В. Г. Ладыгин

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ, НАСЛЕДОВАНИЕ, БИОГЕНЕЗ, БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ *СНLAMYDOMONAS REINHARDTII*



Пущино, 2015

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук

В. Г. Ладыгин

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ, НАСЛЕДОВАНИЕ, БИОГЕНЕЗ, БИОХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА И СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ХЛОРОПЛАСТОВ *СНLAMYDOMONAS REINHARDTII*

УДК 575.24 : 581.132 : 581.174.1 : 582.264

Ладыгин В.Г. Жизненный цикл, наследование, биогенез, биохимический состав, спектральные свойства и структурно-функциональная организация хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii* // Вопросы современной альгологии. 2015. № 2 (9). 161 с. www.algology.ru.

ISSN: 2311-0147

Монография посвящена актуальным и важным вопросам исследования генетического контроля, молекулярной организации и функционирования фотосистем в хлоропластах Chlamvdomonas reinhardtii Dang. Показана наследственная непрерывность хлоропластов в процессе вегетативного и полового клеточных циклов. Изучены структурные изменения хлоропластной ДНК в процессе формирования дочерних клеток. С помощью пигментных мутантов впервые описаны все этапы биогенеза мембранной системы хлоропластов от единичных пузырьков до макрогран. В работе даны современные представления о биохимическом составе, структурной организации фотосистем I и II, их пространственной локализации в тилакоидах. Определены величины и число фотосинтетических единиц, изучена их функциональная активность. С помощью двойных и тройных мутантов впервые распределения спектральных установлена закономерность форм И максимумов флуоресценции хлорофилла для нативных комплексов фотосистем в клетках in vivo. Рассмотрены современные представления о молекулярной организации фотосистем в хлоропластах эукариот.

Книга будет полезна широкому кругу специалистов и ученых: генетиков, биохимиков, биофизиков и физиологов растений, а также для преподавателей, аспирантов и студентов биологических ВУЗов в качестве учебника.

Ladygin V.G. The life cycle, inheritance, biogenesis, biochemical composition, spectral properties and structural-functional organization of chloroplasts *Chlamydomonas reinhardtii* // Вопросы современной альгологии. 2015. V. 2 (9). 161 p. www.algology.ru.

The monograph is devoted to the topical and important issues of the study of the genetic control of the molecular organization and functioning of the photosystems in the chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. The inherited chloroplast continuity in the process of the vegetative and sexual cell cycles is shown. Structural changes of chloroplast DNA in the process of forming daughter cells are studied. All stages of the biogenesis of membrane system the chloroplast from single vesicles to makrogranums are first described by using pigment mutants. There are current understanding of the biochemical composition, structural organization of photosystems I and II, the spatial localization of them in thylakoids in a monograph. The values and the number of photosynthetic units are defined and their functional activity is studied. The regularity distribution of spectral forms and chlorophyll fluorescence peaks for native complexes of photosystems in cells *in vivo* was first defined using double and triple mutants. Modern understanding of the molecular organization of photosystems in the chloroplasts of eukaryotes is considered.

The book will be interesting for a wide range of experts and scientists: geneticists, biochemists, biophysicists and physiologists of plants as well as for teachers and students of biological universities.

оглавление

ВВЕДЕНИЕ
ГЛАВА І. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ, КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> 6
1. Характеристика Chlamydomonas reinhardtii 6
2. Классификация Chlamydomonas reinhardtii7
3. Морфология клеток Chlamydomonas reinhardtii
4. Жизненный цикл Chlamydomonas reinhardtii8
5. Условия культивирования Chlamydomonas reinhardtii и состав сред
ГЛАВА II. НАСЛЕДОВАНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ВЕГЕТАТИВНОМ (МИТОТИЧЕСКОМ) РАЗМНОЖЕНИИ <i>СНLАМYDOMONAS REINHARDTII</i> 17
1. Наследственная непрерывность хлоропласта при вегетативном размножении17
ГЛАВА III. НАСЛЕДОВАНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ПОЛОВОМ (МЕЙОТИЧЕСКОМ) РАЗМНОЖЕНИИ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>
1. Наследственная непрерывность хлоропласта при половом размножении
ГЛАВА IV. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И НАСЛЕДОВАНИЕ ДНК ХЛОРОПЛАСТОВ В ВЕГЕТАТИВНЫХ КЛЕТКАХ И ЗИГОТАХ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> 53
1. Локализация ДНК в хлоропластах вегетативных клеток
2. Локализация и наследование ДНК в хлоропластах зигот
ГЛАВА V. ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ <i>СНLАМYDOMONAS REINHARDTII</i> ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ61
1. Действие мутагенных факторов61
2. Получение пигментных и нефотосинтезирующих мутантов
ГЛАВА VI. БИОГЕНЕЗ МЕМБРАН ТИЛАКОИДОВ ОТ ЕДИНИЧНЫХ ПУЗЫРЬКОВ ДО МАКРОГРАН У ПИГМЕНТНЫХ МУТАНТОВ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>
1. Характеристика мембранной системы хлоропластов пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii
ГЛАВА VII. БИОСИНТЕЗ, ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИИ КАРОТИНОИДОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ ВОДОРОСЛЕЙ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ
1. Общая характеристика каротиноидов эукариот86
2. Локализация наиболее важных ксантофиллов эукариот
ГЛАВА VIII. УЧАСТИЕ КАРОТИНОИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ ГЛАЗНОГО ПЯТНА И ФОТОТАКСИСЕ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i> 98
1. Формирование ультраструктуры глазного пятна

2. Состав каротиноидов в глобулах глазного пятна	102
3. Изменение состава каротинов глазного пятна путем мутагенеза	103
ГЛАВА IX. БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА У ЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ	110
ГЛАВА Х. БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХЛОРОФИЛЛ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	119
1. Содержание хлорофилла в комплексах фотосистем	119
2. Идентификация хлорофилл-белковых комплексов	121
3. Полипептидный состав индивидуальных комплексов	121
ГЛАВА XI. СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАТИВНЫХ ХЛОРОФИЛЛ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	123
1. Спектральные формы хлорофилла нативных комплексов	123
2. Максимумы флуоресценции хлорофилла нативных комплексов	126
ГЛАВА XII. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОСИСТЕМ ХЛОРОПЛАСТОВ <i>CHLAMYDOMONAS REINHARDTII</i>	129
1. Фотосинтетическая активность	129
2. Величина фотосинтетической единицы	130
3. Число реакционных центров фотосистем	131
ГЛАВА XIII. УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МЕМБРАН ТИЛАКОИДОВ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФОТОСИСТЕМ В ХЛОРОПЛАСТАХ ЭУКАРИОТ	[134
1. Пространственная локализация фотосистем в мембранах хлоропластов	134
2. Состав и функции белков ФС-II	144
ГЛАВА XIV. МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМЫ I И ФОТОСИСТЕМЫ II	[149
1. Структура комплекса фотосистемы I	150
2. Структура комплекса фотосистемы II	152
3. Структура реакционного центра фотосистемы II	155
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	161

введение

Одноклеточная гаплоидная гетероталличная изогамная зеленая водоросль Chlamydomonas reinhardtii является классическим модельным объектом для генетических, биохимических, биофизических, цитологических и физиологических исследований. Жизненный цикл этой водоросли включает два типа размножения: 1 – вегетативное и 2 – половое. Вегетативные клетки, гаметы и зооспоры являются гаплоидными. Они содержат 18 хромосом, только зиготы являются диплоидными. Chlamydomonas reinhardtii легко культивируется, как в темноте – гетеротрофно, так и на свету – автотрофно или миксотрофно. В данной работе представлены всесторонние исследования хлоропластов Chlamydomonas reinhardtii, в значительной степени опирающиеся на 50-летний опыт работы автора и многочисленных соавторов из различных институтов РАН и университетов России.

Важными результатами для всех последующих исследований можно считать доказательства наследственной непрерывности хлоропластов, как при вегетативном размножении, так и на всех стадиях полового размножения. Описаны методы получения пигментных и нефотосинтезирующих мутантов, которые использовались для всесторонних исследований структуры и функции хлоропластов.

Впервые с помощью пигментных мутантов были описаны все этапы биогенеза мембранной системы хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii*. Показаны пути биосинтеза хлорофилла и каротиноидов. С помощью нефотосинтезирующих мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* удалось установить закономерность распределения спектральных форм хлорофилла между четырьмя пигмент-белковыми комплексами фотосистем и обнаружить максимумы излучения флуоресценции хлорофилла, принадлежащие реакционным центрам ФС-I и ФС-II, а также их светособирающим комплексам ССК-I и ССК-II непосредственно в целых клетках мутантов.

В настоящее время установлена локализация хлорофиллов и каротиноидов в мембранах тилакоидов, показана их роль в структуре и функционировании фотосистем, рассчитаны величины фотосинтетических единиц для реакционных центров ФС-I и ФС-II. Также с помощью нефотосинтезирующих мутантов исследована пространственная локализация комплексов фотосистем и светособирающих комплексов в мембранах тилакоидов гран и межгранных участков. Охарактеризовано взаимодействие белковых комплексов внутри фотосистем и участие их отдельных компонентов в электроннотранспортной цепи фотосинтеза.

В последние десять лет ведутся интенсивные исследования молекулярной организации фотосистем. Обсуждаются их трехмерные модели, в которых представлены индивидуальные компоненты, их пространственная локализация и взаимодействие. Детально изучен генетический контроль ключевых белковых компонентов, как комплексов фотосистем, так и суперкомплексов реакционных центров и их светособирающих комплексов. Некоторые из современных структурных моделей ФС-I и ФС-II обсуждаются нами в этой работе.

ГЛАВА І

ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ, КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Альгологически и бактериологически чистую культуру Chlamydomonas reinhardtii использовали в качестве объекта исследования. Изучение фотосинтетического аппарата с точки зрения становления фотосинтетической способности и ультраструктуры хлоропластов в зависимости от содержания и состава пигментов, а также анализ механизма генетического контроля этими процессами требует универсального объекта, поэтому выбор *Chlamydomonas* reinhardtii для данного исследования был не случайным, а основывался на ряде соображений. Для работы требовался одноклеточный микроорганизм, содержащий одни хлоропласт, способный выполнять все реакции фотосинтеза, подобно высшим растениям, обладающий легко контролируемым половым циклом, способный расти в темноте с органическим источником углерода и на всех стадиях своего жизненного цикла развиваться на синтетической среде в контролируемых лабораторных условиях. Такие требования представляют особую ценность при исследовании мутантов с различными нарушениями в содержании пигментов. Генетические изменения пигментного состава у высших растений часто приводят их к гибели на ранних этапах онтогенетического развития. У одноклеточных водорослей мутанты, не способные к фотосинтетическому росту, могут сохраняться неограниченное число поколений даже в темноте на питательной среде, содержащей органический источник углерода. Кроме того, исследование фотосинтетического аппарата высших растений затруднено сложностью тканевого строения листа и изменением состояния их хлоропластов во время эксперимента. Гаплоидная одноклеточная гетероталличная зеленая водоросль Chlamydomonas reinhardtii для таких исследований представляет идеальную модельную систему.

1. Характеристика Chlamydomonas reinhardtii

Наличие одноклеточной вегетативной и зиготной стадий, легкость проведения генетического анализа мутантов дает возможность изучать тонкую структуру таких клеточных органелл как ядро, хлоропласт, митохондрии, пиреноид и глазное пятно (стигма). В настоящее время уже имеются пигментные, нефотосинтезирующие, морфологические, физиологические и ауксотрофные мутантные штаммы этого организма (Ладыгин, 1988, 1991, 1998, 2014; Sager, 1955; Levine et al., 1960, 1968; Harris, 1989, 2001, 2009).

Особую ценность эти мутантные штаммы представляют при разработке таких важных проблем, как генетический контроль синтеза пигментов, изучение начальных стадий фотосинтеза и биохимических циклов, а также в решение вопроса о происхождении и развитии хлоропластов и других органелл фотосинтезирующего организма.

Успех в биохимических и физиологических исследованиях обеспечивается возможностью получения большого количества биомассы вегетативных клеток *Chlamydomonas reinhardtii* за относительно короткий период времени.

Особую важность для генетического анализа представляют такие параметры, как короткий жизненный цикл, классическое течение митоза и мейоза, образование зигот, а затем и тетрад, которые могут быть быстро изолированы, а также возможность применения при работе с этой водорослью общепринятых микробиологических методик. Это дает возможность получать и анализировать большое число потомков, изучая генные рекомбинации, наследование признаков и получая значительное количество различной генетической информации.

Следовательно, используя *Chlamydomonas reinhardtii* в качестве модельного объекта, мы имеем возможность проводить биохимические, физиологические, цитологические и ультраструктурные исследования параллельно с генетическим анализом.

2. Классификация Chlamydomonas reinhardtii

Систематическое положение одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas* reinhardtii следующее:

Тип AlgaeПодтип ChlorophytaКласс EuchorophyceaeПорядок VolvocalesРод ChlamydomonasВид Chlamydomonas reinhardtii Dang.

Полагают, что из *Chlorophyta*, по-видимому, произошли все высшие растения, а также и многие многоклеточные водоросли (Smith, 1950). Однако, как флагеллят, *Chlamydomonas* относят к примитивным *Protozoa*. Эта двойственность в классификации подтверждается цитологическими исследованиями. Водоросль содержит типичную органеллу растительной клетки – хлоропласт, внедренный в цитоплазму, которая по своей организации подобна цитоплазме животных клеток (хорошо развитые аппарат Гольджи, митохондрии, наличие светочувствительного органа – стигмы или глазного пятна и др.) (Sager, Palade, 1957). Кроме того, клетки обладают подвижностью за счет пары жгутиков (рис. 1).



Рис. 1. Продольный срез вегетативной клетки Chlamydomonas reinhardtii.

3. Морфология клеток Chlamydomonas reinhardtii

Вегетативные клетки водоросли имеют овальную слегка удлиненную форму 5–8 мкм в ширину и 8–15 мкм в длину (рис. 1). При выращивании в жидкой среде клетки подвижны. Они плавают при помощи пары жгутиков, расположенных на переднем конце клетки. Длина жгутиков у *Chlamydomonas* варьирует от 15 до 30 мкм. Две трети объема клетки занимает единственный зеленый чашеобразный хлоропласт. В центре его нижней части находится пиреноид – сферическое тело около 2 мкм в диаметре, окруженное одним рядом крахмалоносных пластинок (Ладыгин, 1998).

Глазное пятно расположено вблизи переднего края хлоропласта непосредственно под оболочкой и слегка выдается наружу хлоропласта, как маленькая выпуклость. Оно желтого или оранжевого цвета, состоит из 2–3 рядов гранул гомогенного липидно-каротиноидного вещества (Ладыгин, 2014; Ладыгин, Семенова, 2013, 2014). Сверху это тело дисковидной формы около 1 мкм в диаметре, а сбоку имеет палочковидную или эллипсовидную форму.

Между оболочкой клетки и хлоропластом, а также в цитоплазме около ядра, расположены митохондрии. Передняя треть клетки содержит ядро, аппарат Гольджи, сократительные вакуоли, рибосомы и другие включения цитоплазмы.

4. Жизненный цикл Chlamydomonas reinhardtii

Жизненный цикл *Chlamydomonas reinhardtii* впервые описан Рейнхардом в 1876 году (цит. по Sager, Granick, 1953). Он состоит из двух стадий (рис. 2) вегетативной (бесполой или митотической) и половой (зиготной или мейотической). Водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* имеет два "половых" типа, условно обозначенных как (+) и (–) типы спаривания.

Клетки вегетативной стадии могут неограниченное время культивироваться, как на агаризованной, так и в жидких средах, размножаясь митотически.

Однако, они могут вести себя как гаметы, спариваясь и сливаясь с клеткой противоположного "полового" типа с образованием диплоидной зиготы. Никаких морфологических различий между вегетативными клетками и гаметами не обнаружено, но по способности гамет к спариванию и слиянию можно сделать вывод о существовании биохимических различий между вегетативными клетками и гаметами.

В настоящее время известно, что вегетативные клетки *Chlamydomonas reinhardtii* могут дифференцироваться в гаметы только тогда, когда они израсходуют свои азотные запасы. Указанием на то, что дифференциация гамет может контролироваться путем изменения количества азота в среде, подтверждается двумя фактами.

1. Клетки, выращенные на свету и отобранные на логарифмической фазе роста, негаметичны. Если такие клетки, различающиеся по "половому" знаку, смешать, то они не сольются. Однако же, если клетки выращивать 2–4 суток на безазотной ацетатной среде или предварительно суспензировать их в бидистиллированной воде (каждый в отдельности), то после 3–5 часов пребывания на свету они, израсходовав свои азотные запасы, превращаются в гаметы, что подтверждается фактом слияния их при смешении с образованием зигот.

Вегетативные клетки старых культур, помещенные в бидистиллированную воду, требуют значительно меньше времени освещения для превращения их в гаметы и, наконец, потребность в свете для клеток из весьма старых культур при формировании гамет может быть совсем утрачена. Очевидно, свет необходим не для копуляции, а для биохимических изменений в вегетативных клетках, которые превращаются затем в гаметы, так как потребность в свете может быть удовлетворена еще до смешения противоположных "половых" типов.

По-видимому, свет может действовать фотосинтетически в этом процессе, создавая "излишки" углеводов в виде крахмала, что связано с другими запасами, в частности, азотными.



Рис. 2. Схема жизненного цикла *Chlamydomonas reinhardtii*, показывающая наличие двух типов размножения:

а – бесполое размножение, вегетативный или митотический клеточный цикл: *1–3* – рост вегетативной клетки, *4* и 5 – митотическое деление и выход дочерних зооспор.

б – половое размножение, зиготный или мейотический клеточный цикл: *1* – гамета, *2* – слияние (+) и (-) гамет, *3* – молодая, четырехжгутиковая зигота, *4* и *5* – мейотическое деление ядра и выход дочерних зооспор.

Это было хорошо показано с использованием сред с высоким и низким содержанием азота. В среде с низким содержанием азота или его отсутствием дифференциация гамет проходила гораздо быстрее, чем в среде с высоким его содержанием.

2. Ключевая роль азота была показана при изучении обратимости процесса гаметообразования. Когда активные (+) и (–) гаметы отдельно друг от друга суспензировали в минимальной азотсодержащей среде, то они быстро превращались в вегетативные клетки и теряли способность к копуляции при смешивании.

При испытании всех компонентов среды было показано, что только азотные соединения (любые), которые клетки могли использовать в качестве источника азота, обладают ингибирующим эффектом. Азотное ингибирование копуляции может быть снято путем отмывания и ресуспензирования клеток в безазотной среде на свету, что снова приводит к образованию гамет и возвращению способности к спариванию.

Таким образом, можно сделать вывод, что для формирования гамет необходимо азотное истощение. Свет, когда он требуется для гаметообразования, действует фотосинтетически. В азотно-истощенных клетках свет не требуется вообще ни на одном из звеньев процесса формирования зигот. Особо следует отметить, что в процессе формирования гамет вегетативные клетки всегда теряют клеточную стенку и остаются покрытыми только плазмалеммой, что облегчает слияние гамет. И обратный процесс, если гаметы покрываются клеточной стенкой, они превращаются в вегетативные клетки и теряют способность к образованию зигот.

Такие приемы стимулирования половых процессов известны для других микроорганизмов и водорослей повышением концентрации ионов кальция в среде.

Лучшие результаты для получения и развития зигот *Chlamydomonas reinhardtii* дает минимальная среда с 0.1%-ным ацетатом натрия, так как зиготы плохо растут на высоко фосфатной ацетатной среде.

Половой процесс у *Chlamydomonas reinhardtii* считается изогамным, так как гаметы обоих штаммов морфологически неотличимы. На наш взгляд было бы правильнее называть его гологамией на основании двух фактов: 1 – морфологическая неразличимость вегетативных и половых клеток и 2 – способность не только вегетативных клеток дифференцироваться в гаметы, но и (что особо стоит отметить) способность гамет превращаться в вегетативные клетки. Можно считать, что в половом процессе участвуют претерпевшие биохимические изменения и утратившие клеточную стенку вегетативные клетки (называемые гаметами, так как они участвуют в половом процессе), которые, сливаясь попарно, дают зиготы, как и в результате любого полового процесса. В данном случае слово "гамета" также несколько условно, так как оно отражает лишь физиологическую и функциональную способность клетки к слиянию.

При смешении гамет противоположных "половых" типов сразу же наблюдается группирование (+) и (-) гамет. Спустя короткое время они начинают спариваться, то есть склеиваться попарно и сливаться. Процесс этот продолжается 10–30 мин с момента начала спаривания. Слияние клеток заканчивается образованием двуядерных, четырехжгутиковых, диплоидных зигот.

Спаривание прекращается тот час же после посева клеток на минеральную агаризованную среду, и только те клетки, которые начали сливаться до посева, развиваются в зрелые зиготы.

Слившиеся клетки теряют жгутики, а затем и оболочки, и молодые зиготы оказываются окруженными первичной мембраной – плазмалеммой. Образование этой мембраны происходит до слияния ядер гамет при освещении 5–6 тысяч люкс. Освещение необходимо в первые 18–24 часа, так как только в условиях освещения начинает формироваться настоящая оболочка зиготы.

Одновременно с образованием оболочки зиготы идет ее рост, в результате которого зигота оказывается покрыта плотной оболочкой. Она обладает грубой ретикулярной

структурой и имеет целлюлозную перегородку. Толщина и плотность оболочки зависит от интенсивности освещения и ее продолжительности в процессе созревания зиготы.



Рис. 3. Продольный срез вегетативной клетки исходного дикого типа К(+). *я* – ядро, *яо* – ядрышко, *ох* – оболочка хлоропласта, *n* – пиреноид, *к* – крахмал, *m* – тилакоиды, *м* – митохондрии, *аг* – аппарат Гольджи, *в* – вакуоль, *пл* – плазмалемма, *кс* –

клеточная стенка. Увеличение: 22000×.

К моменту созревания зигота достигает 18–25 мкм в диаметре, что примерно вдвое больше ее исходного диаметра и диаметра одной вегетативной клетки. Продолжительность периода созревания зависит от температуры. При 25°С оно происходит в течение шести суток. Причем, только в первые 18–24 часа они нуждаются в освещении, а затем зиготы созревают в темноте. По окончании периода созревания зиготы могут быть вызваны к прорастанию путем переноса их на свежую агаризованную среду и помещением на свет. Время, необходимое для их прорастания, варьирует от 15 до 24 часов и зависит, в частности, от генотипа зигот. При прорастании оболочка зиготы разрывается, и освобождаются четыре или более, часто восемь, подвижных гаплоидных зооспор. Эти клетки представляют собой продукты мейоза и одного митотического деления и способны к неограниченному вегетативному росту.

Таким образом, жизненный цикл хламидомонады (*Chlamydomonas reinhardtii*) включает в себя два типа клеточных делений: бесполое – вегетативный или митотический клеточный цикл – и половое – зиготный или мейотический клеточный цикл (рис. 2). Мы детально исследовали ключевые периоды обоих клеточных делений, отмеченные на схеме двумя стрелками.

Вегетативные клетки гаплоидны. Они могут неограниченное число циклов размножаться митотически. Электронно-микроскопические исследования вегетативных клеток показали (рис. 3), что каждая особь содержит ядро и один чашеобразный хлоропласт, в центре которого расположен один пиреноид, а в верхней трети, непосредственно под оболочкой пластиды, – светочувствительный органоид – глазное пятно. Кроме того, вблизи пиреноида локализуется ДНК-содержащая область хлоропласта (рис. 4).



Рис. 4. Фрагмент хлоропласта вегетативной клетки, содержащей помимо пиреноида и глазного пятна ДНК-содержащую область. Увеличение: 40000×.

В верхней трети клетки, обычно между ядром и хлоропластом, расположен аппарат Гольджи. По всей цитоплазме между оболочками клетки и хлоропласта разбросаны митохондрии (Тагеева и др., 1971; Ладыгин и др., 1972, 1973, 1978; Sager, Palade, 1957; Ohad et al., 1967). Цитологические исследования митоза и мейоза показали, что поведение хромосом у *Chlamydomonas* принципиально не отличается от поведения их у высших растений (Schaechter, Delamater, 1955; Levine, Folsome, 1959). Тип репликации ДНК в митозе полуконсервативный (Sueoka, 1960).

5. Условия культивирования Chlamydomonas reinhardtii и состав сред

Морфологические и физиологические признаки. Клетки Chlamydomonas reinhardtii имеют овальную или шаровидную форму 7–15 мкм в диаметре. При выращивании на средах с 2% агар-агара клетки дикого типа К(+) образуют колонии зеленого цвета диаметром 3–5 мм через 10–14 суток роста на свету. В жидкой ацетатной среде (минеральная среда с 0.2% ацетата натрия) через 2–3 суток роста суспензия клеток может достигать плотности 30–40 млн клеток на мл. В жидкой минеральной среде (без ацетата натрия) клетки растут медленнее только автотрофно за счет фотосинтеза и максимальной плотности 15–20 млн клеток на мл достигают на 4–5 сутки роста. При добавлении 0.2% ацетата натрия скорость клеточных делений восстанавливается до характерной для миксотрофного роста на ацетатной среде.

Отношение к органическим источникам углерода. Сахара в качестве источника углерода не используются. Клетки *Chlamydomonas reinhardtii* используют в качестве органического источника углерода уксусную кислоту или ее соль – ацетат натрия.

Отношения к источникам азота. Эта водоросль хорошо усваивает хлористый аммоний, но плохо – азотнокислый аммоний.

Условия культивирования. Для выращивания использовали простую и дешевую минеральную среду следующего состава, г/л:

0.40
0.10
0.05
0.72
0.36
1 мл/л
0.50
2.00
1.00

Лимоннокислый трехзамещенный натрий (Na₃C₆H₅O₇×5.5H₂O – цитрат натрия) добавляли для предотвращения преципитации солей при автоклавировании в режиме 1.0 - 1.2 атм. в течение 40 мин.

Натрий уксуснокислый ((CH₃COONa)×3H₂O – ацетат натрия) использовали в качестве органического источника углерода в условиях гетеротрофного и миксотрофного роста.

Дрожжевой экстракт брали в качестве источника витаминов только при выращивании витамин-дефицитных мутантов.

Для удобства и быстрого приготовления питательных сред, мы использовали исходные запасные растворы основных солей следующего состава (Ладыгин, 1970, 2014):

1. Раствор Бейеринка, г/л:

NH ₄ Cl	8.00
$MgSO_4 \times 7H_2O$	2.00
$CaCl_2 \times 2H_2O$ (CaCl_2)	1.02 (0.77)
Дистиллированная H ₂ O	до 1 л

2. Фосфатный буфер, г/л:

K ₂ HPO ₄	14.34
KH ₂ PO ₄	7.26
Дистиллированная H ₂ O	до 1 л

3. *Цитрат натрия, г/л*: 50.0

4. Ацетат натрия, г/л: 200.0

5. Смесь микроэлементов, $г/мл H_2O$ (Hutner et al., 1950)

ЭДТА динатриевая соль	50.0 г/250 мл
$ZnSO_4 \times 7H_2O$	22.0 г/100 мл
H ₃ BO ₃	11.4 г/200 мл
$MnCl_2 \times 4H_2O$	5.06 г/50 мл
FeSO ₄ ×7H ₂ O	4.99 г/50 мл
$CoCl_2 \times 6H_2O$	1.61 г/50 мл
$CuSO_4 \times 5H_2O$	1.57 г/50 мл
$(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \times 4H_2 O_{11} O_{11} O_{12} $	1.10 г/50 мл

Приготовление запасного раствора микроэлементов (Hutner et al., 1950).

Навеску каждого реактива растворяли в указанном объеме дистиллированной воды отдельно. Затем все растворы сливали вместе, последним добавляли ЭДТА. Полученный раствор пурпурного (или фиолетового) цвета кипятили до приобретения им светло-зеленого окрашивания и полного растворения ЭДТА.

Затем раствор слегка охлаждали, но не ниже 70°С (в противном случае ЭДТА будет выпадать в осадок), доводили рН до 6.5–6.8 раствором 20% КОН (нельзя использовать NaOH и делать раствор более щелочным, так как нельзя снижать рН с помощью кислоты).

Полученный раствор доводили до объема 1000 мл дистиллированной водой, закрывали ватной пробкой и настаивали при комнатной температуре в течение 1–2 недель, до приобретения раствором пурпурного (или фиолетового) окрашивания. Осевший краснобурый осадок отфильтровывали через фильтровальную или хроматографическую бумагу №1. Полученный раствор микроэлементов хранили длительное время в холодильнике при пониженной температуре (4–6°С). Запасной раствор микроэлементов можно использовать в течение нескольких лет.

Приготовление минеральной среды, мл/л:

Дистиллированная H₂O..... 890

Раствор Бейеринка	50
Фосфатный буфер	50
Раствор микроэлементов	1
Цитрат натрия	10

Для приготовления агаризованных сред в полученные растворы добавляли 15–20 г/л агар-агара.

Приготовление ацетатной среды, мл/л:

Дистиллированная H ₂ O	880
Раствор Бейеринка	50
Фосфатный буфер	50
Раствор микроэлементов	1
Цитрат натрия	10
Ацетат натрия	10

Для приготовления *дрожжевой среды* использовали 1 л ацетатной среды и добавляли 1 г дрожжевого экстракта.

Для приготовления агаризованных сред в полученные растворы питательных сред добавляли 15–20 г/л агар-агара.

Среды стерилизовали в автоклаве при 1–1.2 атм в течение 40 мин. Затем их слегка охлаждали (до около 70°С) и разливали в пробирки или на чашки Петри.

Наращивание биомассы. Водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* культивировали на агаризованной среде при температуре 23–25°С, а в жидких средах – 27–35°С. Оптимальная освещенность составляла на средах с агар-агаром 3–5 тысяч люкс, а в жидких средах – 13–15 тысяч люкс. В процессе культивирования pH среды изменялась в пределах 6.8–7.2 (оптимальные пределы для роста). Эти изменения pH мы наблюдали на агаризованных средах в течение 10–14 суток роста на непрерывном свету, а в жидких средах – в течение 4–6 суток. При культивировании в жидкой ацетатной среде выход сырой биомассы составлял 5–10 г/л. Для увеличения выхода биомассы до 20 г/л мы увеличивали в 5 раз концентрацию солей, в результате чего время клеточных делений сокращалось с 10–12 часов до 6 часов на 1 споруляцию, а выход биомассы удваивался. При этом содержание хлорофиллов, каротинов и ксантофиллов в расчете на клетку практически не изменялось.

При непрерывном выращивании в искусственных условиях в различные времена года существенных изменений в культурах не наблюдали.

Список литературы

- Ладыгин В.Г. Пигментные мутанты Chlamydomonas reinhardtii, индуцированные нитрозоэтилмочевиной и ультрафиолетовыми лучами // Генетика. 1970. Т. 6. № 3. С. 47–50.
- *Ладыгин В.Г.* Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas* Института почвоведения и фотосинтеза Академии наук СССР (ИПФС АН СССР) // В сб.: Коллекции микроводорослей в СССР (списки культур). Изд-во НЦБИ АН СССР г. Пущино. 1988. С. 104–122.
- *Ладыгин В.Г.* Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas* Института почвоведения и фотосинтеза АН СССР, г. Пущино // В сб.: Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. Изд-во РАН. Москва. 1991. С. 152–173.

- Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиол. растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741–762.
- Ладыгин В.Г. Биогенез и возможности изменения состава каротиноидов глазного пятна у мутантов микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Микробиология. 2014. Т. 83. № 2. С. 160–169.
- *Ладыгин В.Г.* Получение и физиолого-биохимическая характеристика мутанта C-41 *Chlamydomonas reinhardtii* суперпродуцента ζ-каротина // Прикл. биохим. и микробиол. 2014. Т. 50. № 6. С. 578–586.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А. Развитие ультраструктуры и изменение состава каротинов глазного пятна Chlamydomonas reinhardtii с помощью мутагенеза // Биофизика. 2013. Т. 58. № 6. С. 1005–1012.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А. Ультраструктурная организация и состав каротиноидов глазного пятна у пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 2014. Т. 56. № 1. С. 48–56.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Ультраструктура пластид белого и желтого мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1972. Т. 14. № 12. С. 1455–1460.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1973. Т. 15. № 7. С. 810–817.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Вариабельность в накоплении хлорофилла и структура хлоропластов у дочерних штаммов фенотипически желтого мутанта Ж-4 *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 1978. Т. 20. № 9. С. 998–1004.
- Тагеева С.В., Ладыгин В.Г., Семенова Г.А. Использование пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* для изучения структуры и функциональной активности хлоропластов // Труды симпозиума «Биохимия и биофизика фотосинтеза». Иркутск. 1971. С. 84–93.
- *Harris E.H.* The *Chlamydomonas* sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use // San Diego: Acad. Press. 1989. 780 p.
- Harris E.H. Chlamydomonas as a model organism // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 2001. V. 52. P. 363–406.
- Harris E.H. The Chlamydomonas sourcebook, 2nd ed. // New York: Elsevier. 2009. V. 1. 590 p.
- Hutner S.H., Provasoli L., Schatz A., Haskins C.P. Some approaches to the study of the role metals in the metabolism of microorganisms // Proc. Amer. Philos. Soc. 1950. V. 94. P. 152–159.
- Levine R.P. Genetic dissection of photosynthesis // Science. 1968. V. 162. P. 768–771.
- Levine R.P., Ebersold W.T. The genetics and cytology of Chlamydomonas // Ann. Rev. Microbio1. 1960. V. 14. P. 197–216.
- Levine H.P., Folsome C.E. The nuclear cycle in Chlamydomonas reinhardtii // Zs. Vererbungslehre. 1959. V. 90. P. 215–222.
- *Ohad I., Siekevitz P., Palade G.E.* Biogenes of chlorop1ast membranes. I. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii* Y-1) // J. Ceall Bio1. 1967. V. 35. P. 521–552.
- Sager R. Inheritance in the green alga Chlamydomonas // Genetics. 1955. V. 40. P. 476–489.
- Sager R., Granick S. Nutritional studies with Chlamydomonas reinhardtii // Ann. New-York. Acad. Sci. USA. 1953. V. 56. P. 831–838.
- Sager R., Palade G.E. Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green cell // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1957. V. 3. № 3. P. 463–487.
- Schaechter M., DeLamater E.D. Mitosis of Chlamydomonas // Amer. J. Bot. 1955. V. 42. P. 417–422.
- Smith G.M. The fresh water algae of the USA // New–York–London. 1950.
- Sueoka N. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1960. V. 46. P. 83–91.

ГЛАВА II

НАСЛЕДОВАНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ВЕГЕТАТИВНОМ (МИТОТИЧЕСКОМ) РАЗМНОЖЕНИИ *СНLАМУДОМОNAS REINHARDTII*

Цитологические и биохимические исследования (Levine, Ebersold, 1960; Kates et al., 1968; Fowke, 1969; Lovlie, Braten, 1970) выявили многие стороны поведения хромосом и ДНК в процессе митотического и мейотического делений у зеленых водорослей, которые принципиально не отличаются от таковых у высших растений. Однако поведение хлоропластов в процессе обоих типов клеточных делений изучено мало. Исследование этого вопроса стало особенно важным после того, как стало известно о наличии ДНК, РНК, рибосом и ферментных систем в хлоропластах, делающих возможным существование автономной генетической системы в пластидах (Gibor, 1965; Surzycki, 1969). Наиболее вероятным местом локализации автономной генетической системы хлоропласта (пластома) являются области, в которых сосредоточены молекулы ДНК. Эти участки пластид выглядят либо в виде сферических плотных тел (Goodenough, 1970), либо в виде полиморфных фибрилл-содержащих областей (Ris, Plaut, 1962; Sprey, 1968).

Поскольку хлоропласты водорослей, в частности хлореллы и хламидомонады, размножаются делением, то и пластом материнской клетки должен распределяться в дочерние клетки. Важно отметить, что у хламидомонады пластиды дочерних клеток образуются как в случае митотического, так и в случае мейотического деления клетки из одного хлоропласта.

В первом случае – из хлоропласта гаплоидной вегетативной клетки, а во втором – из хлоропласта диплоидной зиготы. Хлоропласт зиготы образуется от слияния двух пластид гамет (Cavalier-Smith, 1970) и содержит ДНК пластид и материнской, и отцовской клетки (Chiang, 1968). Некоторые исследователи считают, что ДНК отцовской пластиды лизируется в процессе созревания зиготы (Sager, Lane, 1969). Факт различной природы хлоропластов вегетативной клетки и зиготы представляется весьма важным и ставит вопрос о необходимости исследования формирования хлоропластов и его компонентов в процессе клеточных делений в митозе и мейозе.

Исследования деления хлоропластов водорослей в процессе митотического деления клетки немногочисленны и имеют ряд противоречивых данных. Так изучение клеточного деления хламидомонады (Goodenough, 1970) показало, что делится не только хлоропласт, но и его структурный компонент – пиреноид. Однако результаты исследования деления хлоропласта сценедесмуса позволили заключить, что пиреноид в дочерних клетках может формироваться *de novo* (Bisalputra, Weier, 1964; Brown, 1967). Задача настоящей работы состояла в том, чтобы изучить деление хлоропласта и формирование его структурных компонентов в течение митотического клеточного деления у одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*.

1. Наследственная непрерывность хлоропласта при вегетативном размножении

Вегетативные клетки гаплоидны. Они могут неограниченное число циклов размножаться митотически. Электронно-микроскопические исследования вегетативных клеток показали (рис. 1), что каждая особь содержит ядро и один чашеобразный хлоропласт, в центре которого расположен один пиреноид, а в верхней трети, непосредственно под оболочкой пластиды, – светочувствительный органоид – глазное пятно.



Рис. 1. Структура вегетативной клетки *Chlamydomonas reinhardtii*. Увел.: 20000×. *кс* – клеточная стенка, *я* – ядро, *яо* – ядрышко, *ох* – оболочка хлоропласта, *n* – пиреноид, *к* – крахмал, *m* – тилакоиды.

В верхней трети клетки, обычно между ядром и хлоропластом, расположен аппарат Гольджи. По всей цитоплазме между оболочками клетки и хлоропласта разбросаны митохондрии (Тагеева и др., 1971; Ладыгин и др., 1972, 1973; Sager, Palade, 1957; Ohad et al., 1967). Цитологические исследования митоза и мейоза показали, что поведение хромосом у *Chlamydomonas* принципиально не отличается от поведения их у высших растений (Schaechter, Delamater, 1955; Levine, Folsome, 1959). Тип репликации ДНК в митозе полуконсервативный (Sueoka, 1960).

Анализ полученных нами данных по вегетативным клеткам показал, что еще до начала деления ядра, цитоплазмы и хлоропласта имеется некоторое число клеток, которые содержат два пиреноида (рис. 2). Подобный факт отмечался и у других водорослей (Brown, 1967).



Рис. 2. Структура вегетативной клетки в начале митотического деления ядра и образование двух пиреноидов. Увеличение: 20000×.

кс – клеточная стенка, *пл* – плазмалемма, *ох* – оболочка хлоропласта, *n*-1 и *n*-2– пиреноиды, *m* – тилакоиды, *гn* – глазное пятно, *я* – ядро, *яо* – ядрышко.

Является ли обязательным деление пиреноида до начала деления хлоропласта или нет, пока сказать трудно, так как у этого же штамма водоросли ранее наблюдали боковое вытягивание и деление пиреноида в процессе деления хлоропласта (Goodenough, 1970). У ряда водорослей отмечались разрушение пиреноида в процессе митотического деления

клетки и формирование его *de novo* в дочерних клетках (Bisalputra, Weier, 1964; Brown, 1967). Трудность трактовки по электронно-микроскопическим фотографиям заключается в том, что оцениваются статические картины; поэтому, как полагают некоторые исследователи (Goodenough, 1970), за начало формирования нового пиреноида могут быть приняты ДНК-содержащие области, которые по своей плотности и гранулярности иногда бывают близки к плотности пиреноида, но они никогда не бывают пронизаны трубочками, характерными для пиреноида.

Деление клетки *Chlamydomonas* начинается с митотического деления ядра, что приводит к формированию двух ядер в одной клетке (рис. 3).



Рис. 3. Срез вегетативной клетки, в которой закончилось митотическое деление и образовалось два ядра, два пиреноида и начинается деление пока еще одного хлоропласта (показано *стрелками*). Увеличение: 20000×.

я-1, я-2 – два ядра, *ох* – оболочка хлоропласта, *n-1*, *n-2* – два пиреноида, *к* – крахмал.



Рис. 4. После митотического деления и образования двух ядер начинается деление глазного пятна (*a*) и пиреноида внутри хлоропласта вегетативной клетки (*б*). После образования двух пиреноидов и двух глазных пятен, происходит деление хлоропласта (показано *стрелкой*). *я-1, я-2* – два ядра, *гп-1, гп-2* – два глазных пятна, *кс* – клеточная стенка, *м* – митохондрия, *ох* – оболочка хлоропласта, *n-1, n-2* – два пиреноида, *к* – крахмал, *m* – тилакоиды, *аг* – аппарат Гольджи. Увеличение: 60000×. До тех пор, пока деление ядра не закончено и не начался цитокинез, никаких доказательств деления хлоропласта мы не наблюдали. Однако видно, что обнаруживаемый на этом рисунке один пиреноид меньших размеров, чем обычно наблюдаемый в вегетативных клетках, необычное расположение и размеры пиреноида не исключают возможности того, что он уже претерпел деление. Такое предположение было подтверждено дальнейшими исследованиями. После образования в вегетативной клетке двух ядер, мы наблюдали формирование в материнской клетке двух органелл глазного пятна (рис. 4, a) и четкое разделение пиреноида внутри хлоропласта с образованием двух дочерних пиреноидов (рис. 4, δ).



Рис. 5. Срез делящейся вегетативной клетки, в которой закончилось митотическое деление с образованием двух ядер и разделился хлоропласт на два полухлоропласта. Увеличение: 20000×.

я-1, я-2 – два ядра, *ох* – оболочка хлоропласта, *n-1, n-2* – два пиреноида, *к* – крахмал, *nx-1, nx-2* – два полухлоропласта. *Стрелками* показано место разделившегося хлоропласта на два полухлоропласта и начало деление клетки с образованием клеточной перегородки (*кn*).

Как только заканчивается митоз, начинается цитокинез. Ранее было показано (Johnson, Porter, 1968), что в течение клеточного деления вся цитоплазма, включая хлоропласт, поворачивается приблизительно на 90° относительно первоначальной клеточной

оси. Образование перегородки начинается от переднего края клетки в области расположения базальных тел жгутиков (рис. 5). Она рассекает клетку центростремительно пополам, разделяя в первую очередь область локализации ядер. По обе стороны перегородки формируются параллельно расположенные микротрубочки, которые пронизывают клетку до противоположной стороны (Goodenough, 1970). Центростремительное формирование перегородки предполагает две возможности деления хлоропласта: пассивное рассечение его пополам перегородкой и предварительное деление хлоропласта, а затем разделение его перегородкой.

На основании полученных нами данных можно предположить, что деление хлоропласта не является пассивным процессом, потому что задолго до того момента, когда перегородка должна разделить хлоропласт пополам, он делится путем сильного сжатия сверху и снизу в месте деления. Нельзя исключить, что в тех случаях, когда к моменту деления хлоропласта деление пиреноида не завершилось, они происходят одновременно (рис. 5), подобно тому, как это было описано ранее (Goodenough, 1970). После образования двух пиреноидов и двух глазных пятен, начинается деление хлоропласта (рис. 4, *a*, показано *стрелкой*).



Рис. 6. Образование двух дочерних вегетативных клеток, каждая из которых содержит новое ядро и полухлоропласт материнской клетки с пиреноидом и зернами крахмала, а также митохондрии и аппарат Гольджи. Увеличение: 18000×.

я-1, *я*-2 – ядра дочерних клеток, *опх* – оболочка полухлоропласта, *n*-1, *n*-2 – пиреноиды, *к* – крахмал, *аг* – аппарат Гольджи, *м* – митохондрия, *кс* – клеточная стенка материнской клетки. *Стрелками* показан участок деления материнской клетки с образованием оболочек дочерних клеток.



Рис. 7. Деление материнской клетки с образованием двух дочерних клеток, каждая из которых содержит собственное ядро, хлоропласт, пиреноид, глазное пятно и митохондрии. Увеличение: 25000×.

я-1, я-2 – ядра дочерних клеток, *ох* – оболочка хлоропласта, *n-1, n-2* – пиреноиды, *гn-1, гn-2* – глазные пятна, *кс* – клеточная стенка материнской клетки. *Стрелками* показан участок деления материнской клетки с образованием новых оболочек дочерних клеток.

Цитокинез завершается формированием двух дочерних клеток, каждая из которых содержит ядро, полухлоропласт с пиреноидом и глазным пятном, а также другие органеллы и клеточные структуры (рис. 6, 7).

Рост образовавшихся полухлоропластов имеет место в дочерних клетках до формирования новых чашеобразных хлоропластов. Каждая дочерняя клетка, помимо ядра, хлоропласта и митохондрий, содержит структуры аппарата Гольджи, расположенные по обе стороны от ядра. Нельзя исключить, что в процессе деления клетки происходит и деление аппарата Гольджи. Подобное явление было обнаружено у водоросли *Ulva mutabilis* (Lovlie, Braten, 1968, 1970). Наблюдаемое иногда многократное увеличение числа структур аппарата Гольджи может подтверждать высказанное нами предположение (Ладыгин и др., 1974).

Наличие большого числа митохондрий не позволяет проследить за их поведением в процессе митотического деления клетки. Формирование клеточной оболочки дочерних клеток *Chlamydomonas reinhardtii* в точности совпадает с ранее описанным способом формирования ее у клеток *Chlorella* (Griffiths, Griffiths, 1969).

На основании изучения содержания нуклеиновых кислот *Chlamydomonas* и *Chlorella* было установлено, что ядро в процессе митоза претерпевает две–три последовательные репликации ДНК, что приводит к временной политении, а затем происходят два–три последовательных митоза и формирование не двух, как наблюдается в жидкой среде, а сразу четырех или восьми клеток, обычно наблюдаемых на агаризованной среде (Sueoka, 1960). Поэтому при культивировании на агаризованных средах с помощью светового микроскопа можно легко наблюдать, что после первого клеточного деления образуются микроколонии, состоящие из четырех или восьми дочерних клеток *Chlamydomonas reinhardtii*.

В делящихся хлоропластах часто наблюдали наличие одного или двух округлых "плотных тел" (рис. 8), в которых, как полагают (Goodenough, 1970), локализована ДНК хлоропласта. Впервые ДНК-содержащие участки хлоропласта у хламидомонады описали Рис и Плаут (Ris, Plaut, 1962). В вегетативных клетках эти участки локализованы вблизи пиреноида (Семенова и др., 1978). Причем в наших исследованиях мы не наблюдали больше одной, обычно рыхлой ДНК-содержащей области хлоропласта рядом с пиреноидом. В тех случаях, когда удавалось обнаружить два плотных тела, что весьма характерно для делящихся хлоропластов, они, как правило, были расположены в противоположных частях хлоропласта, в верхней его части, а не в центральной, где располагается пиреноид (Ладыгин и др., 1974).

По плотности составляющего гранулярного материала эти тела близки к плотности пиреноида, но имеют гораздо меньшие размеры и не окружены крахмальными глобулами (Ладыгин и др., 1974). Подобные структуры в делящихся хлоропластах хламидомонады отмечались ранее (Goodenough, 1970). Было показано, что наличие плотных тел корелирует с поведением ДНК-хлоропластов. Отмеченные особенности возможной различной локализации ДНК-содержащих участков хлоропласта наводят на мысль о том, что для вегетативных клеток характерно наличие одной довольно рыхлой зоны ДНК-содержащих фибрилл, локализованной около пиреноида. А у митотически делящихся клеток к моменту деления хлоропласта могут формироваться две плотных ДНК-содержащих структуры и, подобно пиреноиду и глазному пятну, распределяться по одному в дочерние клетки, объясняя, таким образом, сохранение пластома в ряду клеточных делений. Факты различной локализации ДНК-содержащих областей хлоропласта и изменение их плотности отмечали и другие исследователи (Bisalputra, Bisalputra, 1969; Goodenough, 1970). Принципиальная возможность деления ДНК-содержащих структур была показана методом серийных срезов для хлоропластов ячменя (Sprey, 1968). Химический состав плотных тел пока неизвестен. Однако методом меченых атомов было установлено, что эти области однозначно содержат ДНК (Семенова и др., 1978).



Рис. 8. Срез делящейся вегетативной клетки, показывающий наличие двух плотных тел в хлоропласте (*a*), и фрагмент пластиды с плотным телом гранулярной структуры (δ). Увеличение: *a* – 18000×, δ – 60000×.

я – ядро, *ох* – оболочка хлоропласта, *nm*-1, *nm*-2 – два плотных тела, *к* – крахмал, *nm* – плотное тело.

Таким образом, исследования деления хлоропласта в процессе митотических делений клетки показали, что у ряда водорослей хлоропласт делится независимо от деления клетки (Green, 1964; Manton, 1964, 1966). Однако, у зеленых водорослей *Chlorella*, *Ulva* и *Chlamydomonas* деление хлоропласта проходит одновременно с делением клетки (Ладыгин и др., 1974, 1975; Lovlie, Braten, 1968; Goodenough, 1970). При этом деление хлоропласта не является, по-видимому, пассивным процессом, а строго ориентированным и скоординированным при митотическом делении клетки (рис. 9).



Рис. 9. Схема деления ядра и хлоропласта при вегетативном размножении.

1 – взрослая вегетативная клетка, 2 – начало митотического деления ядра и деление пиреноида в хлоропласте, 3–5 – цитокинез и формирование двух полухлоропластов, 6 и 7 – соответственно образование и выход зооспор.

Деление вегетативной клетки начинается с митотического деления ядра. Деление пиреноида, которое часто имеет место до момента формирования двух ядер, может указывать на то, что уже первые этапы митотического деления ядра служат сигналом для подготовки к делению внутренних компонентов хлоропласта – пиреноида и глазного пятна.

Хлоропласт начинает делиться только тогда, когда деление ядер уже завершено. Вопрос о том, что служит сигналом к началу деления хлоропласта в митозе (удвоение гена, детерминирующего число пластид в клетке, или факт формирования двух ядер), остается окончательно нерешенным. Можно полагать, что деление хлоропластов, наблюдаемое после деления ядра в процессе митоза, обусловлено удвоением генома, а не процессами, связанными с формированием двух ядер. Доказательством этого служит увеличение числа хлоропластов при полиплоидии, когда число хлоропластов увеличивается кратно увеличению числа геномов, в то время как число ядер и клеток остается неизменным, увеличиваясь лишь в объеме (Ладыгин, 1965). Этот факт подтверждает мнение о том, что число хлоропластов является генетически детерминированным признаком и контролируется ядром клетки. Размеры самих хлоропластов, оставаясь постоянными при изменении плоидности, по-видимому, детерминируются автономной генетической системой самой пластиды, т. е. пластомом.

Деление материнского хлоропласта завершается образованием двух дочерних полухлоропластов, в каждый из которых распределяются все составляющие материнскую пластиду структуры – пиреноид и глазное пятно. Они сохраняются в процессе клеточных делений, размножаясь делением раньше или одновременно с делением хлоропласта. Никаких доказательств разрушения пиреноида, подобно тому, как это отмечалось при делении пластид у других водорослей (Brown, 1967), нами обнаружено не было.

Для делящихся хлоропластов характерно наличие плотных тел, поведение которых корелирует с изменением содержания ДНК хлоропластов в митозе (Sueoka, 1960; Goodenough, 1970). Возможно, что именно в плотных телах сосредоточено ДНК хлоропласта, которая распределяется в процессе вегетативного размножения клеток. Изменение места локализации, гранулярности и плотности предполагаемых ДНК-содержащих областей может указывать на наличие механизмов, обеспечивающих функционирование, архитектуру и распределение пластома в процессе митотического деления клеток.

В первые часы жизни зооспор каждый из полухлоропластов дочерних клеток развивается до нормально сформированной пластиды, характерной для вегетативных клеток. Таким образом, способность хлоропласта изучаемой зеленой водоросли размножаться делением одновременно с делением клетки обеспечивает ему наследственную непрерывность в ряду клеточных поколений при бесполом размножении.

Таким образом, электронно-микроскопическое исследование деления хлоропласта одноклеточной зеленой водоросли Chlamydomonas reinhardtii в процессе митотического деления клетки показало, что, до тех пор, пока деление ядра не завершилось, деление хлоропласта не наблюдается. Пиреноид, локализованный в центре пластиды, и глазное пятно могут делиться до начала деления хлоропласта. Однако нами были отмечены случаи, когда пиреноид делился одновременно с делением хлоропласта, предварительно увеличиваясь в размерах и удлиняясь в сторону, перпендикулярную образующейся клеточной перегородке. Никаких доказательств разрушения пиреноида или образования de novo нами обнаружено не было (Ладыгин и др., 1974). Показано изменение плотности и месторасположения предполагаемых ДНК-содержащих областей пластиды, что может быть связано с функционированием и распределением пластома. Тот факт, что хлоропласт делится путем сжатия и разделения его центральной части задолго до того момента, когда клеточная наличие механизма, сформируется в этом участке, указывает на перегородка обеспечивающего четкое деление хлоропласта пополам и распределение полухлоропластов в дочерние клетки также, как и распределение ядер. Сигналом к делению материнского хлоропласта в вегетативных клетках до образования двух дочерних пластид служит предварительное удвоение генома путем митотического деления ядра и формирование двух ядер молодых зооспор. Факт ядерного контроля числа хлоропластов был хорошо установлен при исследовании полиплоидных растений гречихи. Причем, такая закономерность четко и однозначно была показана на трех различных видах гречихи Fagopyrum sagittatum Gelib., Fagopyrum emarginatum Roth. и Fagopyrum tataricum Gaertn. (Ладыгин, 1965). Удвоение генома у тетраплоидных растений сопровождалось кратным увеличением числа хлоропластов в два раза по сравнению с исходными диплоидными растениями. Ядерным геномом контролируется также процесс биосинтеза хлорофилла. Однако размеры самих хлоропластов и белковых компонентов реакционных центров фотосистем и электроннотранспортной цепи фотосинтеза контролируются генами хлоропластов (пластомом) (Ладыгин 1965, 1998).

Список литературы

- Ладыгин В.Г. Замыкающие клетки устьиц, пластиды и пыльцевые зерна диплоидных и тетраплоидных гречих // Генетика. 1965. Т. 1. № 6. С. 127–131.
- Ладыгин В.Г. Пигментные мутанты Chlamydomonas reinhardtii, индуцированные нитрозоэтилмочевиной и ультрафиолетовыми лучами // Генетика. 1970. Т. 6. № 3. С. 42–50.
- Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиол. растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741–762.
- Ладыгин В.Г., Буриков Э.А. Действие ультрафиолетового излучения на асинхронную культуру и на разные стадии вегетативного клеточного цикла синхронной культуры *Chlamydomonas reinhardtii* // Радиобиология. 1972. Т. 12. № 5. С. 723–729.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Ультраструктура пластид белого и желтого мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1972. Т. 14. № 12. С. 1455–1460.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1973. Т. 15. № 7. С. 810–817.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Непрерывность хлоропласта Chlamydomonas reinhardtii в течение жизненного цикла. 1. Деление хлоропласта при вегетативном размножении // Цитология. 1974. Т. 16. С. 1203–1209.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Непрерывность хлоропласта Chlamydomonas reinhardtii в течение жизненного цикла. 2. Формирование хлоропласта зиготы и пластид зооспор в процессе полового размножения // Цитология. 1975. Т. 17. № 2. С. 115–121.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г., Тагеева С.В. Конденсация ДНК хлоропластов в зиготах *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 1978. Т. 20. № 11. С. 1320–1322.
- *Тагеева С.В., Ладыгин В.Г., Семенова Г.А.* Использование пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* для изучения структуры и функциональной активности хлоропластов // Труды симпозиума "Биохимия и биофизика фотосинтеза". Иркутск. 1971. С. 84–93.
- *Bisalputra T., Bisalputra A.* The ultrastructure of chloroplast of a brown alga *Sphacelaria* sp. I. Plastid DNA configuration the chloroplast genofore // J. Ultrastr. Res. 1969. V. 28. P. 151–170.
- Bisalputra T., Weier T.E. The pyrenoid of Scenedesmus guadricauda // Amer. J. Bot. 1964. V. 51. P. 881–892.
- Brown R.M. The pyrenoid: its structure, distribution and function // J. Phycol. 1967. V. 3. P. 5–7.
- Cavalier-Smith T. Electron-microscopic evidence for chloroplast fusion in zygotes of Chlamydomonas reinhardtii // Nature. 1970. V. 228. P. 333-335.
- Chiang K.S. Physical conservation of parental cytoplasmic DNA though meiosis in Chlamydomonas reinhardtii // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1968. V. 60. P. 194–200.
- *Fowke L.C.* Cell division in *Oedogonium*. 1. Mitosis, cytokinesis and cell elongation // Austral. J. Biol. Sci. 1969. V. 22. P. 857–894.
- Gibor A. Chloroplast heredity and nucleic acid // Amer. Natur. 1965. V. 99. P. 229–239.
- Goodenough U.W. Chloroplast division and pyrenoid formation in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Phycol. 1970. V. 6. P. 1–6.
- *Green P.B.* Cinematic observations on the growth and division of Chloroplasts in *Nitella* // Amer. J. Bot. 1964. V. 51. P. 334–342.
- Griffiths D.A., Griffiths D.U. The fine structure of autotrophyc and heterotrophyc cells of Chlorealla vulgaris (Emerson strain.) // P1ant Cell Physiol. 1969. V. 10. P. 11–19.
- Johnson U.G., Porter K.R. Fine structure of cell divison in Chlamydomonas reinhardtii. Basal bodies and microtubules // J. Cell Biol. 1968. V. 38. P. 403–425.

- *Kates J.H., Chiang K.S., Jones R.F.* Studies on DNA replication during synchronized vegetative growth and gametic differentiation in *Chlamydomonas reinhardtii* // Exper. Cell Res. 1968. V. 49. P. 121–135.
- *Levine H.P., Ebersold W.T.* The genetics and cytology of *Chlamydomonas* // Ann. Rev. Microbiol. 1960. V. 14. P. 197–216.
- *Levine H.P., Folsome C.E.* The nuclear cycle in *Chlamydomonas reinhardtii* // Zs. Vererbungslehre. 1959. V. 90. P. 215–222.
- Lovlie A., Braten T. On the division of cytoplasm and chloroplast in the multicellular green alga Ulva mutabilis // Foyn. Exper. Cell Res. 1968. V. 51. P. 211–220.
- Lovlie A., Braten T. On mitosis in the multicellular alga Ulva mutabilis // Foyn. J. Cell Sci. 1970. V.
 6. P. 109–129.
- Manton I. Observations with the electron microscope on the division cycle Dinoflagellate *Prymnesium parvum* Carter // J. Roy. Microsc. Soc. 1964. V. 83. P. 317–325.
- Manton I. Further observations on the fine structure of *Chrysochrmulina chiton* with special reference to the pyrenoid // J. Ceall Sci. 1966. V. 1. P. 187–192.
- *Ohad I., Siekevitz P., Palade G.E.* Biogenes of chloroplast membranes. I. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii* Y-1) // J. Ceall Biol. 1967. V. 35. P. 521–552.
- *Reynolds E.S.* The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy // J. Cell Biol. 1963. V. 17. P. 208–212.
- *Ris H., Plaut W.* Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas* // J. Ceall Biol. 1962. V. 13. P. 383–391.
- Sager R., Lane D. Replication of chloroplast DNA in zygotes of *Chlamydomonas* // Federat. Proc. 1969. V. 28. P. 347–354.
- Sager H., Palade G.E. Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green ceall // J. Biophys. Blochem. Cytol. 1957. V. 3. P. 463–487.
- Schaechter M., DeLamater E.D. Mitosis of Chlamydomonas // Amer. J. Bot. 1955. V. 42. P. 417-422.
- *Sprey B.* Zur Verhalten DNS-haltiger Areale des Plastidenstromas bei der Plastidenteilung // Planta. 1968. V. 78. P. 115–133.
- Sueoka N. Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1960. V. 46. P. 83–91.
- Surzyck I.S.J. Genetic functions of the chloroplast of Chlamydomonas reinhardtii: effect of rifampicin on chloroplast DNA-dependent RNA-polymerase // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1969. V. 63. P. 1327–1334.

ГЛАВА III

НАСЛЕДОВАНИЕ ХЛОРОПЛАСТОВ ПРИ ПОЛОВОМ (МЕЙОТИЧЕСКОМ) РАЗМНОЖЕНИИ *СНLАМУДОМОNAS REINHARDTII*

Вопрос о поведении хлоропластов в процессе полового размножения у хламидомонады изучен мало и представляется весьма важным, поскольку в результате изогамного полового процесса в зиготу попадают два ядра и две пластиды гамет, из которых формируются одно ядро и один хлоропласт зиготы. Механизм поведения хромосом ядра в мейозе хорошо известен, но процесс формирования одного хлоропласта зиготы из двух хлоропластов гамет остается почти неисследованным. Можно предположить две возможности: либо хлоропласт зиготы формируется из хлоропласта одной гаметы, а хлоропласт второй гаметы лизируется, как это отмечалось у *Zignema* и *Ulva mutabilis* (Granick, 1965; Braten, 1971, 1973; Fjeld, 1971); либо хлоропласт зиготы формируется из двух хлоропластов гамет путем слияния, подобно тому как это показано для *Gonium* (Stein, 1959), *Chlamydomonas* (Ладыгин и др., 1975; Brown et al., 1968; Bastia et al., 1969; Cavalier-Smith, 1970), *Acetobularia* (Crowley, 1966) и *Lamynaria* (Bisalputra et al., 1971).

В первом случае хлоропласт зиготы содержит генетическую информацию пластиды (пластом) одной гаметы, т. е. остается гаплоидным, а во втором случае хлоропласт зиготы объединяет два пластома и может становиться диплоидным. Одни исследователи считают, что у *Chlamydomonas reinhardtii* в процессе созревания зиготы ДНК отцовской клетки лизируется (Sager, Lane, 1969), предполагая тем самым гаплоидное состояние пластома после слияния хлоропластов. Другие исследователи отмечали наличие ДНК хлоропластов обоих родителей в течение всего периода созревания зиготы (Chiang, Sueoka, 1967; Gillham, 1969).

Факт возможности формирования хлоропласта зиготы с гаплоидным или диплоидным пластомом имеет исключительно важное значение для понимания механизма распределения пластома в процессе мейотического формирования зооспор, поскольку может предполагать наличие или отсутствие редукционного деления в распределении ДНК хлоропласта зиготы при формировании хлоропластов зооспор, а также может определять материнский или менделевский тип наследования признаков, обусловленных мутациями хлоропластных генов. Кроме того, характер распределения пластома может отразиться на морфологии деления хлоропласта зиготы в отличие от таковой при митотическом делении вегетативной клетки.

Задача настоящего исследования состояла в том, чтобы изучить поведение хлоропластов в процессе полового размножения от момента слияния гамет до формирования дочерних зооспор. Основное внимание мы уделяли выяснению процесса формирования хлоропласта зиготы из хлоропластов гамет и изменению степени развития его мембранной организации. Была также предпринята попытка проследить за процессом формирования хлоропластов зооспор и установить зависимость поведения ядер и хлоропластов во времени.

1. Наследственная непрерывность хлоропласта при половом размножении

Зооспоры, образующиеся как в процессе митотического, так и мейотического делений, способны неограниченное число генераций размножаться вегетативно. Только в условиях азотного дефицита вегетативные клетки дифференцируются в гаметы. *Chlamydomonas reinhardtii* – гетероталличная водоросль, поэтому для образования зигот необходимо предварительно получить гаметы от (+) и (-) штаммов, отобранных для скрещивания.

Процесс дифференциации вегетативных клеток (рис. 1) в гаметы и формирования зиготы детально описан ранее (Brown et al., 1968; Friedmann et al., 1968).



Рис. 1. Фрагменты хлоропластов вегетативных клеток дикого типа K(+) (*a*) и желтого мутанта \mathcal{K} -4(+) (*б*). *ох* – оболочка хлоропласта, *m* – тилакоид, *cm* – стопка тилакоидов, *n* – пиреноид, *к* – крахмал, *оп* – оболочка пластиды, *un* – цепочка пузырьков, *en* – единичные пузырьки, *ог* – осмиофильные глобулы.



Рис. 2. Фрагменты хлоропластов гамет клеток дикого типа К(–) (*a*) и гамет желтого мутанта Ж-4(+) (*б*). *ох* – оболочка хлоропласта, *ст* – стопка тилакоидов, *n* – пиреноид, *к* – крахмал, *оп* – оболочка пластиды, *цп* – цепочка пузырьков, *en* – единичные пузырьки, *ог* – осмиофильные глобулы.



Рис. 3. Продольные срезы гамет исходного зеленого штамма К(-) (*a*) и желтого мутанта Ж-4(+) (*б*). Увеличение: 20000×. *мг* – мембрана гаметы (плазмалемма), *я* – ядро, *яо* – ядрышко, *ям* – ядерная мембрана, *ох* – оболочка хлоропласта, *хл*-1 – хлоропласт гаметы дикого типа К(-), *хл*-2 – пластида гаметы желтого мутанта Ж-4(+), *n* – пиреноид, *m* – тилакоиды, *к* – крахмал, *en* – единичные пузырьки, *ог* – осмиофильные глобулы, *аг* – аппарат Гольджи, *ж* – жгутик.

Поэтому в нашем сообщении мы специально не рассматриваем структурных изменений хлоропласта в этом процессе. Отметим лишь, что в ходе дифференциации вегетативных клеток в гаметы на безазотной среде наблюдается частичная деструкция ламеллярных структур, обусловленная, вероятно, нарушением белкового синтеза, которое сопровождается вторичным разрушением хлорофилла.

Степень деструкции и потери хлорофилла зависит от длительности роста культуры на безазотной среде. Одновременно в гаметах идет накопление большого количества крахмала (рис. 2), являющегося энергетическим резервом для последующих метаболических процессов, которые имеют место при созревании зиготы. Нарушения белоксинтезирующей системы в гаметах, по-видимому, в результате деградации рибосом (Siersma, Chiang, 1971), приводящее к частичной деструкции мембран, а также к накоплению большого количества крахмала в хлоропластах, отмечались и другими исследователями (Friedmann et al., 1968; Bastia et al., 1969).

Электронно-микроскопическое исследование гамет исходного зеленого штамма и желтого мутанта показало, что характер организации мембран их хлоропластов остается подобным тому, что наблюдается при вегетативном размножении этих штаммов, но отмечается характерная деструкция мембранных компонентов внутренней структуры пластид (Ладыгин и др., 1972–1975).

Хлоропласт гамет исходного зеленого штамма содержит большое число тилакоидов, в отдельных местах они группируются в стопки (рис. 3, *a*). Основная часть матрикса межтилакоидного пространства содержит крахмальные глобулы. Пластиды гамет желтого мутанта (Ж-4) имеют сильно редуцированную мембранную систему и формируют лишь отдельные пузырьки, в редких случаях – цепочки пузырьков (рис. 3, δ). В хлоропласте гамет местами наблюдаются разрушение ламеллярной системы и накопление большого количества крахмала. Все гаметы теряют клеточную стенку и остаются покрытыми тонкой мембраной (рис. 3. *a*, δ), что хорошо проиллюстрировано ранее (Ладыгин и др., 1975; Friedmann et al., 1968).

Процесс слияния гамет противоположных типов спаривания начинается сразу после сливания суспензий гамет и продолжается в течение 20–30 мин. Он легко прослеживается с помощью светового микроскопа. При скрещивании желтого мутанта Ж-4 и типом спаривания плюс и исходного зеленого штамма с типом спаривания минус К(–) через 1 час с момента копуляции гамет формируются молодые зиготы, которые содержат два ядра и два морфологически легко отличимых хлоропласта (рис. 4). Оба хлоропласта сохраняют характерную для пластид гамет внутреннюю структурную организацию и органоиды. В первые часы созревания в молодой зиготе, покрытой тонкой первичной мембраной, можно наблюдать сохранение пиреноидов в каждом из хлоропластов и светочувствительных органоидов – глазных пятен, или стигм.

В 2-часовых зиготах обнаруживаются первые этапы слияния ядер. Никаких признаков слияния хлоропластов в это время не отмечалось. Слияние ядер начинается либо в одном месте (рис. 5), либо в 2–3 местах (рис. 6, *a*).

И только когда слияние ядер почти завершается (рис. 7, *a*), спустя 0.5–1 часа с момента начала слияния, удается заметить первые этапы слияния хлоропластов. Слияние хлоропластов начинается так же, как и слияние ядер, с образования "мембранного мостика" (рис. 7, δ). Формирование диплоидного ядра зиготы завершается слиянием ядрышек (рис. 8, *a*). Область слияния хлоропластов постепенно расширяется (рис. 8, δ).

У 4–5-часовых зигот можно наблюдать формирующийся хлоропласт, который состоит из двух морфологически отличимых половин, образованных пластидами гамет желтого мутанта Ж-4(+) и исходного зеленого штамма К(–). При слиянии в желтой половине хлоропласта начинают формироваться мембранная система.

В зиготе, в которой закончилось образование диплоидного ядра и одного ядрышка, продолжается слияние родительских хлоропластов гамет и образование единого хлоропласта зиготы (рис. 9).


Рис. 4. Молодая зигота (через 1 час после копуляции), содержащая два хлоропласта: x_n -1 -хлоропласт гаметы клеток дикого типа К(–), содержащий большое число тилакоидов и x_n -2 – хлоропласт гаметы желтого мутанта Ж-4(+), не содержащий мембранные системы, а лишь единичные пузырьки. Увеличение: 20000×.

мз – мембрана зиготы, *хл*-*1* – хлоропласт гаметы дикого типа К(–), *хл*-*2* – пластида гаметы желтого мутанта Ж-4(+), *n*-*1*, *n*-*2* – пиреноиды, *ох* – оболочка хлоропласта, *n* – пиреноид, *m* – тилакоиды, *к* – крахмал, *en* – единичные пузырьки.



Рис. 5. Молодая зигота (через 2 часа после копуляции), в которой происходит начало слияния ядер в одном или двух участках ядерной мембраны (показано стрелкой). Никаких слияний хлоропластов зеленого (xn-1) и желтого (xn-2) еще не наблюдается. Увеличение: 40000×.

я-1, я-2 – ядра родительских гамет, *хл-1* – хлоропласт гаметы дикого типа К(–), *хл-2* – хлоропласт гаметы желтого мутанта Ж-4(+), *ох* – оболочка зеленого хлоропласта, *оп* – оболочка пластиды желтого мутанта, *m* – тилакоиды.



Рис. 6. Фрагменты молодой зиготы (через 2.5 часа после копуляции), в которой происходит начало слияния ядер родительских гамет в двух участках ядерной мембраны (показано *стрелками*) (*a*). Два хлоропласта родительских гамет (*хл*-1 и *хл*-2), содержащие глазные пятна (*гл*-1, *гл*-2) и расположенные рядом, начинают сливаться внешними мембранами оболочек хлоропластов (показано *стрелкой*) (*б*). Увеличение: $a - 50000 \times$, $b - 60000 \times$.

я-1, я-2 и *яо-1, яо-2* – ядра и ядрышки родительских гамет, *хл-1* – хлоропласт гаметы дикого типа К(–), *хл-2* – хлоропласт гаметы желтого мутанта Ж-4(+), *ох* – оболочка зеленого хлоропласта, *оп* – оболочка пластиды желтого мутанта, *m* – тилакоиды.



Рис. 7. Период завершения слияния ядер гамет в молодой зиготе (5 часов после копуляции) и начало слияния хлоропластов родительских гамет (*хл*-1, *хл*-2) с образованием мембранного мостика (показано *стрелкой*). Увеличение: *a* – 56000×, *б* – 60000×. *ям* – ядерная мембрана, *яз* – ядро зиготы, *яо*-1, *яо*-2 – ядрышки родительских гамет, *хл*-1, *хл*-2 – хлоропласты родительских гамет, *ох* – оболочка зеленого хлоропласта гаметы дикого типа, *оп* – оболочка пластиды гаметы желтого мутанта.



Рис. 8. Слияние ядрышек родительских гамет в молодой зиготе (5 часов после копуляции) (*a*) и хлоропластов родительских гамет (показано *стрелкой*) и начало формирования тилакоидов в желтом хлоропласте (*хл*-2) в зоне слияния. Увеличение: *a* – 70000×, *б* – 30000×.

ям – ядерная мембрана, *яз* – ядро зиготы, *яо-1*, *яо-2* – ядрышки родительских гамет, *хл-1*, *хл-2* – хлоропласты родительских гамет, *ох* – оболочка хлоропласта К(+), *оп* – оболочка пластиды мутанта Ж-4, *m* – тилакоиды, *к* – крахмал.



Рис. 9. Молодая зигота (4–5 часов с момента копуляции), в которой закончилось образование диплоидного ядра зиготы и одного ядрышка и продолжается слияние родительских хлоропластов гамет и образование единого хлоропласта зиготы. Причем в зоне слияния хлоропластов (показано *стрелкой*) в желтой пластиде мутанта Ж-4 (*хл-2*) начинается формирование тилакоидов под влиянием гена дикого типа зеленого хлоропласта (*хл-1*) штамма К(–). Увеличение: 20000×.

яз – диплоидное ядро зиготы, яоз – ядрышко зиготы, *хл-1*, *хл-2* – хлоропласты родительских гамет К(–) и Ж-4(+), соответственно, *m* – тилакоиды, *к* – крахмал, *стрелка* указывает на область слияния двух хлоропластов родительских гамет, *ог* – осмиофильные глобулы, содержащие липиды, которые локализуются в цитоплазме. Причем в зоне слияния хлоропластов (показано *стрелкой*) в желтой пластиде мутанта \mathcal{K} -4 (*хл*-2) начинается формирование тилакоидов под влиянием гена дикого типа зеленого хлоропласта (*хл*-1) штамма K(–) (рис. 9).

Надо отметить, что полоса контакта таких хлоропластов выражена не совсем четко, по-видимому, благодаря тому, что наличие фермента или ферментных систем в хлоропласте дикого типа, нарушенных у мутанта, обусловливает восстановление мембранной организации пластиды мутанта в первую очередь в области слияния.

Подобная картина имеет место не только в базальной части, но и в верхней части хлоропласта, в месте локализации глазного пятна (рис. 10, *a*). Слияние пластид в этом участке происходит также после момента завершения слияния ядер. Однако, как правило, слияние хлоропластов начинается в базальной части, но затем быстро охватывает всю ширину пластиды. Как только слияние хлоропластов завершается, происходит быстрое восстановление мембранной структуры в той части хлоропласта зиготы, которая образована пластидой мутантной гаметы. Большинство 6-часовых зигот содержит одно диплоидное ядро и один хлоропласт зиготы. Слияние пиреноидов, наблюдаемое в некоторых из этих зигот (рис. 10, δ), по-видимому, указывает на завершение формирования хлоропласта зиготы. Ранее высказывалось предположение, что один из пиреноидов в процессе слияния пластид гамет лизируется, а второй сохраняется, формируя пиреноид хлоропласта зиготы (Bastia et al., 1969; Cavalier-Smith, 1970). У *Chlamydomonas reinhardtii* оба пиреноида гамет сохраняются и, сливаясь, формируют пиреноид зиготы (Ладыгин и др., 1975).

Вопрос о формировании глазного пятна хлоропласта зиготы остается невыясненным. Указание на значительную редукцию глазных пятен пластид гамет в процессе формирования хлоропласта зиготы и трудность его обнаружения в процессе созревания (Cavalier-Smith, 1970) не дают ответа на этот вопрос. Однако факт сохранения глазного пятна в течение всего периода созревания зиготы нами установлен (Ладыгин и др., 1975).

В течение первых суток созревания на свету зигота значительно увеличивается в размерах (от 10–15 до 20–25 мкм в диаметре) и формирует плотную оболочку (рис. 11). В процессе темнового созревания зиготы на минимальной среде (без органического источника углерода) ее хлоропласт полностью восстанавливает мембранную структуру, характерную для пластид вегетативных клеток дикого типа с плотной упаковкой тилакоидов. В этот период в хлоропласте зиготы легко выявляется ДНК-содержащая область, расположенная рядом с пиреноидом.

Быстрое увеличение размеров зиготы в первые сутки созревания на свету, вероятно, обусловлено очень высокой активностью метаболических и синтетических процессов, требующих огромных затрат энергии. Именно поэтому основная масса крахмала расходуется в первые сутки созревания. Мембранная система хлоропластов 12–24-часовых зигот претерпевает значительные изменения. Слои плотно упакованных мембран разрыхляются, внутритилакоидные пространства значительно расширяются. Можно полагать, что эти структурные особенности обусловлены синтезом компонентов, составляющих мембранные структуры, и формированием новых тилакоидов. На это может указывать необычно большое число тилакоидов между двумя рядами глобул глазного пятна (рис. 12, а). Обычно между ними располагается только один тилакоид. Иногда в 3-суточных зиготах мы наблюдали в хлоропласте локализацию двух глазных пятен. Обращает на себя внимание необычное расположение одного из них, внутри стопок тилакоидов, а не снаружи, непосредственно под оболочкой пластиды, как обычно. Указывает ли этот факт на сохранение в хлоропласте зиготы двух глазных пятен гамет, или наличие их есть результат деления глазного пятна зиготы, пока сказать трудно. Для выяснения этого вопроса требуются дополнительные исследования. Принципиальная возможность слияния глазков не исключена. Ранее слияние глазных пятен отмечалось у Acetobularia (Crowley, 1966).

В хлоропласте зрелой зиготы до начала его деления можно наблюдать расхождение двух рядов глобул глазного пятна на значительной расстояние (рис. 12, *б*), что может указывать на формирование новых глазных пятен дочерних зооспор.



Рис. 10. Слияние хлоропластов родительских гамет в области глазного пятна (показано *стрелкой*) (*a*) и слияние пиреноидов родительских гамет в молодой зиготе (5 часов после копуляции). Увеличение: *a* – 60000×, *б* – 50000×.

хл-1, хл-2 – хлоропласты родительских гамет, *гл-1, гл-2* – глазные пятна родительских гамет, *охз* – оболочка хлоропласта зиготы, *n-1, n-2* – пиреноиды родительских гамет, *к* – крахмал, *m* – тилакоиды.



Рис. 11. Ультраструктурная организация зиготы после 6 суток созревания в темноте на минеральной среде. Зигота содержит одно диплоидное ядро, один "диплоидный" хлоропласт, содержащий ДНК (ДНК) от обеих родительских гамет, и сформированную толстую оболочку зиготы. Увеличение: 60000×.

яз – ядро зиготы, *охз* – оболочка хлоропласта зиготы, *nз* – пиреноид зиготы, *ДНК* – ДНК-содержащая область зиготы, *m* – тилакоиды, *к* – крахмал, *оз* – оболочка зиготы.



Рис. 12. Начало деления материнского глазного пятна в зрелой зиготе (*a*) и формирование двух глазных пятен дочерних зооспор (*б*). *гп* – материнское глазное пятно, *гп*-1, *гп*-2 – формирование двух глазных пятен дочерних зооспор, *m* – тилакоиды, *nз* – пиреноид зиготы, *к* – крахмал, *ог* – осмиофильная глобула, *оз* – толстая оболочка зрелой зиготы. Увеличение: 75000×.



Рис. 13. Ультраструктура зрелой зиготы, в которой после мейотического деления ядра происходит деление пиреноида и начинается деление хлоропласта зиготы (показано *стрелкой*). Увеличение: 30000×.

n-1, n-2 – пиреноиды формирующихся молодых зооспор, *стрелкой* показано деление материнского хлоропласта, *хл-1, хл-2* – образование двух хлоропластов зооспор путем деления материнского хлоропласта зиготы, *ДНК* – ДНК-содержащая область, *m* – тилакоиды, *к* – крахмал, *оз* – оболочка зиготы.



Рис. 14. Ультраструктурная организация тетрады гаплоидных зооспор внутри зрелой материнской зиготы. Видно, что все хлоропласты зооспор имеют хорошо развитую структуру тилакоидов (поскольку образовались из материнского «диплоидного» хлоропласта путем деления). Так как в процессе мейотического деления ядра две зооспоры получили ген дикого типа chl^+ от K(–), а две другие зооспоры – ген *у*-4 желтого мутанта Ж-4(+), то в процессе последующих вегетативных делений зооспоры с геном chl^+ дают зеленые колонии, а зооспоры с геном *у*-4 образуют желтые колонии. Увеличение: 34000×.



Рис. 15. Схема процесса кариогамии у *Chlamydomonas reinhardtii*, показывающая последовательные этапы слияние гаплоидных ядер родительских гамет до образования одного диплоидного ядра зиготы.

яо – ядрышко, *нм* и *вн* – наружная и внутренняя мембраны ядра, *1* – ядра родительских гамет, 2 – начало слияния наружной и внутренней оболочки с образованием ядерного мостика, *3* – расширение зоны слияния гаплоидных ядер родительских гамет, *4* – образование диплоидного ядра зиготы и начало слияния ядрышек, *5* – заключительный этап формирования диплоидного ядра зиготы с наличием одного ядрышка.

Аналогичную картину перед началом деления хлоропласта можно наблюдать и с формированием пиреноидов дочерних клеток.

В зрелых зиготах после мейотического деления ядра начинается деление хлоропласта, когда в нем уже сформированы новые пиреноиды дочерних клеток (рис. 13).

Важно отметить, что восстановление мембранной организации хлоропласта зиготы наблюдается и в тех случаях, когда в скрещивание были взяты два штамма со значительной редукцией ламеллярной системы хлоропластов у обеих гамет. Так, например, при скрещивании желтого мутанта Ж-4, хлоропласт которого формирует пузырьки (Ладыгин и др., 1973, 1978; Семенова, Ладыгин, 1975), и светло-зеленого мутанта С-8, у которого только единичные тилакоиды в хлоропласте (Ладыгин, 1970б; Ладыгин и др., 1973), в зиготах в процессе созревания наблюдали восстановление мембранной организации хлоропласта до уровня развития ее в вегетативных клетках дикого типа. Этот факт легко объясняется для неаллельных ядерных генов. Подробнее о структуре хлоропластов зигот при реципрокных скрещиваниях мутантов будет описано в другом сообщении.

Созревание зигот длится в течение 6 суток. Для стимуляции процесса мейоза и образования 4 зооспор зиготы переносили на свежую среду на свет. Через 10–12 часов роста на свету начинается мейотическое деление ядра. После завершения деления ядра начинается деление хлоропласта, а затем и цитокинез, который завершается образованием четырех дочерних фенотипически одинаковых зеленых зооспор.

Электронно-микроскопическим доказательством деления хлоропласта зиготы и его пиреноида может служить обнаружение в тетраде, по крайней мере, 3 пиреноидов. Анализ срезов делящихся зигот показал наличие тетрад, у которых на срезе можно было видеть сразу 3 ядра или 3 пиреноида, что подтверждает тем самым деление хлоропласта зиготы и его пиреноида и четкое распределение в дочерние зооспоры.

Все 4 зооспоры, образовавшиеся в результате мейотического деления зиготы, содержат хлоропласты с хорошо развитой системой тилакоидов (рис. 14). Объясняется это, по-видимому, тем, что их пластиды формируются непосредственно из материнского хлоропласта зиготы. И хотя по генотипу гаплоидные зооспоры в тетраде распределяются в соотношении 2 : 2, для фенотипического проявления действия мутантного гена потребуется несколько клеточных делений, в ходе которых произойдет "разбавление" хлорофилла до уровня, генетически обусловленного данной мутацией.

Выход из зиготы четырех неотличимых по структуре хлоропластов зооспор может быть объяснен тем, что редукция мембранной системы пластид требует гораздо больше времени, чем синтез составляющих ее компонентов и восстановление структуры. Так, изучение биогенеза мембран желтого мутанта Ж-1 или у-1 (yellow-1) показало, что для редукции ламеллярной структуры хлоропласта этого мутанта требуется 4–5 суток, в то время как восстановление ее, связанное с синтезом хлорофилла, завершается в течение 9–10 часов. (Ладыгин и др., 1972, 1978; Семенова, Ладыгин, 1975; Ohad et al., 1967).

Следовательно, редукция структуры пластид зооспор, получивших мутантный ген желтого родительского штамма Ж-4, имеет место не в момент мейотического деления зиготы, а в процессе последующих митотических генераций. Отсутствие биосинтеза новых молекул хлорофилла и "разбавление" хлорофилла, полученного от материнского хлоропласта зиготы, приводит половину зооспор к желтой окраске через несколько клеточных делений. В то же время вторая половина зооспор, получивших ген дикого типа от К(–) остается зелеными с момента образования и весь период вегетативного размножения.

Подобное объяснение может быть справедливым и для хлоропластных генов хламидомонады, поскольку есть вероятность, что пластомы материнской и отцовской гамет сохраняются в зиготе (Ладыгин и др., 1975; Chiang, 1968) и может существовать механизм распределения хлоропластных генов ("пластомный мейоз"), подобно распределению ядерных генов. Для доказательства этой возможности требуются дополнительные исследования. Но уже сейчас высказываются предположения о том, что пластидные гены у гаплоидных водорослей могут распределяться в соотношении, близком 2 : 2 (Столбова, 1971;

Фам Тхань Хо, Квитко, 1973), и может существовать механизм четкого распределения пластидных генов в мейозе (Bisalputra et al., 1971).



Рис. 16. Схема формирования "диплоидного" хлоропласта зиготы и гаплоидных пластид зооспор в процессе полового размножения.

1-5 – формирование одного диплоидного ядра зиготы из двух гаплоидных ядер родительских (+) и (–) гамет и "диплоидного" хлоропласта зиготы из зеленого хлоропласта (–) гаметы дикого типа К(–) и желтого хлоропласта (+) гаметы желтого мутанта Ж-4(+); 6 – редукционное деление ядра в процессе мейоза с образованием 4-х гаплоидных ядер дочерних зооспор, а также деление материнского хлоропласта зиготы с образованием 4-х "гаплоидных" хлоропластов дочерних зооспор; 7 – цитокинез материнской клетки и выход 4-х дочерних зооспор из оболочки зиготы.

Совокупность представленных данных позволяет заключить, что хлоропласт зиготы формируется из пластид гамет путем их слияния. Слияние ядер имеет место раньше слияния пластид. В процессе кариогамии (рис. 15) вначале сливаются внешние слои мембран ядер, затем внутренние. Область слияния кариоплазмы постепенно расширяется, пока не охватывает всего диаметра ядра. Процесс кариогамии завершается слиянием ядрышек. Не исключено, что этот процесс имеет определенный биологический, а возможно, и генетический смысл. Слияние хлоропластов гамет в зиготе начинается через 4–5 часов после копуляции, когда слияние ядер уже завершается (рис. 16, 3). Хлоропласт зиготы форсируется в течение первых 6 часов ее созревания, а восстановление его мембранной системы до уровня, характерного для вегетативных клеток – в течение 24 часов (рис. 16, 5). Пластиды зооспор образуются путем деления материнского хлоропласта в процессе мейотического деления зиготы (рис. 16, 7, 8), что обеспечивает их непрерывность при половом размножении хламидомонады в отличие от других водорослей, у которых хлоропласт может формироваться *de novo* (Brown, Arnott, 1966; Hoffman, 1968).

Таким образом, электронно-микроскопическим методом показано, что единственный хлоропласт зиготы *Chlamydomonas reinhardtii* образуется путем слияния двух пластид гамет. Слияние ядер происходит раньше начала слияния хлоропластов. Объединение хлоропластов начинается только тогда, когда слияние ядер почти закончено, что может указывать на важную детерминантную роль генома в процессе формирования хлоропласта зиготы. При созревании зиготы имеют место утилизация крахмала и полное восстановление мембранной организации хлоропласта зиготы, частично редуцированной в пластидах гамет в процессе азотного голодания. Мейотическое деление ядра зрелой зиготы сопровождается делением хлоропласта зиготы на число, кратное числу образующихся зооспор, что обеспечивает наследственную непрерывность хлоропласта в процессе полового размножения *Chlamydomonas reinhardtii*.

Список литературы

- Ладыгин В.Г. Пигментные мутанты Chlamydomonas reinhardtii, индуцированные нитрозоэтилмочевиной и ультрафиолетовыми лучами // Генетика. 1970а. Т. 6. № 3. С. 42–50.
- *Ладыгин В.Г.* Пигментные мутанты как модельная система для изучения структуры и функции хлоропластов // Автореф. канд. дисс. Пущино-на-Оке. 1970б.
- Ладыгин В.Г., Буриков Э.А. Действие ультрафиолетового излучения на асинхронную культуру и на разные стадии вегетативного клеточного цикла синхронной культуры *Chlamydomonas reinhardtii* // Радиобиология. 1972. Т. 12. С. 723–729.
- Ладыгин В.Г., Садовникова Л.Г. Генетический анализ светло-зеленых мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Генетика. 1973. Т. 9. № 6. С. 45–50.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Ультраструктура пластид белого и желтого мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1972. Т. 14. № 12. С. 1455–1460.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1973. Т. 15. № 7. С. 810–819.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Непрерывность хлоропласта Chlamydomonas reinhardtii в течение жизненного цикла. 1. Деление хлоропласта при вегетативном размножении // Цитология. 1974. Т. 16. С. 1203–1209.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Непрерывность хлоропласта Chlamydomonas reinhardtii в течение жизненного цикла. 2. Формирование хлоропласта зиготы и пластид зооспор в процессе полового размножения // Цитология. 1975. Т. 17. № 2. С. 115–121.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Вариабельность в накоплении хлорофилла и структура хлоропластов у дочерних штаммов фенотипически желтого мутанта Ж-4 *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 1978. Т. 20. № 9. С. 998–1004.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г. Ультраструктура пластид трех типов мутантов Chlamydomonas reinhardtii фенотипически желтых на свету или в темноте // Цитология. 1975. Т. 17. № 9. С. 1003–1008.

- Столбова А.В. Генетический анализ пигментных мутаций одноклеточных водорослей // Автореф. канд. дисс. Л. 1971.
- Фам Тхань Хо, Квитко К.В. Тетрадный анализ нестабильных пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. III. Скрещивания со светочувствительными мутантами и с маркированными линиями // Генетика. 1973. Т. 9. № 12. С. 148–150.
- Bastia D., Chiang K.S., Swift H. Chloroplast differentiation and redifferentiation during zygote maturation and germination in *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Ceall Biol. 1969. V. 43. part 2. P. 11–16.
- *Bisalputra T., Schields C.M., Markham J.W.* The situ observations of the fine structure of *Laminaria gametophytes* and embryes in culture. I. Methods and ultrastructure of the zygotes // J. Microsc. 1971. V. 10. P. 83–98.
- *Braten T.* The ultrastructure of fertilization and zygote formation in the green alga *Ulva mutabilis* Foyn // J. Ceall Sci. 1971. V. 9. P. 621–635.
- *Braten T.* Autoradiographic evidence for the rapid disintegration of one chloroplast in the zygote of the green alga *Ulva mutabilis* // J. Ceall Sci. 1973. V. 12. P. 385–389.
- Brown R.M., Arnott H.J. Electron microscopy of zoosporogenesis in Tetracystis excentrica // J. Phycol. 1966. V. 2. P. 5–12.
- Brown R.M., Jonson C., Bold H.C. Electron and phasecontrast microscopy of sexual reproduction in *Chlamydomonas moewusii* // J. Phycol. 1968. V. 4. P. 100–120.
- Cavalier-Smith T. Electron-microscopic evidence for chloroplast fusion in zygotes of Chlamydomonas reinhardtii // Nature. 1970. V. 228. P. 333–335.
- Chiang K.S. Physical conservation of parental cytoplasmic DNA through meiosis in Chlamydomonas reinhardtii // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1968. V. 60. P. 194–200.
- *Chiang K.S., Sueoka N.* Replication of chromosomal and cytoplasmic DNA during mitosis and meiosis in eucaryote *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Cell. Physiol. 1967. V. 70. P. 89–112.
- *Crowley J.C.W.* Some observation on the fine structure of the gametes and zygote of *Acetobularia* // Planta. 1966. V. 69. P. 365–376.
- *Fjeld A*. Unequal contribution of the two gametes to the zygote in the isogamenus multicellular alga *Ulva mutabilis //* Exper. Cell Res. 1971. V. 69. P. 449–452.
- Friedmann I., Colwin A., Colwin L. Fine-structural aspects of fertilization in Chlamydomonas reinhardtii // J. Cell Sci. 1968. V. 3. P. 115–128.
- *Gillham N.W.* Uniparental inheritance in *Chlamydomonas reinhardtii* // Amer. Natur. 1969. V. 103. P. 355–388.
- Granick S. Cytoplasmic units of inheritance (opening remarks of the Chairman) // Amer. Natur. 1965. V. 99. P. 193–199.
- *Hoffman L.R.* Observations on the fine structure of *Oedogonium*. V. Evidence for *de novo* formation of pyrenoids in zoospores of *Oe. cardiasum* // J. Phycol. 1968. V. 4. P. 212–218.
- *Ohad I., Siekevitz P., Palade G.E.* Biogenesis of chloroplast membranes // J. Cell Biol. 1967. V. 35. P. 521–584.
- Sager R., Lane D. Replication of chloroplast DNA in zygotes of *Chlamydomonas* // Federat. Proc. 1969. V. 28. P. 347–352.
- Siersma P.W., Chiang K.S. Conservation and degradation of cytoplasmic and chloroplast ribosomes in Chlamydomonas reinhardtii // J. Mol. Biol. 1971. V. 58. P. 167–185.
- Stein J.R. The four-celled species of Gonium // Amer. J. Bot. 1959. V. 46. P. 366–371.

ГЛАВА IV

ЛОКАЛИЗАЦИЯ И НАСЛЕДОВАНИЕ ДНК ХЛОРОПЛАСТОВ В ВЕГЕТАТИВНЫХ КЛЕТКАХ И ЗИГОТАХ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

В настоящее время ДНК хлоропластов достаточно хорошо исследована. Это двухцепочечная молекула с высоким молекулярным весом и своеобразным составом оснований, отличной от ядерной ДНК (Сэджер, 1975). Хлоропласты хламидомонады содержат примерно столько же ДНК, сколько имеет ее геном бактериальной клетки, что соответствует молекулярному весу $1 \times 10^8 - 2 \times 10^8$ дальтон (Сэджер, 1975). Вес ДНК хлоропласта составляет 14% от общего ее содержания в клетке, равного 1.24×10^{13} дальтон (Chiang, 1971).

В ядрах эукариот хроматин представляет собой комплекс из молекул ДНК и гистонов, т. е. дезоксинуклеопротеид (ДНП). По данным некоторых авторов (Бакаев и др., 1977; Olins et al., 1975), структура ДНП напоминает нитку бус: цепочка сферических частиц диаметром 7 нм связана с нитями толщиной 1.5 нм.

Хроматин в клеточном ядре находится в одном из двух функциональных состояний: синтез РНК и репликация ДНК в интерфазном ядре и перераспределение генетического материала между дочерними клетками во время митоза и мейоза. При этом хроматин состоит из одних и тех же элементарных единиц – нитей ДНП, которые сконденсированы в митотической хромосоме и деконденсированы в интерфазном ядре (Ченцов, Поляков, 1974). Для ДНК хлоропластов конденсированное состояние ранее не было описано. Цель настоящей работы – показать, что хлоропластная ДНК способна конденсироваться в плотные тельца, подобно хромосомам в ядрах, в процессе митоза и мейоза.

1. Локализация ДНК в хлоропластах вегетативных клеток

Для вегетативных клеток *Chlamydomonas reinhardtii* Рис и Плаут (Ris, Plaut, 1962) цитологическими и электронно-микроскопическими методами показали, что в хлоропласте имеется одна или несколько ДНК-содержащих областей, которые находятся в свободном от тилакоидов пространстве вблизи пиреноида и содержат рибосомы и фибриллы ДНК диаметром 2.5 нм. Авторы приводят цитологические картины на световом уровне по ферментативному перевариванию ДНК, но не дают электронно-микроскопических картин переваривания ДНКазой.

Нами также получены картины этих областей хлоропластов вегетативных клеток с содержанием тонкого фибриллярного материала (порядка 2.5 нм толщиной) в области пиреноида, которые мы, так же как Рис и Плаут (Ris, Plaut, 1962), принимаем за нити ДНК (рис. 1). Кроме таких картин в вегетативных клетках хламидомонады мы обнаружили другое состояние ДНК-содержащей области хлоропласта: когда фибриллярный материал несколько иной структуры (Ладыгин и др., 1974). Здесь нити ДНК имеют гораздо большую толщину (порядка 10–20 нм) (рис. 2), а местами, плотно прилегают друг к другу, образуют значительные утолщения: до 100 нм (рис. 3). Причем часто фибриллярная структура ДНК встречается не только в районе пиреноида, а в самых разных частях хлоропласта, в том числе и в верхней трети его чашеобразной структуры – в узких лопастях. Именно такая структура ДНК хлоропластов имеет наибольшее сходство со структурой нуклеоидов прокариот – синезеленых водорослей (рис. 2, δ) и бактериальных клеток (рис. 2, e).



Рис. 1. Ультраструктурная организация вегетативной клетки *Chlamydomonas reinhardtii* с наличием ядра и хлоропласта, который содержит большое число тилакоидов, пиреноид и ДНК-содержащую область. Увеличение: 40000×.

оя – оболочка ядра, я – ядро, ох – оболочка хлоропласта, т – тилакоиды, п – пиреноид, к – крахмал, ДНК – ДНК-содержащая область хлоропласта. Стрелкой показан конденсированный участок ДНК хлоропласта.



Рис. 2. Ультраструктурная организация ДНК-содержащей области хлоропласта вегетативной клетки *Chlamydomonas reinhardtii* с наличием деспирализованных нитей ДНК (*a*), нуклеоида сине-зеленой водоросли *Anabaena variabilis* (б) и нуклеоида прокариот – бактериальных клеток (в). Увеличение: 150000×.

п – пиреноид, *к* – крахмал, *m* – тилакоиды, *ДНК* – ДНК-содержащие области. *Стрелками* показаны нити ДНК.



Рис. 3. Ультраструктурная организация ДНК-содержащей области хлоропласта вегетативной клетки *Chlamydomonas reinhardtii* стационарной стадии роста. Перед митотическим делением ядра вегетативной клетки в ДНК-содержащей области имеет место спирализация нитей ДНК хлоропласта с образованием "хромосомо-подобных" сгустков ДНК. Причем в этой области ДНК выявляется в виде 25Å нитей, которые конденсируются в уплотненные тельца в виде клубка нитей до 100–200Å толщины, по своей структуре похожие на ядерные хромосомы, условно названные "пластосомы" (Семенова и др., 1978).

ДНК – ДНК-содержащая область хлоропласта. *Стрелками* показаны нити ДНК в отдельных участках, образующие спирализованные сгустки. Увеличение: 150000×.

2. Локализация и наследование ДНК в хлоропластах зигот

Наши исследования проведены на зиготах хламидомонады. После смешивания гамет плюс и минус типов спаривания они сливаются в течение 0.5–1 часа в одну клетку. Затем уже внутри этой общей клетки – зиготы – происходит слияние двух ядер гамет в одно ядро зиготы и двух хлоропластов гамет в один хлоропласт зиготы (Ладыгин и др., 1975).



Рис. 4. Ультраструктурная организация созревающей зиготы *Chlamydomonas* reinhardtii, в которой показано, что при инкубации с меченным тимидином методом электронной радиоавтографии было установлено, что ДНК локализуется только в ДНК-содержащей области хлоропласта зиготы. Увеличение: 40000×.

кс – клеточная стенка, *пл* – плазмолемма, *ох* – оболочка хлоропласта, *m* – тилакоиды, *ДНК* – ДНК-содержащая область хлоропласта. *Стрелкой* показана локализация тимидиновой метки только в ДНК-содержащей области хлоропласта.

Зиготы уже в возрасте 5–10 часов после копуляции гамет имеют одно ядро и один хорошо структурированный хлоропласт с равномерным распределением в нем тилакоидов (рис. 4).

На этой стадии развития хлоропласт содержит много крахмальных зерен, которые усложняют картину структуры хлоропласта, сдавливая мембраны и заполняя свободное пространство матрикса. Поэтому удобнее рассматривать зиготы после созревания их в темноте в течение нескольких суток, когда весь крахмал расходуется на синтез мембранных структур в созревающей зиготе.



Рис. 5. Ультраструктурная организация ядра (*a*) и ДНК-содержащей области хлоропласта (*б*) зиготы *Chlamydomonas reinhardtii*, показывающие формирование конденсированных ДНК в ядре в виде фрагментов хромосом (*в*) и плотных ДНК-содержащих структур в хлоропласте (*г*). Увеличение: $a, \delta - 75000 \times, B, c - 150000 \times.$

os – оболочка ядра, s – ядро, ox – оболочка хлоропласта, m – тилакоиды, ДHK – ДНКсодержащая область хлоропласта. Стрелками показана структура хромосом ядра зиготы в начале мейотического деления (a, b) и структура уплотненных телец в ДНК-содержащей области хлоропласта зиготы (b, c). На всем протяжении времени созревания зиготы в течение 3-5 суток и в дальнейшем при прорастании ее в хлоропласте легко выявляется ДНК-содержащая область (рис. 5, δ), которая выглядит как свободная от мембранного материала пространство обычно рядом с пиреноидом. Размеры ее достигают 1 мкм в диаметре и соизмеримы с размерами самого пиреноида. ДНК-содержащая область зиготы значительно крупнее, чем в вегетативных клетках. Эта область содержит фибриллярный материал нитей ДНК (таких же, как в вегетативных клетках: толщиной 2.5 нм) и уплотненные тельца, которые по структуре своей похожи на ядерный хромосомный материал на стадиях митоза и мейоза (рис. 5, a).

При исследовании ультраструктурной организации созревающей зиготы *Chlamydomonas reinhardtii* методом электронной радиоавтографии при инкубации с меченным тимидином было установлено, что ДНК локализуется только в ДНК-содержащей области хлоропласта зиготы (рис. 4).

Тельца эти встречаются в хлоропластах зигот как в скрещиваниях дикого типа с мутантными штаммами, так и в скрещиваниях плюс и минус родительских штаммов дикого типа между собой, а также в скрещиваниях двух мутантов между собой начиная с 24 часа после смешивания гамет вплоть до мейотического деления ядра зиготы при ее прорастании.

По степени уплотненности и размерам нитей, составляющих эти тельца, на поперечных срезах эти структуры сходны со структурой хромосом мейотически делящихся ядер (рис. 5, *a*, *в*). Толщина элементарных нитей, из которых состоят эти тельца в хлоропластах зигот, составляет 10–20 нм в отличие от 2.5 нм нитей ДНК-содержащих областей хлоропласта вегетативных клеток. Мы полагаем, что эти тельца представляют собой конденсацию нитей хлоропластных ДНК в процессе распределения пластома (рис. 5, *б*, *г*). Пока неясно, происходит ли редукция пластома (деление по типу мейоза), или он делится дважды (деление по типу митоза) в процессе образования четырех дочерних клеток хлоропластов зооспор, поскольку имеющиеся данные о содержании и поведении ДНК пластид в гаметах и зиготах противоречивы.

Наибольшее число телец, которое находят в одной ДНК-содержащей области на одном срезе, четыре, но чаще одно – три (рис. 5, б). Например, в 11 просмотренных зиготах на одном срезе в одной из точек фиксации в пяти зиготах было по одному тельцу, в трех – по два и еще в трех – по три тельца в каждой ДНК-содержащей области. Можно полагать, что в каждой ДНК-содержащей области не более четырех телец. Как показала Сэджер (1975), все гены хлоропластной ДНК находятся в одной группе сцепления, т. е. в гаплоидной вегетативной клетке они локализованы в одной кольцевой ДНК пластиды, которая прикреплена к мембране так же, как и бактериальная ДНК (Sueoka, Quinn, 1968). Поэтому логично предположить, что четыре плотных тельца, которые мы видим в ДНК-содержащих областях, в созревающей и прорастающей зиготе представляют собой четыре копии пластома (пластосом) в конденсированном состоянии или условно "хромосом хлоропласта", которые распределяются в четыре дочерних хлоропласта формирующихся зооспор (Семенова и др., 1978). Возможно, конденсация кольцевых ДНК хлоропластов, так же как и в ядре ДНК хромосом, необходима для обеспечения упорядоченного расхождения копий пластома в дочерние хлоропласты, образующихся зооспор. Это всего лишь наше предположение, так как распределение ДНК-содержащих областей и пластосом по фрагментам делящегося хлоропласта нам не удалось четко проследить (Семенова и др., 1978). Эта задача будущих исследований.

Таким образом, в хлоропластах гаплоидных вегетативных клеток и диплоидных зигот *Chlamydomonas reinhardtii* обнаружено уплотнение и конденсация кольцевых фибрилл ДНК хлоропластов в плотные тела, которые расположены в ДНК-содержащих областях хлоропластов, свободных от мембран тилакоидов, и по своей структуре схожи с митотическими хромосомами. Возможно, что уплотнение хлоропластной ДНК необходимо для упорядоченного расхождения копий пластома в дочерние хлоропласты.

Список литературы

- Бакаев В.В., Мельников А.А., Осика В.Д., Варшавский А.Я. Структура хромосомных дезоксинуклеопротеидов. VIII. Выделение и исследование субъединиц хроматина // Молек. биол. 1977. Т. 11. № 1. С. 55–69.
- Ладыгин В.Г. Пигментные мутанты Chlamydomonas reinhardtii, индуцированные нитрозоэтилмочевиной и ультрафиолетовыми лучами // Генетика. 1970. Т. 6. № 3. С. 47–50.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Непрерывность хлоропласта Chlamydomonas reinhardtii в течение жизненного цикла. 1. Деление хлоропласта при вегетативном размножении // Цитология. 1974. Т. 16. С. 1203–1209.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Непрерывность хлоропласта Chlamydomonas reinhardtii в течение жизненного цикла. 2. Формирование хлоропласта зиготы и пластид зооспор в процессе полового размножения // Цитология. 1975. Т. 17. № 2. С. 115–121.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г., Тагеева С.В. Конденсация ДНК хлоропластов в зиготах хламидомонады (Chlamydomonas reinhardtii) // Цитология. 1978. Т. 20. № 11. С. 1320–1321.
- Сэджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. М.: "Мир". 1975.
- Ченцов Ю.С., Поляков В.Ю. Ультраструктура клеточного ядра. М.: "Наука". 1974.
- *Chiang K.S.* Replication, transmission and recombination of cytoplasmic DNA in *Chlamydomonas reinhardtii* // In: Autonomy and biogenesis of mitochondria and chloroplast. Amsterdam, North Holland. 1971. C. 235–249.
- Olins A.L., Carlson R.D., Olins D.E. Visualization of chromatin substructure Y-bodies // J. Cell Biol. 1975. V. 64. P. 528–537.
- *Ris H., Plaut W.* Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas* // J. Cell Biol. 1962. V. 13. P. 383–391.
- Sueoka N., Quinn W.C. Membrane attachment of the chromosomes replication origin in Bacillus subtilis // Cold Spring Harbor Sympos. Quantit. Biol. 1968. V. 33. P. 665–670.

ГЛАВА V

ПОЛУЧЕНИЕ МУТАНТОВ *СНLАМУДОМОNAS REINHARDTII* ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ХЛОРОПЛАСТОВ

1. Действие мутагенных факторов

В качестве мутагенов мы использовали химические (N-нитрозоэтилмочевину – HЭM), УФ-лучи и γ-излучение. Прежде чем приступить к получению мутантов любого из объектов, необходимо проанализировать выживаемость и выход мутаций после действия мутагенов и подобрать оптимальные дозы.

Вегетативные клетки *Chlamydomonas* гаплоидны, поэтому после воздействия мутагенов мы ожидали, что кривые выживаемости доза-эффект будут экспоненциальными. Однако полученные нами данные для всех трех мутагенов показали их сигмоидный характер (рис. 1, *a*). Этот факт можно объяснить двумя причинами: 1) работой репараторной системы, когда физиологические и генетические изменения при малых дозах элиминировались клеткой, и 2) гетерогенностью популяции клеток, различающихся по устойчивости, в частности тех, которые к моменту воздействия мутагена прошли стадию репликации ДНК и содержали удвоенной, по крайней мере, ту часть генома, которая имела прямое отношение к выживаемости.

При анализе выхода мутаций от дозы было установлено (рис. 1, δ), что для Nнитрозоэтилмочевины (НЭМ) и ультрафиолетового излучения (УФ-С-лучей) частота мутаций повышалась с увеличением дозы, но до определенного предела, выше которого заметного отклонения в сторону увеличения не наблюдали. Поэтому для этих мутагенов оптимальной дозой для получения мутантов мы выбрали ЛД₉₀, что соответствовало дозам: для НЭМ 1 час (С = 0.005 М) и УФ-С-лучей 1 мин в варианте без фотореактивации и 3 мин в варианте с фотореактивацией. Для γ -радиации выход мутаций имел эксполинейную зависимость, поэтому для получения мутантов оптимальной дозой мы считали ЛД₉₉ (200 Грей), дающей высокий процент выхода мутаций (10–15%) и статистически достаточное для анализа число выживших клеток (1–2%).

2. Получение пигментных и нефотосинтезирующих мутантов

Наиболее важным моментом при отборе мутантов являлся выбор критериев селекции: окраска, размеры, морфология колоний, ростовые признаки и т.д. Мы установили, что после воздействия мутагенов появлялось большое число (рис. 2, *a*) мелких (карликовых) колоний (Ладыгин, 1970, 1977). Природа их очень разнообразна. Часть мелких колоний, клетки которых при последующих пересевах восстанавливали скорость размножения до контрольной, не являлись мутантами. Остальные карликовые колонии (рис. 2, *б*), клетки которых в сравнении с контрольными (рис. 2, *б*, *1*) требовали в 2–2.5 раза больше времени (рис. 2, *б*, II–IV) на одно клеточное деление при любых условиях выращивания, очень часто были нефотосинтезирующими ацетат-зависимыми мутантами (А-мутанты) (Ладыгин, 1976, 1977).

Часть мутантов обнаруживала потребность в аминокислотах или витаминах, что давало основание считать их ауксотрофами. Крапчатые колонии давали высокий процент реверсий (нестабильные) и, так же как и морфологические колонии (с неровной, шероховатой поверхностью), были немногочисленными. Наибольшую и легко выявляемую группу составляли пигментные мутанты. Они подразделялись на группы: белые (Б-мутанты), не содержащие пигментов; желтые (Ж-мутанты), хлорофилл-дефицитные, накапливающие только каротиноиды, светло-зеленые (С-мутанты), с уменьшенным содержанием пигментов; темно-зеленые (Т-мутанты), с увеличенным накоплением пигментов.



Рис. 1. Зависимость выживаемости (*a*) и выхода мутаций (б) от дозы после воздействия N-нитрозоэтилмочевины (C = 0.005 M), УФ-С-излучения (50 эрг/(мм² c)) и γ -радиации Cs¹³⁷ на клетки дикого типа K(+).

1 – УФ-С-излучение без фотореактивации, 2 – с фотореактивацией.



Рис. 2. Размеры колоний (*a*) и скорость деления клеток дикого типа у различных мутантов (б).

a – нормальные колонии клеток дикого типа K(+) (1) и карликовые колонии (2) нефотосинтезирующих мутантов. δ – последовательное деления клеток дикого типа K(+) (I) и мутантов: А-66 без ФС-I (II), А-90 без ФС-II (III) и гибрида А-66-90 без обеих фотосистем (IV), объясняющие появление мелких (карликовых) колоний мутантов в результате увеличения в 2–2.5 раза времени, необходимого на одно клеточное деление в сравнении с контрольным. Продолжительность одного клеточного цикла определяли по времени между максимумами двух последовательных делений клеток.

0 – единичные клетки; 1 – первое (4 клетки), 2 – второе (16 клеток) и 3 – третье (64 клетки) деления клеток. Кривые построены на основании результатов 3–4 независимых опытов. Процент делящихся клеток определяли через каждые 2 часа роста на ацетатной агаризованной среде, просчитывая 500–1000 клеток.



Рис. 3. Схема получения одинарных, двойных и тройных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* с нарушениями одного, двух или трех хлорофилл-белковых комплексов хлоропластов методом ступенчатого мутагенеза.

Белый сектор – комплексы, утраченные в результате мутации; заштрихованный сектор – сохранившиеся. Внизу схемы – чистые комплексы, сохранившиеся у тройных мутантов и обозначения этих мутантов. СР-I, СР-II – хлорофилл-белковые комплексы РЦ ФС-I и РЦ ФС-II.

Мы провели анализ более 150 пигментных и нефотосинтезирующих мутантов и установили, что с помощью вышеперечисленных мутагенов можно получить только 4 типа мутантов с генетическим нарушением синтеза отдельных компонентов хлорофилл-белковых комплексов (Ладыгин и др., 1976, 1983; Ладыгин, 1993, 1998). Автономное существование в хлоропластах 4-х типов хлорофилл-белковых комплексов позволило нам получить их в чистом виде в живых клетках путем ступенчатого мутагенеза, последовательной индукцией одинарных, двойных и тройных мутантов (рис. 3). В результате исследований тройных мутантов были установлены формы хлорофилла каждого из нативных пигмент-белковых комплексов: 1) - светособирающего хлорофилл-*а/b*-белкового комплекса II (LHC-II), 2) светособирающего хлорофилл-a(или a/b)-белкового комплекса I (LHC-I), 3) – хлорофилл-aбелкового комплекса реакционного центра ФС-II (РЦ-ФС-II) и 4) – хлорофилл-*а*-белкового комплекса реакционного центра ФС-I (РЦ-ФС-I). Кроме того, были установлены низкотемпературные (-196°С) максимумы флуоресценции хлорофилла каждого ИЗ перечисленных индивидуальных комплексов в нативном состоянии непосредственно в целых клетках тройных мутантов (Ладыгин, 1998).

Список литературы

- Ладыгин В.Г. Пигментные мутанты Chlamydomonas reinhardtii, индуцированные нитрозоэтилмочевиной и ультрафиолетовыми лучами // Генетика. 1970. Т. 6. № 3. С. 42–50.
- *Ладыгин В.Г.* Получение и отбор мутантов одноклеточных водорослей с нарушением цепи переноса электрона фотосинтеза // Физиол. растений. 1976. Т. 23. Вып. 5. С. 877–884.
- *Ладыгин В.Г.* Метод выделения нефотосинтезирующих мутантов водорослей по признаку карликовости колоний // Генетика. 1977. Т. 13. С. 905–910.
- Ладыгин В.Г., Фомина И.Р., Биль К.Я., Москаленко А.А., Ширшикова Г.Н. Хлорофиллбелковые комплексы зеленых водорослей и высших растений. 1. Идентификация хлорофилл-содержащих полос в геле с использованием мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 1421–1428.
- *Ладыгин В.Г.* Генетическая детерминация фотосистем и структурно-функциональная организация мембран хлоропластов // Автореф. дисс. докт. биол. наук. Пущино: ИПФС РАН. 1993. 49 с.
- Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиол. растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741–762.
- Ладыгин В.Г., Климов В.В., Шувалов В.А., Тагеева С.В. Характеристика фотохимических реакционных центров трех типов мутантов Chlamydomonas reinhardtii с неактивными фотосистемами // Физиол. растений. 1976. Т. 23. Вып. 4. С. 681–689.

ГЛАВА VI

БИОГЕНЕЗ МЕМБРАН ТИЛАКОИДОВ ОТ ЕДИНИЧНЫХ ПУЗЫРЬКОВ ДО МАКРОГРАН У ПИГМЕНТНЫХ МУТАНТОВ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

В решении вопросов структурной организации хлоропластов, механизма фотосинтеза и биосинтеза пигментов все большее внимание приковывают к себе исследования, проведенные на мутантах. Это объясняется тем, что методы экспериментального мутагенеза наряду с методами меченых атомов позволяют устанавливать последовательность протекания реакций и идентифицировать промежуточные продукты изучаемого процесса.

Исследования мутантов высших растений, особенно водорослей, позволили установить многие промежуточные этапы в биосинтезе хлорофиллов и каротиноидов (Goodwin, 1965) и выяснить роль отдельных пигментов в различных физиологических процессах (Sager, Zalokar, 1958; Robertson et al., 1960). Активно ведется также изучение генетического контроля фотосинтеза (Gamier, 1965; Levine, 1968).

С помощью мутантов высших растений были установлены все основные этапы развития структуры хлоропластов от формирования отдельных пузырьков и проламеллярного тела до образования тилакоидов и упаковки их в граны (Lefort, 1957; Wettstein, 1959, 1961; Walles, 1965; Kirk, Tilney-Bassett, 1967).

Зеленые водоросли (*Chlamydomonas*, *Chlorella* и другие) благодаря способности синтезировать хлорофилл, как на свету, так и в темноте в течение всего жизненного цикла имеют хорошо развитую структуру хлоропласта. Изучение становления этой структуры представляется возможным на пигментных мутантах. Такие мутанты были получены нами ранее (Ладыгин, 1969, 1970, 1988, 1991).

В данной работе представлены результаты исследования ультраструктурной организации пластид ряда пигментных мутантов с различной степенью нарушения биосинтеза пигментов, вплоть до полного отсутствия их (белый мутант), с одной стороны, и с увеличенным содержанием по сравнению с исходным зеленым штаммом (темно-зеленый мутант) – с другой. Показано, что нарушением пигментного состава можно искусственно редуцировать ламеллярную структуру хлоропласта одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* до любого из этапов ее развития, свойственных хлоропластам высших растений.

1. Характеристика мембранной системы хлоропластов пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii

Проявление недостаточности по пигментам у мутантов может быть обусловлено как первичным генетическим нарушением в цепи биосинтеза хлорофиллов и каротиноидов, так и вторичными эффектами из-за нарушения межмолекулярного взаимодействия пигментов со структурными белками и липидами хлоропласта или в результате нарушения общего баланса процессов метаболизма. Так как в данной работе рассматриваются мутанты с измененным содержанием пигментов, необходимо было установить, являются ли эти изменения прямым результатом мутации или обусловлены вторичными процессами.

Основываясь на принципах регуляции биосинтетических процессов с точки зрения биохимической генетики (Beadle, Tatum, 1941; Horowitz, Leupold, 1951), истинно пигментные мутанты легко идентифицировать биохимическим анализом хлорофиллов и каротиноидов.

Поскольку синтез пигментов у мутантов при выращивании на полной (дрожжевой) среде не восстанавливается, мы имели основание исключить возможность их ауксотрофной природы. Сохранение высокой интенсивности фотосинтеза у светло-зеленых и темнозеленых мутантов указывает на то, что процессы фотосинтеза не затронуты мутацией. Отсутствие фотосинтеза у светло-зеленого мутанта С-5 не исключает возможности первичного нарушения электронно-транспортной цепи (Ладыгин, 1969).

Белые мутанты. Анализ пигментного состава темновой культуры белого мутанта Б-1 показал, что он содержит только следы хлорофилла (Ладыгин, 1988, 1991; Ладыгин и др., 1972). Другие пигменты спектрофотометрически обнаружить не удалось. На свету белый мутант гибнет. Отсутствие каротиноидов и гибель клеток на свету, очевидно в результате образования продуктов фотоокисления (Станиер, 1962), указывают на возможность генетической блокировки цепи биосинтеза каротиноидов, подобно белым мутантам, полученным ранее у кукурузы (Anderson, Robertson, 1960) и подсолнечника (Шлык и др., 1967).

Желтые мутанты. Клетки желтого мутанта Ж-1 при выращивании в темноте имеют высокое содержание каротиноидов (особенно каротина) и лишь следы хлорофиллов. В условиях светового роста у него восстанавливается синтез хлорофилла и содержание пигментов не отличается от контрольного (Ладыгин и др., 1973). Факт восстановления синтеза хлорофилла на свету указывает на то, что у желтого мутанта генетически блокирован синтез или активность фермента, ответственного за световое превращение одного из предшественников хлорофилла (по-видимому, протохлорофиллида) в хлорофилл подобно мутанту Y-1 (Ладыгин и др., 2014; Чекунова, Ладыгин, 2014). Желтый мутант Ж-4 не способен синтезировать хлорофилл, поэтому накапливает только каротиноиды при выращивании, как на свету, так и в темноте (Ладыгин, 1988, 1991; Ладыгин и др., 1973, 1978).

Светло-зеленые мутанты. Среди светло-зеленых мутантов можно выделить три группы. Одна из них включает мутанты со значительным уменьшением в содержании хлорофилла b (до шестикратного – мутант С-8). Содержание же хлорофилла a остается на достаточно высоком уровне (лишь вдвое меньше контрольного). Тот факт, что при длительном культивировании на свету величина отношения хлорофиллов a и b растет в результате преимущественного синтеза хлорофилла a, дает основание считать, что мутацией блокирован синтез одного из светособирающих комплексов фотосистем (Ладыгин, 1998).

Вторая группа включает светло-зеленые мутанты с уменьшенным содержанием обоих хлорофиллов, подобно мутантам С-5, С-10 и С-46 (Ладыгин, 1988, 1991). Меньшая величина отношения хлорофиллов *a* и *b* у этого мутанта по сравнению с контрольной предполагает возможность первичного нарушения светособирающего пигмент-белкового комплекса фотосистемы I (LHC-I) (Ладыгин, 1991, 1998). Синтез хлорофилла *b* у этих мутантов протекает нормально. Уменьшение в его содержании является вторичным благодаря уменьшению количества хлорофилла *a* в нарушенном пигмент-белковом комплексе.

Третья группа включает светло-зеленые мутанты, у которых полностью блокирован синтез хлорофилла *b* (Ладыгин, 1988, 1991). У хлорофилл *b*-дефицитных светло-зеленых мутантов С-48 и других блокирован синтез светособирающего хлорофилл-*a/b*-белкового комплекса II (LHC-II). Содержание хлорофилла *a* у этой группы светло-зеленых мутантов практически остается на уровне клеток дикого типа (Чунаев и др., 1981).

Для темно-зеленых мутантов (мутант T-8) характерно почти пропорциональное увеличение в 2–3 раза содержания хлорофиллов *а* и *b*, поэтому и величина их отношения остается близкой к контрольной (Ладыгин, 1988, 1991).

До сих пор не известно ни одного мутанта, у которого был бы нарушен синтез хлорофилла *a* при нормальном накоплении хлорофилла *b*. Во всех случаях уменьшение содержания хлорофилла *a* сопровождается уменьшением содержания хлорофилла *b*. Этот факт является генетическим подтверждением гипотезы о синтезе хлорофилла *b* из хлорофилла *a*, выдвинутой и подтвержденной ранее на основании использования метода меченых атомов (Шлык и др., 1967; Чунаев и др., 1981, 1984; Chunaev et al., 1987).

Изменения в суммарном накоплении каротиноидов у всех светло-зеленых мутантов менее значительны, чем в содержании хлорофиллов. Поэтому изменение отношения суммы хлорофиллов к сумме каротиноидов отражает главным образом количественные колебания в

накоплении хлорофиллов. У светло-зеленых мутантов величина этого отношения ниже, а у темно-зеленых – выше, чем в клетках исходного зеленого штамма дикого типа.

Можно полагать, что изменения в содержании каротиноидов обусловлены не прямым генетическим изменением их синтеза, а изменением либо в содержании общего предшественника в биосинтезе хлорофиллов и каротиноидов (Годнев, Липская, 1965; Годнев и др., 1965), либо взаимозависимым синтезом этих пигментов, регулируемых по принципу обратной связи. Генетический анализ пигментных мутантов показал четкое менделевское наследование. Этот факт указывает на то, что мутации локализованы в ДНК ядра (Чунаев и др., 1984; Chunaev et al., 1987).

Клетки дикого типа. Поскольку пигменты являются структурным компонентом ламеллярной системы хлоропластов, то изменения в их содержании не могли не отразиться на структурной организации пластид. Прежде чем рассмотреть изменения в строении пластид мутантов, коротко охарактеризуем архитектуру хлоропластов клеток исходного штамма. (Для большей достоверности будем сравнивать участки ламеллярной системы, расположенные в центре хлоропласта, в области локализации пиреноида).

Хлоропласт клеток исходного зеленого штамма имеет типичную для этой водоросли чашеобразную форму (рис. 1). Значительная часть тела хлоропласта заполнена тилакоидами, во многих местах образующими стопки, подобно гранам высших растений. Более детальное ультраструктурное исследование гран хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii* показало, что, как правило, граны у этой водоросли имеют различные размеры менее четко структурированные (рис. 1). В то же время иногда встречаются хорошо структурированные стопки тилакоидов практически не отличимые от гран высших растений (рис. 2).

В центре хлоропласта располагается пиреноид, содержащий сеть трубочек, которые идут от его центра к периферии и выходят к ламеллам тилакоидов. Можно полагать, что по трубочкам первичные продукты фотосинтеза переносятся от тилакоидов к пиреноиду – органелле, специально предназначенной для быстрого синтеза крахмала. Крахмал локализуется как вокруг пиреноида, так и по всему матриксу хлоропласта между тилакоидами. В матриксе же находятся рибосомы и осмиофильные глобулы или пластоглобулы. В верхней части хлоропласта, под оболочкой располагается светочувствительный орган водоросли – стигма (глазное пятно), состоящая из двух-четырех рядов гомогенных каротиноид-содержащих гранул.

Над хлоропластом, в верхней трети водоросли, располагаются ядро, аппарат Гольджи, эндоплазматическая сеть, вакуоли и другие клеточные включения. Между оболочкой хлоропласта и оболочкой клетки по всему пространству разбросаны митохондрии. Более детальное изучение ультраструктурной организации клеток исходного зеленого штамма опубликовано ранее (Sager, Palade, 1957) и неоднократно подтвержденное другими исследователями (Ладыгин, 1998).

Поскольку хлорофилл является одним из важнейших компонентов тилакоидов, то изменение в его содержании, как правило, четко корелирует со степенью развития мембранной системы хлоропластов. Все мутанты в зависимости от накопления пигментов имеют либо редуцированную ламеллярную систему (в случае уменьшения содержания пигментов), либо более высокоструктурированную (при увеличении содержания пигментов) по сравнению с контрольной.

В зависимости от условий культивирования, степень развития мембранной системы хлоропластов в клетках дикого типа и различных мутантов может варьировать в незначительной степени, но характерные особенности формирования и пространственной упаковки тилакоидов остаются стабильными. Так при выращивании клеток на свету, как правило, наблюдается несколько более высокое содержание хлорофилла, чем в клетках, выращенных в темноте. На свету не только формируется несколько большее число тилакоидов, но и сам характер пространственной упаковки их становится более плотный с наличием хорошо сформированных гран. В клетках, выращенных в темноте, формируется чуть меньшее число тилакоидов и характер их упаковки становится более рыхлым.



Рис. 1. Ультраструктурная организация вегетативной клетки дикого типа К(+) *Chlamydomonas reinhardtii* при выращивании на свету. Продольный срез. Увел.: 30000×.

я – ядро, *яо* – ядрышко, *ох* – оболочка хлоропласта, *m* – тилакоиды, *n* – пиреноид, *к* – крахмал, *аг* – аппарат Гольджи.



Рис. 2. Фрагмент хлоропласта вегетативной клетки дикого типа К(+) *Chlamydomonas* reinhardtii при выращивании на свету. В отдельных участках хлоропласта формируются стопки – граны, по своей структуре схожие с гранами хлоропластов высших растений. Увеличение: 90000×.

ст – стопка тилакоидов (грана), *ог* – осмиофильные глобулы, *к* – крахмал.

Белые мутанты. Структурная организация пластиды белого мутанта Б-1 значительно отличается от архитектуры хлоропласта исходного зеленого штамма (рис. 3). У него четко видна оболочка пластиды. Мембранные структуры практически отсутствуют. Они представлены лишь отдельными пузырьками, разбросанными по всему матриксу. Огромное тело пластиды, мало отличающееся по размерам от контрольного, заполнено только матриксом. Важно отметить, что у белого мутанта не наблюдается формирования глазного пятна и пиреноида. Редукция глазного пятна может быть обусловлена потерей каротиноидов. Очевидно, по этой же причине клетки этого мутанта погибают при культивировании на свету, что согласуется с представлением о защитной роли каротиноидов (Ладыгин, 2000, 2002, 2008; Ладыгин, Ширшикова, 2006; Robertson et al., 1956).

При длительном культивировании в темноте в гетеротрофных условиях роста в различных участках матрикса пластиды может накапливаться крахмал. При выращивании в темноте вегетативные клетки белого мутанта Б-1 хорошо растут и размножаются. Детальный анализ ультраструктурной организации клеток показал, что они формируют нормальную клеточную стенку и плазмалемму. Кроме того, в них формируется хорошо структурированная оболочка хлоропласта (рис. 4). Внутри хлоропласта, заполненного матриксом, можно обнаружить небольшое число мембранных пузырьков и осмиофильные глобулы. Единичные мембранные пузырьки липидно-белковой природы, по-видимому, из-за отсутствия хлорофилла и каротиноидов не могут формировать даже цепочек пузырьков, которые указывают на самые ранние этапы формирования мембран.



Рис. 3. Продольный срез вегетативной клетки белого мутанта Б-1 *Chlamydomonas* reinhardtii при выращивании в темноте. Увеличение: 25000×.

я – ядро, *ох* – оболочка хлоропласта, *к* – крахмал, *кс* – клеточная стенка, *ж* – жгутики, *м* – митохондрия.


Рис. 4. Фрагмент хлоропласта вегетативной клетки белого мутанта Б-1 *Chlamydomonas reinhardtii* при выращивании в темноте. Увеличение: 50000×.

кс – клеточная стенка, *ох* – оболочка хлоропласта, *мп* – мембранные пузырьки, *ог* – осмиофильные глобулы, *к* – крахмал.

Наличие в клетках белого мутанта Б-1 хорошо развитого хлоропласта и одновременно отсутствие внутри него мембранной системы служит доказательством независимого генетического контроля самого хлоропласта, как органеллы, и компонентов его мембранной системы, которая не формируется из-за отсутствия у этого мутанта, как хлорофилла, так и каротиноидов.

Таким образом, отсутствие накопления пигментов у белого мутанта сопровождается полной потерей ламеллярной системы пластиды, а также редукцией стигмы и пиреноида, хотя сама пластида вместе с ростом клетки достигает значительных размеров. Развитие мембранных структур пластиды у этого мутанта останавливается на одном из самых ранних этапов развития, до стадии образования пузырьков и агрегации их в первичные слои, подобно белым мутантам ячменя (Wettstein, 1959) и томатов (Lefort, 1957).

Желтые мутанты. У желтых мутантов, накапливающих каротиноиды при отсутствии хлорофилла, формируется пластида нормального размера, в то же время в ней можно наблюдать только ранние этапы формирования мембран, а именно, большое число пузырьков, которые в отдельных участках могут объединятся в цепочки (рис. 5).



Рис. 5. Фрагмент хлоропласта вегетативной клетки желтого мутанта Ж-4 *Chlamydomonas reinhardtii* при выращивании на свету. Увеличение: 80000×.

пл – плазмалемма, *ох* –оболочка хлоропласта, *еп* – единичные пузырьки, *цп* – цепочка пузырьков, *n* – пиреноид.



Рис. 6. Фрагменты хлоропластов желтого мутанта Ж-4 на свету (a) и мутанта Ж-1 (yellow-1) желтого в темноте, но зеленеющего на свету через 1 час роста на свету (δ).

on – оболочка пластиды, m – тилакоиды, un – цепочка пузырьков, en – единичные пузырьки, mn – мембранные пузырьки, n – пиреноид, κ – крахмал, or – осмиофильные глобулы, nm – проламеллярное тело. Увеличение: a – 75000×, δ – 110000×.

Нами были получены три типа желтых мутантов, у которых в зависимости от кинетики накопления пигментов, как на свету, так и в темноте, можно наблюдать различную степень структурирования хлоропластов от самых ранних этапов у фенотипически желтых штаммов до нормально структурированных хлоропластов у желтых мутантов, зеленеющих на свету (Семенова, Ладыгин, 1975).

Можно полагать, что образование мембранных пузырьков в хлоропластах белых и желтых мутантов осуществляется без участия хлорофилла, как в темноте, так и на свету. Хлорофилл же необходим при формировании тилакоидов. Так, у желтого мутанта Ж-1, потерявшего способность синтезировать хлорофилл только в темноте, на свету в начале накопления хлорофилла можно наблюдать формирование коротких мембран тилакоидов (рис. 6, a), а затем и кристаллических структур проламеллярного тела (рис. 6, δ). Дальнейшее накопление хлорофилла ведет к развитию и превращению проламеллярных тел в хорошо развитые тилакоиды.

Следовательно, в случае желтых мутантов мы имеем два типа ламеллярной системы пластид. Один из них характеризуется редукцией мембранных структур до стадии образования пузырьков, как на свету, так и в темноте. Это незеленеющие желтые мутанты Ж-3 и Ж-4. Они представляют интерес при изучении вопросов молекулярной организации начальных этапов формирования мембран тилакоидов и участия каротиноидов в этом процессе.

Другой тип пластид имеет желтый мутант Ж-1, восстанавливающий синтез хлорофилла на свету. Он представляет интерес, как для отмеченных выше исследований, так и для изучения вопросов об участии хлорофиллов в молекулярной организации тилакоидов от начала их формирования до полного развития и упаковки в граны внутри хлоропласта, а также для выяснения причин, обусловливающих их функциональную активность, поскольку развитие ламеллярных структур хлоропластов сопровождается восстановлением фотосинтетической способности.

Пиреноид и стигма у желтых мутантов в темноте менее развиты, чем в клетках дикого типа. Пиреноид образует сеть трубочек, но нормального развития крахмалоносных пластин не происходит. Глазное пятно содержит только один–два ряда не полностью сформированных гранул. Второй ряд или отсутствует вообще, или только начинает образовываться. На свету эти структуры быстро развиваются и мало отличаются от контрольных.

Таким образом, у желтых мутантов нарушение синтеза хлорофилла при достаточно высоком содержании каротиноидов обусловило редукцию мембран до стадии образования пузырьков и проламеллярного тела (рис. 6), свойственных желтым мутантам и этиолированным высшим растениям (Sager, Palade, 1954; Wettstein, 1961). Пузырьки образовывали первичные цепочки, но образование тилакоидов не происходило.

Светло-зеленые мутанты. Структура светло-зеленого мутанта С-5 существенно отличается в зависимости от условий выращивания. Так, при выращивании в темноте мембранная система пластиды этого мутанта приобретает вид, характерный для ранних этапов развития хлоропласта высших растений в период начала зеленения, когда уже образовались отдельные тилакоиды, но еще присутствует проламеллярное тело (рис. 7, a). На свету ламеллярная система представлена хорошо развитыми отдельными тилакоидами и незначительным количеством небольших нормально развитых гран (рис. 7, δ). Стигма и пиреноид в хлоропластах светло-зеленых мутантов, как правило, хорошо развиты и не отличаются от контрольных. Однако у светло-зеленого мутанта С-5 в темноте глазное пятно, также как и редуцированная мембранная система, остается слабо развитым и образует только один ряд липидно-каротиноидных глобул (рис. 7, a) (Ладыгин, 2014).

Однако большинство светло-зеленых мутантов накапливает от 40 до 60% суммы хлорофиллов и суммы каротиноидов от их содержания в клетках дикого типа. Поэтому в них никогда не наблюдается образование проламеллярного тела. Они содержат большое число тилакоидов, как правило, образующих граны небольшого размера.



Рис. 7. Фрагменты хлоропластов вегетативных клеток светло-зеленого мутанта С-5, образующего проламеллярное тело при выращивании в темноте (*a*) и формирующего много единичных тилакоидов и небольших гран при выращивании на свету (δ).

on – оболочка пластиды, nm – проламеллярное тело, m – тилакоиды, en – глазное пятно, κ – крахмал, κc – клеточная стенка, ox – оболочка хлоропласта, e – грана, oe – осмиофильные глобулы. Увеличение: $a - 25000 \times$, $\delta - 75000 \times$.

Нарушение синтеза хлорофилла *b* у светло-зеленого мутанта С-48 при достаточно высоком содержании хлорофилла *a* сопровождалось меньшей редукцией ламеллярной системы, чем у мутанта С-5. Тонкая структура его хлоропласта представлена хорошо развитыми, как единичными, так и упакованными в граны тилакоидами (Ладыгин, Агрикова, 1983).

Таким образом, светло-зеленые мутанты образуют систему единичных тилакоидов, но окончательной дифференцировки в стопки не происходит, подобно тому, как это отмечалось для хлоропластов светло-зеленых мутантов у высших растений (Virgin et al., 1963; Kirk, Tilney-Bassett, 1967).

Исходные зеленые клетки дикого типа. Для электронно-микроскопических исследований структурной организации клеток дикого типа К(+) и мутантов использовали срезы образцов, полученные после 1%-ной OsO₄ фиксации (Ладыгин и др., 2014).

Осмиевая фиксация, стабилизирующая липидный бислой мембран клеток, позволяла хорошо видеть их на ультратонких срезах в электронном микроскопе (рис. 8). Белковые компоненты мембран, располагаясь с двух сторон липидного бислоя и являясь в большей степени электронно-плотными, создают образ трехслойности. Трехслойная организация мембран особенно хорошо видна на плазмалемме (плазмамембране). Толщина плазмалеммы составляет 10 нм, а толщина других клеточных мембран около 7 нм.

Липидный бислой тилакоидов, оболочек хлоропласта и митохондрий пронизан белковыми компонентами насквозь и потому на этих мембранах четкой трехслойности не видно.

В клетках дикого типа K(+) и на свету, и в темноте мембраны оболочки митохондрий, как внешняя, так и внутренняя, которая образует складки – кристы, хорошо сформированы. Вакуоль ограничена мембраной тонопласта, ядро покрыто двойной ядерной мембраной. Все элементы цитоплазмы – рибосомы, аппарат Гольджи, цистерны эндоплазматического ретикулума также хорошо выражены. Плотность рибосом в цитоплазме составляет около тысячи штук на мкм² (970±30 шт/мкм²).

На фрагментах клеток дикого типа К(+) *Chlamydomonas reinhardtii* в области глазка при большом увеличении было показано, что плазмалемма четко видна как гладкая, ровная и приближена к клеточной стенке (Семенова и др., 2015; Zhang, Robinson, 1986). В клетках, выросших на свету, все мембраны митохондрий четко выражены и имеют плотный матрикс (Семенова и др., 2015).

Электронно-микроскопические исследования показали, что в клетках дикого типа К(+) мембранная система хлоропластов хорошо развита и представлена большим числом тилакоидов во многих местах, образующих граны, состоящие из 10–15 тилакоидов (рис. 9). Известно, что именно в участках контакта тилакоидов внутри гран локализуются комплексы ФС-II (Ладыгин, 1998). В то же время комплексы ФС-I локализуются преимущественно в межгранных участках и в единичных тилакоидах (Ладыгин, 1998, 2014).

Поскольку пигменты являются структурным компонентом ламеллярной системы хлоропластов, то увеличение в содержании хлорофилла в клетках дикого типа по сравнению со светло-зелеными мутантами не могли не отразиться на структурной организации пластид. Их хлоропласты более высоко структурированные, чем у С-мутантов. Для большей достоверности лучше сравнивать участки ламеллярной системы хлоропластов, расположенные в центре, в области локализации пиреноида.

Хлоропласт клеток исходного зеленого штамма имеет типичную для этой водоросли структуру. Значительная часть тела хлоропласта заполнена большим числом тилакоидов, во многих местах образующих стопки, подобно гранам высших растений. Более детальное ультраструктурное исследование гран хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii* показало, что, как правило, граны у этой водоросли имеют различные размеры, но менее структурированные. В то же время иногда встречаются хорошо сформированные стопки тилакоидов практически не отличимые от гран высших растений (рис. 9, a, δ).



Рис. 8. Продольный срез вегетативной клетки дикого типа К(+) *Chlamydomonas* reinhardtii при выращивании на свету. Увеличение: 20000×.

кс – клеточная стенка, *пл* – плазмолемма, *я* – ядро, *ох* – оболочка хлоропласта, *m* – тилакоиды, *n* – пиреноид, *к* – крахмал.



Рис. 9 *а*, б. Фрагменты хлоропластов вегетативных клеток дикого типа К(+) *Chlamydomonas reinhardtii* при выращивании на свету. *ох* – оболочка хлоропласта, *m* – тилакоиды, *г* – грана, *n* – пиреноид, *к* – крахмал. Увеличение: 60000×.

Темно-зеленые мутанты. Мутанты, накапливающие в 2–3 раза больше хлорофилла, чем клетки исходного зеленого штамма, имеют более высокоструктурированную ламеллярную систему с большим числом тилакоидов, заполняющих все тело хлоропласта (рис. 10). В мембранной структуре этих мутантов образуются стопки плотно упакованных тилакоидов, подобно гранам высших растений. Этот факт подтверждает мнение о том, что степень структурирования хлоропласта коррелирует с накоплением клеткой пигментов (Sager, Palade, 1954; Wettstein, 1961).

Увеличение количества хлорофилла у темно-зеленого мутанта Т-8 сопровождается кратным увеличением числа тилакоидов в хлоропластах. Их число становится настолько большим, что практически все тело хлоропласта заполнено тилакоидами и представляет собой "единую грану" (рис. 11, *a*). Пиреноид и окружающие его крахмальные зерна также практически окружены сплошной массой тилакоидов. Результаты структурной организации хлоропласта темно-зеленого мутанта Т-8 показывают, что с помощью мутагенеза можно не только редуцировать мембранную систему до единичных пузырьков, но и в значительной степени усовершенствовать ее до практически полного заполнения хлоропласта тилакоидами с высокой фотосинтетической способностью и накоплением биомассы важной для целей фотобиотехнологии.



Рис. 10. Ультраструктурная организация хлоропласта вегетативной клетки темнозеленого мутанта T-8 *Chlamydomonas reinhardtii* при выращивании на свету. Показано, что весь хлоропласт заполнен тилакоидами. Увеличение: 15000×.

кс – клеточная стенка, *г* – граны, *m* – тилакоиды, *гn* – глазное пятно, *к* – крахмал, *м* – митохондрия.



Рис. 11 *а*, б. Фрагменты хлоропластов вегетативных клеток темно-зеленого мутанта T-8 *Chlamydomonas reinhardtii* при выращивании на свету. Увеличение: *a* – 75000×, б – 60000×.

ох – оболочка хлоропласта, *г* – грана, *n* – пиреноид, *к* – крахмал, *ог* – осмиофильные гранулы.



Рис. 12. Схема развития мембранной системы хлоропласта *Chlamydomonas reinhardtii* от образования единичных пузырьков у белого мутанта и проламеллярного тела у желтого мутанта, единичных тилакоидов и небольших гран у светло-зеленого мутанта, хорошо развитых гран у исходного дикого типа и полностью заполненного тилакоидами хлоропласта у темно-зеленого мутанта.

1 – клеточная стенка, 2 – матрикс, 3 – проламеллярное тело, 4 – глазное пятно, 5 – тилакоиды, 6 – пиреноид, 7 – крахмал.

Итак, исследование ряда пигментных мутантов показало, что методом экспериментального мутагенеза удается искусственно получить самые разнообразные нарушения цепи биосинтеза пигментов. Изучение ультраструктурной организации пластид пигментных мутантов привело нас к заключению, что у зеленых водорослей, несмотря на присутствие в норме хорошо развитой ламеллярной системы хлоропласта на всех стадиях жизненного цикла, эту систему можно редуцировать искусственно практически до любого этапа ее развития, установленного для хлоропластов высших растений (рис. 12).

Генетические нарушения содержания пигментов. приволяшие к релукции ламеллярной системы хлоропласта, вплоть до полной потери мембранных структур (белый мутант), а также прохождение хлоропластом этой водоросли через стадию проламеллярного тела (желтый мутант) до образования отдельных тилакоидов и небольших гран (светлозеленые мутанты) до более развитых, чем в контроле, плотно упакованных стопок мембранных структур - "макрогран", заполняющих все тело хлоропласта (темно-зеленый мутант), позволило доказать принципиальную идентичность организации ламеллярной системы хлоропластов одноклеточной зеленой водоросли Chlamydomonas reinhardtii и высших растений (рис. 12). Кроме того, установление всех основных этапов в развитии пластиды Chlamydomonas reinhardtii, свойственных хлоропластам высших растений, может служить подтверждением общности происхождения высших растений и изучаемой зеленой водоросли.

Здесь представлены результаты исследования пигментов и структурной организации пластид четырех типов мутантов Chlamydomonas reinhardtii: белого, двух желтых, двух светло-зеленых и темно-зеленого. Показано, что пластида белого мутанта, по размерам мало отличающаяся от контрольной, заполнена только матриксом. Развитие ее ламеллярных структур блокировано на стадии формирования пузырьков в результате отсутствия пигментов. Накопление значительного количества каротиноидов у желтых мутантов сопровождается образованием большого числа пузырьков, по-видимому, без хлорофилла. Мутанты, восстанавливающие синтез хлорофилла на свету, в процессе зеленения вначале формируют проламеллярное тело, а затем – и тилакоиды. Уменьшение содержания пигментов в 2-3 раза у светло-зеленых мутантов сопровождается редукцией ламеллярной системы до стадии формирования единичных тилакоидов. Повышенное накопление пигментов в 2-3 раза у темно-зеленых мутантов по сравнению с контрольным сопровождается формированием большого числа тилакоидов, образующих "макрограны", заполняющих практически весь матрикс. На основании обнаружения всех основных этапов формирования ламеллярной системы хлоропластов от единичных пузырьков до упаковки тилакоидов в стопки, свойственных высшим растениям, доказывается принципиальная идентичность организации мембранных структур хлоропластов изучаемой одноклеточной зеленой водоросли Chlamydomonas reinhardtii и высших растений.

Список литературы

- Годнев Т.Н., Липская Г.А. К методике определения пигментов в хлоропластах растений // Физиол. раст. 1965. Т. 12. № 3. С. 554–557.
- Годнев Т.Н., Ротфарб Р.М., Ходасевич Э.В., Акулович Н.К. Вопросы биосинтеза хлорофилла и каротиноидов. В сб.: Биохимия и биофизика фотосинтеза. М. 1965. С. 126–145.
- Касьяненко А.Г., Усманов П.Д., Насыров Ю.С. Биохимический мутант Arabidopsis thaliana (L.), восстанавливающий ультраструктуру хлоропластов под действием экзогенного лейцина // ДАН Тадж. ССР. 1970. Т. 13. № 6. С. 47–50.
- *Ладыгин В.Г.* Пигментные мутанты как модельная система для изучения структуры и функции хлоропластов // Автореф. канд. дисс. Институт биологической физики АН СССР. Пущино. 1969. С. 1–49.

- Ладыгин В.Г. Пигментные мутанты Chlamydomonas reinhardtii, индуцированные нитрозоэтилмочевиной и ультрафиолетовыми лучами // Генетика. 1970. Т. 6. № 3. С. 42–50.
- Ладыгин В.Г. Коллекция штаммов мутантов Chlamydomonas reinhardtii Института почвоведения и фотосинтеза Академии наук СССР (ИПФС АН СССР) // Коллекции микроводорослей в СССР Отв. ред. Семененко В.Е. Изд-во АН СССР, НЦБИ Пущино. 1988. С. 104–122.
- *Ладыгин В.Г.* Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas* Института почвоведения и фотосинтеза АН СССР, Пущино // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. Отв. ред. Семененко В. Е. Изд-во РАН. Москва. 1991. С. 152–175.
- Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиол. растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741–762.
- *Ладыгин В.Г.* Биосинтез каротиноидов в пластидах растений // Биохимия. 2000. Т. 65. № 10. С. 1317–1333.
- *Ладыгин В.Г.* Биосинтез каротиноидов мембран хлоропластов зеленых водорослей и высших растений // Физиол. растений. 2000. Т. 47. № 6. С. 904–923.
- Ладыгин В.Г. Современные представления о путях биосинтеза каротиноидов в хлоропластах эукариот // Журнал общей биологии. 2002. Т. 63. № 4. С. 299–325.
- Ладыгин В.Г. Лютеин-5,6-эпоксидный цикл новый ксантофилловый цикл в хлоропластах растений // Биол. мембраны. 2008. Т. 25. № 3. С. 163–172.
- *Ладыгин В.Г.* Получение и физиолого-биохимическая характеристика мутанта C-41 *Chlamydomonas reinhardtii* – суперпродуцента ζ-каротина // Прикл. биохим. и микробиол. 2014. Т. 50. № 6. С. 578–586.
- Ладыгин В.Г. Биогенез и возможности изменения состава каротиноидов глазного пятна у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Микробиология. 2014. Т. 83. №2. С. 160–169.
- Ладыгин В.Г., Агрикова И.М. Структурная организация хлоропластов у аллельных хлорофилл *b*-дефицитных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 1983. Т. 25. № 11. С. 1231–1235.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Ультраструктура пластид белого и желтого мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1972. Т. 14. № 12. С. 1455–1460.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1973. Т. 15. № 7. С. 810–817.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Формирование хлоропласта зиготы и пластид зооспор в процессе полового размножения // Цитология. 1975. Т. 17. № 2. С. 115–120.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Вариабельность в накоплении пигментов и структурной организации хлоропластов у рекомбинантов фенотипически желтого мутанта Ж-4 Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1978. Т. 20. № 9. С. 998–1004.
- Ладыгин В.Г., Чекунова Е.М., Семенова Г.А., Кособрюхов А.А. Структурно-функциональная организация клеток мутанта Brc-1 Chlamydomonas reinhardtii, накапливающего протопорфирин IX в темноте // Биофизика. 2014. Т. 59. № 4. С. 692–703.
- Ладыгин В.Г., Ширшикова Г.Н. Современные представления о функциональной роли каротиноидов в хлоропластах эукариот // Журнал общей биологии. 2006. Т. 67. № 3. С. 163–189.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г. Ультраструктура пластид трех типов мутантов Chlamydomonas reinhardtii фенотипически желтых на свету или в темноте // Цитология. 1975. Т. 17. № 9. С. 1003–1008.
- Семенова Г.А., Чекунова Е.М., Ладыгин В.Г. Светозависимый синтез клеточных мембран у мутанта Brc-1 Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. Т. 57. № 5. С. 353–359.
- Чекунова Е.М., Ладыгин В.Г. Исследование генетического контроля биосинтеза и метаболизма хлорофилла с использованием мутагенеза и генной инженерии. В кн. «Современные проблемы фотосинтеза». Ред. Аллахвердиев С. И., Рубин А. Б., Шувалов

В. А. Ижевский Институт компьютерных исследований, Ижевск-Москва, 2014. Т. 2. Глава 22. С. 169–248.

- Чунаев А.С., Ладыгин В.Г., Гавриленко Т.А., Крэла Л.П., Корнюшенко Г.А. Наследование признака "отсутствие хлорофилла b" и изменчивость светособирающего комплекса в мейотическом потомстве мутанта C-48 Chlamydomonas reinhardtii // Генетика. 1981. Т. 17. № 11. С. 2013–2024.
- Чунаев А.С., Ладыгин В.Г., Мирная О.Н., Семенов Е.П., Гаевский Н.А., Болдина О.Н. Множественный аллелизм в гене *cbn-1*, контролирующем накопление хлорофилла *b* у *Chlamydomonas reinhardtii* // Генетика. 1984. Т. 20. № 5. С. 775–781.
- Appelqvist L., Bounton J.E., Henningsen K.W., Stumpf P.K., Wettstein D., von. Lipid biosynthesis in chloroplast mutant of barley // J. Lipid Res. 1968. V. 9. P. 513–524.
- *Bryan G.W., Zadylak A.H., Ehret C.F.* Fotoreduction of chloroplasts in a *Chlorella* mutant // J. Cell Sci. 1967. V. 2. P. 513–528.
- Budd G.W., Tjostem J.L., Duysen M.E. Ultrastructure of Chlorella pyrenoidosa of affected by environmental changes // Amer. J. Bot. 1969. V. 56. P. 540–545.
- *Chunaev A.S., Ladygin V.G., Kornyushenko G.A., Gaevsky N.A., Mirnaya O.N.* Studies on chlorophyll-*b*-less mutant in *Chlamydomonas reinhardtii* // Photosynthetica. 1987. V. 21. № 3. P. 301–307.
- Eriksson G., Kahn A., Walles B., Wettstein D., von. Zur makromolekularen Physiologie der Chloroplasten // Berichte Deutsch. Bot. Ges. 1961. V. 74. № 7. P. 22–35.
- Friedberg I., Goldberg I., Ohad I. A prolammelar body-like structure in Chlamydomonas reinhardtii // J. Cell Biol. 1971. V. 50. P. 268–275.
- Goldberg I., Ohad I. Biogenes chloroplast membranes. IV. Lipid and pigment changes during synthesis of chloroplast membranes in a mutant *Chlamydomonas reinhardtii* Y-1 // J. Cell Biol. 1970. V. 44. P. 563–571.
- *Chua N.-H., Matlin K., Bennoun P.* A chlorophyll-protein complex lacking in photosystem I mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // J. Cell. Biol. 1975. V. 67. P. 361–377.
- Lefort M. Structure inframicroscopique des chloroplast de certains mutants de-pigments cher Lycopersicum esculentum C. R. Acad. Sci. 1957. V. 245. P. 718–720.
- Levine R.P. Genetic dissection of photosynthesis // Science. 1968. V. 162. P. 768–771.
- Robertson D.S., Rachman M.D., Anderson I.C. Role of carotenoids in protecting chlorophyll from photodestruction. II. Studies on the effect of four modifier of the albino mutant of maize // Photochem. Photobiol. 1966. V. P. 797–805.
- Sager R., Palade G.E. Chloroplasts structure in Green and Yellow strains of Chlamydomonas // Exper. Cell Res. 1954. V. 7. P. 584–592.
- Sager R., Palade G.E. Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green cell // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1957. V. 3. P. 463–487.
- Sager R., Zalokar N. Pigments and photosynthesis in a carotenoid-defecient mutant of *Chlamydomonas* // Nature. 1958. V. 182. P. 98–100.
- *Virgin H.J., Kahn A., Wettstein D.* The physiology of chlorophyll formation in relation to structural changes in chloroplasts // Photochem. Photobiol. 1963. V. 2. P. 83–93.
- *Walles B.* Plastid structure of carotenoid-defecient mutants of sunflower (white mutant) // Hereditas. 1965. V. 53. P. 247–256.
- *Wettstein D., von.* The effect of genetic factors on the submicroscopic structures of the chloroplast // J. Ultrastr. Res. 1959. V. 3. P. 234–240.
- Wettstein D., von. Nuclear and cytoplasmic factors in development of chloroplast structure and function // Canad. J. Bot. 1961. V. 39. P. 1537–1545.
- *Zhang Gu-Hua, Robinson D.G.* The endomembranes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a comparison of the wild type with the wall mutants CW2 and CW15 // Protoplasma. 1986. V. 133. P. 186–194.

ГЛАВА VII

БИОСИНТЕЗ, ЛОКАЛИЗАЦИЯ И ФУНКЦИИ КАРОТИНОИДОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ ВОДОРОСЛЕЙ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

В настоящее время ведутся активные исследования по изучению функциональной роли каротиноидов и их локализации в мембранах хлоропластов. За предыдущие 10–15 лет были достигнуты значительные успехи в изучении процесса биосинтеза каротиноидов и его генетического контроля (Ладыгин, 2002, 2014; Britton, 1998; Hirschberg, 1998). Однако в вопросах локализации каротиноидов и их функционирования остается еще очень много неясного. Разноплановость полученных результатов и значительные успехи по отдельным вопросам обусловили необходимость обобщения этих результатов с целью освещения современного состояния функциональной значимости каротиноидов и участия их в фотохимических реакциях процесса фотосинтеза.

Каротиноиды являются широко распространенным классом пигментов, обнаруженных в природе. Они встречаются у бактерий, грибов, водорослей, растений и животных. В настоящее время известно более 800 видов каротиноидов (Карнаухов, 2000). Это большая группа желтых, оранжевых или красных пигментов, которые представляют собой полиеновые соединения преимущественно с 40 атомами углерода, построенные из изопреновых (С₅) единиц (обычно из восьми). Различают две группы каротиноидов: каротины и ксантофиллы. Каротины – это углеводороды, которые содержат в своем составе только атомы углерода и водорода. Ксантофиллы – это кислород-содержащие производные каротинов, которые, помимо атомов углерода и водорода, имеют атомы кислорода в виде гидрокси- (-OH), эпокси- (-O-) и оксо- (=O) групп (Ладыгин, 2000, 2002, 2014; Britton, 1998). Считается, что каротины принимают участие в организации и функционировании основных (core) комплексов реакционных центров фотосистем (Hashimoto, Koyama, 1990), в то время как ксантофиллы участвуют в организации вспомогательных светособирающих (антенных) комплексов фотосистем (Ладыгин, 2014; Ruban et al., 2001).

К основным функциям каротиноидов можно отнести светособирающую, структурную и фотозащитную. Важная фотозащитная роль каротиноидов связана с механизмом нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла и участием их в обратимых реакциях ксантофилловых циклов. Анализу последних достижений по этим вопросам посвящена монография (Ладыгин, 2014) и данная работа.

1. Общая характеристика каротиноидов эукариот

В основе структуры каротиноидов лежит полиеновая цепь с большим числом ненасыщенных сопряженных двойных связей. Сопряженными называются двойные или тройные связи, разделенные одной простой связью. Если они разделены двумя или более простыми связями или две двойные связи примыкают к одному и тому же атому углерода, то они не являются сопряженными.

Каротиноиды хлоропластов состоят из центральной хромофорной части – линейной цепи ненасыщенных сопряженных двойных связей, и двух концевых групп – иононовых колец (рис. 1). Хромофорная группа с определенным числом сопряженных двойных связей в молекуле каротиноида обусловливает его спектр поглощения и окраску. Эти пигменты поглощают свет в области 280–550 нм.

Поглощением света в синей области объясняется желто-оранжевая и красная окраска каротиноидов. С увеличением числа сопряженных двойных связей в молекулах каротиноидов они поглощают свет с большей длиной волны в видимой области спектра и становятся более интенсивно окрашенными. Так, в петролейном эфире фитоин, имеющий 3 сопряженные двойные связи (3 с.д.с.) и максимумы поглощения в ультрафиолетовой области



Рис. 1. Нумерация атомов углерода, структура хромофорной части (*a*) и наиболее характерных концевых групп (б) молекул каротиноидов в хлоропластах водорослей и высших растений (Ладыгин, 2002; Britton, 1998).

 $\lambda_{\text{max}} = 275, 285$ и 296 нм, и фитофлуин (5 с.д.с.) с $\lambda_{\text{max}} = 331, 348$ и 367 нм бесцветны. Дзетакаротин (7 с.д.с.) имеет поглощение в синем коротковолновом участке видимого спектра ($\lambda_{\text{max}} = 378, 400 \ 425 \ \text{нм}$) и потому выглядит желтым, нейроспорин (9 с.д.с.) с $\lambda_{\text{max}} = 414, 439, 467 -$ желто-оранжевым, а ликопин (11 с.д.с.) поглощает в видимом сине-зеленом диапазоне спектра с $\lambda_{\text{max}} = 444, 470, 502$ нм обладает характерной оранжево-красной окраской.



Рис. 2. Структурная организация ФС-І. Lhca 1, Lhca 2, Lhca 3, Lhca 4 – светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы внешней антенны ФС-I; PSI-C – PSI L, PSI-G (G), PSI-K (K) – светособирающие комплексы внутренней антенны ФС-I; PSI-A/B – ядровый хлорофилл-*a*-белковый комплекс ФС-I (Wollman et al., 1999; Fromme et al., 2003).

Редко встречаемые другие каротиноиды присущи лишь некоторым таксономическим группам, например лактукаксантин (3,3-дигидрокси-є,є-каротин) обнаружен только в листьях растений салата *Lactuca sativa* (Siefermann-Harms et al., 1981).



Рис. 3. Структурная организация димера ФС-II. Тримеры LHC-II – светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы внешней, периферической антенны ФС-II; СР24, СР26, СР29 – светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы внутренней антенны ФС-II; D1, D2, Cyt b₅₅₉, CP43, CP47 – ядровые хлорофилл-*a*-белковые комплексы ФС-II; OE23, OE33 – белки водоокисляющего комплекса с мол. массой 23 и 33 кДа (Wollman et al., 1999; Amerongen, Dekker, 2003).

В хлоропластах зеленых водорослей (*Chlorophyta*) состав каротиноидов практически такой же, как и у высших растений, но иногда дополнительно встречается лороксантин (Ладыгин, 2000, 2002). В то же время красные (*Rhodophyta*), эвгленовые (*Euglenophyta*), а также бурые, золотистые, диатомовые и другие морские водоросли (относящиеся к *Chromophyta*) отличаются большим разнообразием каротиноидов. ε -Каротин (ε , ε -каротин) в малых количествах накапливается у водорослей (*Cryptophyceae*, *Diatomophyceae*, *Prasinophyceae* и *Chlorophyceae*) (Liaaen-Jensen, 1998). Все каротиноиды локализуются в пластоглобулах или тилакоидных мембранах, где распределяются гетерогенно. Часть из них связывается со специфическими хлорофилл-белковыми комплексами фотосистемы I (Φ C-II) и фотосистемы II (Φ C-II) (Wollman et al., 1999). Распределение каротиноидов между ядровыми пигмент-белковыми комплексами I и II (LHC-I и LHC-II) внутренней и внешней антенны фотосистем очень неравномерно (рис. 2, 3).

Показано, что каротины (в основном это β -каротин) принимают участие в организации и функционировании реакционных центров ФС-I и ФС-II (Nanba, Satoh, 1987; Hashimoto, Koyama, 1990), а ксантофиллы – в структуре и функции светособирающих хлорофилл-*a/b*-белковых комплексов LHC-I и LHC-II (Demmig-Adams et al., 1996; Gal et al., 1997; Peterman et al., 1997; Amerongen, Dekker, 2003; Fromme et al., 2003; Green et al., 2003). Установлено также, что α -каротин, как и β -каротин, может связываться в основном с реакционными центрами ФС-I и ФС-II и только в малых количествах – с их светособирающими комплексами (Young, Britton, 1989).

В исследованиях последних лет была обнаружена важная функциональная роль каротиноидов, участвующих в обратимых реакциях ксантофилловых циклов. Было показано, что в хлоропластах эукариот ключевая роль принадлежит ксантофиллам виолаксантинового цикла (виолаксантин, антераксантин и зеаксантин), которые связываются главным образом со светособирающими хлорофилл-a/b-белковыми комплексами LHC-I и LHC-II (Siefermann-Harms, 1985; Thayer, Bjorkman, 1992; Lee, Thornber, 1995; Yamamoto, Bassi, 1996). Эти ксантофиллы распределены неравномерно среди различных комплексов LHC-I и LHC-II. Считается, что обогащение каротиноидами ксантофиллового цикла в большей степени присуще минорным компонентам светособирающих хлорофилл-a/b-белковых комплексов (CP29, CP26 и CP24), образующих внутреннюю антенну ФС-II (рис. 3), чем главному светособирающему комплексу ФС-II (тримеры LHC-II), формирующему внешнюю периферическую антенну (Bassi et al., 1993; Ruban et al., 1994; Lee, Thornber, 1995; Demmig-Adams et al., 1996; Goss et al., 1997; Verhoeven et al., 1999; Wollman et al., 1999).

В минорных комплексах локализуется до 80% пигментов ксантофиллового цикла, в то время как в состав главного периферического комплекса LHC-II входит лишь 20% этих пигментов (Gilmore et al., 1998). Важно отметить, что ксантофиллы находятся в этих комплексах в непосредственной близости к хлорофиллу. Помимо фотосинтетических мембран каротиноиды есть и в оболочках хлоропластов, в том числе около 1% виолаксантина (Siefermann et al., 1978; Douce, Joyard, 1979; Joyard et al., 1998). Установлено, что деэпоксидация виолаксантина до зеаксантина происходит как в тилакоидах гран, так и в тилакоидах стромы (Siefermann, Yamamoto, 1976).

2. Локализация наиболее важных ксантофиллов эукариот

Большой прогресс в вопросах биосинтеза каротиноидов был достигнут недавно с помощью новых молекулярных манипуляций, которые позволили на генетическом уровне частично разобраться в биосинтетическом пути ксантофиллов у высших растений и водорослей (Ладыгин, 2002; Britton, 1998; Cunningham, Gantt, 2001). В течение последнего десятилетия были клонированы гены ферментов, участвующих в синтезе α-каротина (β,εкаротин) и β-каротина (β,β-каротин) (Sandmann, 1994; Cunningham, Gantt, 1998, 2001). Главными ксантофиллами, которые могут встречаться в фотосинтезирующих органах растений, являются лютеин (3,3'-дигидрокси-α-каротин), зеаксантин (3,3'-дигидрокси-βкаротин), антераксантин (3,3'-дигидрокси-5,6-эпокси-β-каротин), виолаксантин (3,3'дигидрокси-5,6,5',6'-диэпокси-β-каротин) и 9'-*cis*-неоксантин (3,3'-дигидрокси-5',6'-эпокси-βкаротин). Лютеин синтезируется из α-каротина, в то время как другие четыре ксантофилла являются производными β-каротина (рис. 4). Недавно были клонированы гены из *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 1996) и из плодов перца *Capsicum annuum* (Bouvier et al., 1998) и установлены аминокислотные последовательности β-каротиновой гидроксилазы, которая связывает гидрокси группу с третьим атомом углерода СЗ β-иононового кольца.



Рис. 4. Пути биосинтеза основных каротиноидов в хлоропластах эукариот. Показано три типа ксантофилловых циклов: виолаксантинового (*a*), лютеин-5,6-эпоксидного (*б*) и диадиноксантинового (*в*). В нижней части схемы перечислены основные ксантофиллы, выполняющие светособирающую функцию у разных таксонов водорослей (Ладыгин, 2002, 2014; Macpherson, Hiller, 2003; Scheer, 2003).

С помощью фермента β-гидроксилазы показано превращение эндогенного β-каротина до зеаксантина через промежуточное соединение β-криптоксантин (3-гидрокси-β-каротин) у *Arabidopsis thaliana*.

У высших растений и зеленых водорослей (*Chlorophyta*) зеаксантин вначале эпоксидируется до 5,6-моноэпоксида антераксантина, а затем до 5,6,5',6'-диэпоксида виолаксантина с помощью фермента зеаксантиновой эпоксидазы (рис. 5), локализованной на внешней стороне мембраны тилакоида (Hager, Holocher, 1994). Генетические исследования на мутантах *Arabidopsis thaliana* (Rock, Zeevaart, 1991), *Nicotiana plumbaginifolia* (Marin et al., 1996) и зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (Niyogi et al., 1997а, b) показали, что эти организмы содержат только один ген *Zep 1*, который ответственен за эпоксидазную реакцию как в биосинтезе антераксантина и виолаксантина, так и лютеин-5,6-эпоксида и диадиноксантина в других ксантофилловых циклах (рис. 4, a-e) (Demmig-Adams et al., 1996; Bungard et al., 1999; Lavaud et al., 2002).



Рис. 5. Локализация ферментов в мембранах тилакоидов: виолаксантиновой деэпоксидазы в неактивном (*A*) и активном (*Б*) состояниях и прочно связанной зеаксантиновой эпоксидазы (*B*) (Hager, Holocher, 1994).

В виолаксантиновом цикле (рис. 4, *a*), локализованном в тилакоидных мембранах хлоропластов, в условиях избыточного освещения виолаксантин быстро деэпоксидируется до антераксантина и зеаксантина (Goss et al., 1998) с помощью кодируемого геном Vde 1 фермента виолаксантиновой деэпоксидазы (рис. 5), которая локализуется в люмене на внутренней стороне мембраны тилакоида. Ее максимальная активность наблюдается при рН 5.2, а при рН 6.5 и выше она становится неактивной. В темноте и при слабой интенсивности света зеаксантин превращается обратно в виолаксантин с помощью зеаксантиновой эпоксидазы (Hager, 1980; Hager, Holocher, 1994). Ген Zep 1, кодирующий зеаксантиновую эпоксидазу, был выделен и идентифицирован в листьях Nicotiana plumbaginifolia, Arabidopsis thaliana (Marin et al., 1996) и в плодах перца Capsicum annuum (Bouvier et al., 1996). Получено доказательство, что зеаксантиновая эпоксидаза, прикрепленная к внешней стромальной стороне тилакоидной мембраны, становится максимально функционально активной при рН 7.5 (Siefermann, Yamamoto, 1975a; Hager, Holocher, 1994). Полученная с помощью генной инженерии очищенная зеаксантиновая эпоксидаза из плодов перца участвует в реакциях только с ксантофиллами, имеющими гидроксильную группу у третьего атома углерода СЗ или СЗ' иононовых колец, полученных из β-каротина, т.е. с β-криптоксантином,

зеаксантином или антераксантином, но не использует как субстрат сам β -каротин (Bouvier et al., 1996). Мутанты с нарушениями в гене *Zep 1* зеаксантиновой эпоксидазы накапливали большое количество зеаксантина, но не могли синтезировать антераксантин и виолаксантин и были дефицитны как по этим пигментам, так и по неоксантину (Rock, Zeevaart, 1991; Marin et al., 1996; Niyogi et al., 1997a, b). Эти результаты подтвердили более раннее предположение о том, что виолаксантин является прямым предшественником неоксантина. Однако фермент неоксантиновая синтаза (ген *Ncy*), катализирующий образование *trans-* или 9'-*cis*-неоксантина из виолаксантина, был идентифицирован лишь недавно (Al-Babili et al., 2000; Bouvier et al., 2000).

В отличие от хлорофилл-*a/b*-содержащих зеленых водорослей из отдела *Chlorophyta* (Liaaen-Jensen, 1998) среди морских и океанических хлорофилл-*a/c*-содержащих водорослей, относящихся к отделу Chromophyta (Christensen, 1989; Liaaen-Jensen, 1998), можно обнаружить значительно более разнообразный набор каротиноидов, в основном производных β-каротина (Björnland, Liaaen-Jensen, 1989). Из них следует особо отметить ксантофиллы, содержащие алленовую или ацетиленовую группу. Это связано с тем, что наличие алленовой группы часто характерно для светособирающих ксантофиллов (рис. 4), таких как фукоксантин у диатомовых (Diatomophyceae), бурых (Fucophyceae, или Phaeophyceae) и гаптофитовых (Haptophyceae, или Prymnesiophyceae) водорослей, перидинин у динофлагеллят (*Dinophyceae*) или вошериаксантин у ксантофитов (Xanthophyceae) (Anderson, Barrett, 1986; Wilhelm, 1990; Björnland, Liaaen-Jensen, 1989). Ацетиленовая группа обнаружена у таких каротиноидов, как диатоксантин, его 5,6моноэпоксид диадиноксантин, гетероксантин у эвгленовых (Euglenophyceae) и аллоксантин у криптофитовых (Cryptophyceae) (рис. 4). У морских и океанических хлорофилл-a/ссодержащих водорослей, таких, как диатомовые, бурые, динофлагелляты, гаптофиты и диадиноксантина ксантофиты, реакции взаимопревращений диатоксантина И осуществляются при функционировании диадиноксантинового цикла (рис. 4, в), который является альтернативой виолаксантиновому циклу (Hager, 1980; Björnland, Liaaen-Jensen, 1989; Liaaen-Jensen, 1998; Al-Babili et al., 2000; Bouvier et al., 2000). В дальнейшем было установлено, что у морских водорослей в определенных условиях оба эти цикла могут функционировать одновременно (Lohr, Wilhelm, 1999, 2001).

У водорослей был клонирован только один ген *CrtL-b* (ликопин-β-циклазы), контролирующий образование β -каротина как у хлорофилл-*a/b*- (*Chlorophyta*), так и у хлорофилл-*а/с*-содержащих (*Chromophyta*) эукариот. В обоих случаях реакции, ведущие к синтезу β-каротина, катализирует фермент ликопин-β-циклаза (Scheer, 2003). В течение длительного времени наш взгляд на ксантофилловый синтез у этих водорослей основывался большей частью на хемисистематических соображениях, которые предполагали, что виолаксантин является общим предшественником всех каротиноидов, содержащих алленовые или ацетиленовые группы (Milborrow, 1982; Björnland, Liaaen-Jensen, 1989; Ладыгин, 2000, 2002). Недавно удалось подтвердить эту гипотезу, показав, что у диатомовых, бурых и других водорослей, обладающих диадиноксантиновым циклом, при оптимальных условиях освещения также содержатся в очень малых количествах пигменты виолаксантинового цикла. Однако, когда быстрорастущие адаптированные к слабому свету водоросли подвергали резкой смене интенсивности освещения в течение нескольких часов, они накапливали значительные количества ксантофиллов виолаксантинового цикла (Lohr, Wilhelm, 1999, 2001). Детальные исследования на диатомовой водоросли Phaeodactylum tricornutum показали, что виолаксантин является промежуточным соединением в биосинтезе диадиноксантина (Lohr, Wilhelm, 1999). Другие авторы (Goericke, Welschmeyer, 1992), исходя из экспериментов на диатомовой водоросли Thalassiosira weissflogii, предположили, что диадиноксантин в свою очередь может служить предшественником фукоксантина (Lohr, Wilhelm, 1998, 1999). Широкое распространение виолаксантина у зеленых (Chlorophyta) и цветных (*Chromophyta*) водорослей наводит на мысль о том, что биосинтетический путь от βкаротина до виолаксантина у них одинаков.

Исследования биосинтетического пути ксантофиллов у диатомовой водоросли P. *tricornutum*, начиная от β -каротина до виолаксантина, позволили: 1) идентифицировать число потенциальных промежуточных соединений на пути до виолаксантина, 2) изучить последовательность превращения пигментов от виолаксантина до фукоксантина, предложить математическую модель путей каротиноидных взаимопревращений у диатомовых водорослей, предполагая, что биосинтез виолаксантина у них идет по тому же пути, как у зеленых водорослей и высших растений (Lohr, Wilhelm, 1999, 2001).

Кроме того, интересно отметить, что в процессе биосинтеза виолаксантина из βкаротина были идентифицированы два возможных промежуточных соединения, а именно, βкриптоксантин и β-криптоксантин-5,6-эпоксид. На сильном свету накапливается βкриптоксантин, а на слабом преобладает β-криптоксантин-5,6-эпоксид. Возможно, так происходит в результате повышенной активности на сильном свету фермента виолаксантиновой деэпоксидазы. Предположение, что зеаксантин является обязательным промежуточным соединением в синтезе виолаксантина, приводит к большим расхождениям между измеренными и рассчитанными скоростями его эпоксидации на слабом свету. В условиях слабого света вместо зеаксантина в биосинтез виолаксантина у диатомовых β-криптоксантин-5,6-эпоксид, водорослей может быть вовлечен который может превращаться сразу в антераксантин, минуя стадию синтеза зеаксантина.

Для Phaeodactylum tricornutum и Cyclotella meneghiniana были определены кинетики нескольких этапов превращения ксантофиллов (Lohr, Wilhelm, 2001). Экспериментально определенные скорости превращения ксантофиллов были использованы для оценки гипотетического пути их синтеза у диатомовых водорослей. Для этой цели была разработана математическая модель, которая позволила рассчитать теоретические скорости превращения пигментов для микроводорослей при стабильных условиях освещения и роста. Сравнение измеренных и рассчитанных скоростей превращения пигментов хорошо согласуется с предполагаемым синтезом фукоксантина через виолаксантин.

Список литературы

Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 422 с.

- Карнаухов В.Н. Функции каротиноидов объект биофизических исследований // Биофизика. 2000. Т. 45. № 2. С. 364–384.
- *Ладыгин В.Г.* Биосинтез каротиноидов в пластидах растений // Биохимия. 2000. Т. 65. № 10. С. 1317–1333.
- Ладыгин В.Г. Современные представления о путях биосинтеза каротиноидов в хлоропластах эукариот // Журн. общей биологии. 2002. Т. 63. № 4. С. 299–325.
- Ладыгин В.Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей // Вопросы современной альгологии (Бюллетень). 2014. Т. 2. № 6. С. 1–16. [Анонс]
- Ладыгин В.Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей // Вопросы современной альгологии. 2014. Т. 2. № 6. URL: http://algology.ru/529 [Монография. 87 с.]
- Al-Babili S., Hugueney P., Schledz M., Welsch R., Frohnmeyer H., Beyer P. Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from Solanum tuberosum // FEBS Lett. 2000. V. 485. № 2–3. P. 168–172.
- Amerongen H., Dekker J.P. Light-harvesting in photosystem II. Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. Eds. Green B.R., Parson W.W. // Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 219–251.
- Anderson J.M., Barrett J. Light-harvesting pigment-protein complexes of algae. Encyclopedia of Plant Physiology. Photosynthesis III. Eds. Staehelin L.A., Arntzen C.J. // Berlin; Heidelberg; New York: Springer. 1986. V. 19. P. 269–285.

- Bassi R., Pineau B., Dainese P., Marquardt J. Carotenoid-binding proteins of photosystem II // Eur. J. Biochem. 1993. V. 212. P. 297–303.
- Björnland T., Liaaen-Jensen S. Distribution patterns of carotenoids in relation to chromophyte phylogeny and systematics. The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives. Systematics Association. Eds. Green J.C., Leadbeater B.S.C., Diver W.L. // Oxford: Clarendon Press. 1989. V. 38. P. 37–60.
- Bouvier F., D'Harlingue A., Backhaus R.A., Kimagai M.N., Camara B. Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. № 3. P. 6346–6352.
- Bouvier F., D'Harlingue A., Hugueney P., Marin E., Marion-Poll A., Camara B. Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of b-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 271. № 46. P. 28861–28867.
- *Bouvier F., Keller Y., D'Harlingue A., Camara B.* Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1391. P. 320–328.
- Britton G. Carotenoids UV/Visible spectroscopy. Spectroscopy. Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. // Basel: Birkhauser. 1995a. V. 1B. P. 13–62.
- Britton G. Structure and properties of carotenoids in relation to function // FASEB J. 1995b. V. 9. № 15. P. 1551–1558.
- Britton G. Overview of carotenoid biosynthesis. Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism. Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. // Basel; Boston; Berlin: Birkhauser Verlag. 1998. V. 3. P. 13–147.
- Bungard R.A., Ruban A.V., Hibberd J.M., Press M.C., Horton P., Scholes J.D. Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 3. P. 1135–1139.
- *Christensen T.* The *Chromophyta*, past and present. The *Chromophyte* Algae: Problems and Perspectives. Systematics Association. Eds. Green J.C., Leadbeater B.S.C., Diver W.L. // Oxford: Clarendon Press. 1989. V. 38. P. 1–12.
- *Cunningham F.X. Jr., Gantt E.* Genes and enzyme of carotenoid biosynthesis in plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. V. 49. № 4. P. 557–583.
- *Cunningham F.X. Jr., Gantt E.* One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ε-cyclases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 5. P. 2905–2910.
- Demmig-Adams B., Gilmore A.M., Adams W.W. III. In vivo function of carotenoids in higher plants // FASEB J. 1996. V. 10. №4. P. 403–412.
- *Douce R., Joyard J.* Structure and function of plastide envelope. Advances in Botanical Research. Ed. Woolhouse H.W. // London: Acad. Press. 1979. V. 7. P. 1–116.
- Fromme P., Schlodder E., Jansson S. Structure and function of the antenna system in photosystem I. Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. Eds. Green B.R., Parson W.W. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 253–279.
- *Gal A., Zer H., Ohad I.* Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. News and views // Physiol. Plantarum. 1997. V. 100. P. 869–885.
- Gilmore A.M., Shinkarev V.P., Hazlett T.L., Govindjee. Quantitative analysis of the effects of intrathylakoid pH and xanthophyll cycle pigments on chlorophyll a fluorescence lifetime distributions and intensity in thylakoids // Biochemistry. 1998. V. 37. № 39. P. 13582–13593.
- *Goericke R., Welschmeyer N.A.* Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii.* II. The ¹⁴CO₂-labeling kinetics of carotenoids // J. Phycol. 1992. V. 28. P. 507–517.
- Goss R., Böhme K., Wilhelm C. The xanthophyll cycle of Mantoniella squamata converts violaxanthin into antheraxanthin but not to zeaxanthin: consequences for the mechanism of enhanced non-photochemical energy-dissipation // Planta. 1998. V. 205. P. 613–621.

- *Goss R., Richter M., Wild A.* Pigment composition of PSII pigment protein complexes purified by anion exchange chromatography: identification of xanthophyll cycle pigment binding proteins // J. Plant Physiol. 1997. V. 151. P. 115–119.
- Green B.R., Anderson J.M., Parson W.W. Photosynthetic membranes and their light-harvesting antennas. Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. Eds. Green B.R., Parson W.W. // Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 1–28.
- *Hager A*. The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast. Pigments in Plants. Ed. Czygan F.-C. // Stuttgart: Fischer. 1980. P. 57–79.
- *Hager A., Holocher K.* Localization of the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin deepoxidasa within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease // Planta. 1994. V. 192. № 4. P. 581–589.
- Hashimoto A., Koyama Y. The 2¹Ag state of a carotenoid bound to spinach chloroplast as revealed by picosecond transient Raman spectroscopy // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1017. № 2. P. 181–186.
- Hirschberg J. Molecular biology of carotenoid biosynthesis. Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism. Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. // Basel; Boston; Berlin: Birkhauser-Verlag. 1998. V. 3. P. 149–194.
- Joyard J., Teyssier E., Miege C., Berny-Seigneurin D., Marechal E., Block M.A., Dorne A.-J., Rolland N., Ajlani G., Douce R. The biochemical machinery of plastid envelope membranes // Plant Physiol. 1998. V. 118. № 3. P. 715–723.
- Lavaud J., Rousseau B., Gorkom H.J., van, Etienne A.L. Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum* // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 1398–1406.
- Lee A.L.-C., Thornber J.P. Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*) // Plant Physiol. 1995. V. 107. P. 565–574.
- Liaaen-Jensen S. Carotenoids in chemosystematics. Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism. Eds. Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. // Basel; Boston; Berlin: Birkhauser Verlag. 1998. V. 3. P. 217–247.
- *Lohr M., Wilhelm C.* Pigment synthesis and xanthophyll cycle in diatoms under high light stress and during low recovery. Photosynthesis: Mechanisms and Effects. Ed. Garab G. // Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 1998. P. 2313–2316.
- Lohr M., Wilhelm C. Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 15. P. 8784–8789.
- Lohr M., Wilhelm C. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model // Planta. 2001. V. 212. P. 382–391.
- Macpherson A.N., Hiller R.G. Light-harvesting systems in chlorophyll *c*-containing algae. Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. Eds. Green B.R., Parson W.W. // Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 323–352.
- Marin E., Nussaume L., Quesada A., Gonneau M., Sotta B., Hugueney P., Frey A., Marion-Poll A. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of Nicotiana plumbaginifolia, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of Arabidopsis thaliana // EMBO J. 1996. V. 15. P. 2331–2342.
- *Milborrow B.V.* Stereochemical aspects of carotenoid biosynthesis. Carotenoid Chemistry and Biochemistry. Eds. Britton G., Goodwin T.W. // Oxford: Pergamon Press. 1982. P. 279–295.
- Nanba O., Satoh K. Isolation of a PS-II reaction center consisting of D1 and D2 polypeptides and cytochrome b559 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 109–112.
- Niyogi K.K., Björkman O., Grossman A.R. Chlamydomonas xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching // Plant Cell. 1997a. V. 9. P. 1369–1380.
- Niyogi K.K., Björkman O., Grossman A.R. The role of specific xanthophylls in photoprotection (lor-1) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997b. V. 94. № 25. P. 14162–14167.

- Peterman E.J.G., Gradinaru C.C., Calcoen F., Borst J.C., Grondelle R., van, Amerongen H., van. Xanthophylls in light-harvesting complex II of higher plants: Light harvesting and triplet quenching // Biochemistry. 1997. V. 36. № 40. P. 12208–12215.
- Rock C.D., Zecvaart J.A.D. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxycarotenoid biosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 3. P. 7496–7499.
- Ruban A.V., Pascal A.P., Robert B., Horton P. Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting complex of photosystem II and thylakoid membranes // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 27. P. 24862–24870.
- Ruban A.V., Young A.J., Pascal A.P., Horton P., 1994. The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes // Plant Physiol. V. 104. P. 227–234.
- Sandmann G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants // Eur. J. Biochem. 1994. V. 223. № 1. P. 7–24.
- Scheer H. The pigments. Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. Eds. Green B.R., Parson W.W. // Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 29–81.
- Siefermann D., Yamamoto H.Y. Properties of NADH and oxygen-dependent zeaxanthin epoxidation in isolated chloroplasts // Arch. Biochem. Biophys. 1975a. V. 171. P. 70–77.
- Siefermann D., Yamamoto H.Y. Light-induced de-epoxidation in letucce chloroplasts. VI. Deepoxidation in grana and stroma lamellae // Plant Physiol. 1976. V. 57. № 6. P. 939.
- Siefermann-Harms D. Carotenoids in photosynthesis. 1. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 811. P. 325–355.
- Siefermann-Harms D., Hertzberg S., Borch G., Liaaen-Jensen S. Lactucaxanthin, an ɛ,ɛ-carotene-3,3'-diol from Lactuca sativa L. // Phytochemistry. 1981. V. 20. № 1. P. 85–88.
- Siefermann-Harms D., Joyard J., Douce R. Light-induced changes of the carotenoid levels in chloroplasts envelopes // Plant Physiol. 1978. V. 61. P. 530–533.
- Sun Z., Gantt E., Cunningham, F.X., Jr. Cloning and functional analysis of the β-carotene hydroxylase of Arabidopsis thaliana // J. Biol. Chem. 1996. V. 271. P. 24349–24352.
- Thayer S.S., Björkman O. Carotenoid distribution and de-epoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize // Photosynth. Res. 1992. V. 33. P. 213–225.
- Verhoeven A.S., Adams III W.W., Demmig-Adams B., Croce R., Bassi R. Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in Vinca major // Plant Physiol. 1999. V. 120. P. 727–738.
- *Wilhelm C.* The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll *b* and chlorophyll *c*-containing algae // Plant Physiol. Biochem. 1990. V. 28. P. 293–306.
- Wollman F.-A., Minai L., Nechushtai R. The biosynthesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1411. № 1. P. 21–85.
- Yamamoto H.Y., Bassi R. Carotenoids: localization and function. Advances in Photosynthesis. Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions. Eds. Ort D.R., Yocum C.F. // Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 1996. V. 4. P. 539–563.
- *Young A.J., Britton G.* The distribution of α-carotene in photosynthetic pigment-protein complexes of higher plants // Plant Science. 1989. V. 64. № 2. P. 179–183.

ГЛАВА VIII

УЧАСТИЕ КАРОТИНОИДОВ В ФОРМИРОВАНИИ ГЛАЗНОГО ПЯТНА И ФОТОТАКСИСЕ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Типичным представителем зеленых микроводорослей является Chlamydomonas reinhardtii. Жгутиковые одноклеточные зеленые водоросли обладают фототаксическими способностями и образуют специфическую органеллу хлоропластов – глазное пятно (evespot), часто называемое глазком или стигмой. Структурно оно содержит один или несколько (обычно 2–3) слоев гексагональных плотно упакованных богатых каротиноидами липидных глобул, локализованных внутри хлоропласта. У Chlamydomonas reinhardtii, как правило, оно располагается непосредственно под оболочкой хлоропласта, которая плотно прилегает к плазмомембране, но не сливается с ней (Семенова, Ладыгин, 1975; Семенова, 1978; Inwood et al., 2008). В световой микроскоп глазное пятно (eyespot) или стигму можно видеть как желтую, оранжевую или светло-красную точку или пятно (Kreimer et al., 1992; Inwood et al., 2008). Вначале полагали, что глазное пятно состоит только из 2–3-х слоев липидно-каротиноидных глобул. Однако в ходе дальнейших исследований было установлено, что липидные глобулы снаружи окружены белковыми мембранами (Семенова, 1978), которые формируются в процессе развития глазного пятна внутри хлоропласта. Образование тилакоидов и глазного пятна обычно протекает почти одновременно. Каждый из 2-3 слоев липидно-каротиноидных глобул глазного пятна располагается на одном из тилакоидов (Семенова, Ладыгин, 1975; Foster, Smyth, 1980; Melkonian, Robenek, 1984; Nultsch, Hader, 1988).

Полученные нами ранее пигментные мутанты *Chlamydomonas reinhardtii* представляют огромную ценность, как для идентификации фоторецепторных пигментов, так и для анализа структуры и функции глазного пятна (Ладыгин, 1970, 1991).

В одной из статей мы обратили внимание на очень интересный факт, что область максимальной спектральной чувствительности фототаксиса для глазного пятна мутанта CC1101 ey, mt(–) была смещена в коротковолновую часть длин волн в сравнении со штаммом дикого типа (Синещеков и др., 1989). Эти данные позволили нам предположить, что смещение максимума фототаксиса может быть обусловлено изменениями состава каротиноидов как в мембранах хлоропластов, так и в глобулах глазного пятна. Нас заинтересовал вопрос: может ли изменяться у мутантов состав каротиноидов глазного пятна, так же как и в мембранах хлоропластов? С целью проверки этого предположения, мы провели исследования состава пигментов глазного пятна на серии мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, с измененным составом каротиноидов в мембранах хлоропластов, полученных нами раннее (Ладыгин, 1991).

В данной работе мы ставили перед собой две задачи: 1 – изучить биогенез глазного пятна от образования первых глобул до развития максимально структурированной органеллы; 2 – установить состав каротиноидов в глобулах глазного пятна исходного дикого штамма и впервые с помощью мутантов доказать возможность экспериментального изменения их состава. Обе задачи можно было решить только с использованием пигментных мутантов от белых до темно-зеленых, в первом случае, а также мутантов с измененным составом каротиноидов в мембранах хлоропластов во втором. Наличие большого набора обоих типов мутантов, полученных нами ранее (Ладыгин, 1991), позволило нам решить обе задачи. Мы установили все этапы развития глазного пятна и впервые показали возможность экспериментального изменения состава каротиноидов в глобулах глазного пятна у мутантов *Сhlamydomonas reinhardtii*.

1. Формирование ультраструктуры глазного пятна

Благодаря способности к темновому синтезу хлорофилла и каротиноидов, в хлоропластах клеток дикого типа *Chlamydomonas reinhardtii*, всегда наблюдается хорошее развитие мембранной системы и глазного пятна, как на свету, так и в темноте. Поэтому, для того чтобы изучить различные этапы формирования глазного пятна и мембран хлоропластов, необходимо было искусственно блокировать на ранних этапах биосинтез пигментов. С этой целью методом мутагенеза нами были получены белые, желтые, светло-зеленые и темнозеленые мутанты (Ладыгин, 1970, 1991).

С помощью белого мутанта Б-1, не содержащего ни хлорофилла, ни каротиноидов, нам удалось обнаружить самые первые этапы начала формирования глазного пятна. Так у мутанта Б-1 было обнаружено глазное пятно, состоящее всего из 2–3-х липидно-каротиноидных глобул (рис. 1, a), а у светочувствительного почти весь первый ряд глобул (рис. 1, δ).

Мы получили три типа желтых мутантов. Мутант Ж-1 – желтый в темноте и зеленеющий на свету подобно высшим растениям. Мутант Ж-3 – зеленый в темноте и фенотипически желтый на свету. Этот мутант терял хлорофилл на свету только при доступе O_2 . При посеве же иглой уколом внутрь столбика агара, мутант Ж-3 и на свету оставался зеленым, т. е. фотодеструкция и обесцвечивание были только при доступе O_2 на свету. Мутант Ж-4 постоянно был желтым, как на свету, так и в темноте (Семенова, Ладыгин, 1975; Ладыгин, 1991). Исследование желтых мутантов показало, что степень развития глазного пятна четко корелирует с содержанием каротиноидов. Наличие или отсутствие хлорофилла и соответствующая степень развития мембранной системы, в меньшей степени влияло на формирование глазного пятна. Практически во всех вариантах в хлоропластах желтых мутантов мы наблюдали достаточно хорошо развитое глазное пятно, как правило, состоящее из двух рядов глобул (рис. 1, ϵ). У них наблюдали только начальные этапы формирования тилакоидов.

В группе светло-зеленых мутантов, с различным содержанием и соотношением хлорофиллов "a" и "b", но накапливающих практически то же самое количество каротиноидов, что и у желтых мутантов, мы наблюдали у них близкий уровень развития глазного пятна, но с хорошо развитыми тилакоидами (рис. 1, c).

В клетках дикого типа К(+), как правило, наблюдалось формирование глазного пятна, состоящего из двух-трех рядов липидно-каротиноидных глобул, в зависимости от накопления пигментов (рис. 1, *д*).

Однако у темно-зеленого мутанта Т-8, накапливающего в 2–3 раза больше, чем в контроле каротиноидов и хлорофиллов, глазное пятно могло формировать до четырех рядов глобул (рис. 1, *e*), что было обнаружено впервые.

Таким образом, благодаря серии пигментных мутантов нам впервые удалось установить все ранние этапы биогенеза формирования глазного пятна. Кроме того было показано, что степень развития глобул глазного пятна хорошо корелирует с накоплением каротиноидов и в меньшей мере зависит от содержания хлорофиллов. Причем, благодаря мутантам, мы впервые изучили биогенез глазного пятна от 2–3 глобул до формирования 4-х рядов липидно-каротиноидных глобул у темно-зеленых мутантов.

После фиксации глутаровым альдегидом было установлено, что каждая липиднокаротиноидная глобула окружена белковой мембраной (Семенова, 1978). Обнаружить наличие мембраны вокруг глобул глазного пятна можно различными способами: либо фиксацией белковых компонентов мембран глютар-альдегидом и последующей экстракцией липидов и пигментов этанолом и ацетоном в процессе обезвоживания образцов для электронной микроскопии. В этом случае мы наблюдали оставшиеся округлые белковые компоненты, окружавшие глобулы глазного пятна (рис. 2, δ). Либо когда для фиксации мы брали очень старые (более 30 суток роста на свету) клетки, в которых имела место частичная деградация липидно-каротиноидных компонентов хлоропласта и глазного пятна.



Рис. 1. Ультраструктурная организация глазного пятна на поперечных срезах в хлоропластах мутантов: белого Б-1 (*a*), белого светочувствительного Б-3 в темноте (δ) и желтого Ж-4 на свету (ϵ), светло-зеленого мутанта С-48 (ϵ), клеток дикого типа К(+) (δ) и мутанта Т-8 (ϵ) на свету. Увеличение: *a*, δ , ϵ , ϵ – 80000×, ϵ , δ – 100000×.



Рис. 2. Ультраструктурная организация глазного пятна на поперечных срезах после глутар-осмиевой (*a*) и глутаровой фиксации (*б*), а также на продольных срезах после глутаросмиевой (*в*) и глутаровой фиксации (*г*) клеток дикого типа К(+) на свету. Увеличение: ×100000

В результате мы наблюдали разрушение внутренней структуры глобул глазного пятна и сохранение окружающих их белковых мембран. При этом форма окружающих мембран полностью сохраняла контуры всех рядов глобул глазного пятна (Семенова, 1978; Ладыгин,

Семенова, 2013, 2014). Следует особо отметить, что на поперечных срезах глобулы глазного пятна имеют округлую или овальную форму (рис. 2, *a*, *б*).

В то же время на продольных срезах глазного пятна (рис. 2, *в*, *г*), особенно после экстракции липидно-каротиноидных компонентов, хорошо видно, что внутри каждого слоя глобул глазка мембраны имеют четкую гексагональную структуру (рис. 2, *г*). Продольный срез (вид сверху) глазного пятна по своей структуре напоминает структуру пчелиных сот (Ладыгин, 2014). Подобные структуры глазного пятна были так же обнаружены и у зеленой водоросли *Spermatozopsis similis* (Renninger et al., 2001).



Рис. 3. Ультраструктура выделенных липидно-каротиноидных глобул глазного пятна после глутар-осмиевой фиксации (глобулы черного цвета). Увеличение: ×300000.

2. Состав каротиноидов в глобулах глазного пятна

В нашей работе необходимо было выяснить два вопроса: 1 – установить основные каротиноиды, входящие в состав глобул глазного пятна; и 2 – выяснить может ли изменяться их состав, при существенном изменении состава каротиноидов в мембранах хлоропластов у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. Для того чтобы ответить на эти вопросы, мы выделяли из разрушенных хлоропластов фракцию липидно-каротиноидных глобул глазного пятна путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (Ладыгин, Семенова, 2014). Желтую или оранжевую полосу №1 глобул глазного пятна переносили в отдельную пробирку. Затем фракцию глобул глазного пятна использовали для биохимических, электронно-микроскопических и спектрофотометрических исследований. Каждая глобула глазного пятна представляет собой мембранный пузырек, заполненный липидами и каротиноидами.

Электронномикроскопически мы установили, что выделенная нами центрифугированием фракция №1 действительно содержала липидно-каротиноидные глобулы глазного пятна (рис. 3). При осмиевой фиксации они выглядели как черные, округлые глобулы, часто связанные между собой в ассоциаты различной величины.

Подобные структуры были описаны ранее для глазков *Spermatozopsis similis* (Grung et al., 1994; Renninger et al., 2001). Они образуются при различной степени обработки ультразвуком аппарата глазного пятна.

Таблица 2. Процентное содержание каротинов в мембранах хлоропластов клеток дикого
типа К(+) и мутантов А-90 и С-41 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .

	Содержание каротинов, %			
Штаммы	α-каротин	β-каротин	β-зеакаротин	ζ-каротин
Дикий тип К(+)	4.9 ± 1.7	95.1 ± 3.2	0	0
Мутант А-90	57.4 ± 3.9	42.6 ± 2.8	0	0
Мутант С-41	0	46.3 ± 2.6	17.1 ± 2.7	36.5 ± 2.7

Мы провели предварительные исследования и показали, что в состав глобул глазного пятна входят, главным образом, каротины (Ладыгин, 2014). Поэтому именно этой группе каротиноидов мы уделяли особое внимание в этой работе. Биохимические и спектрофотометрические исследования, проведенные нами на глобулах глазного пятна, показали, что в клетках дикого типа К(+) основным каротиноидом является β-каротин с максимумом поглощения при 464 нм (рис. 4, *a*).

Таблица 3. Максимумы поглощения каротинов из клеток дикого типа К(+) и мутантов А-90 и С-41 *Chlamydomonas reinhardtii*.

Каротины	Максимумы поглощения в хлороформе, нм			
α-Каротин	432	457	485	
β-Каротин	433	464	493	
β-Зеакаротин	410	433	460	
ζ-Каротин	378	409	434	

Учитывая, что в мембранах хлоропластов клеток дикого типа K(+) соотношение α - и β -каротинов составляет 5:95, можно заключить, что основным пигментом глобул глазного пятна штамма K(+) является β -каротин (табл. 2 и 3). Входит ли в их состав α -каротин, у клеток дикого типа, сказать трудно из-за очень низкого его содержания в хлоропластах зеленых водорослей (Hager, Meyer-Bertenrath, 1966).

Существенных количеств ксантофиллов в глобулах глазного пятна мы не обнаружили. На основании полученных нами данных, можно утверждать, что в состав глобул глазного пятна входят каротины. Причем, у клеток дикого типа К(+) главным образом β-каротин.

3. Изменение состава каротинов глазного пятна путем мутагенеза

Для того, чтобы выяснить может ли α -каротин входить в состав глобул глазного пятна мы провели дополнительные исследования на мутанте А-90, накапливающем в мембранах хлоропластов до 60% α -каротина и уменьшенное до 40% содержание β -каротина (табл. 2). Анализ пигментов глобул глазного пятна мутанта А-90 показал, что основным пигментом глобул глазного пятна у него является α -каротин с максимумом поглощения 457 нм (рис. 4, δ). Следовательно, можно утверждать, что состав каротинов глобул глазного пятна может изменяться одновременно с изменением их состава в мембранах хлоропластов.



Рис. 4. Спектры поглощения каротинов в хлороформе из глобул глазного пятна (A) и их четвертые производные (A⁴) клеток дикого типа K(+) (*a*), мутанта A-90 с высоким содержанием α -каротина (δ) и мутанта C-41 с высоким содержанием ζ -каротина (ϵ).

Очевидно, глазное пятно мутанта A-90 содержит примерно такой же процент α каротина (до 60%), как и мембраны хлоропластов этого мутанта. Эти результаты дали нам основание утверждать, что основными пигментами глобул глазного пятна являются каротины, причем, состав α - и β -каротинов изменяется одновременно с изменением их состава в мембранах хлоропластов каждого из штаммов, если судить по максимумам поглощения (табл. 3).

Чтобы окончательно убедиться в правильности нашей гипотезы мы провели еще одно дополнительное исследование на мутанте C-41, у которого в мембранах хлоропластов накапливается до 38% ζ-каротина, 19% β-зеакаротина и 43% β-каротина (табл. 2). Высокое содержание ζ-каротина в мембранах хлоропласта мутанта C-41 позволяет изучить возможность включения его в состав глобул глазного пятна. Полученные нами результаты четко показали, что в глобулах глазного пятна мутанта C-41 содержится ζ-каротин (Ладыгин, 2014). Вероятно такое же высокое количество ζ-каротина (рис. 4, e), как и в мембранах хлоропластов. Видно, что в спектр поглощения глазного пятна мутанта C-41 существенный вклад вносит ζ-каротин с максимумами поглощения при 408 и 434 нм (рис. 4, e) и β-каротин с максимумом 464 нм (рис. 4, e).



Рис. 5. Спектры поглощения в хлороформе хроматографически выделенных β -каротина (1) и α -каротина (2) из мутанта А-90 (*a*), а так же β -каротина (1) и ζ -каротина (3) из мутанта С-41 (δ).

Чтобы убедиться в правильности наших рассуждений о принадлежности определенных полос поглощения конкретным каротинам мы выделили хроматографически чистые β -каротин и ζ -каротин из клеток мутанта C-41 (рис. 5, δ). Из полученных результатов видно достаточно хорошее совпадение максимумов поглощения каротинов из глобул глазного пятна (рис. 4) и чистых индивидуальных каротинов из мембран хлоропластов целых клеток (рис. 5).

Таким образом, на основании полученных нами результатов на клетках дикого типа K(+), мутанта A-90, с высоким содержанием α -каротина и мутанта C-41, с высоким содержанием ζ -каротина, мы пришли к выводу о том, что основными пигментами глазного пятна являются каротины. Причем, впервые было установлено, что состав и соотношение изомеров каротинов в глобулах глазного пятна у мутантов может изменяться в зависимости от изменения их состава и соотношения в мембранах хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii* (Ладыгин, Семенова, 2013; Ладыгин, 2014).

Таким образом, наши исследования показали, что у *Chlamydomonas reinhardtii* глазное пятно, состоящее из 1–4 рядов глобул, расположено в верхней части хлоропласта. Причем, глобулы каждого ряда глазного пятна располагаются на одном из тилакоидов непосредственно под оболочкой хлоропласта, плотно прилегающей к плазмомебране. Считалось, что они состоят из рядом расположенных липидно-каротиноидных глобул, не разделенных между собой. Теперь показано, что они окружены мембранами.

Считается, что с окружающими мембранами ячеек глазного пятна связаны различные формы ретиналя и родопсина (Beckmann, Hegemann, 1991; Derguini et al., 1991; Hegemann et al., 1991). Внутренняя структура каждой из ячеек заполнена липидно-каротиноидными глобулами. Состав пигментов, входящих в эти глобулы до сих пор окончательно не был установлен, хотя он представлял очень большой интерес.

Наблюдения, основанные на фотоповедении мутантов, с нарушениями по биосинтезу каротиноидов, при экзогенном добавлении ретиналя или некоторых аналогов ретиналя: 11cis-peтиналя (Foster et al., 1984; Hegemann et al., 1988) или all-trans-peтиналя (Hegemann et al., 1991; Takahashi et al., 1991) было показано, какие рецепторные пигменты необходимы для функционирования фототаксиса у Chlamydomonas reinhardtii. В этих исследованиях были получены результаты с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC) ретиноидов из экстрактов целых клеток или фракций мембран из штаммов дикого типа и мутантов Chlamydomonas reinhardtii. Установлено, что ретиналь может быть в форме all-trans (Derguini et al., 1991; Beckmann, Hegemann, 1991), либо all-trans и 13-cis (Renninger et al., 2001) изомеров из целых клеток, а также из изолированных интактных глазных пятен из Spermatozopsis similis all-trans- и 11-cis-ретиналя (Kreimer et al., 1991). Эти фоторецепторные пигменты, по-видимому, локализованы в мембранах окружающих глобулы глазного пятна (Foster, Smyth, 1980; Melkonian, Robenek, 1984).

Некоторые авторы считают, что глазное пятно – не является фоторецептором для фототаксиса зеленой водоросли, а лишь играет важную вспомогательную роль в генерации сигнала. Они полагают, что вращение клеток при движении связано с модуляцией сигнала фоторецепторного локуса путем периодического его освещения и затенения (Boscov, Feinleib, 1979; Foster, Smyth, 1980; Melkonian, Robenek, 1980). Так некоторые авторы считают, что фототаксическая ориентация клеток мутанта еу 627, mt(–) *Chlamydomonas reinhardtii* (у которого глазок отсутствует или сильно редуцирован) осуществляется путем затеняющих свойств хлоропласта и является необходимым для генерации сигнала (Kreimer et al., 1992). В то же время они не отрицают, что интактное глазное пятно является необходимым для более точной фототаксической ориентации (Kreimer et al., 1991; Morel-Laurens, Bird, 1995). Дополнительной функцией глазного пятна, вероятно, является важность расширения фототаксического сигнала и зоны чувствительности при низких плавных скоростях движения клетки (Kreimer et al., 1992).

Во всех исследованиях глазного пятна жгутиковых зеленых водорослей проявление фототаксической активности на свету имеет место в тех случаях, когда падающий свет

располагается перпендикулярно глазному пятну (Foster, Smyth, 1980; Morel-Laurens, Feinleib, 1983; Kreimer, Melkonian, 1990). Сейчас считается, что у зеленых водорослей точная фототаксическая ориентация зависит как от отражающих, так и поглощающих свойств глазного пятна (Kreimer, Melkonian, 1990; Riiffer, Nultsch, 1991; Kreimer et al., 1992). Химические изменения, происходящие в глазном пятне и влияющие на его функциональные свойства, пока еще не установлены.

Нарушение структуры глазного пятна у мутанта еу 627, mt(-) Chlamydomonas reinhardtii в условиях быстрого деления клеток является идеально удобной моделью для изучения этих эффектов. Анализ отражающих свойств глазного пятна этого мутанта в синхронных культурах с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа показал (Kreimer et al., 1992), что отражающие свойства глазного пятна у этого мутанта схожи с таковыми штамма дикого типа и определяют фотоориентацию популяции клеток и фотоэлектрический ответ. Такие исследования были проведены и на других мутантах Chlamydomonas reinhardtii, в том числе на мутантах с отсутствием глазного пятна (Ладыгин и др., 1973; Harz, Hegemann, 1991; Kreimer et al., 1992), на которых было установлено, что вспышки света с длиной волны 500 и 440 нм при редукции глазного пятна не приводили к фототаксической ориентации клеток. Функциональное состояние фоторецепторных пигментов также мало изменяло поведение мутантных клеток. В то же время инкубация клеток мутанта с высокой концентрацией *all-trans* – ретиналя (10 мМ), независимо от биосинтеза каротиноидов, приводила к усилению отражающей способности глазного пятна (Kreimer et al., 1992). Эти данные показывают важное значение глазного пятна, как в поглощении фототаксически активного света, так и в четкой ориентации клеток к свету в процессе фототаксиса (Kreimer et al., 1992).

В последнее десятилетие активно изучается биохимический состав белков мембран глазного пятна (Wagner et al., 2008). Особое внимание уделяется исследованию родопсина и изомеров ретиналя (Ладыгин и др., 1973; Renninger et al., 2001; Dieckmann, 2003). Недавно была описана редукция каротинов и глазного пятна у белого светочувствительного мутанта с блокировкой синтеза фермента фитоинсинтазы (Lawson, Satir, 1995; Inwood et al., 2008). Эти результаты подтверждают наше заключение о том, что без каротиноидов не образуется глазное пятно. В зависимости от содержания каротиноидов в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* глазное пятно может содержать от 1 до 4 рядов липидно-каротиноидных глобул. Причем, каждый ряд липидно-каротиноидных глобул окружен мембранами, которые на продольном срезе имеют гексагональную структуру схожую с пчелиными сотами. На поперечном срезе каждая глобула глазного пятна имеет овальную или округлую форму. Такую же структуру имеет глазное пятно у зеленой водоросли *Spermatozopsis similis*, в глобулах которого было обнаружено преобладающее накопление каротинов (Renninger et al., 2001; Grung et al., 1994).

На основании проведенных нами исследований можно заключить, что липиднокаротиноидные глобулы глазного пятна одноклеточной зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* содержат каротины. Впервые удалось показать, что у мутантов состав каротинов может изменяться в зависимости от изменения их состава в мембранах хлоропластов.

Список литературы

Ладыгин В.Г. Пигментные мутанты *Chlamydomonas reinhardtii*, индуцированные нитрозоэтилмочевиной и УФ-лучами // Генетика. 1970. Т. 6. № 3. С. 42–50.

Ладыгин В.Г. Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas* института почвоведения и фотосинтеза АН СССР, г. Пущино // В сб.: Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. Изд-во РАН. Москва. 1991. С. 152–173.
- Ладыгин В.Г. Биогенез и возможности изменения состава каротиноидов глазного пятна у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Микробиология. 2014. Т. 83. №2. С. 160–169.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А. Развитие ультраструктуры и изменение состава каротинов глазного пятна Chlamydomonas reinhardtii с помощью мутагенеза // Биофизика. 2013. Т. 58. № 6. С. 1005–1012.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А. Ультраструктурная организация и состав каротиноидов глазного пятна у пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 2014. Т. 56. № 1. С. 48–56.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1973. Т. 15. № 7. С. 810–819.
- Семенова Г.А. Ультраструктурная организация глазка хламидомонады // Цитология. 1978. Т. 20. № 6. С. 603–606.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г. Ультраструктура пластид трех типов мутантов Chlamydomonas reinhardtii, фенотипически желтых на свету или в темноте // Цитология. 1975. Т. 17. № 9. С. 1003–1008.
- Синещеков О.А., Говорунова У.Г., Литвин Ф.Ф. Роль фотосинтетического аппарата и стигмы в формировании спектральной чувствительности фототаксиса у жгутиковой зеленой водоросли // Биофизика. 1989. Т. 34. № 2. С. 255–258.
- Beckmann M., Hegemann P. In vitro identification of rhodopsin in the green alga Chlamydomonas // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 3692–3697.
- *Boscov J.S., Feinleib M.E.* Phototactic response of *Chlamydomonas* to flashes of light. II. Response of individual Cells // Photochem. Photobiol. 1979. V. 30. P. 499–505.
- Derguini F., Mazur P., Nakanishi K., Starace D.M., Saranak J., Foster K.W. All-trans-retinal is the chromophore bound to the photoreceptor of the alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Photoehem. Photobiol. 1991. V. 54. P. 1017–1021.
- *Dieckmann C.L.* Eyespot placement and assembly in the green alga *Chlamydomonas* // BioEssays. 2003. V. 25. P. 410–416.
- Foster K.W., Saranak J., Patel N., Zarilli G., Okabe M., Kline T., Nakanishi K. A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote Chlamydomonas // Nature. 1984. V. 311. P. 756–759.
- Foster K.W., Smyth R.D. Light antennas in phototactic Algae // Microbiol. Rev. 1980. V. 44. P. 572–630.
- Grung M., Kreimer G., Calenberg M., Melkonian M., Liaaen-Jensen S. Carrotenoids in the eyespot apparatus of the flagellate green alga *Spermatozopsis similes*: Adaptation to the retinal-based photoreceptor // Planta. 1994. V. 193. P. 38–43.
- *Hager A., Meyer-Bertenrath T.* Die isolierung und quantitative bestimmung der carotinoide und chlorophylle von beatten, algen and isolierten chloroplasten mit hilfe dunnschichtchromatographischer methoden // Planta. 1966. V. 69. № 3. P. 198–217.
- Harz H., Hegemann P. Rhodopsin-regulated calcium currents in Chlamydomonas // Nature. 1991. V. 351. P. 489–491.
- Hegemann P., Gfirtner W., Uhl R. All-trans retinal constitutes the functional chromophore in Chlamydomonas rhodopsin // Biophys. J. 1991. V. 60. P. 1477–1489.
- Hegemann P., Hegemann U., Foster K.W. Reversible bleaching of Chlamydomonas reinhardtii rhodopsin in vivo // Photochem. Photobiol. 1988. V. 48. P. 123–128.
- *Inwood W., Yoshihara C., Zalpuri R., Kim K.–S., Kustu S.* The ultrastructure of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain lacking phytoene synthase resembles that of a colorless alga // Molecular Plant. 2008. V. 1. № 6. P. 925–937.
- *Kreimer G., Brohsonn U., Melkonian M.* Isolation and partial characterization of the photoreceptive organelle for phototaxis of a flagellate green alga // Eur. J. Cell Biol. 1991. V. 55. P. 318–327.
- *Kreimer G., Melkonian M.* Reflection confocal laser scanning microscopy of eyespots in flagellated green algae // Eur. J. Cell Biol. 1990. V. 53. P. 101–111.

- Kreimer G., Overlander C., Sineschekov O.A., Stolzis H., Nultsch W., Melkonian M. Functional analysis of the eyespot in Chlamydomonas reinhardtii mutant ey 627, mt(-) // Planta. 1992. V. 188. № 4. P. 513–521.
- *Lawson M.A., Satir P.* Characterization of the eyespot regions of "Blind" *Chlamydomonas* mutants after restoration of photophobic responses // J. Eukaryotic Microbiology. 1995. V. 41. № 6. P. 593–601.
- Melkonian M., Robenek H. Eyespot membranes of Chlamydomonas reinhardtii: a freeze-fracture study // J. Ultrastruct. Res. 1980. V. 72. P. 90–102.
- *Melkonian M., Robenek H.* The eyespot apparatus of flagellated green algae: a critical review // Prog. Phycol. Res. 1984. V. 3. P. 193–268.
- Morel-Laurens N.M.L., Bird D.J. Effects of cell division on the stigma of wild-type and an "eyeless" mutant of *Chlamydomonas* // J. Ultrastruc. Res. 1995. V. 87. P. 46–61.
- Morel-Laurens N.M.L., Feinleib M.E. Photomovement in an "eyeless" mutant of Chlamydomonas // Photochem. Photobiol. 1983. V. 37. P. 189–194.
- Nultsch W., Hader D.-P. Photomovement in motile microorganisms-II // Photochem. Photobiol. 1988. V. 47. P. 837–869.
- Renninger S., Backendorf E., Kreimer G. Sub fractionation of eyespot apparatuses from the green alga Spermatozopsis similis: isolation and characterization of eyespot globules // Planta. 2001. V. 213. P. 51–63.
- *Riiffer U., Nultsch W.* Flagellar photoresponses of *Chlamydomonas* cells held on micropipettes: II. Change in flagellar beat pattern // Cell Motil. Cytoskeleton. 1991. V. 18. P. 269–278.
- Takahashi T., Yoshihara K., Watanabe M., Kubota M., Johnson R., Derguini F., Nakanishi K. Photoisomerization of retinal at 13-ene is important for phototaxis of Chlamydomonas reinhardtii: simultaneous measurements of phototactic and photophobic responses // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. V. 178. P. 1273–1279.
- Wagner V., Ulmann K., Mollwo A., Kaminski M., Mittag M., Kreimer G. Phosphoproteome of Chlamydomonas reinhardtii eyespot fraction includes key proteins of light signaling pathway // Plant Physiol. 2008. V. 146. P. 772–788.

ГЛАВА ІХ

БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА У ЗЕЛЕНЫХ ВОДОРОСЛЕЙ И ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

1. Генетика биосинтеза хлорофилла

Несмотря на хорошую изученность ферментов биосинтеза хлорофилла (Миронов, 1998; Шестаков, 1998; Ладыгин, 2006; Beale, 1999), ряд вопросов по генетическому контролю этого процесса остаются открытыми до сих пор. Некоторые этапы биосинтеза (рис. 1, 2 шаги 8, 9 и 12) у водорослей и растений требуют наличия кислорода. Вместе с тем, многие бактерии синтезируют бактериохлорофилл в отсутствие О2. Такие анаэробные ферменты и кодирующие их гены найдены далеко не во всех известных случаях. Мало исследованы и механизмы биосинтеза хлорофилла в темноте. Хотя известно, что у покрытосеменных растений образование хлорофилла – это строго светозависимый процесс. В то же время у многих фотосинтезирующих организмов (в том числе у голосеменных высших растений, мхов, водорослей и фототрофных бактерий) сохранилась способность зеленеть и в темноте. содержат альтернативный световому ферменту НАДФ-протохлорофиллид Они оксидоредуктазы (сПОР) (рис. 2, шаг 14) темновой ферментный комплекс НАДФпротохлорофиллид оксидоредуктазы (тПОР), кодируемый у эукариот хлоропластными генами, который осуществляет 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 светонезависимого биосинтеза хлорофилла (Шалыго и др., 1990; Timko, 1998). Идентификация этих генов открывает возможности поиска еще неизвестных факторов, необходимых для темновых реакций биосинтеза хлорофиллов. В настоящее время активно ведется и поиск генетических детерминантов, обеспечивающих регуляцию метаболизма пигментов и связанных с ними процессов биогенеза хлоропластов (Masuda, Fujita, 2008).

Значительный вклад в решение этой проблемы внесли исследования мутантов с нарушенной регуляцией биосинтеза хлорофилла таких классических модельных объектов генетики фотосинтеза, как арабидопсис (Arabidopsis thalianum), одноклеточная зеленая водоросль хламидомонада (Chlamydomonas reinhardtii) и фотосинтезирующие бактерии Rhodobacter cupsulatus и Synechocystis sp. PCC (табл. 1). Детальная характеристика биосинтеза хлорофилла от самых ранних этапов – от образования глутамата – до заключительных стадий биосинтеза хлорофиллов *а* и *b* подробно описана в обзорах 2013 и 2014 годов (Чекунова, Ладыгин, 2013, 2014).

С накоплением экспериментальных данных становиться все более очевидным, что ферменты и интермедиаты биосинтеза хлорофилла являются участниками регуляторных процессов, обеспечивающих системный контроль, необходимый для оптимальной работы генетических механизмов в хлоропластах зеленых водорослей и высших растений в изменяющихся условиях их существования.

Применение генетических методов позволило не только найти гены, кодирующие ферменты метаболизма природных тетрапирролов: хлорофиллов и гема (табл. 1), но и охарактеризовать их структуру и свойства (Beale, 1999; Masuda, Fujita, 2008). Недавно в нескольких обзорах были даны подробные характеристики ферментов и генов, участвующих во всех последовательных превращениях предшественников хлорофиллов до заключительных стадий цепи биосинтеза (Ладыгин, 2006; Чекунова, Ладыгин, 2013, 2014).

Мы не будем останавливаться подробно на описании ранних этапов цепи биосинтеза хлорофилла от глутаминовой кислоты и глицина до образования протопорфирина IX и Мд-протопорфирина IX (рис. 1), поскольку они были детально изучены и подробно рассмотрены в нескольких современных обзорах (Ладыгин, 2006; Беляева, 2009; Чекунова, Ладыгин, 2013, 2014; Ладыгин и др., 2014). Кроме того, остается много вопросов по заключительным этапам цепи биосинтеза хлорофиллов, на которых мы остановимся подробнее.

Таблица 1. Ферменты цепи биосинтеза хлорофилла и их генетический контроль

No	Ферменты	Arabidopsis	Chlamv-	Фотосин.	Обозначения	
	- ·F	thaliana	domonas	бактерии	ферментов	
1	глутамил-тРНК ^{GLU} синтетаза	ets	ets	gltX	GluRS	
-		815	815	8000	EC 6.1.1.17	
2	глутамил-тРНК ^{GLU} релуктаза	hemA1	otr	hemA		
	редуктизи	hemA?	811	nona i	GluTR	
		hemA3			EC 1.2.1.70	
3	глутамат-1-полуальлегил	asal	asa	homI	GSA-AT	
5	трансфераза	asa?	854	nemL	FC 5 4 3 8	
Δ	А ПК-легипратаза	aladl	alad	homB	PRGS	
-	Паназа	alad?	uiuu	nemb	FC 4 2 1 24	
5	Hoppool	nhad	nhad	homC	DRCD	
5	порфобилиноген деаминаза	pogu	pogu	nemC	FC 4 1 3 8	
6	vpouophupuuopau III auutataaa	uros	uros	hamD		
0	уропорфириноген птеинтегаза	uros	uros	nemD	EC 4 2 1 75	
7	wagaanhunuuarau	urodl	uradl	homE	LC 4.2.1.75	
/	уропорфириноген	urod?	urod?	nemE	UROD	
	декарооксилаза	uroa2	urod2		EC 4.1.1.37	
0*	Konnondunuuorou	anal	anvl	h ann E	CDOV	
0.	копропорфириноген	cpo1	CPXI	hemr hemN	EC 1 2 2 2	
0*				hemin	EC 1.3. 3.3	
9*	протопорфириноген оксидаза	<i>pp01</i>	ppx	nemG	FOX	
10	M		(ppo)		EC 1.3.3.4	
10	Мд-хелатаза н субъединица	ChiH	<i>chlH</i>	<i>bcnH</i>		
	Мд-хелатаза D субъединица	chiD	chiD	bcnD		
	Мд-хелатаза І субъединица	chll1	chlll	bchl	EC 0.0.1.1	
		chl12	chll2			
11		1114	chl13	1 1 1 4		
11	Mg-протопорфирин IX	ChIM	ChIM	bchM	Mg-PPM1	
10*	метилтрансфераза	11	.1.1		EC 2.1.1.11	
12*	Mg-протопорфирин IX	crd1	cth1	acsF	Mg-PPME	
	монометиловыи эфир циклаза	(<i>chl27</i>)	crd1	bchE	EC 1.14.13.81	
13	Дивинил редуктаза	dvr	dvr	bchJ	DVR	
					EC 1.3.1.75	
14	НАДФ-протохлорофиллид	porA	lpor	bchY		
	оксидоредуктаза (сПОР)	porB		bchZ	l-FOK	
		porC			EC 1.5.1.55.	
15	хлорофилл синтетаза	chlG	chlG	bchG	CHLS	
					EC 2.5.1.62	
16	хлорофиллид "а" оксигеназа	CAO	cao		CAO	
			<i>cbn-1-48</i>		EC 1.13.12.14	
17	НАДФ-протохлорофиллид		chlL	bchL		
	оксидоредуктаза (тПОР)		chlB	bchB	<i>d</i> -POR	
			chlN	bchN		

*Ферментативные реакции, проходящие в аэробных и анаэробных условиях (Чекунова, Ладыгин, 2014). В таблице номера ферментов соответствуют аналогичным в цепи биосинтеза хлорофилла на рис. 1, 2. *Chlamydomonas* – одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii.* Фотосин. бактерии – фотосинтезирующие бактерии: *Rhodobacter cupsulatus* и *Synechocystis* sp. PCC.



Рис. 1. Схема ранних этапов биосинтеза хлорофилла от глутаминовой кислоты до Mgпротопорфирина IX. Для каждого этапа биосинтеза цифрами обозначены номера ферментов, указанные в таблице 1 (Ладыгин, 2006; Чекунова, Ладыгин, 2013, 2014).



Рис. 2. Схема заключительных этапов биосинтеза хлорофилла от Мд-протопорфирина IX до хлорофилла *а* и хлорофилла *b*. Для каждого этапа биосинтеза цифрами обозначены номера ферментов, указанные в таблице 1 (Ладыгин, 2006; Чекунова, Ладыгин, 2013, 2014).

2. Заключительные стадии биосинтеза хлорофилла

Поздние этапы цепи биосинтеза хлорофилла включают в себя восстановление протохлорофиллида до хлорофиллида и этерификацию его фитолом с образованием хлорофилла *а*.

Превращение протохлорофиллида в хлорофиллид катализируют две различные НАДФ-протохлорофиллид-оксидоредуктазы: светозависимая (сПОР) (Masuda, Takamiya, 2004) и светонезевисимая – темновая (тПОР) (Armstrong, 1998). Оба фермента функционируют у голосеменных растений, мхов, лишайников, водорослей и эубактерий, обусловливая способность зеленеть как в темноте, так и на свету. Эволюционно более молодые покрытосеменные растения утратили тПОР, и при росте в темноте они формируют этиолированные проростки растений желтого цвета, накапливающие протохлорофиллид. Свет активирует светозависимую НАДФ-протохлорофиллид-оксидоредуктазу, запуская тем самым процесс зеленения, а именно, синтез хлорофиллида, а затем и хлорофиллов. Хотя оба фермента выполняют одну функцию – редукцию двойной связи в IV пиррольном кольце макроцикла, тем не менее, они различаются как структурно, так и по механизму действия.

Фотопревращение протохлорофиллида в хлорофиллид. Ген. колирующий фотоэнзим НАДФН-протохлорофиллид оксидоредуктазу (сПОР) (рис. 2, шаг 14), впервые был клонирован у ячменя (Schulz et al., 1989). Авторам удалось выделить фермент из листьев растений в количестве, достаточном для получения 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, Reinbothe, 1996). История его клонирования у Chlamydomonas reinhardtii связана с мутантами класса yellow (фенотипически желтый в темноте, зеленый на свету). Фенотип такого температурочувствительного мутанта у-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, Timko, 1996). В геноме Arabidopsis thaliana найдено несколько паралогов этого гена: porA, porB, porC (Oosawa et al., 2000), также как и у ячменя (Holtorf, Apel, 1996), и некоторых голосеменных (Skinner, Timko, 1999). У цианобактерий и Chlamydomonas reinhardtii этот ген уникален.

В 1959 году С. Граник обнаружил, что добавление экзогенной АЛК к этиолированным проросткам высших растений, растущим в темноте, вызывает накопление предшественников хлорофилла (от протопорфирина IX до протохлорофиллида) (Granick, 1959). Вскоре было установлено, что в норме механизм, препятствующий накоплению этих фототоксичных интермедиатов, состоит в обратном ингибировании синтеза 5-АЛК протохлорофиллидом (Timko, 1998). В 2001 году был обнаружен компонент этой "регуляторной петли", негативный регулятор биосинтеза порфиринов – белок FLU (*fluorescent*), который через взаимодействие с ферментом GluTR ингибирует синтез 5-АЛК (Meskauskiene et al., 2001). Мутанты Arabidopsis thaliana с нарушенной регуляцией биосинтеза хлорофилла накапливали в темноте избыточное количество протохлорофиллида и имели повышенную активность синтезирующих 5-АЛК ферментов. Эти мутанты были названы flu (fluorescent) из-за яркокрасной флуоресценции протохлорофиллида 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 (Meskauskien, Apel, 2002). Через три года два белка, гомологичных FLU, были найдены и у Chlamydomonas reinhardtii. Эти FLP (Flu-Like Protein) белки протяженностью 373 и 386 аминокислот являются результатом 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 5-АЛК. Экспрессия гена flp позитивно регулируется светом, а в условиях темнового роста – интермедиатами биосинтеза хлорофилла: протопорфирином IX, Mg-протопорфирином и протохлорофиллидом. Недавно было установлено, что у описанного еще в 1974 году мутанта ячменя *tigrina-d*, накапливающего протохлорофиллид в темноте (Nielsen, 1974), мутантный ген, является ортологом гена *flu Arabidopsis thaliana* (Lee et al., 2003).

Светонезависимый биосинтез хлорофиллида. В настоящее время обнаружено три гена, необходимые для восстановления протохлорофиллида в темноте. У Rhodobacter capsulatus они были обозначены как гены bchB, bchL и bchN, а их ортологи, позднее найденные в геномах хлоропластов эукариот, получили названия: chlB, chlL и chlN. Эти гены кодируют три субъединицы (B, L, N) темнового фермента НАДФН-протохлорофиллид оксидоредуктазы (тПОР) (табл. 1, № 17), аминокислотные последовательности которых сходны с субъединицами фермента нитрогеназы – NifK, NifH, NifD, соответственно (Armstrong, 1998).

Темновое превращение протохлорофиллида в хлорофиллид – это важнейший этап биосинтеза хлорофилла.

Светозависимый биосинтез хлорофиллида. Этиолированные проростки высших растений, выращенные в темноте, окрашены в желтый цвет и морфологически отличаются от зеленых, растущих на свету. Их хлоропласты не содержат тилакоидов, а лишь мембранные пузырьки, и хлорофилла, биосинтез которого остановлен на стадии образования протохлорофиллида. Они представляют собой этиопласты с проламеллярным телом и отходящими от него протилакоидами, на которых аккумулируются стабильные комплексы светозависимой НАДФН-протохлорофиллид оксидоредуктазы (сПОР) (Ладыгин и др., 1973; Aronsson et al., 2003).

В клетках таких этиолированных проростков свет запускает процесс зеленения: Протохлорофиллид превращается в хлорофиллид и далее в хлорофилл. Затем сПОР перемещается в протилакоиды (Ryberg, Dehesh, 1986), и происходит дифференциация этиопластов в хлоропласты, когда проламеллярные тела и протилакоиды трансформируются в тилакоиды, которые формируют развитую ламеллярную систему (Ладыгин и др., 1973; Aronsson et al., 2003). Стартовым механизмом этих структурно-функциональных изменений служит поглощение света сПОР. К настоящему времени этот процесс зеленения *yellow* мутантов описан достаточно подробно (Беляева, Литвин, 2007; Чекунова, Ладыгин, 2014; Lebedev, Timko, 1998).

Биосинтез хлорофилла а. Последний этап формирования молекулы хлорофилла – это этерификация хлорофиллида *a* фитолом, т. е. присоединение фитольного "хвоста" к остатку пропионовой кислоты в позиции C17. Фермент, осуществляющий эту реакцию, был выделен из *Rhodobacter capsulatus* и назван бактериохлорофилл синтетазой (Bollivar et al., 1994). Найден был и ген, кодирующий этот фермент – *bchG*. Впоследствии в геномах *Chlamydomonas reinhardtii* и высших растений были обнаружены его ортологи – *chlG* (рис. 1, шаг 15) (Garcia-Gil et al., 2003). Фитол – это мононенасыщенный спирт ($C_{20}H_{39}OH$), который синтезируется из геранилгеранил-дифосфата, а затем подвергается редукции ферментом геранилгеранил-редуктазой с образованием фитил-дифосфата. 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: геранилгеранил-дифосфат и фитил-дифосфат.

На тилакоидных мембранах хлоропластов световая энергия поглощается светособирающими пигмент-белковыми комплексами двух фотосистем (ССК-I и ССК-II). Типичный апопротеин ССК-II связывает 17 молекул пигментов, из которых 3 – молекулы каротиноидов (ксантофиллов) и 14 молекул хлорофиллов (8 – хлорофилла *а* и 6 – хлорофилла *b*). Хлорофилл *b* – дополнительный пигмент растений, водорослей и прохлорофит, доля которого составляет 15–50% от общего содержания хлорофиллов.

Биосинтез хлорофилла b. В процессе биосинтеза хлорофилла b из хлорофиллида a или из хлорофилла a происходит последовательное двухступенчатое окисление метильной группы в положении 7 макроцикла до формильной. Реакцию катализирует фермент хлорофиллид/хлорофилл-*a*-оксигеназа (САО) в присутствии кислорода (Tanaka et al., 1998). У *Chlamydomonas reinhardtii* синтез хлорофилла *b* контролируется геном *cbn-1-48* (Ладыгин, 1976, 1988, 1991; Мирная и др., 1990; Чунаев и др., 1981, 1984; Chunaev et al., 1987). Субстратом для него может служить как хлорофиллид *a* так и хлорофилл *a* (рис. 1, шаги 15, 16).

Мутанты без хлорофилла *b* были впервые получены на *Arabidopsis thaliana* в 1963 году (Нігопо, Redei, 1963). Позднее, они были найдены у многих других высших растений, включая ячмень, кукурузу и рис. Генетический анализ десяти подобных мутантов ячменя показал, что к потере хлорофилла *b* ведут мутации из одной группы комплементации, свидетельствуя о том, что синтез хлорофилла *b* контролируется одним генетическим локусом (Simpson et al., 1985). Первый мутант без хлорофилла *b* у *Chlamydomonas reinhardtii* был получен в феврале 1972 года с помощью γ -излучения Cs¹³⁷ и описан в 1976 году (Ладыгин, 1976). После получения коллекции таких мутантов удалось установить, что отсутствие хлорофилла *b* обусловлено рецессивными мутациями в ядерном гене *cbn-1-48* (Мирная и др., 1990). Этот ген, позднее получивший название *CAO* (*chlorophyll-a-oxygease*) (рис. 2, шаг 16), был клонирован с помощью инсерционных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, не способных синтезировать хлорофилл *b* (Tanaka et al., 1998). В дальнейшем, его нуклеотидную последовательность использовали для поиска гомологичных генов в геномных и кДНК библиотеках *Arabidopsis thaliana* 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 A-домена накапливали хлорофилл b и погибали от обесцвечивания на свету (Yamasato et al., 2008). Авторы предположили, что Aдомен участвует в контроле биосинтеза хлорофилла b и необходим для защиты от фотодеструкции.

Список литературы

- *Беляева О.Б.* Светозависимый биосинтез хлорофилла. Под ред. проф. Ф.Ф. Литвина // Изд-во "БИНОМ. Лаборатория знаний". Москва. 2009. 232 с.
- Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. Фотоактивные пигмент-ферментные комплексы предшественника хлорофилла в листьях растений. Успехи биологической химии. 2007. Т. 47. С. 189–232.
- *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.
- Ладыгин В.Г. Коллекция штаммов мутантов Chlamydomonas reinhardtii Института почвоведения и фотосинтеза Академии наук СССР (ИПФС АН СССР) // Коллекции микроводорослей в СССР Отв. ред. Семененко В.Е. Изд-во АН СССР, НЦБИ Пущино. 1988. С. 104–122.
- *Ладыгин В.Г.* Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas* Института почвоведения и фотосинтеза АН СССР, Пущино // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. Отв. ред. Семененко В.Е. Изд-во РАН. Москва. 1991. С. 152–175.
- *Ладыгин В.Г.* Редукция мембранной системы хлоропластов при нарушении ранних этапов биосинтеза хлорофилла // Физиол. раст. 2006. Т. 53. № 1. С. 15–30.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1973. Т. 15. № 7. С. 810–817.

- Ладыгин В.Г., Чекунова Е.М., Семенова Г.А., Кособрюхов А.А. Структурно-функциональная организация клеток мутанта Brc-1 Chlamydomonas reinhardtii, накапливающего протопорфирин IX в темноте // Биофизика. 2014. Т. 59. № 4. С. 692–703.
- Мирная О.Н., Фомина-Ещенко Ю.Г., Чунаев А.С. Локализация мутации cbn-1 в первой группе сцепления ядерных генов Chlamydomonas reinhardtii // Генетика. 1990. Т. 26. С. 958–960.
- *Миронов А.Ф.* Биосинтез природных тетрапирролов // Соросовский образовательный журнал (СОЖ). 1998. № 7. С. 35–42.
- Чекунова Е.М., Ладыгин В.Г. Исследование генетического контроля биосинтеза и метаболизма хлорофилла с использованием мутагенеза и генной инженерии. В кн. «Фотосинтез: открытые вопросы и что мы знаем сегодня». Ред. Аллахвердиев С. И., Рубин А. Б., Шувалов В. А. Ижевский Институт компьютерных исследований, Ижевск-Москва, 2013. Глава 16. С. 535–615.
- Чекунова Е.М., Ладыгин В.Г. Исследование генетического контроля биосинтеза и метаболизма хлорофилла с использованием мутагенеза и генной инженерии. В кн. «Современные проблемы фотосинтеза». Ред. Аллахвердиев С. И., Рубин А. Б., Шувалов В. А. Ижевский Институт компьютерных исследований, Ижевск-Москва, 2014. Т. 2. Глава 22. С. 169–248.
- Чунаев А.С., Ладыгин В.Г., Гавриленко Т.А., Крэла Л.П., Корнюшенко Г.А. Наследование признака "отсутствие хлорофилла b" и изменчивость светособирающего комплекса в мейотическом потомстве мутанта C-48 Chlamydomonas reinhardtii // Генетика. 1981. Т. 17. № 11. С. 2013–2024.
- Чунаев А.С., Ладыгин В.Г., Мирная О.Н., Семенов Е.П., Гаевский Н.А., Болдина О.Н. Множественный аллелизм в гене *cbn-1*, контролирующем накопление хлорофилла *b* у *Chlamydomonas reinhardtii* // Генетика. 1984. Т. 20. № 5. С. 775–781.
- Шалыго Н.В., Чекунова Е.М., Чунаев А.С., Аверина Н.Г. Анализ состава порфиринов в мутантах Chlamydomonas reinhardtii // Изв. АН БССР. Сер. Биол. наук. 1990. № 4. С. 53–57.
- Шестаков С.В. Молекулярная генетика фотосинтеза // Соросовский образовательный журнал (СОЖ). 1998. № 9. С. 22–27.
- 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.
- 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.
- Beale S.I. Enzymes of chlorophyll biosynthesis // Photosynthesis research. 1999. V. 60. P. 43-73.
- 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.
- *Chunaev A.S., Ladygin V.G., Kornyushenko G.A., Gaevsky N.A., Mirnaya O.N.* Studies on chlorophyll-*b*-less mutant in *Chlamydomonas reinhardtii* // Photosynthetica. 1987. V. 21. № 3. P. 301–307.
- *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 and Development. 2005.V. 19(1). P. 176–187.
- *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.
- *Granick S.* Magnesium porphyrin formed by barley seedlings treated with 5-aminolevulinic acid // Plant Physiology. 1959. Suppl. 34. P. 18.
- *Hirono Y., Redei G.P.* Multiple allelic control of chlorophyll b level in *Arabidipsis taliana* // Nature. 1963. V. 197. P. 1324–1325.

- *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.
- Lebedev N., Timko M. Protochlorophyllide photoreduction // Photosynth. Res. 1998.V. 58. P. 5–23.
- 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. 2003. V. 553. № 1–2. P. 119–124.
- 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.
- *Masuda T., Fujita Y.* Regulation and evolution of chlorophyll metabolism // Photochem Photobiol Science. 2008. V. 7. P. 1131–1149.
- *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.
- *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.
- 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. 12826–12831.
- *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.
- *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.
- *Reinbothe S., Reinbothe Ch.* Regulation of chlorophyll biosynthesis in angiosperms // Plant Physiology. 1996. V. 111. P. 1–7.
- *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.
- 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.
- 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.
- Skinner J.S., Timko M.P. Differential expression of genes encoding the light-dependent and lightindependent enzymes for protochlorophyllide reduction during development in loblolly pine // Plant Mol Biology. 1999. V. 39. № 3. P. 577–592.
- Tanaka A., Ito H., Tanaka R., Tanaka N.K., Yoshida K., Okada K. Chlorophyll a oxygenase (CAO) is involved in chlorophyll b formation from chlorophylla // PNAS, USA. 1998. V. 95. № 21. P. 12719–12723.
- *Timko M.P.* Pigment biosynthesis: chlorophylls, heme and carotenoides. The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in *Chlamydomonas*. Eds. Rochaix J.-D., Goldschmidt-Clermont M., Merchant S. // Kluwer Acad. Publ. 1998. P. 377–414.
- 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.

ГЛАВА Х

БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХЛОРОФИЛЛ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Состав хлорофиллов и каротиноидов в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* практически не отличается от состава пигментов хлоропластов высших растений. Кроме того, биохимический состав хлорофилл-белковых комплексов и их организация и взаимодействие в фотосистеме I и в фотосистеме II, а также их светособирающих комплексов не отличается от таковых в хлоропластах высших растений.

1. Содержание хлорофилла в комплексах фотосистем

Учитывая, что специфичность белков-носителей в комплексах играет решающую роль в локализации хлорофилла, можно было ожидать потерю в каждом конкретном мутанте именно той части хлорофилла, которая была связана с утраченным в результате мутации комплексом. Исследования, проведенные нами (Ладыгин, 1980; Ладыгин и др., 1983), полностью подтвердили эту гипотезу и позволили установить, что потеря любого хлорофилл-белкового комплекса у мутантов сопровождалась уменьшением определенного количества (табл. 1) пигментов в расчете на клетку с характерными спектральными, биохимическими и фотохимическими свойствами (Ладыгин, 1980, 1993; Ладыгин и др., 1988, 1989; Лебедев и др., 1990). Так, у мутанта С-48 и всех хлорофилл *b*-дефицитных мутантов (Чунаев и др., 1984; Chunaev, 1990) не формировался светособирающий хлорофилл-*a/b*белковый комплекс II (ССК-II) и терялся весь хлорофилл *b* (Ладыгин и др., 1983). При этом доля связанного с этим комплексом и соответственно утраченного хлорофилла *a* составляла около 30% от содержания его в клетках дикого типа (Ладыгин и др., 1989).

Штомал	Хлорофилл а	Каротиноиды	Хлорофилл а	Каротиноиды	Хлорофилл а/
штаммы	мкг/10 ⁷	клеток	мг/г сыро	ой массы	Каротиноиды
K(+)*	22.3 ± 0.7	6.5 ± 0.6	6.76 ± 0.28	2.09 ± 0.19	3.2–3.4
C-48	15.2 ± 0.6	4.5 ± 0.5	5.31 ± 0.36	1.29 ± 0.27	3.4–4.1
CC-107	9.2 ± 0.8	3.4 ± 0.3	2.16 ± 0.47	0.84 ± 0.14	2.6–2.7
ACC-11	3.6 ± 0.7	3.2 ± 0.6	0.62 ± 0.09	0.55 ± 0.11	1.1–1.2
ACC-14	3.2 ± 0.5	2.9 ± 0.4	0.55 ± 0.07	0.50 ± 0.08	1.1–1.5
ACC-42	3.3 ± 0.4	2.7 ± 0.5	0.57 ± 0.06	0.47 ± 0.09	1.1–1.3
ACC-66	2.0 ± 0.4	1.9 ± 0.5	0.35 ± 0.08	0.32 ± 0.02	1.0–1.1
ACC-98	2.3 ± 0.5	1.9 ± 0.3	0.40 ± 0.04	0.27 ± 0.09	1.2–1.5
ACC-100	2.8 ± 0.4	2.1 ± 0.5	0.45 ± 0.11	0.28 ± 0.05	1.3–1.6
ACC-238	2.3 ± 0.3	1.7 ± 0.4	0.42 ± 0.06	0.28 ± 0.06	1.4–1.5

Таблица 1. Содержание пигментов (хлорофилла *a** и каротиноидов) в клетках дикого типа и одинарных, двойных и тройных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*

Примечание. С-48 – одинарный мутант, не содержащий ССК-II и хлорофилла *b*; СС-107 – двойной мутант, без светособирающих комплексов, содержащий только РЦ ФС-I и РЦ ФС-II; АСС-11, АСС-14, АСС-42 – тройные мутанты, содержащие только комплексы РЦ ФС-I; АСС-66, АСС-98, АСС-100, АСС-238 – тройные мутанты, содержащие только комплексы РЦ ФС-II. *K(+) – штамм дикого типа 137С mt(+) дополнительно содержит хлорофилл *b*: 9.8 мкг/10⁷ клеток или 2.54 мг/г сырой массы. Одинарные мутанты С-10 и С-42, утратившие светособирающий хлорофилл-белковый комплекс I (ССК-I), накапливали на 20–30% меньше пигментов, чем клетки дикого типа (Ладыгин, 1993; Ладыгин и др., 1989). А двойной мутант СС-107, не содержащий обоих светособирающих комплексов, накапливал хлорофилла на 60–70% меньше, чем в контроле (Ладыгин, 1993, 1998; Ладыгин и др., 1989). Эти данные давали основание утверждать, что именно такое количество хлорофиллов (в том числе весь хлорофилл *b*) входит в состав светособирающих комплексов.

Исследования одинарных нефотосинтезирующих мутантов А-66 и А-90, утративших хлорофилл белковые комплексы реакционных центров ФС-I (СР-I) или ФС-II (СР-II) (Ладыгин, 1980), а также тройных мутантов, содержащих в чистом виде только один из этих комплексов, позволили установить (табл. 1), что на долю комплекса РЦ ФС-I (мутанты АСС-11, АСС-14 и АСС-42) приходится 15–20% хлорофилла *a*, а на долю комплекса РЦ ФС-II (мутанты АСС-66, АСС-98, АСС-100 и АСС-238) – 10–15% хлорофилла *a* от общего его содержания в клетках дикого типа K(+) (Ладыгин, 1993, 1998; Ладыгин и др., 1989).



Рис. 1. Гель-электрофорез хлорофилл-белковых комплексов мембран хлоропластов клеток дикого типа К(+) и двойных мутантов: СС-107, содержащего только комплексы РЦ ФС-I (СР-I) и РЦ ФС-II (СР-II), и гибрида А-66-90, содержащего только светособирающие комплексы: ССК-I (LH₀ + LH_x) и ССК-II (LH₁ + LH₂ + LH₃).

Цифрами показаны величины молекулярных масс (мол. м.). У мутанта А-66-90 полоса LH_x выявляется над полосой LH₁ в результате частичного нарушения структуры LH_x.

Изменения в содержании каротиноидов были менее значительными (Ладыгин и др., 1990; Пакшина и др., 1991) и, по-видимому, не являлись прямым следствием мутаций. Вероятно. были обусловлены либо плейотропным действием они генов, либо взаимозависимым синтезом пигментов деструктивными изменениями мембран И

хлоропластов в результате потери хлорофилла пигмент-белковых комплексов (Ладыгин и др., 1980, 1989, 1990; Семенова, Ладыгин, 1985).

2. Идентификация хлорофилл-белковых комплексов

Для установления прямой связи изменений в содержании пигментов и идентификации принадлежности отдельных хлорофилл-содержащих полос в геле к определенным комплексам необходимо было провести анализ мембран хлоропластов мутантов методом гель-электрофореза. Лучше это было сделать, исследуя двойные мутанты (рис. 1), содержащие только комплексы РЦ ФС-I и РЦ ФС-II (СС-107) или только ССК-I и ССК-II (А-66-90) в сравнении с клетками дикого типа K(+). Мы установили, что в геле можно выявить по одной полосе хлорофилл-*a*-белковых комплексов реакционного центра ФС-I (СР-I) или реакционного центра ФС-II (СР-II) и три хлорофилл-содержащие полосы (LH₁, LH₂, LH₃), принадлежащие светособирающему хлорофилл-*a*/*b*-белковому комплексу II (ССК-II), и две полосы (LH₀ и LH_x), принадлежащие светособирающему хлорофилл-*a*(или *a/b*)-белковому комплексу I (ССК-I), а также одну полосу свободных пигментов (FP), содержащую не связанные с белком хлорофилл *a* и каротиноиды (Ладыгин и др., 1983).

3. Полипептидный состав индивидуальных комплексов

Мы исследовали состав полипептидов мутантов, не способных к синтезу определенных пигмент-белковых комплексов (Лебедев и др., 1990; Хатыпов и др., 1995). На основании всестороннего анализа различных мутантов было показано (Лебедев и др., 1990; Хатыпов и др., 1995), что у *Chlamydomonas*, как и у высших растений (Svensson et al., 1991; Ikeushi, 1992a; Ikeushi, 1992b), светособирающий хлорофилл-*a/b*-белковый комплекс II (ССК-II) содержит три основных полипептида с мол. м. 26, 28 и 31 кДа. В состав светособирающего хлорофилл-белкового комплекса I (ССК-I) входят также три полипептида с мол. м. 23, 25 и 34 кДа (Лебедев и др., 1990).

Основными полипептидами хлорофилл-*а*-белкового комплекса ФС-I являются хлорофилл-содержащие полипептиды 65 и 68 кДа, образующие внутреннюю антенну реакционного центра ФС-I. Важным условием для формирования и агрегации наивного комплекса ФС-I является наличие полипептида 19 кДа (Же-S-белка). У мутантов, утративших этот низкомолекулярный полипептид, весь комплекс ФС-I не формируется (Лебедев и др., 1990).

Аналогичным образом происходит формирование и агрегация хлорофилл-*а*-белкового комплекса РЦ ФС-II. В этом комплексе основными хлорофилл-содержащими белками являются высокомолекулярные полипептиды 47 и 51 кДа (СР43, СР47), образующие внутреннюю антенну реакционного центра ФС-II. Однако для нормального формирования комплекса, включающего помимо указанных выше полипептидов и гербицид-связывающий белок Д1 (32 кДа), необходим еще Д2-белок (30 кДа). Если у мутантов нарушается синтез полипептида 30 кДа, то у них не происходит образование и агрегация всего комплекса ФС-II (Лебедев и др., 1990). Более детально охарактеризован полипептидный состав у высших растений (Svensson et al., 1991; Ikeushi, 1992a, 1992b; Bassi et al., 1992; Zilber, Malkin, 1992).

Список литературы

Ладыгин В.Г. Получение гибридного штамма *Chlamydomonas reinhardtii* с неактивными ФС-I и ФС-II и установление трех типов антенного хлорофилла в клетках *in vivo* // Генетика. 1980. Т. 16. С. 994–1001.

- *Ладыгин В.Г.* Генетическая детерминация фотосистем и структурно-функциональная организация мембран хлоропластов // Автореф. дисс. докт. биол. наук. Пущино: ИПФС РАН. 1993. 49 с.
- Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиол. растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741–762.
- Ладыгин В.Г., Аллахвердиев С.И., Ананьев Г.М., Климов В.В., Мальцев С.В. Функциональная характеристика фотосистемы 2 мутантов Chlamydomonas reinhardtii, не содержащих светособирающего комплекса и фотосистемы 1 // Физиология растений. 1988. Т. 35. С. 14–23.
- Ладыгин В.Г., Аллахвердиев С.И., Четвериков А.Г. Влияние редукции светособирающего комплекса на величину фотосинтетической единицы и число реакционных центров фотосистем у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Биофизика. 1990. Т. 35. С. 280–284.
- *Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В.* Фотохимические свойства и структура мембран хлоропластов гибридного штамма *Chlamydomonas* с неактивными ФС-1 и ФС-2 // Физиология растений. 1980. Т. 27. С. 91–97.
- *Лебедев Н.Н., Тан Цзунчин, Ладыгин В.Г.* Полипептидный состав и формирование пигментбелковых комплексов в мутантах *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 2072–2077.
- Ладыгин В.Г., Фомина И.Р., Биль К.Я., Москаленко А.А., Ширшикова Г.Н. Хлорофиллбелковые комплексы зеленых водорослей и высших растений. 1. Идентификация хлорофилл-содержащих полос в геле с использованием мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Биохимия. 1983. Т. 48. С. 1421–1428.
- Ладыгин В.Г., Ширшикова Г.Н., Аллахвердиев С.Н., Четвериков А.Г. Экспериментальный мутагенез в исследованиях фотосистем как ключевых звеньев фотосинтеза и продуктивности растений // Биопродуктивность агроценозов как комплексная проблема. Пущино: ОНТИ НЦБИ. 1989. С. 123–140.
- Пакшина Е.Н. Лебедев Н.Н., Ладыгин В.Г., Красновский А.А. Состав хлорофилл-белковых комплексов и содержание каротиноидов в мутантах хламидомонады // Физиология растений. 1991. Т. 38. С. 655–661.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г. Структурная организация мембран тилакоидов мутанта хламидомонады, лишенного светособирающего комплекса и фотосистемы 1 // Физиология растений. 1985. Т. 32. С. 223–230.
- Хатыпов Р.А., Ширшикова Г.Н., Ладыгин В.Г., Шувалов В.А. Полипептидный состав мембран тилакоидов мутантов Chlamydomonas reinhardtii с неактивной фотосистемой 2 // Биохимия. 1995. Т. 60. С. 573–577.
- Чунаев А.С., Ладыгин В.Г., Мирная О.Н., Семенов Е.П., Гаевский Н.А., Болдина О.Н. Множественный аллелизм в гене cbn-1, контролирующем накопление хлорофилла b у Chlamydomonas reinhardtii // Генетика. 1984. Т. 20. С. 775–781.
- Bassi R., Soen S.Y., Krank C., Zuber H., Rochaix J.D. Characterization of chlorophyll-a/b-protein of photosystem I from Chlamydomonas reinhardtii // J. Cell Biol. 1992. V. 267. P. 25714–25721.
- *Chunaev A.S.* Genetics of Photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // Photosynthetica. 1990. V. 24. P. 283–308.
- Ikeushi M. Subunit Proteins of Photosystem I // Plant Cell Physiol. 1992a. V. 33. P. 669–679.
- Ikeushi M. Subunit Proteins of Photosystem II // Bot. Mag. Tokyo. 1992b. V. 105. P. 327-337.
- Svensson P., Andersson E., Albertsson P.A. Heterogeneity among Photosystem I // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1060. P. 45–50.
- *Zilber A.L., Malkin R.* Organization and Topology of Photosystem I Subunits // Plant Physiol. 1992. V. 99. P. 901–911.

ГЛАВА ХІ

СПЕКТРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НАТИВНЫХ ХЛОРОФИЛЛ-БЕЛКОВЫХ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

В настоящее время установлено, что весь хлорофилл в хлоропластах зеленых водорослей и высших растений локализован в пигмент-белковых комплексах фотосистем. Основная часть хлорофилла а до 50-60% и весь хлорофилл b связаны с белками светособирающих хлорофилл-*а/b*-белковых комплексов фотосистемы I и фотосистемы II (ССК I и ССК II). Остальная часть 40-50% хлорофилла *а* входит в состав ядровых хлорофилл-а-белковых комплексов реакционных центров фотосистемы I и фотосистемы II (РЦ ФС-І и РЦ ФС- ІІ) (Ладыгин, 1993, 1998). Причем особо следует отметить, что в зависимости от того с каким из белков связаны молекулы хлорофилла, будет зависеть их пространственная локализация в мембранах тилакоидов, их взаимодействии между собой, а, следовательно, и их спектры поглощения и излучения флуоресценции хлорофилла каждого из четырех индивидуальных пигмент-белковых комплексов. Из-за высокой интенсивности миграции энергии со светособирающих комплексов I и II на комплексы реакционных центров ФС-I и ФС- II при комнатной температуре (20-25°С) мы не можем наблюдать максимумы поглощения и флуоресценции хлорофилла индивидуальных комплексов. Чтобы установить их максимумы поглощения и флуоресценции, необходимо заморозить в жидком азоте образцы и блокировать миграцию энергии между комплексами, используя метод второй или четвертой производной спектров поглощения и флуоресценции. Именно методы низкотемпературные (-196°С), производные спектрофотометрии, были использованы нами для установления индивидуальных форм хлорофилла и максимумов излучения флуоресценции каждого из четырех нативных комплексов с помощью модельных объектов: одинарных, двойных и тройных пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii (Ладыгин, 1979, 1991, 1993, 1998; Ладыгин и др., 1979; Ладыгин, Лебедев, 1986).

1. Спектральные формы хлорофилла нативных комплексов

Все высшие растения и зеленые водоросли имеют два типа молекул хлорофиллов a и b. В экстракте каждый из этих пигментов имеет только один максимум поглощения, например, в ацетоне при 662 и 644 нм соответственно. Не выявляются в экстракте другие максимумы и при использовании производной спектрофотометрии (Ладыгин, 1985). В то же время в хлоропластах живых клеток известны две формы хлорофилла b и, по-видимому, семь основных форм хлорофилла a (Ладыгин, 1980, 1985). Одной из главных причин, изменяющих спектральные свойства молекулы хлорофилла *in vivo*, является его взаимодействие со специфическими белками мембран хлоропластов, генетическое нарушение которых ведет к потере активности реакционных центров ФС-I или ФС-II в зависимости от того, какой из белков утрачен в результате мутации. Проведенные нами исследования мутантов: 1) А-66 с неактивной ФС-I, 2) А-90 с неактивной ФС-II и 3) А-66-90 с неактивными обеими фотосистемами позволили установить различные спектральные формы хлорофилла в нативных пигмент-белковых комплексах мембран хлоропластов (Ладыгин, 1980, 1985, 1998), что с использованием других методов сделать невозможно.

Использование целых клеток мутантов позволило установить (рис. 1), что формы хлорофилла a с максимумами поглощения при 689, 698 и 703 нм входят только в состав хлорофилл-a-белкового комплекса ФС-I и выполняют функции внутренней антенны ее реакционного центра Π_{700} . Утрата комплекса ФС-I (мутант А-66) приводит к исчезновению этих полос поглощения в спектре.

Формы хлорофилла *а* 661, 673, 685 нм с основным длинноволновым максимумом при 685 нм (Ладыгин, 1985) входят в состав хлорофилл-*а*-белкового комплекса реакционного

центра ФС-II. Мутант А-90, утративший этот комплекс, теряет соответствующие формы хлорофилла и выполняет функции внутренней антенны ее реакционного центра Π_{680} . Сохранение у гибридного штамма А-66-90 с неактивными обеими фотосистемами форм хлорофилла *b* при 644 и 649 нм и форм хлорофилла *a* с максимумами поглощения при 661, 667 и 678 им указывало на принадлежность этих форм хлорофилла к светособирающим комплексам (Ладыгин, 1970, 1993, 1998).



Рис. 1. Спектры поглощения хлорофилла (А – сплошная линия) и их вторые производные ($\Delta^2 A / \Delta \lambda^2$ – пунктирная линия) при температуре –196°С клеток дикого типа K(+) и мутантов: без ФС-I (А-66), без ФС-II (А-90) и гибрида без обеих фотосистем (А-66-90). Спектры второй производной для удобства представлены максимумами вверх.



Рис. 2. Спектры поглощения хлорофилла (А – сплошная линия) и их вторые производные ($\Delta^2 A / \Delta \lambda^2$ – пунктирная линия) при температуре –196°С тройных мутантов, содержащих чистые ССК-II (ВФ-5-16) или ССК-I (А-66-90-1), а также выделенных из клеток дикого типа К(+) с помощью гель-электрофореза хлорофилл-белковых полос; LH₃ (мономер ССК-II) и LH₀ (олигомер ССК-I). Спектры второй производной для удобства представлены максимумами вверх.

Для подтверждения этих выводов мы провели исследование на полученных нами тройных мутантах. Впервые на целых клетках удалось установить конкретные спектральные формы хлорофиллов этих комплексов: а) для нативного светособирающего хлорофилл-a/b-белкового комплекса II (ССК-II) 649, 661, 667, 676 нм и б) для нативного светособирающего хлорофилл-a/b-белкового комплекса I (ССК-I) 644, 661, 663, 671, 681 нм (рис. 2).

2. Максимумы флуоресценции хлорофилла нативных комплексов

Известно, что клетки дикого типа *Chlamydomonas reinhardtii* имеют три характерные полосы в спектре излучения флуоресценции хлорофилла при –196°С с максимумами при 686, 697 и 715 нм и слабо выраженный максимум в области 678–681 нм (рис. 3).



Рис. 3. Спектры излучения флуоресценции хлорофилла (F – сплошная линия) и их вторые производные ($\Delta^2 F/\Delta \lambda^2$ – пунктирная линия) при температуре –196°С клеток дикого типа K(+), двойных мутантов: содержащих только ФС-I и ФС-II (СС-107) или светособирающие комплексы ССК-I и ССК-II (А-66-90), а также тройных мутантов: с высоким содержанием комплекса ФС-I (АСС-14) и накапливающих только комплекс ФС-II (АСС-66) или светособирающий хлорофилл-*a/b*-белковый комплекс ССК-II (ВФ-5-16). Спектры второй производной для удобства представлены максимумами вверх.

Двойные мутанты (СС-107), содержащие только хлорофилл-*а*-белковые комплексы РЦ ФС-I и РЦ ФС-II, имели три четких максимума при 686, 697 и 720 нм. В то же время клетки гибрида А-66-90, содержащие только светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы I (ССК-I) и II (ССК-II), имели два хорошо выраженных максимума при 681 и 707 нм (Лебедев и др., 1990; Lebedev et al., 1988). Эти факты давали основание утверждать, что каждому из нативных хлорофилл-белковых комплексов свойственны строго определенные полосы излучения флуоресценции хлорофилла.

Для получения прямого ответа на вопрос о том, какие полосы флуоресценции принадлежат каждому из комплексов, мы изучили тройные мутанты, содержащие в нативном состоянии только по одному из хлорофилл-белковых комплексов. Исследование их спектров флуоресценции однозначно показало, что в нативном состоянии комплексу РЦ ФС-І принадлежит полоса излучения при 720 нм (ACC-14), а комплексу РЦ ФС-ІІ принадлежат две полосы излучения при 686 и 697 нм (ACC-66), светособирающему хлорофилл-*a/b*-белковому комплексу II (CCK-II) – полоса при 681 им (ВФ-5-16), а светособирающему хлорофилл-*a/b*-белковому комплексу I (ССК-I) – полоса при 707 нм. Детальный анализ мутантов, у которых генетически блокировано формирование одного, двух или трех пигмент-белковых комплексов, позволил установить для *Chlamydomonas* наличие двух длинноволновых полос излучения при 707 и 720 нм, обусловливающих суммарную длинноволновую полосу флуоресценции клеток дикого типа при 715 нм (Ладыгин, Лебедев, 1986; Лебедев и др., 1990; Ладыгин, 1993, 1998).



Рис. 4. Схема 4-х компонентной организации фотосистем, показывающая закономерность распределения спектральных форм хлорофилла между пигмент-белковыми комплексами и полосы излучения флуоресценции каждого из них. F – флуоресценция, Z – комплекс фотоокисления воды, Xл – хлорофилл, C-цикл – углеродный цикл.

Таким образом, проведенные нами биохимические и спектральные исследования одинарных, двойных, тройных нефотосинтезирующих мутантов и гибридного штамма в сравнении с клетками дикого типа привели к заключению о существовании в хлоропластах 4-х типов различных хлорофилл-белковых комплексов: двух, принадлежащих реакционным центрам Φ C-I (CP-I) и Φ C-I (CP-I), и двух, связанных с ними, светособирающих комплексов I (CCK-I) и II (CCK-II) (рис. 4). Важно отметить, что установленная нами универсальная закономерность распределения спектральных форм хлорофилла для *Chlamydomonas* (Ладыгин, 1993, 1998) была подтверждена нами на морских многоклеточных зеленых, бурых и красных водорослях, на эвглене, хлорелле и на высших растениях как хвойных, так и лиственных С₄- и C₃-растениях, причем как при генетической блокировке, так и при метаболической редукции комплексов (Ладыгин, 1979; Ладыгин и др., 1992; Ladygin, Bil', 1981). Мы полагаем, что светособирающие комплексы ССК-I и ССК-II передают энергию возбуждения хлорофилла на комплексы реакционных центров Φ C-I (CP-I) и Φ C-II (CP-II), соответственно, практически со 100% эффективностью.

Список литературы

- *Ладыгин В.Г.* Спектральные формы хлорофилла мутантов *Chlamydomonas* с неактивными фотосистемами // Биофизика. 1979. Т. 24. Вып. 2. С. 254–259.
- *Ладыгин В.Г.* Получение гибридного штамма *Chlamydomonas reinhardtii* с неактивными ФС-I и ФС-II и установление трех типов антенного хлорофилла в клетках *in vivo* // Генетика. 1980. Т. 16. С. 994–1001.
- *Ладыгин В.Г.* Спектральные свойства хлорофилл-*а*-белкового комплекса фотосистемы II в нативном состоянии // Физиология растений. 1985. Т. 32. С. 851–859.
- *Ладыгин В.Г.* Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas* Института почвоведения и фотосинтеза АН СССР, Пущино // Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. Отв. ред. Семененко В.Е. Изд-во РАН. Москва. 1991. С. 152–175.
- *Ладыгин В.Г.* Генетическая детерминация фотосистем и структурно-функциональная организация мембран хлоропластов // Автореф. дисс. докт. биол. наук. Пущино: ИПФС РАН. 1993. 49 с.
- Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиол. растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741–762.
- *Ладыгин В.Г., Биль К.Я., Божок Г.В.* Формы хлорофилла и структура хлоропластов мутантов гороха с неактивной фотосистемой I или фотосистемой II // Физиология растений. 1982. Т. 29. С. 479–487.
- *Ладыгин В.Г., Лебедев Н.Н.* Спектры флуоресценции хлорофилла фотосистемы 1, фотосистемы 2 и светособирающего комплекса *Chlamydomonas reinhardtii* // Мол. биол. 1986. Т. 20. С. 407–414.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Спектральные формы хлорофилла и структура хлоропластов мутантов *Chlamydomonas* с нарушениями в светособирающих пигментах // Биофизика. 1979. Т. 24. Вып. 4. С. 681–678.
- Лебедев Н.Н., Тан Цзунчин, Ладыгин В.Г. Полипептидный состав и формирование пигментбелковых комплексов в мутантах *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 2072–2077.
- *Ladygin V.G., Bil' K.Ya.* Chlorophyll form of 684 nm as antenna of photosystem II in chloroplasts of C₄ plant leaves // Photosynthetica. 1981. V. 15. P. 49–54.
- Lebedev N.N., Khatypov R.A., Ladygin V.G. Fluorescence excitation spectra and decay kinetics of light-harvesting complex in *Chlamydomonas reinhardtii* Mutants // Photosynthetica. 1988. V. 22. P. 364–370.

ГЛАВА ХІІ

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ФОТОСИСТЕМ ХЛОРОПЛАСТОВ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

В настоящее время накопилось уже достаточно результатов, чтобы признать 4компонентную организацию фотосистем (Govindjee, Govindjee, 1975). Однако возникал вопрос, как будут функционировать нативные комплексы РЦ ФС-I и ФС-II при утрате светособирающих комплексов. Эффективно и быстро выполнить такую работу можно было только на живых клетках мутантов.

1. Фотосинтетическая активность

В работе были использованы клетки дикого типа K(+), мутанта C-48 без хлорофилл b, утратившего светособирающий хлорофилл a/b-белковый комплекс II (CCK-II, двойного мутанта CC-107, не содержащего обоих светособирающих комплексов CCK-I и CCK-II, а также тройных мутантов, имеющих только комплексы РЦ ФС-I (мутанты ACC-11, ACC-14, ACC-42) или ФС-II (мутанты ACC-66, ACC-98, ACC-100, ACC-238).

При импульсном освещении у всех мутантов, содержащих Φ C-II, наблюдали (табл. 1) осцилляции с периодичностью максимального выделения O_2 на 3–4 вспышки (Ладыгин и др., 1988). Наличие осцилляций указывало на нормальное функционирование ферментной системы формирования O_2 . Высокий уровень стационарного выделения O_2 при импульсном освещении подтверждал нормальное функционирование системы окисления H_2O и реакционного центра Φ C-II (Ладыгин и др., 1988, 1989).

Таблица 1. Характеристика функционального состояния электрон-транспортной цепи хлоропластов клеток дикого типа и мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* по их способности к фотосинтетическому выделению кислорода (Ладыгин и др., 1988)

	Импульсно	е освещение	Непрерывн	ое освещение	BUYOT O.	Темновой	
Штаммы	Осцилляции выделения O_2 $(V_{\text{макс}} - V_{\text{мин}})$ Стационарный уровень O_2 $(V_{\text{стац}})$ Первичный выброс O_2 $(V_{\text{макс}})$ Стационарное выделение O_2 $(V_{\text{стац}})$				выход О ₂ на 1-ю и 2-ю вспышки (V ₁ , V ₂)	выброс O ₂ после освещения (V _{темн})	
K(+)	++	++	++	+++	_	_	
C-48	++	++	+++	++	+	+	
CC-107	+	+	++	++	+	+	
ACC-11	—	—	—	—	—	—	
ACC-14	—	—	—	—	—	—	
ACC-42	—	—	—	—	—	—	
ACC-66	++	++	+++	—	—	—	
ACC-98	++	++	+++	_	_	_	
ACC-100	++	++	+++	_	_	_	
ACC-238	+	+	+++	+	_	_	

Примечание. Знаком (+) показано наличие слабой, нормальной (++) и высокой (+++) активности по данному показателю, а знаком (-) – ее отсутствие. ($V_{\text{макс}}-V_{\text{мин}}$) – показатели работы ферментной системы формирования O₂; $V_{\text{стац}}$ – показатель работы системы окисления H₂O и реакционного центра ФС-II; $V_{\text{макс}}$ – показатель работы реакционного центра ФС-II и системы фиксации CO₂; V_1 , V_2 – критерии образования O₂ на первую и вторую вспышки света; $V_{\text{темн}}$ – темновое выделение O₂ при дисмутации H₂O₂.

При непрерывном освещении клеток мутантов, сохранивших Φ C-II, первичный выброс O_2 был либо равный с клетками дикого типа K(+), либо превышал его, что указывало на сохранение нормального функционирования пула пластохинонов Φ C-II. Однако высокий стационарный уровень выделения O_2 мы отмечали только в клетках дикого типа K(+), а у мутантов C-48 и CC-107 для достижения максимального уровня требовалась более высокая интенсивность освещения из-за потери одного или обоих светособирающих комплексов.

Способность стационарного выделения O_2 характеризовала нормальную работу электронно-транспортной цепи хлоропластов, включая функциональную активность ФС-I, ФС-II и системы темновой фиксации CO₂. Отсутствие комплекса ФС-I у тройных мутантов (АСС-66, АСС-98, АСС-100 и АСС-238) не позволяло длительно поддерживать высокий уровень выделения O₂, поскольку после восстановления пула пластохинонов ФС-II скорость выделения O₂ в них резко падала, но, как правило, не до нуля. Нами было установлено, что такой эффект обусловлен тем, что в отсутствие ФС-I, хотя и с низкой скоростью, возможен перенос электрона от ФС-II на НАДФ или гидрогеназу с выделением H₂ (Бойченко и др., 1986; Ладыгин и др., 1988).

Таким образом, используя мутанты, нам удалось доказать, что в отсутствие светособирающих комплексов сохранялась потенциально нормальная активность комплексов реакционных центров. Однако уменьшение в содержании хлорофилла требовало более высокой освещенности. Чтобы оценить как изменялись величина фотосинтетической единицы и число реакционных центров, мы провели специальные исследования.

Таблица 2. Величина фотосинтетической единицы в клетках дикого типа К(+) и мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, рассчитанная по светоиндуцированным изменениям поглощения Π_{680} , феофитина, Π_{700} и сигналам ЭПР-I и ЭПР-II (Ладыгин и др., 1989, 1990)

Штаммы	Размер установленни	антенны ФС-І ый абсорбцион	и ФС-II, ным методом	Размер антенн II, определен ЭІ	Антенна ФС-I /	
	хлорофилл/	хлорофилл	хлорофилл/П	хлорофилл/П	хлорофилл/П	ФС-II
	Π_{680}	/Φeo	700	X	700	
K(+)*	875 ± 46	809 ± 73	624 ± 37	860 ± 97	881 ± 44	0.7 - 1.1
C-48	340 ± 32	300 ± 34	404 ± 41	300 ± 31	432 ± 68	1.2-1.4
CC-107	264 ± 86	158 ± 49	152 ± 56	233 ± 45	223 ± 43	0.6–1.1
ACC-11	0	0	143 ± 56	0	118 ± 29	_
ACC-14	0	0	128 ± 32	0	111 ± 24	_
ACC-42	0	0	118 ± 37	0	117 ± 24	_
ACC-66	48 ± 15	38 ± 16	0	67 ± 21	0	_
ACC-98	60 ± 14	46 ± 17	0	84 ± 26	0	_
ACC-100	57 ± 11	48 ± 12	0	95 ± 18	0	_
ACC-238	51 ± 18 42 ± 12 0 129 ± 34 0		_			

Примечание. Нуль указывает на отсутствие реакционных центров ФС-I или ФС-II. П₆₈₀ – хлорофилл, Фео – феофитин и Пх[–] – пластосемихинон реакционного центра ФС-II, а П₇₀₀ – хлорофилл, П₇₀₀⁺ – парамагнитные центры ФС-I.

2. Величина фотосинтетической единицы

Ранее (Ладыгин и др., 1989; Ладыгин, 1993, 1998) мы отмечали, что в результате мутаций, приводящих к потере ССК-I или II и комплексов РЦ ФС-I или ФС-II, накопление хлорофилла уменьшалось. Каждый из этих комплексов содержал примерно 25, 50 и 15, 10% соответственно (Ладыгин и др., 1989; Wollman, Bennoun, 1982). Столь существенные

изменения в накоплении хлорофиллов снижали величину фотосинтетической единицы, рассчитанную по соотношению общего содержания молекул хлорофилла на число молекул хлорофилла П₇₀₀ реакционных центров ФС-I или феофитина и хлорофилла П₆₈₀ реакционных центров ФС-II (табл. 2).

Количественная оценка содержания реакционных центров Φ C-II и Φ C-I была проведена прямым их измерением. Реакционные центры Φ C-II анализировали по светоиндуцированному изменению поглощения молекул хлорофилла Π_{680} и феофитина, а Φ C-I – по хлорофиллу Π_{700} , а также по сигналам ЭПР-II и ЭПР-I соответственно. В этих исследованиях нами было установлено, что в клетках дикого типа K(+) величина фотосинтетической единицы составляла 620–880 молекул хлорофилла в расчете на один реакционный центр Φ C-I или Φ C-II.

Потеря светособирающего комплекса II у мутанта С-48 уменьшала размер фотосинтетической единицы до 300–430 молекул хлорофилла, а потеря обоих светособирающих комплексов I и II у мутанта СС-107 до 150–260 молекул хлорофилла. У тройных мутантов, содержащих только комплекс ФС-I (АСС-11, АСС-14, АСС-42), величина фотосинтетической единицы уменьшалась до 80–140 молекул хлорофилла, а чистый комплекс РЦ ФС-II в нативном состоянии у мутантов АСС-66, АСС-98, АСС-100, АСС-238) содержал 40–60 молекул хлорофилла (Ладыгин и др., 1988, 1990). Важно было знать, изменяется ли в нативном хлоропласте число РЦ ФС-I и ФС-II при столь существенном уменьшении содержания хлорофилла?

3. Число реакционных центров фотосистем

Обычно у штаммов, содержащих обе фотосистемы, соотношение реакционных центров Φ C-II/ Φ C-I колебалось от 0.6 до 1.4 в зависимости от функционального состояния хлоропластов и стадии онтогенеза клеток. У функционально активных хлоропластов оно близко к 1.0 или выше. В наших исследованиях было установлено, что в клетках дикого типа K(+) и мутантов C-48 с потерей одного и CC-107 с отсутствием обоих светособирающих комплексов число РЦ Φ C-I и Φ C-II существенно не изменялось в расчете на один хлоропласт (табл. 3).

Таблица 3. Число реакционных центров в клетках дикого типа К(+) и мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, рассчитанное по светоиндуцированным изменениям поглощения, феофитина (Ладыгин и др., 1989)

Штаммы	$n \times 10^6$ /хлоропласт			$n \times 10^{14}$ /г сырой массы			$n \times 10^{14}$ /мг хлорофилла			$\Pi \Psi C \Pi $
	П ₆₈₀	Фео	П ₇₀₀	П ₆₈₀	Фео	Π ₇₀₀	П ₆₈₀	Фео	Π_{700}	гц ФС-і
K(+)*	2.47	2.67	3.46	71.3	77.1	100.0	7.7	8.3	10.7	0.7–0.8
C-48	3.02	3.42	2.54	105.3	119.3	88.6	19.8	22.5	16.7	1.2–1.3
CC-107	2.35	3.93	4.09	55.2	92.2	95.8	26.3	42.7	44.5	0.6–1.0
ACC-11	0	0	1.77	0	0	31.6	0	0	47.1	—
ACC-14	0	0	1.84	0	0	42.1	0	0	52.7	—
ACC-42	0	0	2.06	0	0	51.4	0	0	57.1	—
ACC-66	2.75	3.48	0	49.2	62.1	0	140.5	177.4	0	—
ACC-98	2.58	3.37	0	45.0	58.7	0	112.5	146.8	0	—
ACC-100	3.31	3.93	0	53.2	63.1	0	118.1	140.3	0	_
ACC-238	3.09	3.75	0	55.5	67.4	0	132.1	160.4	0	—

Примечание. Представлены средние арифметические величины числа реакционных центров по 3–5 независимым экспериментам. Во всех опытах ошибка измерений не превышала 20%. См. примечание к табл. 2.

Даже при потере комплексов РЦ ФС-І или ФС-ІІ у тройных мутантов число оставшихся реакционных центров только ФС-І или ФС-ІІ на клетку и на один хлоропласт оставалось близким к контрольному. Однако в расчете на 1 мг хлорофилла относительное число реакционных центров ФС-І и ФС-ІІ по мере редукции светособирающих комплексов ССК-І и ССК-ІІ существенно возрастало, что, прежде всего, связано с уменьшением размера антенн. Этот факт указывал, во-первых, на отсутствие специфичности участия всех комплексов в организации фотосинтетических мембран хлоропластов, а во-вторых, на относительное обогащение оставшихся мембран хлоропластов у тройных мутантов реакционными центрами ФС-І и ФС-ІІ (Семенова, Ладыгин, 1985; Semenova, Ladygin, 1984). Известно, что между количеством мембран в хлоропластах и содержанием хлорофилла существует прямая коррелятивная связь (Ладыгин и др., 1973).

Колебания в числе центров ФС-I и ФС-II в расчете на грамм сырой массы обусловлены в основном различиями в накоплении метаболитов, преимущественно углеводов, в миксотрофных условиях. Аналогичные данные для нативных комплексов нам неизвестны. Однако если принять, что из основных полипептидов ФС-II только два высокомолекулярных 47 и 51 кДа содержат хлорофилл по 23-25 молекул (Ладыгин и др., 1990; de Vitry et al., 1984), то антенна каждого реакционного центра должна включать около 50 молекул хлорофилла. Эти данные хорошо согласуются с организацией нативных комплексов ФС-II у тройных мутантов АСС-66, АСС-98, АСС-100, АСС-238 Chlamydomonas, которые имеют 50±10 молекул хлорофилла на один РЦ ФС-II и обладают функциональными свойствами, характерными для клеток дикого типа. Содержание молекул хлорофилла нативного комплекса ФС-І у тройных мутантов (АСС-11, АСС-14, АСС-42 (табл. 3)) хорошо согласуется с общепринятым (Dunahay, Staehelin, 1985) в настоящее время представлением о величине ее фотосинтетической единицы, равной 110–160 молекул хлорофилла. Известно, однако, что лишь 30-60 молекул этого комплекса связаны с полипептидами с мол. м. 65, 68 кДа РЦ ФС-І (de Vitry et al., 1984; Dunahay, Staehelin, 1985). Поэтому, исходя из этих представлений, можно полагать, что у тройных мутантов, содержащих комплекс ФС-І (Wollman, Bennoun, 1982; de Vitry et al., 1984), помимо пигментов, связанных с внутренней антенной реакционного центра П₇₀₀, накапливается еще 60–90 молекул хлорофилла внешней антенны, вероятно, непосредственно не передающей энергию возбуждения на реакционные центры, а лишь на их внутреннюю антенну.

Список литературы

- Бойченко В.А., Аллахвердиев С.И., Ладыгин В.Г., Климов В.В. Функциональное сопряжение гидрогеназы с фотосистемой II в целых клетках мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Докл. АН СССР. 1986. Т. 290. С. 995–998.
- *Ладыгин В.Г.* Генетическая детерминация фотосистем и структурно-функциональная организация мембран хлоропластов // Автореф. дисс. докт. биол. наук. Пущино: ИПФС РАН. 1993. 49 с.
- Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиол. растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741–762.
- Ладыгин В.Г., Аллахвердиев С.И., Ананьев Г.М., Климов В.В., Мальцев С.В. Функциональная характеристика фотосистемы 2 мутантов Chlamydomonas reinhardtii, не содержащих светособирающего комплекса и фотосистемы 1 // Физиология растений. 1988. Т. 35. С. 14–23.
- Ладыгин В.Г., Аллахвердиев С.И., Четвериков А.Г. Влияние редукции светособирающего комплекса на величину фотосинтетической единицы и число реакционных центров фотосистем у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Биофизика. 1990. Т. 35. С. 280–284.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1973. Т. 15. С. 810–817.

- Ладыгин В.Г., Ширшикова Г.Н., Аллахвердиев С.Н., Четвериков А.Г. Экспериментальный мутагенез в исследованиях фотосистем как ключевых звеньев фотосинтеза и продуктивности растений // Биопродуктивность агроценозов как комплексная проблема. Пущино: ОНТИ НЦБИ. 1989. С. 123–140.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г. Структурная организация мембран тилакоидов мутанта хламидомонады, лишенного светособирающего комплекса и фотосистемы 1 // Физиология растений. 1985. Т. 32. С. 223–230.
- *Dunahay T.C., Staehelin L.A.* Isolation of photosystem 1 complexes from octyl glucoside/sodium dodecyl sulfate solubilized spinach thylakoids. Characterization and reconstitution into liposomes // Plant Physiol. 1985. V. 78. P. 606–613.
- Govindjee Y., Govindjee R. Introduction to photosynthesis. Bioenergetics of Photosynthesis. Ed. Govindjee Y. // Acad. Press. 1975. P. 1–50.
- Semenova G.A., Ladygin V.G. Topography of thylakoid membranes of chloroplasts based on the analysis of Chlamydomonas mutants deficient in chlorophyll-protein complexes // Photosynthetica. 1984. V. 18. P. 50–56.
- de Vitry C., Wollman F.-A., Delepelaire P. Function of the polypeptides of the photosystem 2 reaction center in Chlamydomonas reinhardtii // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 767. P. 415–422.
- Wollman F.-A., Bennoun P. A new chlorophyll-protein complex related to photosystem I in Chlamydomonas reinhardtii // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 680. P. 352–360.

ГЛАВА ХШ

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МЕМБРАН ТИЛАКОИДОВ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ ФОТОСИСТЕМ В ХЛОРОПЛАСТАХ ЭУКАРИОТ

С помощью пигментных мутантов *Chlamydomonas* методами электронной микроскопии нами были установлены все основные этапы формирования мембранной системы хлоропластов *Chlamydomonas*, характерные для пластид высших растений и, следовательно, были получены доказательства принципиальной идентичности организации мембран хлоропластов зеленой водоросли *Chlamydomonas* и высших растений (Ладыгин и др., 1973; Ладыгин, 1993, 1998).

1. Пространственная локализация фотосистем в мембранах хлоропластов

Многие исследователи пытались локализовать фотосистемы в мембранах хлоропластов с помощью фракционирования, действия ингибиторов синтеза белков, детергентов, выделения гранальных и межгранных участков. Ни один из этих методов не давал однозначных результатов. Мы использовали мутанты А-66 без РЦ ФС-I, А-90 без РЦ ФС-II и гибрида А-66-90 без реакционных центров обеих фотосистем, чтобы изучить, как в нативных клетках этих мутантов изменялась архитектура тилакоидов и локализация частиц, обусловленных белками фотосистем на гидрофобных поверхностях сколов замороженных мембран хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii*.

В электронно-микроскопических исследованиях тонких срезов клеток дикого типа K(+) было установлено, что его мембранная система содержит большое число тилакоидов и формирует хорошо структурированные граны (рис. 1, *a*). У мутанта А-66 с неактивной ФС-I было установлено, что в отличие от клеток дикого типа K(+) у них сильно редуцированы межгранные участки тилакоидов (рис. 1, δ). Напротив, у мутанта А-90 с не активной ФС-II оставались хорошо развитые тилакоиды, но они не имели плотных контактов, характерных для участков гран (рис. 2, *a*). В клетках гибрида А-66-90, не имеющего обеих фотосистем, в хлоропластах формировались стопки тилакоидов, но они не образовывали плотных контактов между собой (рис. 2, δ). Эти результаты предполагали локализацию ФС-I преимущественно в межгранных участках тилакоидов, а ФС-II – в участках плотных контактов тилакоидов гран (Ладыгин и др., 1980).

чтобы подтвердить это предположение, основанное на изменении Однако, архитектуры мембранной системы хлоропластов, необходимо было исследовать структурную локализацию хлорофилл-белковых комплексов в тилакоидах. Выявить локализацию белковых частиц в мембранах тилакоидов с помощью электронного микроскопа можно было методом замораживания-скалывания (freeze-fracture). Анализ белковых частиц, выявляемых на гидрофобных поверхностях сколов замороженных мембран хлоропластов (рис. 3), позволил установить (Semenova, Ladygin, 1984) четкую корреляцию между отсутствием хлорофилл-a-белкового комплекса реакционного центра Φ C-I у мутанта A-66 и гибрида A-66-90 и 140Å частиц на внешней гидрофобной поверхности скола (PF_u) мембран тилакоидов межгранных участков (рис. 3, б и 4, б).

В то же время отсутствие хлорофилл-*а*-белкового комплекса Φ C-II у мутанта А-90 и гибрида А-66-90 четко коррелировало с потерей 160Å частиц на внутренней гидрофобной поверхности скола мембраны (EF_s) в участках контактов тилакоидов гран (рис. 4). Аналогичные результаты были получены и другими исследователями (Miller, 1980; Simpson, 1980, 1982; Olive et al., 1992).

Важно отметить, что у мутанта C-48, не содержащего хлорофилла *b*, в результате потери светособирающего хлорофилл-*a/b*-белкового комплекса II, число 160Å частиц на EF-поверхности не изменялось, но размеры их уменьшались до 80–110Å (Ладыгин, 1998; Miller et al., 1976; Simpson, 1979; Semenova, Ladygin, 1984).



Рис. 1. Структурная организация хлоропластов клеток дикого типа K(+) с хорошо развитыми гранальными и межгранными тилакоидами (*a*) и мутанта A-66 без РЦ ФС-I с редуцированными межгранными участками тилакоидов (*б*).

КС – клеточная стенка, ОХ – оболочка хлоропласта, Т – межгранные тилакоиды, Г – грана, ОГ – осмиофильные глобулы, К – крахмал.



Рис. 2. Структурная организация хлоропластов клеток мутанта А-90 без РЦ ФС-II (*a*) и гибрида А-66-90 без РЦ ФС-I и РЦ ФС-II (*б*), у которых нет гран и плотных контактов между тилакоидами.

ОХ – оболочка хлоропласта, Т – тилакоид, МТ – миелиноподобное тело, образуемое у мутантов без РЦ ФС-II за счет множественного слипания мембран тилакоидов, ОГ – осмиофильные глобулы (липиды).



Рис. 3. Белковые частицы фотосистем, выявляемые на внутренней (ЕF) и внешней (PF) гидрофобных поверхностях скола мембран тилакоидов после замораживания и скалывания (freeze-fracture) (*a*) клеток дикого типа K(+) и (δ) мутанта A-66 без РЦ ФС-I, у которого на PF-поверхности нет 140Å частиц. *Стрелками* показаны 140Å частицы на PF-поверхности (*a*) и 160Å частицы на EF-поверхности (*a*, δ).



Рис. 4. Белковые частицы фотосистем, выявляемые на гидрофобных поверхностях скола мембран тилакоидов клеток мутанта А-90 без РЦ ФС-II (*a*), у которого на ЕF-поверхности нет 160Å частиц и гибрида А-66-90 без РЦ ФС-I и РЦ ФС-II (*б*), у которого нет 140Å частиц на PF-поверхности и 160Å частиц на EF-поверхности. *Стрелками* показаны 140Å частицы на PF-поверхности скола мембран мутанта А-90 (*a*).

Этот факт указывал на то, что 160Å частицы представляют собой агрегаты, включающие в себя хлорофилл-*а*-белковый комплекс РЦ ФС-II и светособирающий хлорофилл-*а/b*-белковый комплекс II (ССК-II). Кроме того, полученные данные подтверждают преимущественную локализацию хлорофилла *b* в гранальных участках мембран хлоропластов (Ладыгин, Агрикова, 1983; Burke et al., 1979). Отсутствие хлорофилла *b* ведет к ослаблению контактов между тилакоидами гран и предполагает важную роль светособирающего комплекса ФС-II в образовании контактов между тилакоидами гран (Ладыгин, Агрикова, 1983; Burke et al., 1979).

Установлено, что светособирающий хлорофилл-*а/b*-белковый комплекс ФС-I (ССК-I) локализован преимущественно в межгранных участках в составе 140Å частиц, которые представляют собой агрегаты этого комплекса и комплекса РЦ ФС-I (Ладыгин и др., 1980; Ладыгин, 1998; Miller, 1980; Simpson, 1980, 1982; Olive et al., 1992). Правомочность такого предположения подтверждалась тем, что потеря комплекса ФС-I не приводила к полной утрате 140Å частиц, а лишь уменьшала их размеры до 80Å (Ладыгин и др., 1980; Ладыгин, 1998; Simpson, 1979; Semenova, Ladygin, 1984).

Сложная организация 160Å частиц, которые локализуются в зонах плотного (истинного) контакта тилакоидов гран (рис. 5, *a*) была выявлена нами на фотографиях EF_s -поверхности скола при больших увеличениях (рис. 5, *б*). В этих 160Å частицах, представляющих собой сложные белковые агрегаты, можно было наблюдать до 4 субчастиц (рис. 5, *б*). Существует мнение, что в состав 160Å частиц, помимо светособирающего хлорофилл-*a*/*b*-белкового комплекса II (ССК-II) и хлорофилл-*a*-белкового комплекса реакционного центра ФС-II (состоящего из двух субъединиц: СР43 и СР47, а также D1- и D2-белков), может входить и цитохром-*b*/*f*-комплекс (Olive et al., 1992). Аналогичная 4-компонентная организация была обнаружена и на EF_s гидрофильной поверхности со стороны внутритилакоидного пространства (Ладыгин, 1998; Simpson, 1979).

Таблица 5. Плотность и соотношение (% от суммы) внутримембранных частиц на гидрофобных поверхностях скола гранальных и межгранных участков тилакоидов клеток дикого типа и мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* (Семенова, Ладыгин, 1985)

	EF-пo	оверхность	, число части	РЕ-поверхность, число частиц			
Штаммы	10^{1} mm^{2}	% от суммы			число частиц	% от с	суммы
	на і мкм	<100Å	100–140Å	>140Å	на 1 мкм ²	<100Å	>100Å
К(+) граны	1100 ± 140	21	42	37	4000 ± 180	85	15
К(+) строма	450 ± 80	47	41	12	4400 ± 500	63	37
А-66 граны	1200 ± 64	15	38	47	4300 ± 290	86	14
А-90 строма	150 ± 56	88	12	0	3000 ± 110	69	31
A-66-90	400 ± 45	81	19	0	4000 ± 240	85	15
C-48	1200 ± 50	26	62	12	2300 ± 235	62	38
CC-107	1400 ± 140	15	80	5	2400 ± 360	60	40
ACC-238	2600 ± 130	14	80	6	4500 ± 650	80	20

Примечание. Среднеарифметические величины, полученные от измерений не менее 500 частиц с 8–10 микрофотографий. Число частиц для каждой поверхности определяли площадью не менее 0.1 мкм² на суммарной площади скола не менее 1 мкм².



Рис. 5. Структура гранального участка мембран хлоропласта: a – фрагмент тонкого среза хлоропласта мутанта А-66 без РЦ ФС-I, показывающий наличие истинных контактов между тилакоидами, выявляемых в виде плотной черной линии (показано *стрелками*); δ – фрагмент скола гранального участка хлоропласта при большом увеличении. На сколах мембран тилакоидов гран на EF_s-поверхности можно видеть, что 160Å частицы состоят из 3–4 субчастиц (показано *стрелкой*).

Следует особо отметить, что у двойных и тройных мутантов, также как и в клетках дикого типа и одинарных мутантов, сохраняется способность формировать достаточно развитую систему тилакоидов. Этот факт однозначно свидетельствует о том, что в структурном формировании мембран тилакоидов участвуют все четыре хлорофилл-белковых комплекса. Кроме того, была выявлена важная закономерность, что в тех случаях, когда в результате мутации терялся один, два или три комплекса, число оставшихся комплексов на единицу поверхности мембраны пропорционально увеличивалось (табл. 5).

Так, у двойных мутантов CC-107, утративших два светособирающих комплекса и Φ C-I, и Φ C-II, число частиц Φ C-II на 1 мм² поверхности мембраны увеличивалось в 2 раза, а у тройных мутантов ACC-66, ACC-238, у которых из 4-х пигмент-белковых формировался только один хлорофилл-*а*-белковый комплекс реакционного центра Φ C-II. В этом случае число частиц РЦ Φ C-II на 1 мм² возрастало в 4 раза (Семенова, Ладыгин, 1985; Ладыгин, 1998; Semenova, Ladygin, 1984).

Полученные нами экспериментальные результаты (табл. 5) позволили заключить, что в норме в хлоропластах клеток дикого типа К(+) плотность белковых частиц на 1 мм² в мембране стехиометрически достаточно постоянна, так же как и размеры самих индивидуальных комплексов, и изменяется лишь при существенной потере реакционных центров или светособирающих комплексов.

На основании всей совокупности полученных данных нами предложена схема (рис. 6) локализации хлорофилл-белковых комплексов как в гранальных, так и в межгранных участках тилакоидов *Chlamydomonas reinhardtii*. Комплексы являются важнейшими компонентами для структурной организации всей мембранной системы хлоропластов и высокоэффективного поглощения и запасания солнечной энергии в процессе фотосинтеза. Поэтому в структуре и функционировании фотосинтетических мембран им принадлежит ключевая роль.

В настоящее время генетическими методами доказано (рис. 6), что все основные полипептиды ССК-I и ССК-II и гидрофильного комплекса фотоокисления H₂O (Z) контролируются ядерными генами, а полипептиды комплексов РЦ ФС-I (СР-I) и ФС-II (СР-II) – хлоропластными генами (Ладыгин, 1998; Chunaev, 1990; Bondrean et al., 1994).

Сейчас можно считать установленным, что в участках плотного контакта тилакоидов гран локализуется не менее 80% хлорофилл-*a*-белкового комплекса реакционного центра Φ C-II (CP-II) и примерно 80% светособирающего хлорофилл-*a*/*b*-белкового комплекса II (CCK-II) (Ладыгин и др., 1980; Simpson, 1979, 1980). В то же время основная часть хлорофилл-*a*-белкового комплекса реакционного центра Φ C-I (CP-I) и не менее 80% светособирающего хлорофилл-*a*-белкового комплекса II (CCK-II) и примерно 80% светособирающего комплекса II (CCK-II) и не менее 80% светособирающего хлорофилл-*a*/*b*-белкового комплекса I (CCK-I) локализуется в межгранных участках тилакоидов (Miller, 1980; Simpson, 1982; Anderson, Melis, 1983; Semenova, Ladygin, 1984). Причем при использовании метода замораживания–скалывания (freeze-fracture) белковые 160Å частицы комплексов РЦ Φ C-II и CCK-II выявляются на EF_s – внутренней гидрофобной поверхности скола мембран тилакоидов в гранальных участках (рис. 6). В то же время белковые 140Å частицы комплексов РЦ Φ C-I и CCK-I локализуются на PF_u внешней гидрофобной поверхности скола мембран тилакоидов межгранных участков. При использовании метода замораживания сколы мембран проходят по центру липидного бислоя тилакоидов (рис. 6).

Основу каждого из комплексов составляют специфические полипептиды, имеющие различные молекулярные массы. Так, комплекс реакционного центра Φ C-II составляет четыре основных полипептида с мол. м. 32 (D1-белок), 30 (D2-белок), 47 и 43 кДа, которые контролируются хлоропластными генами *psbA*, *psbD*, *psbC* и *psbB* соответственно (Gruissen, 1989; Marder, Barber, 1989; Bondrean et al., 1994). Две белковые субъединицы цитохрома *b* 559, 4 и 10 кДа, кодируются двумя хлоропластными генами *psbE* и *psbF*.

Основные полипептиды, составляющие комплекс реакционного центра Φ C-I, имеют мол. м. 68, 65 и 19 (Fe-S-белок) кДа и контролируются хлоропластными генами *psaA*, *psaB* и *psaC* соответственно (Chunaev, 1990; Leu et al., 1990; Olive et al., 1992).



Рис. 6. Схема пространственной локализации хлорофилл-а-белкового комплекса реакционного центра ФС-II (СР-II) и ее светособирающего хлорофилл-*а/b*-белкового комплекса II (ССК-II) в 160Å частицах на EF_s-поверхности гранальных участков тилакоидов, хлорофилл-а-белкового комплекса реакционного а также центра ΦC-I И ee светособирающего хлорофилл-*а/b*-белкового комплекса I (ССК-I) в 140Å частицах на PF_nповерхности межгранных участков тилакоидов. Цифрами показаны молекулярные массы основных полипептидов, входящих в состав каждого из комплексов. В соответствии с последовательностью расположения полипептидов дан перечень генов, контролирующих их синтез (Лалыгин, 1998).

Z – комплекс фотоокисления H_2O ; EF (the exoplasmic face) – внутренняя гидрофобная поверхность скола, PF (the protoplasmic face) – внешняя гидрофобная поверхность скола мембран тилакоидов; freeze-fracture – метод замораживания-скалывания; *Lhca 1–4* и *Lhcb 1–6* – гены, контролирующие синтез полипептидов ССК-I и ССК-II соответственно.

Светособирающие комплексы генетически изучены в меньшей степени, особенно ССК-I (Ладыгин, 1993, 1998; Wollman, Bennoun, 1982). Однако, не вдаваясь в детальный анализ, можно считать установленным, что основными полипептидами светособирающего хлорофилл-a/b-белкового комплекса II (ССК-II) являются полипептиды с мол. м. 26, 28 и 31 кДа (Лебедев и др., 1990; Phillip et al., 1996), а светособирающего хлорофилл-a/b-белкового комплекса I (ССК-I) являются полипептиды с мол. м. 22, 25 и 34 кДа (Bassi et al., 1992; Zilber, Malkin, 1992). Все полипептиды светособирающих комплексов кодируются ядерными генами (Stayton et al., 1987; Hoffman et al., 1988). И хотя еще не для всех полипептидов установлены гены, но уже хорошо изучен ген, контролирующий синтез хлорофилла b, обозначенный для высших растений как ген Lhcb (по современной номенклатуре), а для

Chlamydomonas reinhardtii – обозначенный нами как *cbn-1* (Ладыгин, Агрикова, 1983; Чунаев и др., 1984; Chunaev, 1990). Генетическим анализом установлено, что ген *cbn-1* локализован в первой группе сцепления ядерных генов (Мирная и др., 1990; Чунаев и др., 1994). Ядерные гены, кодирующие полипептиды ССК-I, в последнее время обозначают как *Lhca*-гены.

Гидрофильные белки комплекса фотоокисления воды ФС-II (Z) с мол. м. 33, 23 и 16 кДа, также контролируются ядерными генами *psbO*, *psbP* и *psbQ* соответственно. Они не содержат хлорофилла.

Итак, благодаря использованию мутантов *Chlamydomonasm reinhardtii* нам удалось показать, что все нативные хлорофилл-белковые комплексы, участвующие в организации фотосистем, являются дискретными, генетически автономно детерминированными единицами. Формирование каждого из них может быть блокировано мутациями отдельных генов (Ладыгин, Агрикова, 1983; Ладыгин, 1998; Gruissen, 1989; Marder, Barber, 1989; Chunaev, 1990; Leu et al., 1990; Bondrean et al., 1994). Генетический блок образования любого из комплексов обусловлен нарушением биосинтеза специфических белков-носителей и, как следствие, сопровождается потерей части хлорофилла, которая с ним ассоциирована. Специфичность локализации белков в мембранах хлоропластов и их взаимодействие с хлорофиллом определяют характерные для каждого из комплексов спектральные свойства, фотохимическую активность, пространственную упаковку тилакоидов, обусловленную гетерогенным распределением хлорофилл-белковых комплексов в гранальных и межгранных участках фотосинтетических мембран.

Таким образом, с помощью мутагенов (N-нитрозоэтилмочевины, УФ-С-излучения и гамма-радиации) были получены одинарные, двойные и тройные мутанты с нарушением синтеза одного, двух или трех пигмент-белковых комплексов фотосистем. Установлены спектральные формы хлорофилла и полосы излучения флуоресценции, характерные для каждого из 4-х нативных хлорофилл-белковых комплексов: реакционных центров ФС-I, ФС-II и связанных с ними светособирающих комплексов I и II (ССК-I и ССК-II) соответственно. Показано, что до 60–70% молекул хлорофилла входит в состав светособирающих комплексов и лишь 25–30% молекул хлорофилла a составляют антенну реакционных центров ФС-I и ФС-II. Изучены фотохимические свойства и проведена количественная оценка величины фотосинтетической единицы и числа реакционных центров фотосистем и обнаружено, что потеря светособирающих хлорофилл-белковых комплексов I и II не приводит к уменьшению числа реакционных центров ФС-I и ФС-II в расчете на хлоропласт (Ладыгин, 1998).

Установлено, что каждый из 4-х хлорофилл-белковых комплексов может автономно принимать участие в образовании мембранной системы хлоропластов. Если мембраны тилакоидов формировались за счет двух (ССК-II и РЦ ФС-II) или только одного (РЦ ФС-II) из хлорофилл-белковых комплексов, то стехиометрическая плотность этих белковых частиц на 1 мм² внутренней (EF_s) гидрофобной поверхности скола увеличивалась соответственно в 2 или 4 раза. Нами предложена принципиальная схема организации фотосистем зеленых водорослей и высших растений. Она основана на том, что хлорофилл-*а*-белковый комплекс реакционного центра ФС-II вместе со светособирающим хлорофилл-*а/b*-белковым комплексом II (ССК-II) входит в состав 160Å частиц, локализованных на внутренней (EF_s) гидрофобной поверхности скола мембран тилакоидов в области гран, а хлорофилл-*а*белковый комплексом I (ССК-I) входит в состав 140Å частиц, локализованных на внешней (PF_u) гидрофобной поверхности скола мембран межгранных участков тилакоидов.
2. Состав и функции белков ФС-ІІ

Комплекс ФС-II высших растений и зеленых водорослей включает более 20 полипептидов (рис. 7), из которых лишь 5 являются периферическими белками (PsbO, PsbP, PsbQ, PsbTn, Psb31).

Остальные белки являются интегральными и содержат от 1 до 6 трансмембранных спиралей. Условно, все белки, входящие в ФС-II, можно разделить на три группы: 1) белки ядра и группа примыкающих к ним низкомолекулярных белков; 2) белки водоокисляющего комплекса; и 3) полипептиды внешней антенны комплекса. Детали строения основных компонентов ФС-II на настоящий момент хорошо известны благодаря данным рентгеноструктурного анализа ФС-II цианобактерий (Kamiya, Shen, 2003; Ferreira et al., 2004; Loll et al., 2005; Guskov et al., 2009; Umena et al., 2011). В центре пигмент-белкового комплекса находится ядро ФС-II, включающее семь основных белков: D1, D2, CP43, CP47, белок I, а также α - и β -субъединицы цитохрома b₅₅₉. Ключевые функции в работе ФС-II берут на себя белки D1 и D2, с которыми связаны все основные кофакторы переноса электронов, среди них:

- 6 молекул хлорофилла *a*, две из которых входят в РЦ, образуя димер с максимумом поглощения 680 нм (Р₆₈₀);
- две молекулы феофитина однако, только одна молекула, связанная с D1, участвует в электронном транспорте и служит первичным акцептором электрона;
- два хинона: вторичные акцепторы электронов: пластохинон Q_A и пластохинон Q_B (Croce, van Amerongen, 2011; Renger, 2011; Umena et al., 2011; Cardona et al., 2012).

К остальным белкам ядра относят белки внутренней антенны – СР43 и СР47, с которыми связаны 13 и 16 молекул хлорофилла, соответственно; и цитохром b₅₅₉, который не включен в цепь линейного транспорта электронов, однако, необходим для защиты комплекса ФС-II от фотодеструкции. Кроме того, цитохром b₅₅₉ может участвовать в циклическом транспорте электронов в ФС-II (Barber, De Las Rivas, 1993; Vasil'ev et al., 2003).

Выяснение роли белков ФС-II в процессе окисления воды показывает, что эволюционные изменения практически не затронули внутреннее "ядро" ФС-II. В состав минимального комплекса ФС-II, способного к окислению воды, как у высших растений, так и у цианобактерий, входит семь белков: D1, D2, CP43 и CP47, а также α- и β-субъединицы цитохрома b₅₅₉ и белок PsbI, удаление которых приводит к нарушениям в сборке ФС-II и отсутствию выделения кислорода (Umena et al., 2011; Bricker et al., 2012). Вместе они образуют "ядро" ФС-II, структуру, способную окислять воду и восстанавливать пул пластохинонов в экспериментальных условиях (Umena et al., 2011; Bricker et al., 2012). Однако, несмотря на то, что такой минимальный комплекс ФС-II обладает фотохимической активностью, скорость выделения О2 у него не высока и не превышает 25% от скорости полностью сформированного комплекса ФС-II, выделенного из мембраны. Кроме того, такой минимальный комплекс не стабилен и легко инактивируется светом, а также нуждается в высоких, нефизиологических концентрациях ионов Ca²⁺ и Cl⁻ в среде для поддержания активности (Bricker, 1992). Для его устойчивой работы необходимо присутствие еще нескольких внешних белков комплекса фотоокисления воды, связанных с донорной стороной ФС-II (Bricker et al., 2012).

У высших растений и зеленых водорослей водоокисляющий комплекс представлен белками PsbO, PsbP и PsbQ, которые формируют внешний домен комплекса ФС-II (Пиголев и др., 2012). Эти белки связываются с люменальной стороной мембраны и располагаются вблизи каталитического центра водоокисляющего комплекса. Роль, которую они играют в активности комплекса фотоокисления воды, заключается в стабилизации каталитического центра при физиологическом содержании ионов Ca²⁺ и Cl⁻ в среде (Bricker et al., 2012). Кроме того, белки водоокисляющего комплекса защищают Mn-кластер от атаки внешними восстановителями, которые находятся в люмене (Popelkova, Yocum, 2011; Пиголев и др., 2012).



Рис. 7. Схема расположения основных компонентов ΦС-II в мембранах тилакоидов зеленых водорослей и высших растений. D1 (PsbA) и D2 (PsbD) – белки с мол. массой 38 кДа; CP43 и CP47 – прочно связанные с PЦ светособирающие комплексы; PsbO, PsbP и PsbQ – водорастворимые белки системы окисления воды; Cyt b₅₅₉ – цитохром b₅₅₉, имеющий максимум поглощения при 559 нм; P680 – димер хлорофилла, первичный донор электрона; Phe – молекула феофитина, первичный акцептор электрона; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хиноновые акцепторы электрона; PQ – пул пластохинона; Y_z – вторичный донор электрона (Tyr161 белка D1); CP24, CP26, CP29 и LHC-II – светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы II.

В состав водоокисляющего комплекса у разных организмов может входить от 1 до 5 белков (De Las Rivas et al., 2004; Pagliano et al., 2013). У эукариот (высших растений и зеленых водорослей) такими белками являются PsbO (26.5 кДа), PsbP (20 кДа) и PsbQ (16 кДа). Сайты связывания для этих белков у разных организмов различны. В ФС-II зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* у каждого из трех белков имеется отдельный сайт связывания – независимая модель связывания (Suorsa, Aro, 2007; Enami et al., 2008). У растений только два белка (PsbO, PsbP) самостоятельно связываются с мембраной. Взаимодействие самого маленького белка (PsbQ) с ФС-II происходит при помощи других белков. Данный вопрос до конца не изучен, но считается, что PsbQ может связываться с ФС-II через белок PsbP или имеет посадочный сайт сразу на двух белках – PsbO и PsbP (Suorsa, Aro, 2007; Enami et al., 2008). Дополнительно в состав водоокисляющего комплекса высших растений и зеленых водорослей входит небольшой белок PsbR (Suorsa et al., 2006; Enami et al., 2008; Pagliano et al., 2013).

Список литературы

- *Ладыгин В.Г.* Генетическая детерминация фотосистем и структурно-функциональная организация мембран хлоропластов // Автореф. дисс. докт. биол. наук. Пущино: ИПФС РАН. 1993. 49 с.
- Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиол. растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741–762.
- *Ладыгин В.Г., Агрикова И.М.* Структурная организация хлоропластов у аллельных хлорофилл-*b*-дефицитных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 1983. Т. 25. С. 1231–1235.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов Chlamydomonas reinhardtii // Цитология. 1973. Т. 15. С. 810–817.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Фотохимические свойства и структура мембран хлоропластов гибридного штамма *Chlamydomonas* с неактивными ФС-1 и ФС-2 // Физиология растений. 1980. Т. 27. С. 91–97.
- Мирная О.Н., Фомина-Ещенко Ю.Г., Чунаев А.С. Локализация мутации cbn-1 в первой группе сцепления ядерных генов Chlamydomonas reinhardtii // Генетика. 1990. Т. 26. С. 958–960.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г. Структурная организация мембран тилакоидов мутанта хламидомонады, лишенного светособирающего комплекса и фотосистемы 1 // Физиология растений. 1985. Т. 32. С. 223–230.
- Лебедев Н.Н., Тан Цзунчин, Ладыгин В.Г. Полипептидный состав и формирование пигментбелковых комплексов в мутантах *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 2072–2077.
- Пиголев А.В., Тимошевский Д.В., Климов В.В. Влияние аминокислотных замен К223Е и К226Е в белке PsbO фотосистемы 2 на стабильность и функциональную активность водоокисляющего комплека в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. 2012. Т. 77. № 1. С. 90–98.
- Чунаев А.С., Ладыгин В.Г., Мирная О.Н., Семенов Е.П., Гаевский Н.А., Болдина О.Н. Множественный аллелизм в гене *cbn-1*, контролирующем накопление хлорофилла *b* у *Chlamydomonas reinhardtii* // Генетика. 1984. Т. 20. С. 775–781.
- Чунаев А.С., Столбова А.В., Квитко К.В., Александрова Н.Н., Чекунова Е.М., Мирная О.Н., Тугаринов В.В. Генетический контроль биосинтеза хлоропластных пигментов у зеленых водорослей // Генетика. 1994. Т. 30. С. 1075–1084.
- Anderson I.M., Melis A. Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1983. V. 80. P. 745–752.

- Bassi R., Soen S.Y., Krank C., Zuber H., Rochaix J.D. Characterization of chlorophyll-a/b-protein of photosystem I from Chlamydomonas reinhardtii // J. Cell Biol. 1992. V. 267. P. 25714–25721.
- *Barber J., De Las Rivas J.* A functional model for the role of cytochrome b₅₅₉ in the protection against donor and acceptor side photoinhibition // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. V. 90. P. 10942–10946.
- *Bricker T.M.* Oxygen evolution in the absence of the 33-kDa manganese-stabilizing protein // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 4623–4628.
- Bricker T.M., Roose J.L., Fagerlund R.D., Frankel L.K., Eaton-Rye J.J. The extrinsic proteins of photosystem II // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. № 1. P. 121–142.
- Bondrean E., Otis C., Turmed M. Conserved gene clusters in highly rearranged chloroplast genomes of Chlamydomonas reinhardtii // Plant Mol. Biol. 1994. V. 24. P. 585–602.
- Burke J.J., Steinback K.E., Arntzen C.J. Analysis of the light-harvesting pigment-protein complex of wild type and a chlorophyll *b*-less mutant of barley // Plant Physiol. 1979. V. 63. P. 237–243.
- Cardona T., Sedoud A., Cox N., Rutherford A.W. Charge separation in photosystem II: a comparative and evolutionary overview // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. № 1. P. 26–43.
- *Chunaev A.S.* Genetics of Photosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // Photosynthetica. 1990. V. 24. P. 283–308.
- Croce R., van Amerongen H. Light-harvesting and structural organization of photosystem II: from individual complexes to thylakoid membrane // J. Photochem. Photobiol. B. 2011. V. 104. P. 142–153.
- *Cruissen W.* Chloroplast gene expression: how plants turn their plastids on // Cell. 1989. V. 56. P. 161–170.
- *De Las Rivas J., Barber J.* Analysis of the structure of the PsbO protein and its implications // Photosynth. Res. 2004. V. 81. P. 329–343.
- Enami I., Okumura A., Nagao R., Suzuki T., Iwai M., Shen J.R. Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species // Photosynth. Res. 2008. V. 98. P. 349–363.
- *Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S.* Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center // Science. 2004. V. 303. № 5665. P. 1831–1838.
- Hoffman N.E., Pichersky E., Malik V.S. A DNA clone encoding a photosystem I protein with homology to photosystem II chlorophyll-a/b-protein polypeptide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. V. 84. P. 8844–8848.
- Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A., Saenger W. Cyanobacterial photosystem II at 2.9Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. P. 334–342.
- Kamiya N., Shen J.R. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from Thermosynechococcus vulcanus at 3.7Å resolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 98–103.
- Leu S., White D., Michaelis A. Cell cycle-dependent transcriptional and posttranscriptional regulation of chloroplast gene-expression in *Chlamydomonas reinhardtii* // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1049. P. 311–317.
- Loll B., Kern J., Saenger W., Zouni A., Biesiadka J. Towards complete cofactor arrangement in the 3.0Å resolution structure of photosystem II // Nature. 2005. V. 438. P. 1040–1044.
- Marder J.B., Barber J. The molecular anatomy and function of thylakoid proteins // Plant Cell a Environ. 1989. V. 12. P. 595–616.
- Miller K.R. A chloroplast membrane lacking photosystem 1. Changes in instacked membrane regions // Biochim. Biophys. Acta. 1980. V. 592. P. 143–152.
- *Miller K.R., Miller G.I., McIntyre K.R.* The light-harvesting chlorophyll protein complex of photosystem 2. Its location in the membrane // J. Cell Biol. 1976. V. 71. P. 624–638.

- Olive J., Recouvreur M., Girard-Bascon J., Wollman F.-A. Further identification of the exoplasmic pace particles on the freeze-fractured thylakoid membranes: a study using double and triple mutants from Chlamydomonas reinhardtii lacking various photosystem II subunits and cytochrome b₆/f complex // Eur. J. Cell Biology. 1992. V. 59. P. 176–186.
- Pagliano C., Saracco G., Barber J. Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II // Photosynth. Res. 2013. V. 116. № 2–3. P. 167–188.
- Phillip D., Ruban A.V., Hortan P., Asato A., Young A.J. Quenching of chlorophyll fluorescence in the major light-harvesting complex of photosystem II: a systematic study of the effect of carotenoid structure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 1492–1497.
- Popelkova H., Yocum C.F. PsbO, the manganese-stabilizing protein: analysis of the structure-function relations that provide insights into its role in photosystem II // J. Photochem. Photobiol. B. 2011. V. 104. № 1–2. P. 179–190.
- Renger G. Light induced oxidative water splitting in photosynthesis: energetic, kinetics and mechanism // J. Photochem. Photobiol. B. 2011. V. 104. № 1–2. P. 35–43.
- Semenova G.A., Ladygin V.G. Topography of thylakoid membranes of chloroplasts based on the analysis of Chlamydomonas mutants deficient in chlorophyll-protein complexes // Photosynthetica. 1984. V. 18. P. 50–56.
- Simpson J.D. Freeze-fracture studies on barley plastid membranes: III. Location of the lightharvesting chlorophyll-*a/b*-protein // Carlsberg Res. Commun. 1979. V. 44. P. 305–336.
- Simpson J.D. Freeze-fracture studies on barley plastid membranes: IV. Analysis of freeze-fracture particle size and shape // Carlsberg Res. Commun. 1980. V. 45. P. 201–210.
- Simpson J.D. Freeze-fracture studies on barley plastid membranes: V. Viridis-n³⁴, a photosystem 1 Mutant // Carlsberg Res. Commun. 1982. V. 47. P. 215–225.
- Stayton M.M., Brosto P., Dunsmuir P. Characterization of a full-length petunia cDNA encoding a polypeptide of light-harvesting complex associated with photosystem I // Plant Mol. Biol. 1987. V. 10. P. 127–137.
- Suorsa M., Sirpiö S., Allahverdiyeva Y., Paakkarinen V., Mamedov F., Styring S., Aro E.M. PsbR, a missing link in the assembly of the oxygen-evolving complex of plant photosystem II // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 145–150.
- Suorsa M., Aro E.M. Expression, assembly and auxiliary functions of photosystem II oxygenevolving proteins in higher plants // Photosynth. Res. 2007. V. 93. № 1–3. P. 89–100.
- Umena Y., Kawakami K., Shen J.R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9Å, *Nature*, 2011, Vol. 473, No. 7345, p. 55–60.
- Vasil'ev S., Brudvig G.W., Bruce D. The X-ray structure of photosystem II reveals a novel electron transport pathway between P₆₈₀, cytochrome b₅₅₉ and the energy-quenching cation, ChlZ+ // FEBS Lett. 2003. V. 543. № 1–3. P. 159–163.
- Wollman F.-A., Bennoun P. A new Chlorophyll-protein complex related to photosystem I in Chlamydomonas reinhardtii // Biochim. Biophys. Acta. 1982. V. 680. P. 352–360.
- *Zilber A.L., Malkin R.* Organization and topology of photosystem 1 subunits // Plant Physiol. 1992. V. 99. P. 901–911.

ГЛАВА ХІУ

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМЫ I И ФОТОСИСТЕМЫ II

Учитывая, что биохимический состав мембран хлоропластов и их структурнофункциональная организация у зеленых водорослей и высших растений практически одинакова, поэтому результаты, полученные на реакционных центрах фотосистем высших растений, можно применить к фотосистемам зеленых водорослей.

За последние годы достигнуты значительные успехи в исследовании молекулярной организации компонентов фотосинтетического аппарата (рис. 1) (Nelson, Ben-Shem, 2002; Merchant, Sawaya, 2005; Jensen et al., 2007). Последние результаты, полученные недавно на фотосистеме II (Biesiadka et al., 2004; Ferreira et al., 2004; Kern et al., 2005) и на ССК-II (Liu et al., 2004; Standfuss et al., 2005) имеют более высокое разрешение, чем описанные ранее (Kuhlbrandt et al., 1994; Klukas et al., 1999; Zouni et al., 2001; Kamiya, Shen, 2003).



Рис. 1. Архитектура комплексов тилакоидных мембран и растворимых белков, основанная на структурах с высоким разрешением. Доступные структурные данные по белковым комплексам мембран и растворимым белкам были скорректированы с учетом относительных размеров фотосистемы I растений (PS I). Структурные данные были получены из Protein Data Bank (PDB): PS I – 1QZV, 1YO9 (теоретическая модель); Fd – 1A70; PC – 1AG6; ферредоксин-НАДФ-редуктаза – 1QG0. Структура F-АТФазы хлоропласта была построена на основании данных митохондриальной и бактериальной F-АТФаз-PDB 1H8E (каталитической) и 1YCE (мембранной). Вставка представляет собой схематическое изображение фрагмента тилакоида, который был смоделирован с использованием структур с высоким разрешением (Nelson, Yocum, 2006).

Сейчас получены более совершенные результаты и по структурной организации мембранного суперкомплекса реакционного центра ФС-І растений и связанного с ним антенного комплекса ССК-І (Ben-Shem et al., 2003). Сходство в составе и расположении кофакторов в комплексах, разделенных миллиардами лет эволюции, поражает (Ben-Shem et al., 2004; Nelson, Ben-Shem, 2005; Jensen et al., 2007), а различия в белок-белковых взаимодействиях и новые функции, добавленные в течение длительной эволюции эукариотических комплексов, подчеркивают уникальность биологической адаптации к экологическим нишам и сохранение возникших изменений в этих сложных ферментных системах (Nelson, Ben-Shem, 2005; Jensen et al., 2007). На механистическом уровне, новые структуры накладывают ограничения на теоретические спекуляции и указывают на эксперименты, необходимые для поддержки или отклонения старых и новых гипотез.

1. Структура комплекса фотосистемы І

Фотосистема I (ФС-I) – это замечательная нано-фотоэлектрическая машина, которая работает с квантовым выходом, близким к 1.0 (Nelson et al., 2002; Nelson, Ben-Shem, 2004). Теоретические решения квантовой механики для такого механизма существуют (Forster, 1948; Dexter, 1953; Ritz et al., 2001; Yang, Fleming, 2002, 2003), но искусственные системы не достигают такой эффективности. Эта эффективность привлекла к изучению структуры фотосистем молекулярных биологов (Allen et al., 1987; Deisenhofer, Michel, 1989). Сложная организация ФС-I растений является одной из важнейших проблем (Sener et al., 2005), так как она состоит из РЦ ФС-І и ССК-І, в результате чего ее суперкомплексы представляют более трудную проблему, чем бактериальные реакционные центры (Ihalainen et al., 2002; Nelson, Ben-Shem, 2004). Поэтому не удивительно, что первая структура ФС-I была изучена с помощью термофильной цианобактерии *Thermosynechococcus elongatus* (Fromme et al., 1996; Schubert et al., 1998; Jordan et al., 2001). Структурная модель с разрешением 2.5Å (Jordan et al., 2001) содержала 12 белковых субъединиц и 127 кофакторов (96 молекул хлорофилла, 22 молекулы каротиноидов, 2 молекулы филлохинонов, 3Fe₄S₄ кластера и 4 молекулы липидов). Это эпохальное достижение, которое обеспечивало первое подробное описание молекулярной архитектуры ФС-I. Были определены ориентация и взаимодействия белковых субъединиц и других кофакторов (Jordan et al., 2001). Кристаллическая структура ФС-I in vivo Thermosynechococcus elongatus – это тример с диаметром 210Å и максимальной толщиной 90Å. В отличие от этого, ФС-I растений является мономером. Модель, полученная с разрешением 4.4Å, состоит из 16 белковых субъединиц, 167 молекул хлорофиллов, 2 молекул филлохинонов (витамин K_1) и 3Fe₄S₄-центров (кластеров) (Ben-Shem et al., 2003).

Стромальный участок тилакоидов ФС-І растений (рис. 2) показывает два различных, слабо связанных фрагмента: РЦ ФС-І и ССК-І, которые отделены друг от друга глубокой щелью (cleft). Четыре субъединицы ССК-І формируют два димера, расположенных последовательно, и формируют "лунообразный" пояс, который контактирует с PsaF субъединицей реакционного центра ФС-І.

Этот пояс является наиболее известным дополнением к структуре ФС-І растений. Реакционный центр сохраняет то же самое место и ориентацию компонентов переноса электронов и трансмембранных спиралей, обнаруженных в ФС-І цианобактерий, принадлежащих Х- и М-субъединицам, которые были утрачены во время эволюции хлоропластов и приобретены ФС-І цианобактерий после расхождения с эукариотической ФС-І (Ben-Shem et al., 2004; Jensen et al., 2007). Две дополнительные субъединицы (PsaG и PsaH) присутствуют в ФС-І растений (рис. 2). PsaH, локализованная рядом с PsaL, имеет единичную трансмембранную спираль с последующей 20Å-ной спиралью, которая лежит на стромальной стороне мембраны и связана с одной молекулой хлорофилла. PsaG гомологична PsaK (Okkels et al., 1992). Она расположена на противоположной стороне PsaK и способствует увеличению площади контактной поверхности для связи с ССК-I (рис. 2). Две трансмембранные спирали соединяются с помощью длинной петли, которая расположена на стромальной стороне мембраны (Ben-Shem et al., 2003), что соответствует недавним биохимическим исследованиям (Rosgaard et al., 2005). Хотя PsaK является настолько не четкой в своем положении рядом с PsaA, что ее петля была слабо видна даже в структуре с высоким разрешением ФС-I цианобактерий (Jordan et al., 2001). PsaG прочно связана с PsaB, а также имеет спираль-спиральное взаимодействие с Lhca1 (рис. 2).



Рис. 2. Структура фотосистемы I растений (вид со стромальной стороны). Структурные координаты получены из теоретических расчетов (PDB) исходных структурных данных (PDB 1QZV) (Jolley et al., 2005). Зеленым цветом показаны молекулы хлорофилла, красным – рассчитанное расположение каротиноидов и липидов. Белковая основа, состоящая из 16 субъединиц, показана на заднем плане. Также показано расположение PsaG, PsaH, PsaK и Lhca1 – Lhca4 субъединиц (Nelson, Yocum, 2006).

На стромальной стороне также расположены основные структуры периферийных субъединиц PsaC, PsaD и PsaE, почти идентичные ФС-I цианобактерий за исключением увеличения N-конца PsaD, что является уникальным для эукариотической субъединицы (рис. 3). Большую устойчивость этого домена ФС-I хлоропластов связывают с хаотропными агентами в этом удлинении PsaD. На люменальной стороне наиболее заметно различие между фотосистемами растений и цианобактерий. Это различие заключается в наличии структуры спираль-петля-спираль, что способствует удлинению N-концевого домена субъединицы PsaF у растений (Ben-Shem et al., 2003) и обеспечивает более эффективное

связывание с реакционным центром. В результате, перенос электронов от этого медьсодержащего белка на Р₇₀₀ ФС-I оказывается на два порядка выше той величины, которая характерна для цианобактерий (Hippler et al., 1996; Olesen et al., 1999).

Таким образом, кристаллическая структура РЦ ФС-І растений показывает не только его архитектуру, но и возможный режим взаимодействия с ССК-І в результате чего образуются суперкомплексы. Их структура также обеспечивает новое понимание природы локусов взаимодействия между ФС-І и пластоцианином, ферредоксином, ферредоксин-НАДФ-редуктазой, а также с ССК-II. Следовательно, молекулярная структура ФС-I обеспечивает основу для исследования механизма светосбора и превращения энергии в процессе фотосинтеза, а также эволюционных связей, которые сформировали фотосинтетический аппарат зеленых водорослей и высших растений.



Рис. 3. Структура фотосистемы I растений (вид сбоку). Хлорофилл, каротиноиды и липиды были исключены. Кофакторы, участвующие в светоиндуцированном транспорте электронов (P_{700} , A_0 , A_1 , F_X , F_A и F_B), показаны вместе с белковой основой, состоящей из 16 субъединиц. Показано расположение PsaB, PsaC, PsaD, PsaE и PsaF субъединиц. В цепи переноса электронов указаны хлорофилл P_{700} (*красный*) и другие хлорофиллы (*зеленые*). Показаны также хиноны (*синие*) и железо (*красное*) и сера (*желтая*) в железо-серных кластерах (Nelson, Yocum, 2006).

2. Структура комплекса фотосистемы ІІ

В случае фотосистемы II растений трехмерная модель суперкомплексов РЦ ФС-II получена с помощью криоэлектронной микроскопии и анализа единичных частиц (Nield et

al., 2000). Этим методом доступны были только кристаллические структуры внешних субъединиц PsbP и PsbQ с разрешением 1.6Å и 1.95Å, соответственно (Calderone et al., 2003; Ifuku et al., 2004). Большая субъединица PsbP состоит в основном из β-складок (β-sheets) и, по-видимому, не имеет каких-либо общих черт со структурой PsbV цианобактерий. Структура PsbQ также не имеет аналогов среди субъединиц цианобактерий. Эта гибкая область PsbQ, как полагают, участвует в связывании с ФС-II (Seidler, 1996). Попытки кристаллизовать PsbO-белок не удались, возможно, потому что ему свойственна неупорядоченность (Lydakis-Simantiris et al., 1999).

Получить дифракционные качественные кристаллы интактной ФС-II растений также не удалось (Fotinou et al., 1993) из-за протеолиза образцов в процессе кристаллизации. Эта проблема не возникала при кристаллизации ФС-II термофильных цианобактерий (например, *Thermosynechococcus elongatus, Thermosynechococcus vulcanus*) (Zouni et al., 2001; Kamiya, Shen, 2003; Ferreira et al., 2004). Их белковый комплекс образует димеры в кристаллах с разрешением структур в диапазоне от 3.8Å до 3.5Å; а недавно было сообщение с разрешением 3.2Å (Biesiadka et al., 2004; Nelson, Yocum, 2006).

Модели структуры ФС-II вид сверху со стороны стромы (рис. 4) и вид сбоку (рис. 5) представлены на основании данных, полученных Феррейра с соавторами (Ferreira et al., 2004).



Рис. 4. Структура димера фотосистемы II цианобактерий (вид со стромальной стороны). Полипептидные цепи белков показаны на заднем плане, а хромофоры – на переднем плане; также показаны СР43 (*PsbB*) и СР47 (*PsbC*), хлорофилл (зеленый), каротиноиды (красные), пластохиноны (синие) и граница между мономерами реакционного центра II (пунктирная стрелка). Структура основана на PDB-1S5L ФС-II (Nelson, Yocum, 2006).

Такие модели являются удовлетворительными, потому что многие из их особенностей совпадают с предсказаниями, полученными биохимическими и спектроскопическими экспериментами. Вмести с тем, они позволяют сделать расширенные структурные

толкования относительно размещения отдельных субъединиц и ориентацию пигментов, связанных с реакционными центрами и их антенных систем. Во всех представленных структурах видно, что трансмембранные спирали субъединиц PsbA и PsbD реакционных центров находятся в непосредственной близости друг к другу. Как и ожидалось, хромофоры реакционных центров (включая 6 молекул хлорофилла, 2 молекулы феофетина, пластохиноны Q_A и Q_B , и редокс-активные тирозины Y_Z и Y_D) связанны с этими субъединицами. Субъединица PsbC находится вблизи к PsbA и PsbD и в непосредственной близости к PsbB. Расположение молекул хлорофилла в PsbB и PsbC в настоящее время достаточно хорошо изучено; 14 молекул хлорофилла *а* связаны с PsbB и 16 молекул связаны с PsbC. Для 23 молекул хлорофилла, лигандом к центральному атому Mg^{2+} хлоринового кольца является азот His-имидазола. Семь молекул β -каротина выявлены в этой структуре; некоторые из них связаны с цит. b_{559} , Chl_z D1 и Π_{680} – хлорофиллом реакционного центра Φ C-II (Biesiadka et al., 2004).

Большие внешние петли PsbB и PsbC хорошо видны, как значительные выступы во внутритилакоидное пространство над трансмембранными α -спиралями этих больших субъединиц. Дополнительные субъединицы (такие как: PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbN, PsbT, PsbX, и PsbZ) локализуются в этой структуре. Предполагается, что PsbL, PsbM, и PsbT вовлечены в формирование димеров PU Φ C-II, в то время как PsbI и PsbX, вероятно, стабилизируют связывание 5 и 6 молекул хлорофилла, Chl_zD1 и Chl_zD2, которые связаны с PsbA и PsbD, соответственно. Субъединицы PsbJ, PsbK, PsbN, и PsbZ сгруппированы вблизи PsbC и, предполагается, участвуют в связывании каротиноидов (Ferreira et al., 2004). На стромальной стороне структуры, сайт связывания Q_A состоит из аминокислотных остатков от PsaD; сайт связывания Q_B состоит из лигандов, расположенных на PsbA.

Негемовое железо, расположенное между этими сайтами завершает структуру, которая очень похожа, но не идентична, хиноновым сайтам фотосинтезирующих бактерий (Kern et al., 2005).

По прогнозам от мутагенеза и биохимических экспериментов (Bricker, Frankel, 2002) крупные внешние петли PsbB и PsbC обеспечивают сайты связывания для прикрепления субъединицы PsbO, которая видна на люминальной стороне комплекса как удлиненная структура, содержащая β-складки, в соответствии с предсказаниями физических характеристик растворимого белка (Xu et al., 1994; Betts et al., 1997; Shutova et al., 1997; Zubrzycki et al., 1998; Lydakis-Simantiris et al., 1999, 1999а).

В структурной модели, N-концевой белок связан с внешней петлей PsbC, в то время как петля в структуре PsbO вступает в контакт с внешним доменом PsbB.

Однако структура не дает никаких доказательств обнаруженного взаимодействия в ФС-II растений между N-концом PsbO и внешней петлей PsbB (Odom, Bricker, 1992). Наличие двух копий PsbO белка у растений (Xu, Bricker, 1992) может отвечать за дополнительное взаимодействие PsbO–PsbB в хлоропластах шпината. Хотя PsbO стабилизирует неорганический ионный кластер, а 3.5Å модель предполагает, что лиганды PsbO не связываются с атомами Mn. Тем не менее, петля в PsbO проходит в направлении Mn-кластера, и эта петля, как предполагают, может функционировать в качестве гидрофильного пути между люменом и неорганическим ионным кластером (Ferreira et al., 2004). Субъединицы у растений либо содержат четыре спирали (PsbQ), либо богатые βскладки (PsbP), которые отсутствуют в структурах PsbU и PsbV у цианобактерий. Наличие гема в PsbV дает дополнительные доказательства для отмеченных различий между прокариотическими и эукариотическими субъединицами (Nelson, Yocum, 2006).

Для окончательных выводов о структуре ФС-II из доступных структур требуются дополнительные данные. Ограниченное разрешение (3.8–3.2Å) боковых цепей аминокислот требует дополнительных исследований для моделирования и создания точной структуры (Biesiadka et al., 2004). Один из основных вопросов касается структуры неорганического иона самого кластера. Все модели на сегодняшний день позволяют предположить расположение мономер–тример атомов Мп в кластере, в соответствии со спектроскопическими

экспериментами (Peloquin et al., 2000). В детальной модели Ferreira et al. (Ferreira et al., 2004), три атома Mn и атом Ca^{2+} образуют ассиметричную кубо-подобную структуру, в которой отдельный атом Mn может располагаться так, чтобы играть важную роль в окислении H₂O.



Рис. 5. Структура фотосистемы II цианобактерий (вид сбоку). Расположение внешних полипептидов показано вместе с внутренними субъединицами PsbA–PsbD и малой дополнительной субъединицей, PsbZ. Окраска хромофоров дана на рис. 20; показаны геммы цитотхромов c_{550} и b_{559} (*красные*), Mn-кластер (*синий*) и ось псевдо-C₂-симметрии между мономерными субъединицами (*вертикальная пунктирная стрелка*) гомодимера (Nelson, Yocum, 2006).

К сожалению, высокая энергия Х-лучей и время воздействия, используемые для получения дифракционных данных, приводят к радиационным повреждениям, которые восстанавливают атомы Mn, вероятно всех до Mn^{2+} , в отличие от нативных состояний окисления Mn^{3+} и Mn^{4+} (Riggs et al., 1992; Klein et al., 1993). Вполне вероятно, что Mn^{2+} отделен от нативных лигандов, в результате чего возможна некоторая перегруппировка аминокислотных остатков в сайте связывания (Dau et al., 2004). Такая возможность также предполагалась в экспериментах с использованием ИК-Фурье спектрометрии (FTIR) на Φ C-II *Synechocystis* 6803, которые показали, что карбоксильный конец PsbA (Ala344) представляет собой лиганд к кластеру Mn (Chu et al., 2004; Mizusawa et al., 2004; Strickler et al., 2005). В наиболее детальной модели, основанной на кристаллической структуре, этот остаток размещается около атома Ca²⁺, но не в качестве лиганда Mn. Эти оговорки не должны отвлекать от огромных достижений, полученных по кристаллической структуре Φ C-II. Однако для проверки современной модели неорганического ионного кластера требуется все больше данных, полученных по коротким временам воздействия.

3. Структура реакционного центра фотосистемы ІІ

Ядро комплекса фотосистемы II состоит из большого числа внутренних субъединиц и трех внешних полипептидов, кодируемых *psb*-генами, большинство из которых, в случае эукариотических фотосинтетических организмов (растений и водорослей), являются

пластидными, а остальная часть ядерными (Pagliano et al., 2013). Существует широко распространенное мнение о том, что комплекс ФС-II обычно функционирует как димер, а мономерный комплекс может быть, как промежуточная форма при нормальном пути сборки или в цикле восстановления после повреждения (Barbato et al., 1992; Hankamer et al., 1997).



Рис. 6. Изображение мономера комплекса реакционного центра ФС-II вдоль мембраны со стороны внутритилакоидного пространства, показывающее расположение трансмембранных спиралей внутренних белковых субъединиц. Они связаны с теми же белками в другом мономере. Граница между мономерами показана *пунктирной линией*. Псевдо-ось, расположенная перпендикулярно плоскости мембраны, проходит через негемовое Fe, связанное с трансмембранными спиралями гетеродимера D1/D2, а субъединицы LMM, PsbI и PsbX, а также CP43 и CP47 выделены *овальной и округлыми линиями* (Pagliano et al., 2013). Рисунок составлен на основе работы Ferreira et al. (2004) с дополнениями из работ Guskov et al. (2009) и Umena et al. (2011).

В каждом мономере (рис. 6) основные интегральные субъединицы D1 (PsbA) и D2 (PsbD) связываются с большинством окислительно-восстановительных кофакторов, образующих цепь переноса электронов при участии антенных белков CP47 (PsbB) и CP43 (PsbC), а также двух субъединиц *a* и *b* (PsbE и PsbF) цитохрома b₅₅₉ (Цит b559).

Все перечисленные субъединицы у эукариот кодируются хлоропластными генами. Они образуют реакционный центр (РЦ) ФС-II, представленный во всех О₂-выделяющих фотосинтезирующих организмах.

Наряду с основными субъединицами РЦ ФС-II, есть несколько интегральных мембранных субъединиц с низкой молекулярной массой (субъединицы LMM, менее 10 кДа), на которые приходится более половины всего комплекса. Эти субъединицы являются более разнообразными (Shi and Schröder, 2004; Shi et al., 2012). Рассмотрение структурных моделей свидетельствует о том, что субъединицы LMM играют роль в стабилизации и связывании кофакторов с ядром комплекса ФС-II. Для полностью функциональной ФС-II требуется ансамбль O_2 -выделяющего комплекса (OEC), содержащего Mn_4CaO_5 металло-кластер, который стабилизируется периферийными субъединицами. Хотя ядро РЦ ФС-II и O_2 -выделяющий комплекс остаются высоко консервативными в процессе эволюции от цианобактерий до высших растений, их субъединицы, стабилизирующие O_2 -выделяющий комплекс, отличаются.

Общепринятое мнение, что у высших растений и зеленых водорослей внешними белками являются PsbO, PsbP и PsbQ, у цианобактерий и диатомовых водорослей – PsbO, PsbV и PsbU, а у красных водорослей в дополнение к PsbO, PsbV и PsbU есть четвертая субъединица, называемая PsbQ' (Roose et al., 2007; Enami et al., 2008; Bricker et al., 2012). Ранее были детально описаны Psb белки ФС-II, кодируемые *psb*-генами, а также дана подробная характеристика всех основных компонентов пигмент-белковых комплексов фотосистемы II (Pagliano et al., 2013).

Список литературы

- Allen J.P., Feher G., Yeates T.O., Komiya H., Rees D.C. Structure of the reaction center from Rhodobacter sphaeroides R-26: the protein subunits // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. № 17. P. 6162–6166.
- Barbato R., Friso G., Rigoni F., Dalla Vecchia F., Giacometti G.M. Structural changes and lateral redistribution of photosystem II during donor side photoinhibition of thylakoids // J. Cell Biol. 1992. V. 119. № 2. P. 325–335.
- *Ben-Shem A., Frolow F., Nelson N.* The crystal structure of plant photosystem I // Nature. 2003. V. 426. P. 630–635.
- Ben-Shem A., Frolow F., Nelson N. Evolution of photosystem I from symmetry through pseudosymmetry to asymmetry // FEBS Lett. 2004. V. 564. № 3. P. 274–280.
- Betts S.D., Ross J.R., Pichersky E., Yocum C.F. Mutation Val235Ala weakens binding of the 33kDa manganese stabilizing protein of photosystem II to one of two sites // Biochemistry. 1997. V. 36. № 13. P. 4047–4053.
- *Biesiadka J., Loll B., Kern J., Irrgang K.D., Zouni A.* Crystal structure of cyanobacterial photosystem II at 3.2Å resolution: a closer look at the Mn-cluster // Phys. Chem. Chem. Phys. 2004. V. 6. P. 4733–4736.
- Bricker T.M., Frankel L.K. The structure and function of CP47 and CP43 in photosystem II // Photosynth. Res. 2002. V. 72. № 2. P. 131–146.
- Bricker T.M., Roose J.L., Fagerlund R.D., Frankel L.K., Eaton-Rye J.J. The extrinsic proteins of photosystem II // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. № 1. P. 121–142.
- Calderone V., Trabucco M., Vujicić A., Battistutta R., Giacometti G.M., Andreucci F., Barbato R., Zanotti G. Crystal structure of the PsbQ protein of photosystem II from higher plants // EMBO Rep. 2003. V. 4. № 9. P. 900–905.
- *Chu H.A., Hillier W., Debus R.J.* Evidence that the C-terminus of the D1 polypeptide of photosystem II is ligated to the manganese ion that undergoes oxidation during the S1 to S2 transition: an isotope-edited FTIR study // Biochemistry. 2004. V. 43. № 11. P. 3152–3166.

- *Dau H., Liebisch P., Haumann M.* The structure of the manganese complex of Photosystem II in its dark-stable S1-state-EXAFS results in relation to recent crystallographic data // Phys. Chem. Chem. Phys. 2004. V. 6. P. 4781–4792.
- Deisenhofer J., Michel H. Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium Rhodopseudomonas viridis // EMBO J. 1989. V. 8. № 8. P. 2149–2170.
- Dexter D.L. A theory of sensitized luminescence in solids // J. Chem. Phys. 1953. V. 21. P. 836-850.
- *Enami I., Okumura A., Nagao R., Suzuki T., Iwai M., Shen J.R.* Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species // Photosynth. Res. 2008. V. 98. № 1–3. P. 349–363.
- *Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K., Barber J., Iwata S.* Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center // Science. 2004. V. 303. № 5665. P. 1831–1838.
- Forster T. Zwischen molekular energiewanderung und fluoreszenz // Ann. Phys. 1948. V. 2. P. 55– 75.
- Fotinou C., Kokkinidis M., Fritzsch G., Haase W., Michel H., Ghanotakis D.F. Characterization of a photosystem II core and its three-dimensional crystals // Photosynth. Res. 1993. V. 37. № 1. P. 41–48.
- Fromme P., Witt H.T., Schubert W.-D., Klukas O., Saenger W., Krauss N. Structure of photosystem I at 4.5Å resolution: a short review including evolutionary aspects // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1275. P. 76–83.
- Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A., Saenger W. Cyanobacterial photosystem II at 2.9Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. № 3. P. 334–342.
- Hankamer B., Nield J., Zheleva D., Boekema E., Jansson S., Barber J. Isolation and biochemical characterization of monomeric and dimeric photosystem II complexes from spinach and their relevance to the organization of photosystem II in vivo // Eur. J. Biochem. 1997. V. 243. № 1– 2. P. 422–429.
- Hippler M., Reichert J., Sutter M., Zak E., Altschmied L., Schröer U., Herrmann R.G., Haehnel W. The plastocyanin binding domain of photosystem I // EMBO J. 1996. V. 15. № 23. P. 6374– 6384.
- *Ifuku K., Nakatsu T., Kato H., Sato F.* Crystal structure of the PsbP protein of photosystem II from *Nicotiana tabacum* // EMBO Rep. 2004. V. 5. № 4. P. 362–367.
- Ihalainen J.A., Jensen P.E., Haldrup A., van Stokkum I.H., van Grondelle R., Scheller H.V., Dekker J.P. Pigment organization and energy transfer dynamics in isolated photosystem I (PSI) complexes from Arabidopsis thaliana depleted of the PSI-G, PSI-K, PSI-L, or PSI-N subunit // Biophys. J. 2002. V. 83. № 4. P. 2190–2201.
- Jensen P.E., Bassi R., Boekema E.J., Dekker J.P., Jansson S., Leister D., Robinson C., Scheller H.V. Structure, function and regulation of plant photosystem I // Biochim. Biophys. Acta. 2007. V. 1767. № 5. P. 335–352.
- Jolley C., Ben-Shem A., Nelson N., Fromme P. Structure of plant photosystem I revealed by theoretical modeling // J. Biol. Chem. 2005. V. 280. № 39. P. 33627–33636.
- Jordan P., Fromme P., Witt H.T., Klukas O., Saenger W., Krauss N. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5Å resolution // Nature. 2001. V. 411. № 6840. P. 909–917.
- Kamiya N., Shen J.R. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from Thermosynechococcus vulcanus at 3.7Å resolution // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 1. P. 98–103.
- *Kern J., Loll B., Zouni A., Saenger W., Irrgang K.D., Biesiadka J.* Cyanobacterial photosystem II at 3.2Å resolution the plastoquinone binding pockets // Photosynth. Res. 2005. V. 84. № 1–3. P. 153–159.
- Klein M.P., Sauer K., Yachandra V.K. Perspectives on the structure of the photosynthetic oxygen evolving manganese complex and its relation to the Kok cycle // Photosynth. Res. 1993. V. 38. № 3. P. 265–277.

- Klukas O., Schubert W.D., Jordan P., Krauss N., Fromme P., Witt H.T., Saenger W. Photosystem I, an improved model of the stromal subunits PsaC, PsaD, and PsaE // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 11. P. 7351–7360.
- Kuhlbrandt W., Wang D.N., Fujiyoshi Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography // Nature. 1994. V. 367. № 6464. P. 614–621.
- Liu Z., Yan H., Wang K., Kuang T., Zhang J., Gui L., An X., Chang W. Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72Å resolution // Nature. 2004. V. 428. № 6980. P. 287–292.
- Lydakis-Simantiris N., Betts S.D., Yocum C.F. Leucine 245 is a critical residue for folding and function of the manganese stabilizing protein of photosystem II // Biochemistry. 1999. V. 38. № 47. P. 15528–15535.
- Lydakis-Simantiris N., Hutchison R., Betts S.D., Barry B.A., Yocum C.F. Manganese stabilizing protein of photosystem II is a thermostable, natively unfolded polypeptide // Biochemistry. 1999a. V. 38. № 1. P. 404–414.
- *Merchant S., Sawaya M.R.* The light reactions: a guide to recent acquisitions for the picture gallery // Plant Cell. 2005. V. 17. № 3. P. 648–663.
- Mizusawa N., Yamanari N., Kimura Y., Ishii A., Nakazawa S., Ono T.-A. Changes in the functional and structural properties of the Mn cluster induced by replacing the side group of the cterminus of the D1 protein of photosystem II // Biochemistry. 2004. V. 43. № 46. P. 14644– 14652.
- Nelson N., Ben-Shem A. Photosystem I reaction center: past and future // Photosyth. Res. 2002. V. 73. № 1–3. P. 193–206.
- Nelson N., Ben-Shem A. The complex architecture of oxygenic photosynthesis // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004. V. 5. № 12. P. 971–982.
- Nelson N., Ben-Shem A. The structure of photosystem I and evolution of photosynthesis // Bioessays. 2005. V. 27. № 9. P. 914–922.
- Nelson N., Sacher A., Nelson H. The significance of molecular slips in transport systems // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. V. 3. № 11. P. 876–881.
- *Nelson N., Yocum C.F.* Structure and function of photosystems I and II // Annu. Rev. Plant Biol. 2006. V. 57. P. 521–565.
- Nield J., Orlova E.V., Morris E.P., Gowen B., van Heel M., Barber J. 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis // Nat. Struct. Biol. 2000. V. 7. № 1. P. 44–47.
- *Odom W.R., Bricker T.M.* Interaction of Cpa-1 with the manganese-stabilizing protein of photosystem II identification of domains cross-linked by 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl]carbodiimide // Biochemistry. 1992. V. 31. P. 5616–5620.
- *Okkels J.S., Nielsen V.S., Scheller H.V., Moller B.L.* A cDNA clone from barley encoding the precursor from the photosystem I polypeptide PSI-G: sequence similarity to PSI-K // Plant Mol. Biol. 1992. V. 18. № 5. P. 989–994.
- Olesen K., Ejdeback M., Crnogorac M.M., Kostic N.M., Hansson O. Electron transfer to photosystem I from spinach plastocyanin mutated in the small acidic patch: ionic strength dependence of kinetics and comparison of mechanistic models // Biochemistry. 1999. V. 38. P. 16695–16705.
- *Pagliano C., Saracco G., Barber J.* Structural, functional and auxiliary proteins of photosystem II // Photosynth. Res. 2013. V. 116. № 2–3. P. 167–188.
- Peloquin J.M., Campbell K.A., Randall D.W., Evanchik M.A., Pecoraro V.L., Armstrong W.H., Britt R.D. Mn-55 ENDOR of the S2 state multiline EPR signal of photosystem II: implications on the structure of the tetranuclear Mn cluster // J. Am. Chem. Soc. 2000. V. 122. P. 10926– 10942.
- *Riggs P.J., Mei R., Yocum C.F., Penner-Hahn J.E.* Reduced derivatives of the manganese cluster in the photosynthetic oxygen-evolving complex // J. Am. Chem. Soc. 1992. V. 114. P. 10650–10651.

- *Ritz T., Park S., Schulten K.* Kinetics of excitation migration and trapping in the photosynthetic unit of purple bacteria // J. Phys. Chem. B. 2001. V. 105. P. 8259–8267.
- *Rosgaard L., Zygadlo A., Scheller H.V., Mant A., Jensen P.E.* Insertion of the plant photosystem I subunit G into the thylakoid membrane // FEBS J. 2005. V. 272. № 15. P. 4002–4010.
- Roose J.L., Wegener K.M., Pakrasi H.B. The extrinsic proteins of photosystem II // Photosynth. Res. 2007. V. 92. № 3. P. 369–387.
- *Shi L.X., Schröder W.* The low molecular mass subunits of the photosynthetic supracomplex, photosystem II // Biochim. Biophys. Acta. 2004. V. 1608. № 2–3. P. 75–96.
- Shi L.X., Hall M., Funk C., Schröder W. Photosystem II, a growing complex: updates on newly discovered components and low molecular mass proteins // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1817. № 1. P. 13–25.
- Schubert W.D., Klukas O., Saenger W., Witt H.T., Fromme P., Krauss N. A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems: a comparison based on the structural model of photosystem I // J. Mol. Biol. 1998. V. 280. № 2. P. 297–314.
- Seidler A. The extrinsic polypeptides of photosystem II // Biochim. Biophys. Acta. 1996. V. 1277. № 1–2. P. 35–60.
- Sener M.K., Jolley C., Ben-Shem A., Fromme P., Nelson N., Schulten K. Comparison of the lightharvesting networks of plant and cyanobacterial photosystem I // Biophys. J. 2005. V. 89. № 3. P. 1630–1642.
- Shutova T., Irrgang K.D., Shubin V., Klimov V.V., Renger G. Analysis of pH-induced structural changes of the isolated extrinsic 33 kDa protein of photosystem II // Biochemistry. 1997. V. 36. № 21. P. 6350–6358.
- Standfuss J., Terwisscha van Scheltinga A.C., Lamborghini M., Kuhlbrandt W. Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5Å resolution // EMBO J. 2005. V. 24. № 5. P. 919–928.
- Strickler M.A., Walker L.M., Hillier W., Debus R.J. Evidence from biosynthetically incorporated strontium and FTIR difference spectroscopy that the C-terminus of the D1 polypeptide of photosystem II does not ligate calcium // Biochemistry. 2005. V. 44. № 24. P. 8571–8577.
- Umena Y., Kawakami K., Shen J.R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9Å // Nature. 2011. V. 473. № 7345. P. 55–60.
- Xu Q., Nelson J., Bricker T.M. Secondary structure of the 33 kDa, extrinsic protein of photosystem
 II a far-UV circular dichroism study // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1188. № 3. P. 427–431.
- Xu Q., Bricker T.M. Structural organization of proteins on the oxidizing side of photosystem II 2 molecules of the 33-kDa manganese-stabilizing proteins per reaction center // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. № 36. P. 25816–25821.
- Yang M., Fleming G.R. Influence of phonons on exciton transfer dynamics: comparison of the Redfield, Forster, and modified Redfield equations // Chem. Phys. 2002. V. 282. P. 1163– 1180.
- *Yang M.N., Fleming G.R.* Construction of kinetic domains in energy trapping processes and application to a photosynthetic light harvesting complex // J. Chem. Phys. 2003. V. 119. P. 5614–5622.
- Zouni A., Witt H.T., Kern J., Fromme P., Krauss N., Saenger W., Orth P. Crystal structure of photosystem II from Synechococcus elongatus at 3.8 angstrom resolution // Nature. 2001. V. 409. № 6821. P. 739–743.
- Zubrzycki I.Z., Frankel L.K., Russo P.S., Bricker T.M. Hydrodynamic studies on the manganesestabilizing protein of photosystem II // Biochemistry. 1998. V. 37. № 39. P. 13553–13558.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одноклеточная гаплоидная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii* имеет значительные преимущества для генетических и физиологических исследований в отличие от других гаплоидных зеленых водорослей, таких как *Chlorella* и др., не имеющих полового цикла размножения, и диплоидных высших растений с длительным периодом роста и размножения. Вегетативные клетки *Chlamydomonas reinhardtii* можно быстро выращивать и проводить необходимые исследования, так как в жидкой среде на одно клеточное деление необходимо 6–12 часов. При половом размножении на одно поколение от слияния гамет и образования зигот до их созревания и выхода дочерних зооспор *Chlamydomonas reinhardtii* требуется 6 суток. Гаплоидный набор хромосом и наличие у нее всего одного хлоропласта, имеющего одинаковый с высшими растениями состав пигментов и структурнофункциональную организацию фотосистем в мембранах хлоропластов, несомненно, позволяет использовать ее в качестве модельного объекта. Ценность этого объекта состоит не только в ускорении процесса исследования, но и дает преимущество в том, что позволяет получать синхронные культуры клеток, а полученные результаты можно сравнивать с данными, полученными на хлоропластах высших растений.

Важными результатами для всех последующих исследований можно считать представленные в этой работе доказательства наследственной непрерывности хлоропластов, как при вегетативном размножении, так и на всех стадиях полового размножения. Описанные методы получения пигментных и нефотосинтезирующих мутантов позволили нам широко использовать мутанты для всесторонних исследований биохимического состава, структуры и функции хлоропластов.

Кроме того, использование пигментных мутантов позволило нам обнаружить и впервые описать все основные этапы биогенеза мембранной системы хлоропластов *Chlamydomonas reinhardtii*. Изучены пути биосинтеза хлорофилла и каротиноидов. В настоящее время установлена локализация хлорофиллов и каротиноидов в мембранах тилакоидов, показана их роль в структуре и функционировании фотосистем.

С помощью нефотосинтезирующих мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* удалось установить закономерность распределения спектральных форм хлорофилла между четырьмя пигмент-белковыми комплексами фотосистем и обнаружить максимумы излучения флуоресценции хлорофилла, принадлежащие реакционным центрам ФС-I и ФС-II, а также их светособирающим комплексам ССК-I и ССК-II непосредственно в целых клетках мутантов.

Благодаря наличию полученных нами уникальных одинарных, двойных и тройных мутантов была изучена их фотосинтетическая активность и рассчитаны величины фотосинтетических единиц для реакционных центров ФС-I и ФС-II.

Используя набор различных нефотосинтезирующих мутантов, нам удалось с помощью электронной микроскопии изучить пространственную локализацию хлорофиллбелковых комплексов реакционных центров фотосистем и их светособирающих комплексов в мембранах тилакоидов гран и межгранных участков. Охарактеризовано взаимодействие белковых комплексов внутри фотосистем и участие их отдельных компонентов в электронно-транспортной цепи фотосинтеза.

Недавние исследования позволили охарактеризовать все белковые компоненты, участвующие в молекулярной организации комплексов реакционных центров ФС-I и ФС-II. Детально изучен генетический контроль ключевых белковых компонентов, их взаимодействие и функции в процессе фотосинтеза. Кроме того, были изучены все вспомогательные комплексы, как для высших растений и зеленых водорослей, так и для цианобактерий, близких по структуре реакционных центров. Выявлены их сходства и отличия. Показано как происходит формирование светособирающих комплексов ССК-I и ССК-II и их объединение с комплексы в мембранах тилакоидов. Изучено участие комплексов фотоокисления воды в структуре и функционировании ядерного комплекса ФС-II.

Краткие сведения об авторе



Ладыгин Владимир Георгиевич родился 20 декабря 1941 года. В 1965 г. окончил Кафедру генетики Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова. В 1970 г. защитил кандидатскую диссертацию на тему: "Пигментные мутанты как модельная система для изучения структуры и функции хлоропластов" по специальности "биофизика" в Институте биофизики АН СССР в г. Пущино Московской области. В 1993 г. защитил докторскую диссертацию на тему: "Генетическая детерминация фотосистем и структурно-функциональная организация мембран хлоропластов" по специальности "биохимия" в Институте фундаментальных проблем биологии РАН в г. Пущино Московской области.

В разные годы с 1993 г. по 2015 г. работал в ИФПБ РАН ведущим научным сотрудником, главным научным сотрудником и заведующим лабораторией "Генетики фототрофных организмов". Ладыгиным В.Г. опубликовано более 170 научных статей в Отечественных Зарубежных журналах список ведущих И (см. статей: http://www.algae.ru/543), обзор (http://algae.ru/625), две монографии по *Chlamydomonas* reinhardtii: 1) Ладыгин В.Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей // Вопросы современной альгологии. 2014. № 2 (6). URL: http://algology.ru/529 [Монография 87 с.]; 2) Ладыгин В.Г. Жизненный цикл, наследование, биогенез, биохимический состав, спектральные свойства и структурно-функциональная организация хлоропластов Chlamydomonas reinhardtii // Вопросы современной альгологии. 2015. № 2 (9). www.algology.ru. [Монография 161 с.].

Глава в книге: Ladygin V.G. Structural and Functional Organization of the Pigment-Protein Complexes of the Photosystems in Mutant Cells of Green Algae and Higher Plants. *Photosynthesis at Different Levels of the Organization*. Ed. S.I. Allakhverdiev. Wiley. 2015. № 5. P. 177–231.