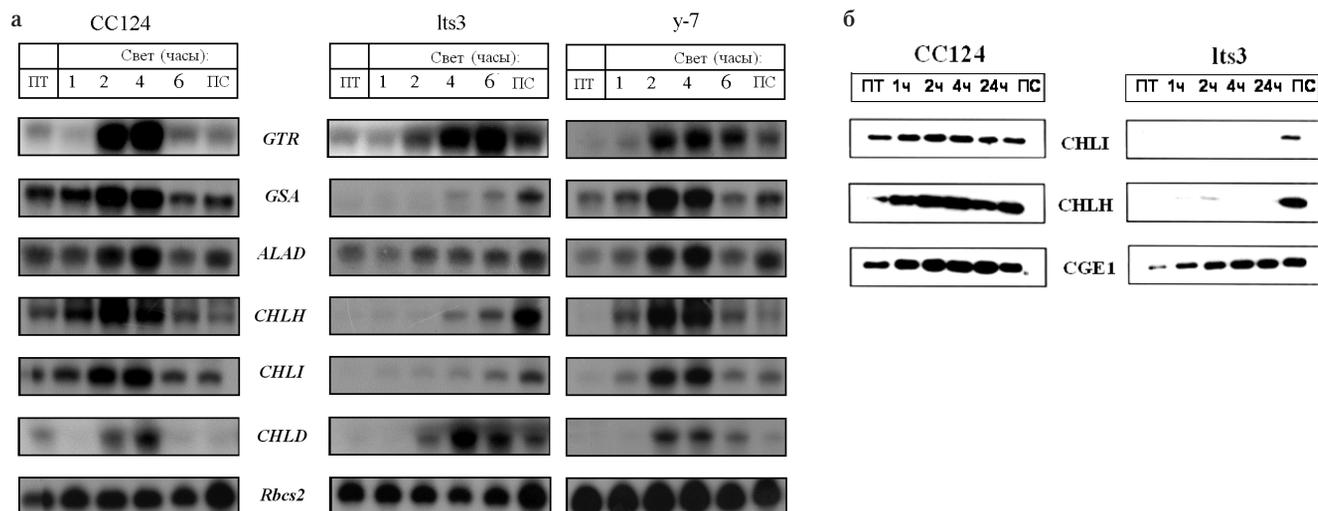


Рис. 3. Транскрипция генов, контролирующих биосинтез хлорофилла у мутантов с нарушениями темнового синтеза хлорофилла (3а). Аликвоты (10 мкг) тотальных РНК, выделенных из штамма дикого типа СС124 и мутантов: *lts3* и *y-7*, были использованы для Нозерн-блот гибридизации, которую осуществляли с фрагментами 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. В качестве контроля использованы пробы к гену малой субъединицы рибулозо-бифосфат карбоксилазы — *Rbcs2*. Вестерн-блот анализ (3б). Аликвоты белков (20 мкг), выделенных из клеток штамма дикого типа (СС124) и мутанта *lts3* при освещении (час.) выращенных в темноте (ПТ) культур, разделяли в 8 % ПААГ в присутствии SDS. Для иммуоблоттинга использовали поликлональные антитела к белкам хламидомонады: CHLH и CHLI — субъединицам магний-хелатазы, и CGE1 — ко-шаперону HSP70A (контроль), которые детектировали методом хемолюминисценции (ECL, Amersham).

анализировали потомство методом тетрадного анализа. Ранее полученные данные (Чекунова, Квитко, 1986), указывали на независимое наследование мутации *lts3* и маркеров VI, X и XI ГЦ и ее слабым сцеплении с дистальным маркером *msr1* первой ГЦ (29P:7N: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 (табл. 3). 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 (рис. 4а).

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 (Rumarquis et al., 2005). У трансформантов, имеющих фенотип 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 *Chlamydomonas 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/Chlre3/Chlre3.home.html>) провели поиск ВАС-клонов, которые могут нести ДНК участка хромосомы I, содержащего ген *LTS3*. Для экспериментов по трансформации были выбраны 25 клонов (табл. 4), суммарно перекрыва-

ющих (по геномной ДНК) область вероятной локализации *LTS3* длиной ок. 1850 тпн приблизительно равную 15 сМ (рис. 4а).

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 РТQ 4402. 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.

Поскольку два ВАС-клона, ДНК которых компенсировала мутантные аллели гена *LTS3*, несли перекрывающиеся последовательности, мы предположили, 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 гена (рис. 4). В результате анализа рестрикционных карт генов-кандидатов были выбраны эндонуклеазы рестрикции, специфически режущие их ДНК (рис. 4). Далее, мутанты по гену *LTS3* трансформировали ДНК ВАС-клонов: РТQ9626 и РТQ 4402, обработанные рестриктазами: *HindIII*, *BamHI*, *PstI*, *SphI*. Отсутствие зеленых в темноте трансформантов было установлено только в экспериментах, в которых использовали ВАС-ДНК, порезанную рестриктазой *SphI* (табл. 5). Эти результаты давали основание предположить, что ген *LTS3* на фрагменте ДНК размером 11,9 тпн занимает положение: 9106–10076. Компьютерный анализ структуры этого гена (рис. 4б), и кодируемого им белка (программа PROSITE) выявили наличие в его последовательности ДНК-связывающего цинк-пальцевого домена (рис. 4в), характерного для транскрипционных факторов. Этот белок, в базе данных геномного проекта *Chlamydomonas reinhardtii* обозначен как: ID 171659 (<http://genome.jgi-psf.org/cgi-bin/DispCeneModel/Chlre3.home.html>).

Таблица 3

Результаты тетрадного анализа зигот скрещиваний мутанта *lts3* с маркерами I группы сцепления *Chlamydomonas reinhardtii* и центромерными маркерами

Пары маркеров	P:N:T	D (сМ)	Пары маркеров: ген — центромер		
			маркеры	PD:ND:T	D (сМ)
<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 + I**</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			

Примечания. * — *pf2* — центромерный маркер группы сцепления XI хламидомонады; *y-6* — центромерный маркер группы сцепления I.

** — Приведены данные по расщеплению трисомика (+ + -) по I группе сцепления. Анеуплоидия используется как центромерный маркер и позволяет оценить расстояние ген-центромер как ½ частоты тетраптипов.

D — расстояние между маркерами, определенное по формуле:

$D(\text{сМ}) = (N + 0,5T) / (P + N + T) \times 100$, где: *P*, *N*, *T* — родительский дитип, неродительский дитип и тетраптип, соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе мутанты хламидомонады по гену *LTS3* стали предметом изучения генетической детерминации механизмов темного биосинтеза хлорофилла (ТБХ) — наименее изученной области исследований процессов хлорофиллообразования. Анализ пигментного состава показал, что мутации: *lts3* и *brc-1* в этом гене приводят к блокированию ТБХ и накоплению интермедиатов ранних этапов биосинтеза хлорофилла: ПП, Mg-ПП, Mg-ППМЭ и ПХЛД. На свету, мутанты зеленеют и синтезируют хлорофилл до уровня, характерного для клеток дикого типа, выращенных в темноте.

Свет в норме индуцирует ферменты биосинтеза хлорофилла у высших растений на 20–50 %. Их продуктивность у организмов, способных к образованию хлорофилла в темноте и на свету, составляет ок. 60 % и 40 %, соответственно (Reinbothe and Reinbothe 1996; Timko, 1998). Магний-хелатаза и магний-протопорфирин IX метилтрансфераза у мутантов по гену *LTS3* утратили способность к активации светом, и эти данные позволили предположить, что продукт гена *LTS3* участвует в световой регуляции этих ферментов.

Выращенные в темноте проростки высших растений — желтые. Они имеют недифференцированные пластиды, называемые этиопластами, не синтезируют хлорофилл и накапливают протохлорофиллид. После освещения в их клетках запускается процесс зеленения: активируется экспрессия генов, кодирующих белки, задействованные в процессах фотосинтеза (*PRP—photosynthetic-related proteins*), из этиопластов формируются хлоропласты, и образуется хлорофилл (Беляева, 2009; Armstrong, 1998). Клетки дикого типа хламидомонады, растущие гетеротрофно, обладают хорошо развитой системой хлоропластных мембран и способны к образованию хлорофилла. 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, Timko, 1996). Штаммы хламидомонады *brc-1* и *lts3* в темноте имеют одинаковое с *yellow* строение хлоропластных мембран (Wang, 1978; Grimm, личное сообщение). Для ответа на вопрос, сохраняется ли сходство мутантов при освещении, мы изучили процесс их зеленения и показали, что для мутантов по гену *LTS3* характерна временная задержка индуцированного светом синтеза хлорофилла. По-видимому, освещение сначала ведет к уменьшению содержания порфириновых интермедиатов, после чего начинается процесс зеленения. Такая последовательность событий, описанная для мутанта *brc-1* (Wang et al., 1974), характерна и для мутанта *lts3*. Очевидно, свет снимает эффект мутаций, — выращенные в тем-

Таблица 4

Клоны из геномной библиотеки ВАС-клонов *Chlamydomonas reinhardtii*

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

Примечания. 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). Полу жирным шрифтом выделены клоны, содержащие аллель дикого типа гена *LTS3*.

ноте мутанты перестают накапливать протопорфирины, и их клетки, вновь образованные в результате деления, становятся способны к синтезу хлорофиллов. На основании этих наблюдений (с учетом результатов изучения активности ферментов) мы предположили, что продукт гена *LTS3* может контролировать ферментную систему,

Таблица 5

Трансформация мутантов по гену *LTS3**

Рестриктазы	Положение сайтов рестрикции на фрагменте ДНК, содержащем аллель дикого типа гена <i>LTS3</i>	Результаты**
HindIII	118, 6228, 11914	+
BamHI	164, 1968, 11010	+
PstI	451, 1559, 1815, 5804, 7183, 8221, 8660	+
SphI	2082, 6458, 7854, 9015, 9256, 10040, 11227	-

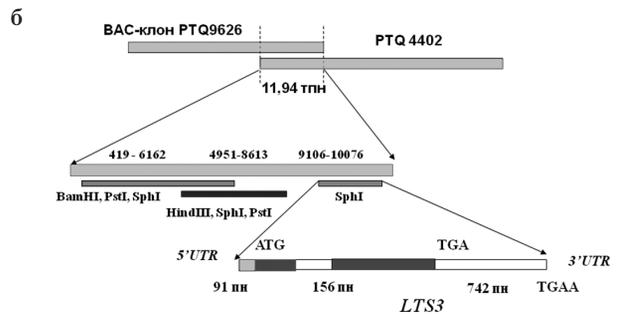
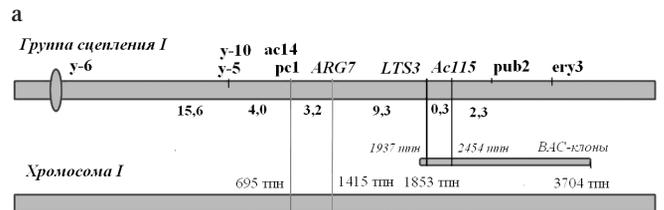
* — клетки трансформировали ДНК ВАС клонов: PTQ9626 и PTQ 4402, порезанных указанными рестриктазами;
 ** — (+) — наличие трансформантов дикого типа (зеленых в темноте); (-) — их отсутствие.

осуществляющую темновое превращение ПП в ХЛД в той её части, которая регулируется светом. В этой связи возникла необходимость оценить влияние мутации в гене *LTS3* на экспрессию генов, кодирующих магний-хелатазу и другие ферменты биосинтеза хлорофилла.

У покрытосеменных растений гены *PRP* строго 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 хлорофилла, такая зависимость выражена слабо. В их клетках мРНК целого ряда генов *PRP* накапливается в достаточно больших количествах в отсутствие света и лишь слегка увеличивается при переносе растений на свет (Ohad et al., 1967). Методом Нозерн-блот анализа мы показали, что характер экспрессии генов, кодирующих ферменты биосинтеза хлорофилла, отражает динамику синтеза хлорофиллов в процессе зеленения анализируемых культур 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 анализа пигментного состава, процесса зеленения и экспрессии генов ферментов биосинтеза хлорофиллов у анализируемых мутантов хламидомонады позволяли предположить, что мутации в гене *LTS3* влияют на световую регуляцию клетки, а его продукт в темноте активирует экспрессию ядерных генов, кодирующих магний-хелатазу (*CHLH*, *CHLD* и *CHLI*) и глутамат 1-полуальдегид аминотрансферазу (*GSA*).

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».



GATA1 – цинк-пальцевый домен

Программы PROSITE
(Database of protein domains, families and functional sites)

53-78 CtQCgtqt..TpvWRAgphgPktl

Рис. 4. Идентификация гена *LTS3*.

а. Генетическое и молекулярное картирование гена *LTS3* 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 ВАС-клонов, использованные в работе, перекрывают участок скаффолда I (позиции: 1853–3704 тпн). Позиции фрагментов, содержащих аллели дикого типа генов *LTS3* и *Ac115* указаны курсивом.

б. Область перекрывания 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), стоп-кодон (TGA) и сайт полиаденилирования (TGAA).

в. Структура белка *LTS3*. Предсказанный белок протяженностью 104 ак, содержит цинк-пальцевый GATA1-домен. «Цинковый палец», расположенный ближе к С-концу молекулы (54 ак — 78 ак), имеет каноническую конфигурацию: Cys-X2-Cys-X17/18 — Cys-X2-Cys, петля которого состоит из 18 аминокислотных остатков. Он узнает консенсусную последовательность ДНК: WGATAR (где W-A/T, а R — A/G).

В результате, в библиотеке ВАС-клонов хламидомонады найден фрагмент ДНК, содержащий аллель дикого типа гена *LTS3*. 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, и, по-видимому, фактор транскрипции LTS3 выступает в роли активатора и (или) репрессора экспрессии генов: *CHLH*, *CHLD*, *CHLI* и *GSA* в темноте и на свету, соответственно.

В ходе генетического анализа известных транскрипционных факторов арабидопсиса, принадлежащих к семейству GATA (ДНК-связывающий домен которых содержит «цинковый палец», узнающий мотив: 5'-(A/T)GATA(A/G)-3' в промоторах светозависимых генов), был обнаружен один белок (из 30-ти), принимающий участие в регуляции биосинтеза хлорофилла (Bi et al, 2005). Им оказался фактор GNC (*GATA*, *nitrate-inducible*, *carbon metabolism-involved*), отсутствие которого в результате Т-ДНК инсерции в кодирующем его гене, вызывает редукцию синтеза хлорофиллов. GNC участвует в координации метаболизма: азота, углерода, и хлорофиллов во время фотоморфогенеза — при переходе от гетеротрофного к фототрофному росту на свету. Выполняет ли белок LTS3 подобные функции у хламидомонады, или его роль сводится к светозависимой регуляции экспрессии генов, контролируемых магний-хелатазу, покажут дальнейшие исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор приносит искреннюю благодарность своим немецким коллегам: проф. К. Беку (Ch. Beck) и проф. Б. Гримму (B. Grimm), за предоставленную возможность выполнения части экспериментов на базе их лабораторий.

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

Литература

1. Александрова Н. Н., Крзла Л. П., Тугаринов В. В., 1979. Генетическая детерминация признаков хлоропласта у хламидомонады. Сообщ. I. Создание множественно-маркированных линий // Исследования по генетике. Вып. 8. С. 139–149.
2. Беляева О. Б., 2009. Светозависимый биосинтез хлорофилла. Москва: Бином. Лаборатория знаний, 232 с.
3. Квитко К. В., Борщевская Т. Н., Чунаев А. С., Тугаринов В. В., 1983. Петергофская генетическая коллекция штаммов зеленых водорослей *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Chlamydomonas* // Культивирование коллекционных штаммов водорослей. Л. С. 28–56.
4. Столбова А. В., 1971. Генетический анализ пигментных мутаций *Chlamydomonas reinhardtii*. Сообщ. I. Идентификация основных пигментов и описание коллекции пигментных форм // Генетика. Т. 7 № 9. С. 90–94.
5. Терентьев П. В., Ростова Н. С., 1977. Практикум по биометрии. Ленинград: ЛГУ. С. 20–34.
6. Чекунова Е. М., Квитко К. В., 1986. Генетическое изучение мутантов хламидомонады, накапливающих протопорфирин IX // Исследования по генетике. N 10. С. 104–112.
7. Чекунова Е. М., Шалыго Н. В., Яронская Е. Б. и др., 1993. Регуляция биосинтеза предшественников хлорофилла у мутантов зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. Т. 58. Вып. 9. С. 1430–1436.
8. Шалыго Н. В., Чекунова Е. М., Чунаев А. С., Аверина Н. Г., 1990. Анализ состава порфиринов в мутантах *Chlamydomonas reinhardtii* // Известия АН БССР. Сер. Биол. наук. N4. С. 53–57.
9. Armstrong G. A., 1998. Greening in the dark: Light-independent chlorophyll biosynthesis from anoxygenic photosynthetic bacteria to gymnosperms // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. Vol. 43. P. 87–100.
10. Bi Y. M., Zhang Y., Signorelli T. et al., 2005. Genetic analysis of *Arabidopsis* GATA transcription factor gene family reveals a nitrate-inducible member important for chlorophyll synthesis and glucose sensitivity // Plant J. Vol. 44(4). P. 680–692.
11. Cahoon A. B., Timko M., 2000. Yellow-in-the-dark mutants of *Chlamydomonas* lack the CHLL subunit of light-independent protochlorophyllide reductase // The Plant Cell. Vol. 12. P. 559–568.
12. Chekounova E., Voronetskaya V., Papenbrock J. et al., 2001. Characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in the H subunit of Mg-chelatase // Mol. Gen. Genet. Vol. 266. P. 363–373.
13. Choquet Y., Rahire M., Girard-Bascou J. et al., 1992. A chloroplast gene is required for light-independent accumulation of chlorophyll in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. EMBO. Vol. 11. N 5. P. 1697–1704.
14. Ford C., Mitchell S., Wang W. Y., 1981. Protochlorophyllide photoconversion mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // Mol. Gen. Genet. Vol. 184. P. 460–464.
15. Forreiter C., Apel K., 1993. Light-independent and light-dependent protochlorophyllide-reducing activities and two distinct NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase polypeptides in mountain pine (*Pinus mugo*) // Planta Vol. 190. P. 536–545.
16. Harris E. H., 1989. The *Chlamydomonas* Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. — San Diego, California: Academic Press, 780 p.
17. Li J., Timko M. P., 1996. The *pc-1* phenotype of *Chlamydomonas reinhardtii* results from a deletion mutation in the nuclear gene for NADPH protochlorophyllide oxidoreductase // Plant. Mol. Biology. Vol. 30. P. 15–37.
18. Merchant S. S., Prochnik S. E., Vallon O. et al., 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions // Science. Vol. 318 (5848). P. 245–250.

19. Ohad I., Siekevitz P., Palade G. E., 1967. Biosynthesis of chloroplast membranes II Plastid differentiation during greening of a dark grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii*) // J. Cell Biology. Vol. 35. P. 553–584.
20. Reinbothe S., Reinbothe C., 1996. The regulation of enzymes involved in chlorophyll biosynthesis // Eur. J. Biochemistry. Vol. 237. P. 323–343.
21. Rochaix J.-D., 1995. *Chlamydomonas* as the photosynthetic yeast // Annu. Rev. Genet. Vol. 29. P. 209–230.
22. Rymarquis L. A., Handley J. M., Thomas M., Stern D. B., 2005. Beyond complementation. Map-based cloning in *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. Vol. 137. P. 557–566.
23. Timko M. P., 1998. Pigment biosynthesis: Chlorophylls, Heme, and Carotenoids // The molecular biology of chloroplast and mitochondria in *Chlamydomonas* / Eds.: J.-D. Rochaix et al., Kluwer Academic Publ. P. 377–341.
24. Wang W-Y, Wang W.L, Boynton J. E., Gillham N. E., 1974. Genetic Control of Chlorophyll Biosynthesis in *Chlamydomonas*. Analysis of mutants at two loci mediating the conversion of protoporphyrin-IX to magnesium-protoporphyrin // J. Cell Biology. Vol. 63. P. 806–823.
- LTS3 GENE CONTROLS LIGHT-INDEPENDENT CHLOROPHYLL BIOSYNTHESIS IN GREEN ALGAE *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII***
- E. M. Chekunova, N. V. Savelieva*
- ✿ **SUMMARY:** The genetic control of light-independent chlorophyll biosynthesis in plant cells has been investigated using *Chlamydomonas reinhardtii* *Lts3*-mutants defective in dark chlorophyll biosynthesis on the stage before protochlorophyllide to chlorophyllide conversion. In heterotrophic conditions the mutants are unable to synthesize chlorophyll and accumulate protoporphyrins, after illumination they are greening. The mutants were tested for pigment contents, activity of enzymes and expression of the genes, encoding these enzymes. The *LTS3* gene has been identified by positional cloning, and the predicted *LTS3* protein appeared to be a GATA transcription factor, which activate the expression of genes encoded chlorophyll biosynthesis enzymes: Mg-chelatase and glutamate 1-semialdehyde aminotransferase in the dark, and possibly, important for adaptation of plant cells for autotrophic conditions.
- ✿ **KEY WORDS:** genetic control; dark reactions of chlorophyll biosynthesis.

✿ Информация об авторах:

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

Савельева Наталья Владимировна — СПбГУ, младший научный сотрудник кафедры генетики и селекции биолого-почвенного факультета СПбГУ. Университетская набережная 7/9, Санкт-Петербург, 199034. E-mail: elena_chekunova@mail.ru.

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

Savelieva Natal'ya Vladimirovna — junior research fellow. The State University of Saint-Petersburg. Universitetskaya nab., 7/9, St.-Petersburg, Russia. 199034. E-mail: elena_chekunova@mail.ru.