

Санкт-Петербургский Государственный университет  
Биологический факультет  
Кафедра генетики и биотехнологии

Матиив Антон Богданович

Генетические механизмы супрессии мутаций в генах,  
контролирующих темновой биосинтез хлорофилла у зеленой водоросли  
*Chlamydomonas reinhardtii*

Выпускная квалификационная работа магистра

Работа выполнена на кафедре  
генетики и биотехнологии

Научный руководитель:  
с.н.с., д.б.н. Чекунова Е.М.

Санкт-Петербург  
2018

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	4
ВВЕДЕНИЕ .....	5
1 Обзор литературы.....	7
1.1 Биосинтез тетрапирролов в фотосинтезирующей клетке.....	7
1.2 Биосинтез хлорофилла из протопорфирина IX .....	11
1.2.1 Магний-хелатаза .....	12
1.2.2 Гены, кодирующие магний-хелатазу.....	12
1.2.3 Активность магний-хелатазы .....	14
1.2.4 Исследования отдельных субъединиц магний-хелатазы.....	15
1.2.5 Структурные исследования и предложенный механизм функционирования магний-хелатазы .....	16
1.3 Регуляция биосинтеза хлорофилла .....	18
1.3.1 Регуляция синтеза АЛК .....	19
1.3.2 Регуляция в точке ветвления синтез гема и хлорофилла .....	20
1.3.3 Регуляция биосинтеза хлорофилла цитокининами .....	22
1.4 Цитокинины .....	23
1.4.1 Биосинтез цитокининов у <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	25
1.4.2 Микробные продуценты цитокининов.....	28
1.4.3 Цитокинины у фотосинтезирующих микроорганизмов .....	30
1.4.4 Цитокинины микроводорослей .....	31
1.5 Супрессия как метод генетического анализа.....	34
1.5.1 Механизмы супрессии .....	35
1.5.2 Использование супрессии при изучении биосинтеза хлорофилла.....	38
2 Материалы и методы.....	41
2.1 Растительный материал .....	41
2.2 Условия культивирования .....	41
2.3 Изучение потребности штамма R6-brs в дрожжевом экстракте для роста.....	42
2.4 Определение размеров клеток.....	42
2.5 Измерение скорости деления клеток .....	42
2.6 Сортировка клеток по размеру методов цитометрии.....	42
2.7 Выделение ДНК.....	43
2.8 Выделение РНК .....	43
2.9 Получение кДНК .....	44

2.10 Анализ экспрессии генов биосинтеза хлорофилла методом ПЦР-РВ.....	44
2.12 Анализ экспрессии предположительных генов биосинтеза цитокининов методом ПЦР-РВ .....	45
2.13 Гель-электрофорез.....	46
2.14 Секвенирование гена <i>CHLH</i> .....	47
2.15 Полногеномное секвенирование .....	47
3 Результаты.....	49
3.1 Изучение морфологических особенностей ревертанта R6-brs.....	49
3.2 Анализ экспрессии генов, кодирующих основные ферменты биосинтеза ХЛ и цитокининов в клетках <i>C. reinhardtii</i> .....	54
3.3 Поиск супрессорной мутации в геноме ревертанта R6-brs .....	58
ОБСУЖДЕНИЕ .....	59
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	62
ВЫВОДЫ .....	64
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	65

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AAA+ – АТФаза, ассоциированная с различными клеточными активностями;

АЛК – 5-аминолевулиновая кислота;

МХ – магний-хелатаза;

ПП – протопорфирин IX;

ПХЛД – протохлорофиллид;

ХЛ – хлорофилл;

CHLI – субъединица I магний-хелатазы;

CHLD – субъединица D магний-хелатазы;

CHLN – субъединица N магний-хелатазы;

GTR – глутамил-тРНК-редуктаза;

Mg-ПП – магний-протопорфирин IX;

Mg-ППМЭ – магний-протопорфирин IX монометилловый эфир

## ВВЕДЕНИЕ

Хлорофиллы (ХЛ) – уникальные природные тетрапирролы, играющие ключевую роль не только в жизни фотосинтезирующих организмов, но и всей биосфере. Их биосинтез связан с морфогенезом растительной клетки и реакциями фотосинтеза – запасанием и передачей энергии света. Важнейшая фундаментальная проблема современной биологической науки состоит в изучении природы процессов биосинтеза ХЛ, механизмов его генетической и биохимической регуляции и закономерностей изменений, которые они претерпели в ходе эволюции при адаптации к различным источникам и формам освещения. Изучение супрессии мутаций, блокирующих ключевые этапы биосинтеза ХЛ у *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*), открывает возможности выявления компенсаторных механизмов, обеспечивающих функционирование аппарата биосинтеза ХЛ при его нарушении, и позволяет оценить адаптивный потенциал фотосинтезирующей клетки.

Большое внимание уделяется изучению роли цитокининов в регуляции биосинтеза хлорофилла. Свет и цитокинины оказывают схожее влияние на рост и развитие растений – они контролируют раскрытие семядолей и развитие листьев, апикальное доминирование, дифференциацию хлоропласта и др. [Аверина и Яронская, 2012]. Целый ряд фотосинтетических ядерных генов, экспрессия которых регулируется светом, также отвечает и на действие цитокининов. При этом о роли и метаболизме цитокининов у одноклеточных водорослей известно очень мало.

Объект исследования – зеленая одноклеточная водоросль хламидомонада *C. reinhardtii*. Этот микроорганизм, интенсивно используемый в экспериментальных исследованиях генетического контроля процессов фотосинтеза, является модельным биологическим объектом, совмещающим в себе особенности генетических систем про- и эукариот [Harris, 1989; Rochaix, 1995]. *C. reinhardtii* относят к зелёным водорослям (*Chlorophyta*), порядка *Chlamydomonadales* (так известный как *Volvoxcales*), семейства *Chlamydomonadaceae*. Она способна к трём типам питания: фототрофному, миксотрофному и гетеротрофному. В отличие от высших растений, формирование фотосинтетических мембран хлоропласта и синтез хлорофилла в клетках хламидомонады происходит не только на свету, но и в темноте, – за счёт утилизации источников углерода из питательной среды. Успешное использование *C. reinhardtii* в качестве модельного объекта генетических исследований обусловлено такими особенностями ее биологии, как

наличие полового размножения, короткий гаплофазный жизненный цикл и простота культивирования.

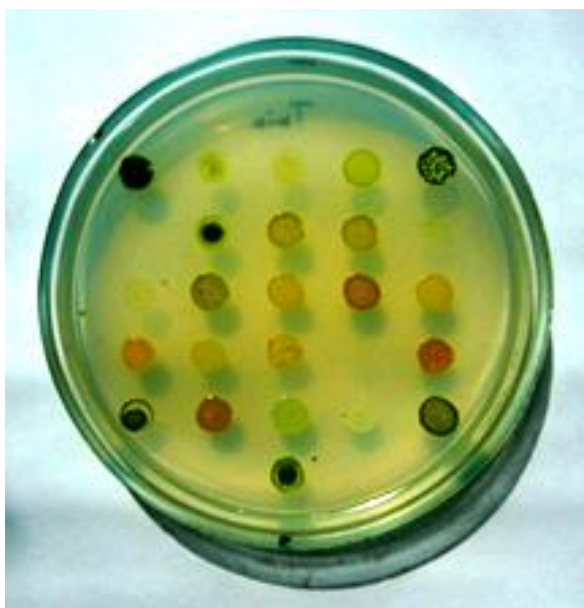
Целью работы стало изучение ревертанта R6-brs, у которого восстановление биосинтеза хлорофилла на фоне мутации бесхлорофильности *brs-1* в гене *CHLH*, кодирующем большую субъединицу магний-хелатазы, произошло в результате доминантной супрессорной мутации, тесно сцепленной с мутацией *brs-1*.

Для реализации поставленной цели было необходимо выполнить следующие задачи:

1. Освоение навыков работы с культурами клеток водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, приготовления сред и методов культивирования.
2. Освоение молекулярно-биологических методов работы с водорослями.
3. Изучение морфологических особенностей ревертанта R6-brs.
4. Анализ экспрессии генов, кодирующих основные ферменты биосинтеза ХЛ и цитокининов в клетках *C. reinhardtii* дикого типа и ревертанта в различных условиях культивирования.
5. Поиск супрессорной мутации в геноме ревертанта R6-brs.

## 1 Обзор литературы

За последние нескольких десятилетий одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas (C.) reinhardtii* стала модельным организмом генетики фотосинтеза [Grossman, 2000]. Способность этой водоросли расти гетеротрофно в темноте, метаболизируя экзогенный ацетат, позволила относительно легко выделить широкий спектр мутантов *C. reinhardtii*, с нарушенным фотосинтезом (Рисунок 1) [Harris, 2001]. Такие мутанты легко анализируются методами гибридологического анализа, так как этот организм имеет половой процесс и относительно простой и короткий жизненный цикл. Кроме того, для изучения *C. reinhardtii* применимы различные физиологические, биохимические, генетические и молекулярные инструменты, что делает ее идеальной модельной системой для выяснения генетического контроля таких важнейших биологических процессов, как фотосинтез и образование хлорофилла [Rochaix, 2002].



**Рисунок 1. Пигментные мутанты *C. reinhardtii* из Петергофской Генетической Коллекции**

### 1.1 Биосинтез тетрапирролов в фотосинтезирующей клетке

Свет – основной фактор внешней среды, определяющий жизнь растений. При изучении процессов утилизации света растениями наибольший интерес представляют механизмы регуляции биосинтеза хлоропластных пигментов и их вовлечение не только в реакции фотосинтеза, но и в регуляцию других клеточных процессов. Пигменты

хлоропласта – хлорофиллы и каротиноиды играют важную роль в функционировании фотосинтетического аппарата, включая: управление энергией возбуждения, биогенез фотосинтетических мембран и интеграцию фотосинтетических функций с регуляцией других клеточных процессов. Как хлорофилл, так и молекулы каротиноидов связываются с интегральными белками машины фотосинтеза, где они поглощают световую энергию для генерации энергии химических связей (в виде сахаров), а также эффективно контролируют использование энергии возбуждения [Lohr et al., 2005]. Каротиноиды также участвуют в окислительно-восстановительных реакциях [Frank and Brudvig, 2004], защите организмов от фотоповреждений путем тушения синглетного кислорода и триплетных состояний хлорофилла [Baroli et al., 2003] и диссипации избыточной поглощенной энергии света посредством взаимодействия с синглетными возбужденными молекулами хлорофилла [Ma et al., 2003]. Они даже способны стабилизировать структуру тилакоидных мембран [Navaux and Niyogi, 1999]. Интересно, что интермедиаты биосинтеза хлорофилла (Mg-протопорфирин IX, протохлорофиллид) могут служить элементами ретроградной (из хлоропласта в ядро) регуляции, – молекулами, передающими сигналы из хлоропласта в ядро, тем самым регулируя экспрессию генов, кодирующих белки аппарата фотосинтеза, включая светособирающие хлорофилл-связывающие белки и полипептиды светособирающего комплекса (LHC) [Strand et al., 2003]. Механизмы биосинтеза хлорофиллов и каротиноидов точно настроены для адаптации растущих клеток в условиях различного освещения, и защиты клетки от фотодеструкции. Промежуточные соединения биосинтеза хлорофиллов нестабильны и фотореактивны, и их накопление может приводить к фотосенсибилизации – вызывать образование реактивных форм кислорода, разрушающего липиды клеточных мембран. Хотя образование как хлорофиллов, так и каротиноидов происходит в хлоропластах, в сосудистых растениях все ферменты, задействованные в этих процессах, кодируются ядерными генами и синтезируются в цитоплазме клеток в качестве белков-предшественников с аминоконцевыми удлинителями (транзитными пептидами), которые позволяют им проходить через двойные мембраны хлоропласта к месту функционирования [Lohr et al., 2005].

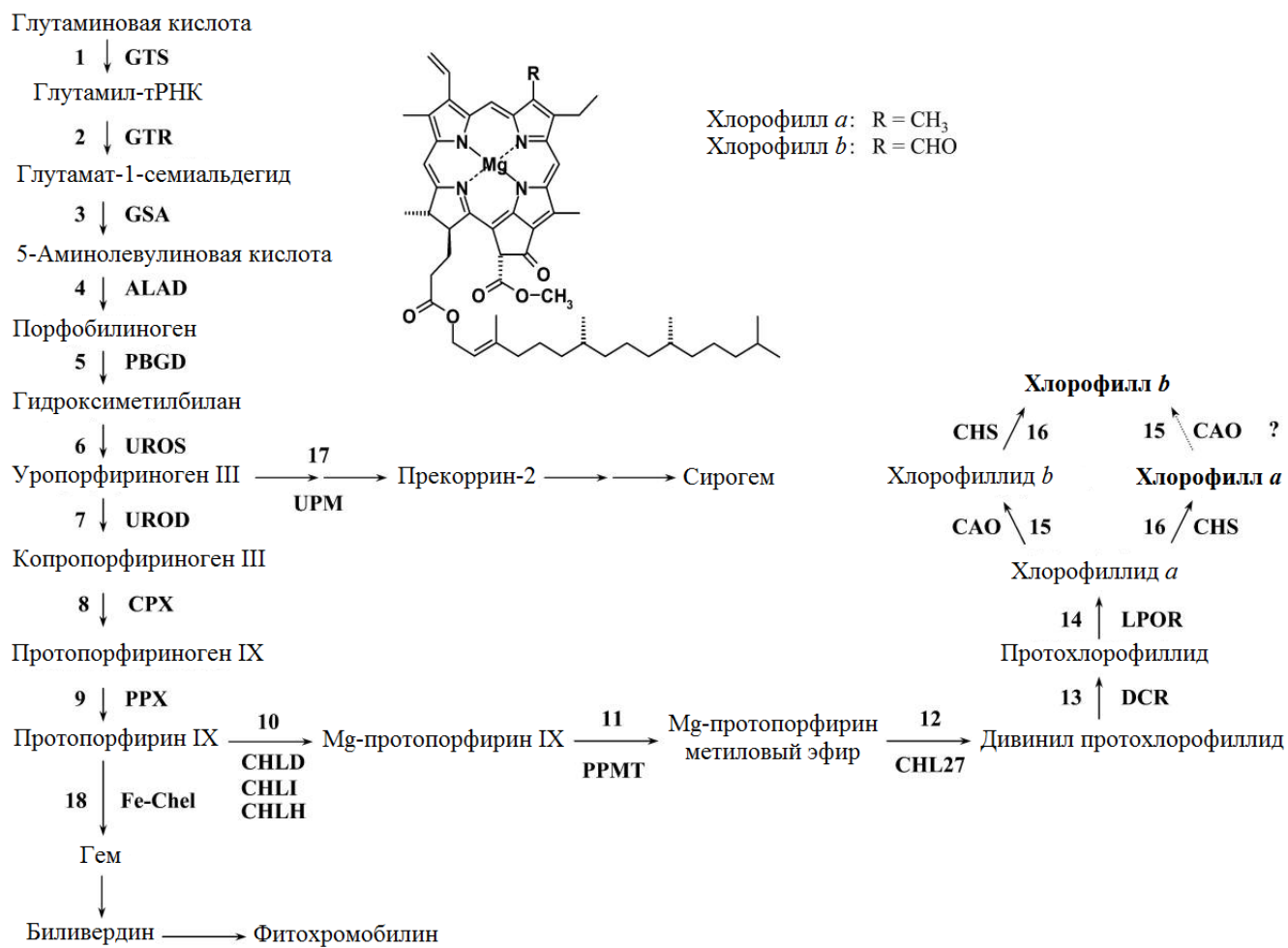
Хлорофилл представляет собой циклический тетрапиррол, координированный центральным ионом  $Mg^{2+}$ . Синтез хлорофилла в растениях и водорослях происходит по C5-пути, в котором исходный предшественник пути, 5-аминолевулиновая кислота (АЛК), синтезируется из молекул глутаминовой кислоты (Рисунок 2). Затем две молекулы АЛК конденсируются с образованием порфобилиногена, и четыре молекулы порфобилиногена соединяются, образуя первый линейный тетрапиррол гидроксиметилбилан, который под действием фермента уропорфириноген III синтазы превращается в уропорфириноген III.



После образования уропорфириногена III происходит первое разветвление путей биосинтеза тетрапиррольных пигментов (Рисунок 2). Декарбоксилирование уропорфириногена III ведет к порфиринам и хлорофиллам, а С-метилование через Прекоррин-1 – к витамину B12 и другим кобаламинам [Миронов, 1998].

Превращение уропорфириногена III под влиянием уропорфириноген III декарбоксилазы включает последовательное декарбоксилирование остатков уксусной кислоты до метильной группы с образованием копропорфириногена III. Копропорфириноген III под действием копропорфириноген III-оксидазы подвергается окислительному декарбоксилированию. В результате два остатка пропионовой кислоты превращаются в винильные группы и образуется протопорфириноген IX. Последний ферментативно окисляется в протопорфирин IX. На этом участке происходит дальнейшее разветвление путей биосинтеза. Введение ионов двухвалентного железа (фермент феррохелатаза) приводит к образованию протогема, который является протетической группой в многочисленных природных белках – гемопротеидах [Миронов, 1998].

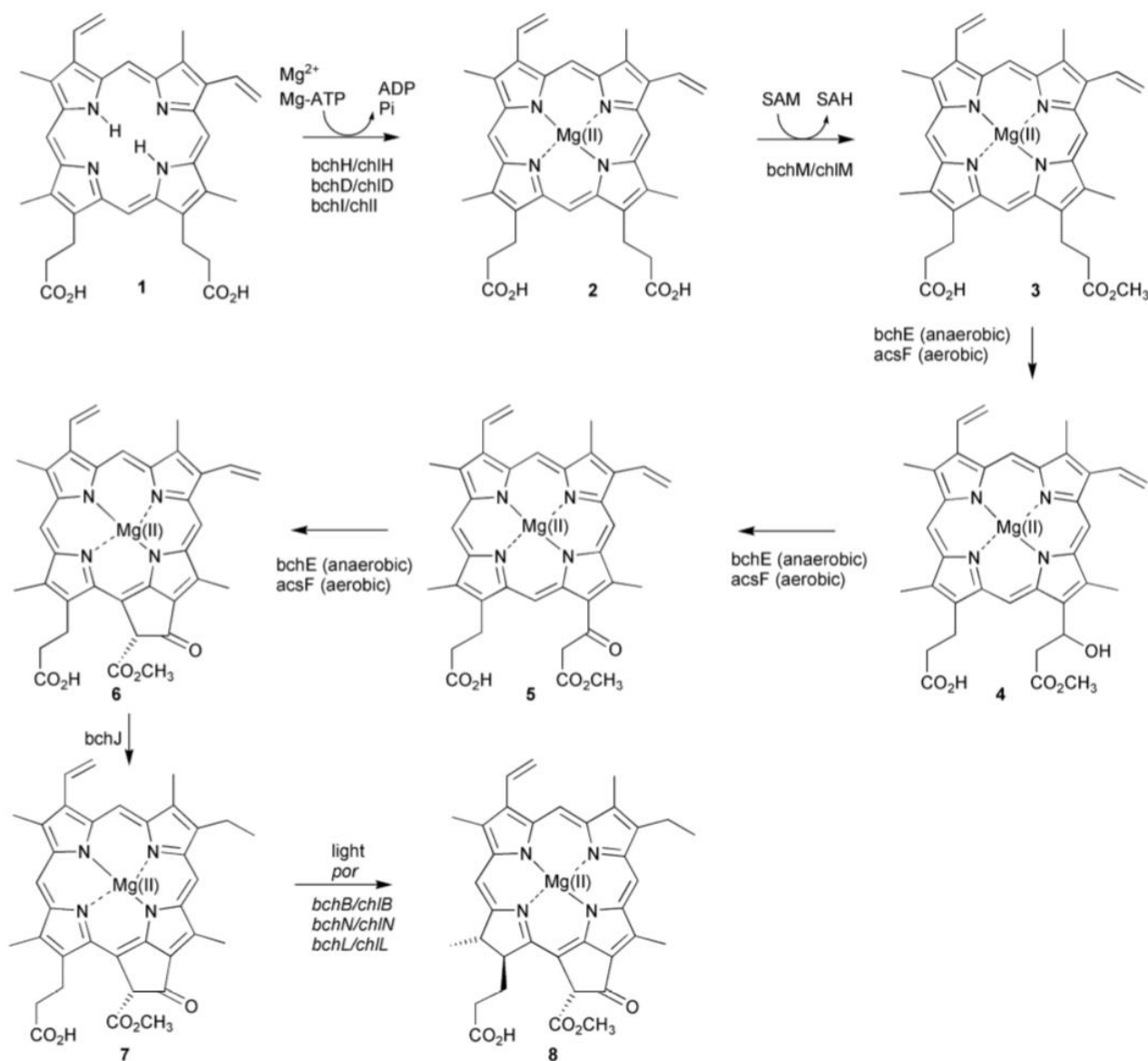
Ион  $Mg^{2+}$  встраивается в молекулу протопорфирина IX, а полученная молекула Mg-протопорфирина IX подвергается метилированию с последующей реакцией циклизации и с образованием циклопентанонового кольца, после чего следуют последовательные стадии восстановления с образованием хлорофиллида *a*. Превращение протохлорофиллида в хлорофиллид может быть осуществлено двумя различными ферментами: светозависимой протохлорофиллид-оксидоредуктазой (сПОР), кодируемой ядром, и светонезависимой (темновой) протохлорофиллид-оксидоредуктазой (тПОР), которая отсутствует у покрытосеменных. Ферментный комплекс тПОР состоит из трех субъединиц (ChlB, ChlL и ChlN), кодируемых геномом пластид. Присоединение фитольного «хвоста» к молекуле хлорофиллида *a* приводит к образованию хлорофилла *a*, тогда как ферментативное окисление хлорофиллида *a* может давать хлорофиллид *b*, за которым следует фитилирование с образованием хлорофилла *b* [Grossman et al., 2004].



**Рисунок 2. Схема биосинтеза хлорофилла.** Полные названия ферментов следующие: GTS, глутамил-тРНК-синтетаза; GTR, глутамил-тРНК-редуктаза; GSA, глутамат-1-семиальдегид аминотрансфераза; ALAD, АЛК дегидратаза; PBGD, порфириногендезаминаза; UROS, уропорфириноген III синтаза; UROD, уропорфириноген III декарбоксилаза; CPX, копропорфириноген III-оксидаза; PPX, протопорфириноген IX-оксидаза; CHLD, субъединица D магний-хелатазы протопорфина IX; CHLI, субъединица I магний-хелатазы протопорфина; CHLH, субъединица H магний-хелатазы протопорфина; PPMT, Mg-протопорфин IX метилтрансфераза; CHL27, Mg-протопорфин IX монометоксиэтилцикловая субъединица; DCR, дивинилпрохлорофиллидредуктаза; LPOR, NADPH: протохлорофиллид-оксидоредуктаза; CAO, хлорофиллид *a* оксигеназа; CHS, хлорофилл синтаза; UPM, уропорфириноген III метилтрансфераза; Fe-Chel, феррохелатаза [Модифицировано по Lohr et al., 2005].

## 1.2 Биосинтез хлорофилла из протопорфина IX

На рисунке 3 представлена общая схема превращения протопорфина IX (1) в хлорофиллид *a* (8). Эта схема общепринята [Willows, 2003].



**Рисунок 3.** Схема превращения протопорфина IX в хлорофиллид *a*. 1 – протопорфин IX; 2 – магний-протопорфин IX; 3 – магний-протопорфин IX 6-монометил эфир; 4 – магний-протопорфин IX 6-монометил β-гидроксиэфир; 5 – магний-протопорфин IX 6-монометил β-кетоефир; 6 – дивинил протохлорофиллид; 7 – протохлорофиллид; 8 – хлорофиллид *a*. Для описания промежуточных продуктов используется номенклатура IUPAC [Willows, 2003].

Идентификация и характеристика ферментов, ответственных за биосинтез как хлорофиллов, так и бактериохлорофиллов, стали в значительной степени результатом

молекулярно-генетического анализа генов фотосинтетических кластеров у пурпурных бактерий *Rhodobacter capsulatus* и *Rhodobacter sphaeroides*. Эти кластеры, размером приблизительно 45 т.п.о., содержат большинство, если не все, гены, необходимые для биосинтеза пигментов и сборки фотосинтетического аппарата в этих организмах, включая гены, кодирующие ферменты биосинтеза бактериохлорофилла из протопорфирина IX [Alberti et al., 1995]. Они были идентифицированы методом направленного мутагенеза, а гетерологичная экспрессия в *E. coli* во многих случаях подтвердила их идентичность. Кроме того, молекулярно-генетические исследования, выполненные на пигментных мутантах растений, позволили установить, что большинство генов растений, контролирующее биосинтез хлорофилла, ортологичны бактериальным генам, что предполагает существование сходных ферментативных механизмов и общее эволюционное происхождение.

### 1.2.1 Магний-хелатаза

Магний-хелатаза является первым специфическим ферментом биосинтеза хлорофилла (БХ). На первый взгляд включение  $Mg^{2+}$  в протопорфирин IX напоминает включение  $Fe^{2+}$ , катализируемое феррохелатазой. Фермент, который катализирует включение  $Fe^{2+}$  в протопорфирин IX без участия каких-либо дополнительных кофакторов, – феррохелатаза [Hunter et al., 2011]. Она представляет собой белок с молекулярной массой около 40 кДа, кодируемый одним геном [Ferreira, 1999]. Напротив, магний-хелатаза нуждается в АТФ и состоит из трех различных белковых субъединиц, известных как *BchI*, *BchD* и *BchH* у организмов, которые синтезируют бактериохлорофиллы, и как *CHLI*, *CHLD* и *CHLN* у организмов, которые синтезируют хлорофиллы [Walker and Willows, 1997]. Субъединицы магний-хелатазы, выделенные из разных источников, ортологичны и сходны по размеру: *BchI/CHLI* составляют ~ 40 кДа, *BchD/CHLD* – ~65 кДа, а *BchH/CHLN* – ~ 140 кДа.

### 1.2.2 Гены, кодирующие магний-хелатазу

Молекулярно-генетические исследования фотосинтетических генных кластеров в геномах *R. capsulatus* и *R. sphaeroides* были важны для поиска связей генов из этих кластеров с ферментативными функциями в биосинтезе бактериохлорофилла их продуктов. Мутации в генах *bchI*, *bchD* и *bchH* нарушали биосинтез бактериохлорофилла и вызывали накопление протопорфирина IX, что указывало на связь с магний-хелатазой

[Bollivar et al., 1994]. У мутантов по гену *bchH* отсутствовали активности как магний-хелатазы, так и метилтрансферазы магний-пропорфирина IX, которые, как полагали, были связаны [Gorchein et al., 1993]. Однако впоследствии было показано, что *bchH* кодирует одну из субъединиц магний-хелатазы [Willows and Beale, 1998]. По сути, аналогичные результаты были также получены с ортологическими генными продуктами *Synechocystis* PCC680310 [Jensen et al., 1996] и *Chlorobium vibrioforme* [Petersen et al., 1998].

Двадцать мутантов ячменя с мутациями в трех генетических локусах, называемых *xantha-f*, *xantha-g* и *xantha-h*, были охарактеризованы как мутанты по магний-хелатазе из-за желтого, лишённого хлорофилла, фенотипа и накопления протопорфирина IX [Henningsen et al., 1993]. Основываясь на гомологии с известными белками BchI, BchH и BchD, гены *CHLI*, *CHLH* и *CHLD* ячменя были клонированы и секвенированы. Анализ уровня транскриптов мРНК этих генов у ряда мутантов *xantha-f*, *xantha-g* и *xantha-h* показал, что ген *CHLI* является локусом *xantha-h*, *CHLH* является локусом *xantha-f* [Jensen et al., 1996], и *CHLD* является локусом *xantha-g* [Petersen et al., 1999]. Три полудоминантных аллеля локуса *xantha-h*, первоначально выделенных у бледно-зеленых мутантов *chlorina*, имеют одну миссенс-мутацию [Hansson et al., 1999].

Были идентифицированы мутанты *Arabidopsis thaliana*, *Ch-42 (cs)*, с дефектами в гене малой субъединицы магний-хелатазы [Koncz et al., 1990]. Эти мутанты могли синтезировать небольшое количество хлорофилла благодаря наличию второго гена *CHLI* [Rissler et al., 2002]. Были описаны и охарактеризованы два мутанта *A. thaliana*, по гену *CHLH*: *cch* (conditional *chlorina*) и *gun5* (genomes uncoupled) [Susek et al., 1993]. Мутанты *genomes uncoupled* были отобраны по их способности экспрессировать связывающий хлорофилл *a/b* белок фотосистемы II, Lhcb1, в условиях, когда он обычно не экспрессируется. Аллели *gun5* и *cch* содержали миссенс-мутацию. Таким образом, было установлено, что белок CHLH выполняет двойную функцию – участвует в биосинтезе хлорофилла и в трансдукции сигнала из хлоропласта в ядро.

Другие мутанты по гену *CHLH* описаны у *Antirrhinum majus* (львиный зев) и *Chlamydomonas reinhardtii*. Было обнаружено, что мутант львиного зева *oli-605* [Luo et al., 1991] имеет вставку транспозона в гене *CHLH*, который кодирует большой белок из 1359 аминокислот, гомологичный субъединице кобальт-хелатазы CobN и белку BchH. Эти данные впервые показали, что гены растительных и бактериальных магний-хелатаз схожи [Hudson et al., 1993]. Мутант *br<sub>s</sub>-1 C. reinhardtii*, также как и другой бесхлорофилльный мутант, называемый *chl1*, несут мутации в гене *CHLH* [Chekounova et al., 2001], которые являются вставками, вызывающими сдвиг рамки считывания, что ведет синтезу укороченных белковых продуктов, которые не накапливаются [Chekounova et al., 2001].

Регуляция экспрессии гена магний-хелатазы было исследована у различных видов растений [von Gromoff et al., 2008]. В этиолированном ячмене гены *CHLI* и *CHLH* регулируются светом [Jensen et al., 1996]. В зеленых ячменных проростках, выращенных при нормальном цикле дневного света, экспрессия гена *CHLH* следует за циркадным ритмом с максимумом в световой фазе [Jensen et al., 1996]. Экспрессия генов табака *CHLH* и *CHLI* следует аналогичному циркадному ритму, однако ген *CHLD* имеет обратную модель экспрессии с максимальным уровнем мРНК в темновой фазе. В *Arabidopsis thaliana* [Gibson et al., 1996] и *Antirrhinum majus* [Hudson et al., 1993] ген *CHLH* обладает максимумом экспрессии в темноте и понижается на свету. Кроме того, ген *CHLI* из ячменя и *A. thaliana* конститутивно экспрессируется, за исключением начальных фаз озеленения.

### 1.2.3 Активность магний-хелатазы

Для проявления активности магний-хелатазы требуется наличие АТФ,  $Mg^{2+}$  и всех трех субъединиц. Реакцию можно разделить на две фазы. Первая фаза включает в себя образование комплекса между белками *VchI/CHLI* и *VchD/CHLD* и зависит как от концентрации белка, так и от наличия АТФ [Jensen et al., 1996; Willows and Beale, 1998]. Этот комплекс катализирует введение магния в протопорфирин IX только в сочетании с белком *VchH/CHLH*,  $Mg$ -АТФ, протопорфирином IX и  $Mg^{2+}$  [Masuda, 2008]. Белок *VchH/CHLH* ведет себя как субстрат в реакции магний-хелатазы и имеет  $K_m$  в низкомолекулярном диапазоне [Willows and Beale, 1998, Gibson et al., 1999].

Характеристика активности магний-хелатазы до 1989 года ограничивалась измерениями, сделанными *in organello*, с использованием развивающихся хлоропластов огурца или сферопластов *Rhodobacter sphaeroides*. Такие данные были получены на хлоропластах, изолированных из табака [Koncz et al., 1990], ячменя [Jensen et al., 1996] и гороха [Walker and Weinstein, 1991]. Результаты измерений активности *in vitro* были получены с помощью методов, разработанных Уолкером и Вайнштейном [Walker and Weinstein, 1991], в которых использовали цельные клетки и лизаты *Rhodobacter sp.* [Gorchein, 1997], и очищенные субъединицы магний-хелатазы из различных видов растений, которые были гетерологично экспрессированы в *E. coli* [Petersen et al., 1998; Willows and Beale, 1998].

Субстратная специфичность и влияние субстратных аналогов на активность магний-хелатазы определяли *in organello*. Магний-хелатаза из огурца (*Cucumis sativus*) в качестве предпочтительного субстрата использовала протопорфирин IX, при этом, другие его производные (дейтеропорфирин IX, мезопорфирин IX, 3-этил, 8-винилпропорфирин

IX и 3-винил, 8-этилпропорфирин IX) также могли выполнять функции субстрата [Walker and Weinstein, 1991]. N-метилпротопорфирин и N-метилмезопорфирин ингибировали (50%) магний-хелатазу, тогда как протохлорофиллид (Рисунок 3, 7), хлорофиллид (Рисунок 3, 8), гем или магний-протопорфирин (Рисунок 3, 2) оказывали малое влияния на его активность. Феофорбид был мощным ингибитором ячменной магний-хелатазы с 50% ингибирования при 0.92 мкМ, в то время как хлорофиллид и феофорбид цинка оказывали лишь слегка ингибирующее действие, а хлорофилл и феофитин не ингибировали реакцию совсем [Röpperl et al., 1997]. Напротив, когда магний-протопорфирин (Рисунок 3, 2) или его монометилловый эфир (Рисунок 3, 3) образуется *in situ* в проростках гороха, активность магний-хелатазы сильно ингибируется [Averina et al., 1996]. По-видимому, металлопорфирины не могут эффективно проникать в хлоропласты. Ингибирование магний-хелатазы феофорбидом может иметь физиологическую функцию, поскольку он образуется во время старения листьев как продукт деградации хлорофилла, и, может выступать в роли сигнала старения, который предотвращает дальнейший биосинтез хлорофилла путем ингибирования магний-хелатазы [Walker and Weinstein, 1994].

#### 1.2.4 Исследования отдельных субъединиц магний-хелатазы

Субъединицы магний-хелатазы *R. sphaeroides* [Hansson and Kannangara, 1997], *Synechocystis* PCC6803 [Jensen et al., 1999], и *C. vibrioforme* [Petersen et al., 1998] были проверены на наличие активности АТФазы, так как VchI/CHLI и ряд белковых последовательностей VchD/CHLD имеют высококонсервативные мотивы АТФазы. Все исследования показали, что субъединицы VchH/CHLH и VchI/CHLI обладают АТФазной активностью, в то время как активность субъединицы VchD/CHLD является переменной, и зависит от чистоты выделенного белка VchD/CHLD [Sirijovski et al., 2006]. Различия в измерениях специфической активности могут зависеть от метода её определения. Для измерения активности АТФазы применяли как радиохимические методы [Petersen et al., 1998], так и связанный анализ, в котором детектировался фосфат, высвобожденный в результате гидролиза АТФ [Jensen et al., 1999]. Суммируя полученные результаты, можно заключить, что, VchI/CHLI, по-видимому, обладает самой высокой активностью АТФазы, меньшей активностью обладает белок VchH/CHLH, а у белка VchD/CHLD данная активность отсутствует. Гидролиз АТФ зависит от  $Mg^{2+}$ , но порфириновый субстрат или добавление других субъединиц не стимулирует активность АТФазы отдельных субъединиц.

Функция АТФазы у субъединиц магний-хелатазы (МХ) еще не до конца понятна. Было высказано предположение о том, что активность АТФазы VchI/CHLI требуется для активации начальной стадии в реакции магний-хелатазы с участием VchI/CHLI, VchD/CHLD, АТФ и  $Mg^{2+}$  [Hansson and Kannangara, 1997]. Более поздние исследования показали, что связывание АТФ, а не гидролиз АТФ, является достаточным для образования комплекса VchI/CHLI:VchD/CHLD [Jensen et al., 1999].

Представляется вероятным, что гидролиз АТФ субъединицами VchI/CHLI служит движущей силой в реакции вставки магния, которая, как было показано, заметно возрастает, когда присутствуют все субъединицы и субстраты. Поскольку АТФ и магний, по-видимому, необходимы для эффективного связывания порфирина IX с субъединицей VchH/CHLN [Karger et al., 2001], предполагается, что функция гидролиза АТФ субъединицей VchH/CHLN необходима для этого связывания.

### **1.2.5 Структурные исследования и предложенный механизм функционирования магний-хелатазы**

Методом рентгеноструктурной кристаллографии была получена кристаллическая структура VchI из *R. capsulatus* (код доступа PDB 168P) [Fodje et al., 2001]. Как структура, так и последовательность VchI показывают, что он принадлежит AAA+ белкам (АТФамам, ассоциированным с различными клеточными активностями). Это один из самых больших и самых разнообразных классов белков, обнаруженных во всех организмах [Vale, 2000]. Эти белки обладают многочисленными функциями в клетке, включая: протеолиз, фолдинг, мембранный транспорт, регуляцию цитоскелета, биогенез органелл, регуляцию ДНК и внутриклеточную подвижность. Известно, что белки AAA+ образуют нуклеотид-зависимые кольцевые структуры, которые обычно являются гексамерами, часто формируя двойные гексамерные кольца, где второе кольцо модуля AAA+ часто имеет неактивную АТФазу, и это кольцо, по-видимому, играет структурную роль. Белки AAA+ называют механоэнзимами из-за наблюдаемых больших конформационных изменений при гидролизе АТФ и механической природы процессов, в который вовлечены белки AAA+ [Vale, 2000]. Ближайшими структурными родственниками VchI являются: домен NSF-D2, участвующий в слиянии везикул, субъединица  $\delta'$  комплекса загрузки ДНК-полимеразы и субъединица HslU АТФ-зависимой протеазы [Fodje et al., 2001].

N-конец VchD/CHLD, гомологичный VchI/CHLI, также имеет модуль AAA+. В C-концевой области VchD/CHLD расположены: пролин-богатый мотив, отрицательно заряженная область из 20-40 аминокислот, и домен интегрин-I, содержащий участок

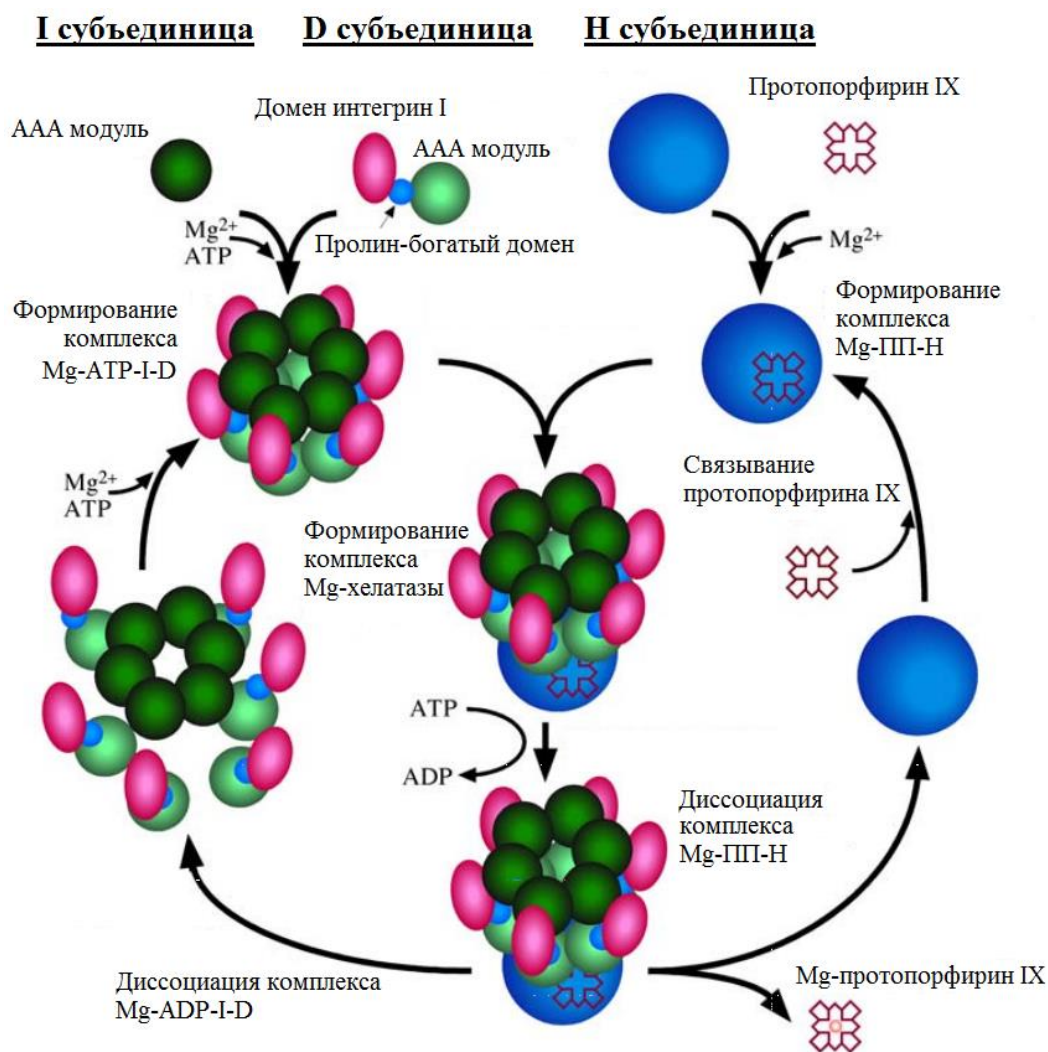


адгезии, зависящий от ионов металла [Fodje et al., 2001]. Известно, что домены интегрин-I взаимодействуют с последовательностями RGD (Аргинин-Глицин-Аспарагиновая кислота) и LDV (Лейцин-Аспарагиновая кислота-Валин) через карбоксильные группы аспарагиновой кислоты в этих последовательностях [Lee et al., 1995]. Консервативные мотивы связывания интегрин-I имеются как в последовательностях VchH/CHLN, так и в VchI/CHLI. По-видимому, домен интегрин-I может опосредовать взаимодействия между всеми тремя субъединицами.

Электронная микроскопия показала, что VchI образует нуклеотид-зависимый гексамер [Fodje et al., 2001], который нестабилен при выделении [Hansson et al., 2002]. Эксперименты с использованием мутантов по VchI, которые не имеют АТФазной активности, показали, что для активности магний-хелатазы необходим скоординированный гидролиз АТФ ряда субъединиц в гексамере [Hansson et al., 2002].

На основе этих наблюдений можно заключить, что наиболее вероятным механизмом функционирования МХ является тот, в котором формируются нуклеотид-зависимые гомогексамерные кольца VchI/CHLI и VchD/CHLD. Эти два кольца затем образуют сложную двойную гексамерную кольцевую структуру [Fodje et al., 2001], которая может действовать на субъединицу VchH/CHLN, связанную с протопорфирином IX и магнием. Согласованный гидролиз АТФ большинства субъединиц в гексамере VchI/CHLI необходим для активности магний-хелатазы. Этот гидролиз, по-видимому, приводит к конформационному изменению в VchH/CHLN, которое влияет на включение иона металла [Hansson et al., 2002].

Энзиматическая реакция (Рисунок 4) начинается с формирования  $Mg^{2+}$ - и АТФ-зависимого комплекса субъединиц I и D, который взаимодействует с субъединицей H, связывающей ПП. Работа фермента делится на две фазы. В первой фазе (активация) происходит  $Mg^{2+}$  и АТФ-зависимое формирование кольцевых структур из 6-ти субъединиц D, куда через домен интегрин I, как в каркас, встраиваются 6 субъединиц I, образуя АТФ-I-D комплекс. Субъединица H связывается с протопорфирином IX в присутствии магния, образуя Mg-ПП-CHLN комплекс. Во второй фазе происходит сборка фермента – связывание комплексов АТФ-I-D и Mg-ПП-CHLN через домен интегрин I субъединиц D. После встраивания ионов магния в молекулу ПП комплекс становится субстратом для фермента Mg-ПП-метилтрансферазы. Далее, он диссоциирует. После ухода Mg-ПП и при наличии субстрата, субъединицы вступают в новый цикл активации [Masuda, 2008].



**Рисунок 4. Модель каталитического цикла магний-хелатазы.** [Модифицировано по Masuda, 2008].

### 1.3 Регуляция биосинтеза хлорофилла

При рассмотрении биологической роли биосинтеза тетрапирролов, разумно предположить, что активность каждой ветви пути отражает потребность клетки в конечном продукте. В то же время активность общих предшественников биосинтеза тетрапиррола может контролироваться в ответ на потребность в конкретном тетрапирроле. Например, чтобы усилить синтез хлорофилла, общая активность биосинтеза тетрапирролов должна увеличиваться, также как и активность пути синтеза хлорофилла. Если подобного увеличения не произойдет, количество конечных продуктов других ветвей биосинтеза тетрапирролов будет снижено. Поэтому разумно предположить, что растения контролируют ферментативную активность точек ветвления пути, а также общие стадии. Фактически, формирование АЛК является первой стадией, подверженной

многочисленным регуляторным механизмам. Регулирование на данном этапе представляет собой значительное преимущество: все промежуточные молекулы более поздних этапов, когда они накапливаются в больших количествах, могут генерировать потенциально токсичный синглетный кислород при освещении [Tanaka & Tanaka, 2007].

### 1.3.1 Регуляция синтеза АЛК

Среди трех этапов синтеза АЛК, превращение глутамил-тРНК в глутамат-1-семиальдегид под действием фермента глутамил-тРНК-редуктазы (GTR) является наиболее важным с точки зрения регуляции. Эта стадия является фиксированной в биосинтезе тетрапирролов, потому что предыдущий шаг, на котором происходит объединение тРНК<sup>Glu</sup> с глутаминовой кислотой, сопряжен с синтезом белка в пластидах. Одно из наблюдений, демонстрирующее ключевую роль глутамил-тРНК-редуктазы заключается в том, что у мутанта *flu Arabidopsis thaliana* отсутствие нормальной репрессии активности глутамил-тРНК-редуктазы в темноте вело к увеличению накопления протохлорофиллида [Goslings et al., 2004]. Эти данные показали, что образование глутамат-1-семиальдегида является лимитирующей стадией биосинтеза хлорофилла.

Контроль активности глутамил-тРНК-редуктазы в основном достигается путем обратного ингибирования, – регулирования конечными продуктами, а не через регулирование на уровне транскрипции. Необходимый компонент механизма регуляции обратной связи активности глутамил-тРНК-редуктазы был определен при изучении мутанта *flu* (флуоресцирующий) *A. thaliana*, который накапливал избыточное количество протохлорофиллида в темноте, был не способен к подавлению образования АЛК в темноте, и показывал повышенную способность к синтезу АЛК на свету [Meskauskiene et al., 2001; Goslings et al., 2004]. В норме ген *FLU* кодирует белок молекулярной массой приблизительно 27 кДа, который локализуется в мембранах пластид. Использование дрожжевой двугибридной системы продемонстрировало, что *FLU* напрямую взаимодействует с *GTR1*, кодируемой геном *HEMA1*. Интересно, что *FLU* не взаимодействует с *GTR2*, который кодируется геном *HEMA2* [Meskauskiene and Apel, 2002]. Эти данные свидетельствуют о том, что *FLU* подавляет активность *GTR1* в ответ на избыточное накопление протохлорофиллида и других промежуточных продуктов ветви биосинтеза хлорофилла. Более того, была описана супрессорная мутация *ulf3*, которая подавляла фенотип *flu* у *A. thaliana* [Goslings et al., 2004]. Эта мутация была локализована в гене *HY1*, который кодирует гемоксигеназу. По-видимому, уменьшение активности

гемоксигеназы при мутации *ulf3* приводит к накоплению гема. В свою очередь, накопление гема подавляло активность глутамил-тРНК-редуктазы независимо от действия FLU. Эти данные свидетельствовали о том, что гем регулирует активность GTR по механизму обратной связи. Позже заметили, что у *C. reinhardtii* ингибирование активности GTR гемом зависит от наличия неидентифицированного растворимого белка [Srivastava et al., 2005]. Вероятно, что белок-белковые взаимодействия имеют важное значение в этом механизме, опосредуемом гемом. Таким образом, GTR1 подвержен регуляции по механизму обратной связи как в ветви синтеза хлорофилла, так и в ветви синтеза гема [Tanaka & Tanaka, 2007].

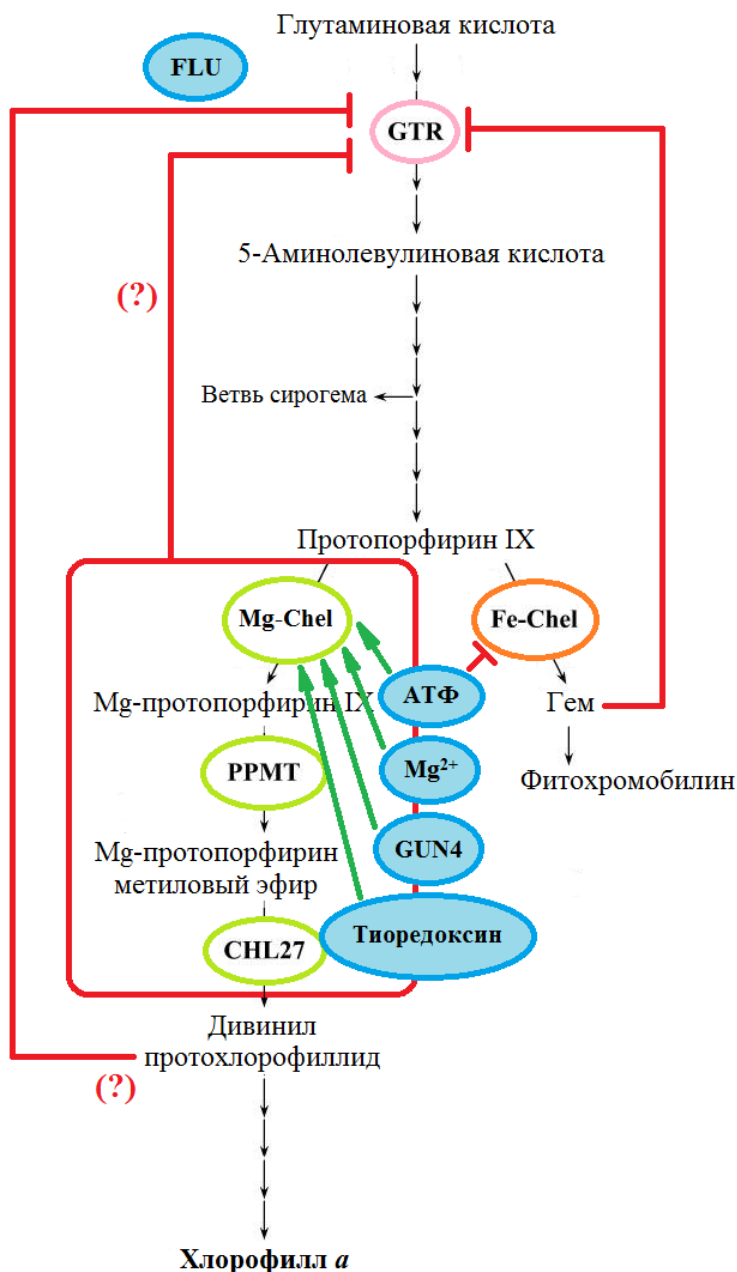
### 1.3.2 Регуляция в точке ветвления синтез гема и хлорофилла

Активность ферментов в точках ветвления пути биосинтеза тетрапирролов, возможно, регулируются окислительно-восстановительным потенциалом внутри хлоропласта. Такая регуляция имеет право на существование, поскольку окислительно-восстановительный потенциал в хлоропластах указывает на чрезмерную или недостаточную фотосинтетическую активность, то есть окислительно-восстановительный потенциал может отражать потребность клетки в синтезе хлорофилла [Tanaka & Tanaka, 2007]. Было обнаружено, что субъединица I магний-хелатазы (CHLI) является белком-мишенью тиоредоксина (Рисунок 5) [Аверина и Яронская, 2012]. Было показано, что субъединица H (CHLH), а также белковый комплекс, образованный субъединицами I и D (CHLD) магний-хелатазы цианобактерии *Synechocystis* PCC6803 может быть инактивирован N-этилмалеимидом, который ковалентно связывает тиольные группы [Jensen et al., 2000]. Тиоредоксин-зависимая регуляция служит подтверждением тому, что магний-хелатаза активируется/инактивируется в соответствии с циркадными ритмами. Глутамат-1-семиальдегид аминотрансфераза, АЛК дегидратаза и уропорфириноген III декарбоксилаза также являются потенциальными мишенями тиоредоксина [Buchanan and Balmer, 2005].

Соотношение АТФ/АДФ и концентрация свободных ионов  $Mg^{2+}$ , которые взаимозависимы в стромах, могут влиять на регуляцию активности магний-хелатазы (Рисунок 5). Концентрация не связанных со стромами ионов  $Mg^{2+}$  увеличивается от 0.5 мМ до 2.0 мМ при переходе из темноты на свет в хлоропластах шпината [Tanaka & Tanaka, 2007]. В экспериментах *in vitro* активность магний-хелатазы сильно зависит от концентрации  $Mg^{2+}$  [Reid & Hunter, 2004]. В присутствии порфирин-связывающего белка GUN4, который усиливает активность магний-хелатазы, концентрация  $Mg^{2+}$ , необходимая

для полной активации магний-хелатазы *Synechocystis in vitro*, снижается от 6 мМ до 2 мМ, Возможно, что концентрация  $Mg^{2+}$  регулирует активность магний-хелатазы в хлоропластах при переходе из темноты на свет [Tanaka & Tanaka, 2007].

Еще один фактор, который может влиять на активность магний-хелатазы, – соотношения АТФ/АДФ. АТФ необходим для активации магний-хелатазы [Reid & Hunter, 2004], тогда как он ингибирует активность феррохелатазы [Cornah et al., 2002]. В хлоропластах кукурузы, соотношение АТФ/АДФ увеличивалось от 1 до 4 при переходе из темноты на свет [Tanaka & Tanaka, 2007]. Следовательно, изменения соотношения АТФ/АДФ при переходе ночь/день может влиять на перенаправление протопорфирина IX в ветвь синтеза гема или хлорофилла.



**Рисунок 5. Модели регуляторных механизмов биосинтеза тетрапирролов.**

Показаны характерные промежуточные продукты и ферменты. Зелеными стрелками обозначена позитивная регуляция, красными – негативная регуляция. GTR, глутамил-тРНК-редуктаза; Mg-Chel, магни-хелатаза; PPM1, Mg-протопорфирин IX метилтрансфераза; CHL27, Mg-протопорфирин IX монометоксиэтилциклазная субъединица; Fe-Chel, феррохелатаза [Модифицировано по Tanaka & Tanaka, 2007].

Белок GUN4 координирует активность магний-хелатазы [Peter & Grimm, 2009]. Ген *GUN4* был первоначально идентифицирован у мутанта *gun4 A. thaliana*, у которого сигнальный путь из пластиды в ядро был нарушен, что подавляло синтез хлорофилла [Larkin et al., 2003]. GUN4 связывает как протопорфирин IX, так и Mg-протопорфирин IX и стимулирует активность магний-хелатазы [Verdecia et al., 2005]. Нарушение гена *GUN4* уменьшало уровни клеточного гема в *Synechocystis*, предполагая, что белок также участвует в биосинтезе гема [Wilde et al. 2004]. Возможно, GUN4 регулирует пути синтеза гема и хлорофилла через общий субстрат.

### 1.3.3 Регуляция биосинтеза хлорофилла цитокининами

Свет и цитокинины оказывают схожее влияние на рост и развитие растений – они контролируют раскрытие семядолей и развитие листьев, апикальное доминирование, дифференциацию хлоропласта и др. Целый ряд фотосинтетических ядерных генов, экспрессия которых регулируется светом, также отвечает и на действие цитокининов [Cortleven et al., 2016].

Большое внимание уделяется изучению роли цитокининов в регуляции биосинтеза хлорофилла. Sugiura описал стимулирующий эффект кинетина на биосинтез хлорофилла при зеленении первичных листьев *Phaseolus vulgaris* [Sugiura, 1963]. Эффект стимулирования накопления хлорофилла во время перехода этиопласта в хлоропласт был описан и для других видов растений и может быть связан с двумя важными стадиями пути биосинтеза хлорофилла: синтезом АЛК и фотопревращением накопленного протохлорофиллида в хлорофиллид. Fletcher с коллегами сообщили, что при предварительной обработке семядоли огурца кинетином во время процесса деэтилирования в биосинтезе хлорофилла отсутствует лаг-фаза, встречающаяся в норме [Fletcher et al., 1973]. Усиление скорости индуцированного светом биосинтеза хлорофилла при этом происходит за счет стимуляции кинетином системы синтеза АЛК. Позже, Masuda с коллегами обнаружили, что в этиолированных семядолях огурца цитокинины увеличивают синтез АЛК посредством стимуляции активности глутамил-тРНК-редуктазы и активности глутамат-1-семиальдегид аминотрансферазы [Masuda et al., 1992; Masuda et al., 1994; Masuda et al., 1995]. Вклад цитокинина в регуляцию экспрессии и активности генов и ферментов всего пути биосинтеза тетрапирролов исследовали Яронская с коллегами в проростках ячменя [Yaronskaya et al., 2006]. Они также показали, что при обработке цитокининами этиолированных проростков ячменя, уровень содержания глутамил-тРНК-редуктазы и глутамат-1-семиальдегид аминотрансферазы были

повышенными. Однако скорость синтеза АЛК в растениях значительно увеличивалась только при воздействии света.

Синтез протохлорофиллида и фотовосстановление протохлорофиллида *a* до хлорофиллида *a* также чувствительны к цитокининам. В ранних работах упоминалось, что цитокинины усиливают синтез протохлорофиллида [Banerji and Laloraya, 1967], что было связано с усиленным синтезом АЛК [Lew and Tsuij, 1982]. Цитокинины также увеличивают уровни мРНК гена *POR* и белка соответствующего фермента сПОР в этиолированных саженцах огурца [Kuroda et al., 1996; Kuroda et al., 2001] и люпина [Kusnetsov et al., 1998]. Светозависимый фермент протохлорофиллид-оксидоредуктаза сПОР может быть стабилизирован в присутствии цитокининов [Kusnetsov et al., 1998]. Эти результаты ясно указывают на то, что цитокинины регулирует активность этого фермента.

Позднее было установлено, что цитокинины изменяет уровни накопления транскриптов специфических генов пути биосинтеза тетрапирролов во время де-этиолирования. Цитокинины увеличивают уровни стабильных мРНК генов: *HEMA1*, *CHLH* и *CHL27* в этиолированных саженцах *Arabidopsis* [Tanaka et al., 2011]. В мутанте по рецепторам цитокининов генотипа *ahk2,ahk3* стимулирующий эффект цитокининов на экспрессию этих и других генов синтеза хлорофилла (*GSA1*, *GUN4*, *CHLM*) был ослаблен [Cortleven and Schmölling, 2015]. В обработанном цитокининами мутанте *ahk2,ahk3* также наблюдали уменьшение скорости зеленения и отсутствие повышенных уровней белка GTR. Эти данные свидетельствовали, что при де-этиолировании стимулирующий эффект цитокининов на биосинтез хлорофилла опосредован рецепторами АНК2 и АНК3. Аналогично мутанту *ahk2,ahk3*, цитокинин-зависимая индукция некоторых генов биосинтеза хлорофилла была снижена в мутанте *arr1, arr12*, предполагая участие ARR1 и ARR12 в регуляции этих генов [Cortleven and Schmölling, 2015].

Таким образом, можно сказать, что контроль образования хлорофилла светом и цитокининами осуществляется независимо, однако мишенью обоих факторов являются ключевые ферменты системы биосинтеза хлорофилла.

#### **1.4 Цитокинины**

Цитокинины (первоначально называемые кининами) были обнаружены в лаборатории Ф. Скуга (США) еще полвека назад. Однако только сейчас, в 21 веке, молекулярные механизмы их действия начинают раскрываться. Первый искусственно полученный цитокинин (кинетин) первоначально проявил свою биологическую активность в культуре аксеничной растительной ткани как соединение, способствующее

делению клеток и росту каллуса. Учитывая тот факт, что Г. Габерландт предполагал существование таких регуляторов в растениях еще в начале 20-го века, цитокинины были поспешно добавлены в список основных гормонов растений.

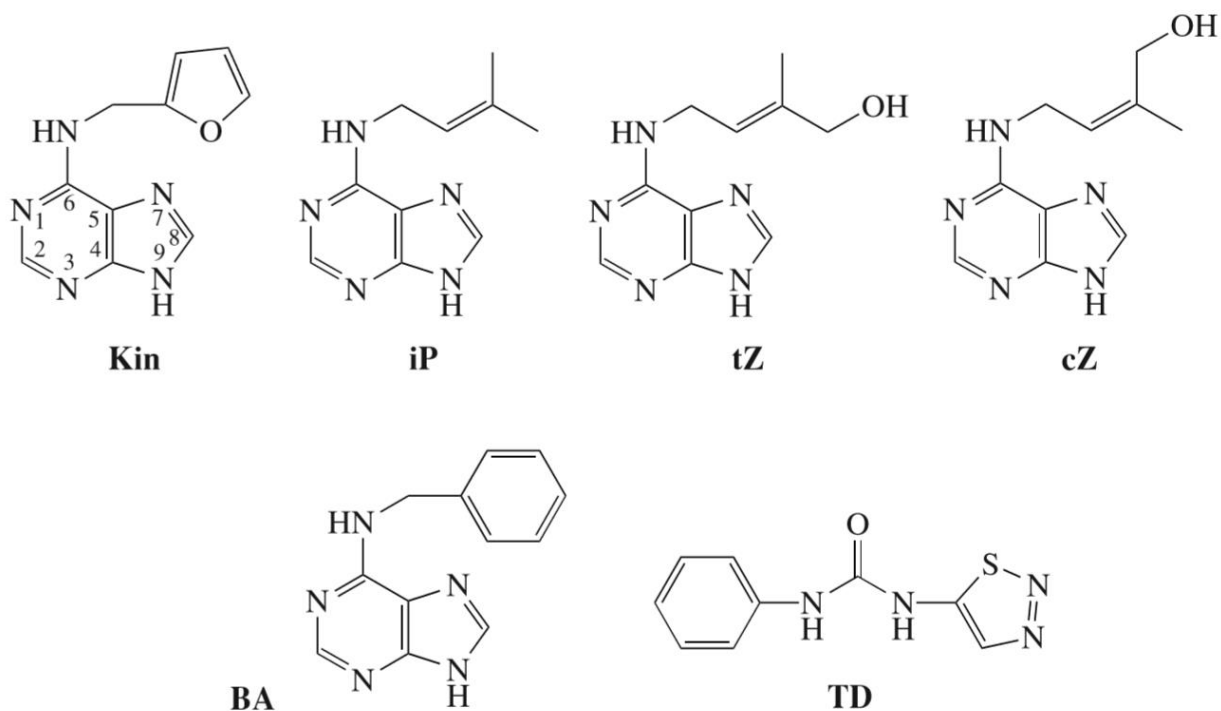
Фактически, первый природный цитокинин - зеатин, был выделен из эмбрионов кукурузы (*Zea mays*), почти через 10 лет после того, как был получен первый синтетический цитокинин (кинетин) [Romanov, 2009]. Значительно позднее, уже в 21 веке, наличие биосинтеза цитокининов у растений было доказано японскими исследователями [Takei et al., 2001].

Цитокинины - производные пуриновых азотистых оснований аденина и аденозина (Рисунок 6). Встречающиеся в природе цитокинины являются относительно простыми производными аденина, модифицированными по атому азота аминогруппы. В большинстве цитокининов короткая алифатическая цепь изопентенильного остатка присоединена к аденину в этом положении. Гормоны, в которых эта цепь не модифицирована, относятся к группе цитокининов изопентенильного типа (iP-типа). Однако в растениях существуют ферменты, гидроксилирующие алифатическую цепь на его концевом атоме углерода [Takei et al., 2004]. Цитокинины с гидроксилированной алифатической цепью называют зеатинами (цитокинины Z-типа). Возможны два стереоизомера зеатина: *транс*-зеатин и *цис*-зеатин. В *транс*-зеатине гидроксильная группа изопентенильной боковой цепи ориентирована от аденинового гетероцикла. Считается, что *транс*-зеатин является наиболее распространенным и активным цитокинином растений. В *цис*-зеатине, наоборот, концевая гидроксильная группа ориентирована к адениновому кольцу, так что водородная связь может быть образована между водородом ОН-группы и атомом азота в положении 1 гетероцикла аденина [Korszun et al., 1989]. Среди других природных цитокининов встречаются такие соединения, как дегидрозеатин (с восстановленной двойной связью в боковой цепи), 6-бензиладенин (БА) и тополин (ароматический цитокинин, впервые обнаруженный в тополе с 3-гидроксibenзильным остатком вместо алифатической цепи [Strnad, 1997]).

Цитокинины обнаруживают во всех организмах, включая человека, а также в воде и почве. Биосинтез цитокининов описан у высших растений, мхов, водорослей, некоторых бактерий, грибов и даже некоторых насекомых, паразитирующих на растениях. Благодаря этим организмам цитокинины проникают в почву и различные водохранилища, где их также можно найти. Небольшое количество цитокининов было обнаружено и у животных, хотя маловероятно, что у них они выполняют гормональную функцию. А именно, некоторые изоформы тРНК содержат изопентенилированный аденин вблизи антикодона [Romanov, 1990]. Эти модифицированные основания обычно представляют собой *цис*-



зеатин или изопентениладенин, а также их метилтиопроизводные. При расщеплении тРНК небольшие количества свободных цитокининов высвобождаются и могут влиять на метаболизм компетентных клеток [Romanov, 2009].



**Рисунок 6. Структуры типичных цитокининов.** BA – 6-бензиладенин; Kin – кинетин; iP – изопентениладенин; cZ – *цис*-зеатин; tZ – *транс*-зеатин; TD – тидиазурон [Romanov, 2009].

Цитокинины влияют на многочисленные процессы роста и развития растений; и характер их действия зависит от концентрации. Одним из наиболее важных эффектов цитокининов является стимуляция деления клеток, благодаря чему в первую очередь были идентифицированы цитокинины. Многие эффекты цитокининов проявляются на уровне организма. Например, образование сосудистых тканей в корнях определяется только способностью цитокининов стимулировать пролиферацию определенной клетки-предшественницы [Romanov, 2009]. В то же время, избыточное содержание этих фитогормонов может привести к подавлению процессов роста и деления клеток [Яронская и др., 2004].

#### 1.4.1 Биосинтез цитокининов у *Arabidopsis thaliana*

Сейчас известно, что цитокинины могут образовываться в результате либо прямого синтеза *de novo*, заключающегося в присоединении диметилаллипирифосфата к

аденозинмонофосфату (АМФ) с помощью фермента изопентилтрансферазы (ИПТ), либо путем присоединения изопентенильной группы  $\Delta^2$ -изопентенилдифосфата к адениновому остатку молекулы тРНК (Рисунок 7) [Mok and Mok, 2001]. В 2001 году двумя группами японских исследователей было обнаружено семейство *ipt*-генов в *A. thaliana* [Kakimoto, 2001; Takei et al., 2001], которые экспрессируются практически во всех органах и тканях [Miyawaki et al., 2004]. При этом, содержание цитокининов регулируется несколькими факторами: уровнем экспрессии генов *ipt*, скоростью распада цитокининов, а также скоростью транспорта фитогормона [Miyawaki et al., 2004].

Распад цитокининов, в результате которого образуются аденин и его производные, осуществляется ферментом цитокининоксидазой/дегидрогеназой (ЦО) [Schmülling et al., 2003]. Гены *ckx* или *cko*, кодирующие этот фермент, были впервые идентифицированы и выделены из кукурузы [Houba-Hérin et al., 1999]. В *A. thaliana* было обнаружено семь изоформ фермента (AtCKX1 - AtCKX7) [Galuszka et al., 2004]. Различные изоформы специфичны к определенным субстратам, однако физиологическое значение специфичности изоформ пока не ясно.

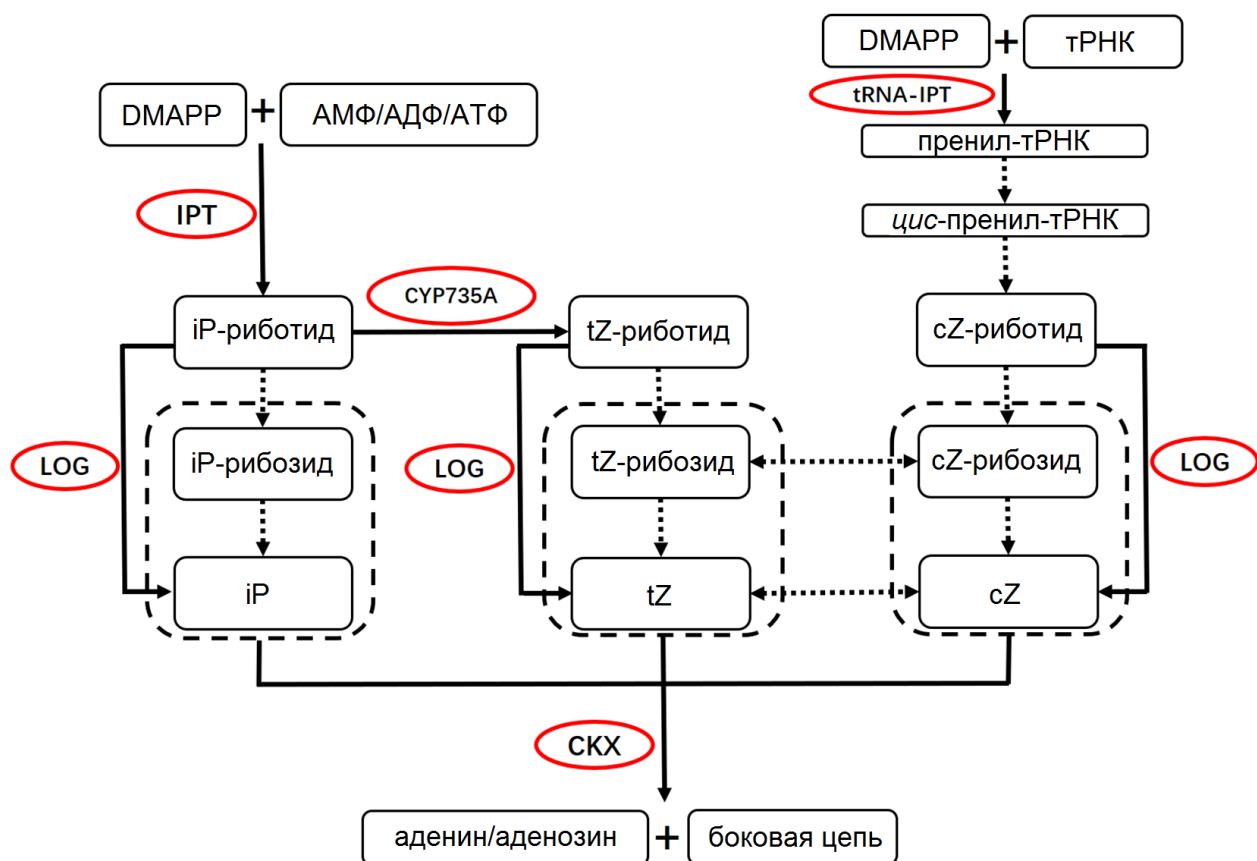
Компоненты сигнального пути цитокининов лучше всего изучены у модельного объекта *A. thaliana*. В 2001 году у *A. thaliana* были выявлены мембранные рецепторы цитокининов, кодируемые генами *cre1/ahk4* (*cytokinin resistant/arabidopsis histidine kinase*), *ahk2*, *ahk3* [Inoue et al., 2001]. Продукты этих генов - 3 близкие по строению гистидинкиназы, организованные по принципу бикомпонентной регуляторной системы фосфорилирования. В этих белках по обе стороны от внеклеточного CHASE-домена (CYCLASE/HISTIDINE KINASE-ASSOCIATED SENSING EXTRACELLUR), который связывается с цитокинином, располагаются трансмембранные участки. Связывание цитокинина с рецептором приводит к автофосфорилированию консервативного остатка гистидина, который затем передает фосфатную группу на остаток аспарагиновой кислоты воспринимающего домена RD (RECEIVER DOMAIN). Данные рецепторы локализованы на плазматической мембране [Kim et al., 2006], а также могут располагаться на внутренних мембранах клетки. Сходные рецепторы цитокининов обнаружены у кукурузы, риса, катарантуса розового, люцерны и водной лилии [Аверина и Яронская, 2012].

В *A. thaliana* были выявлены группы генов раннего ответа на цитокинины. Так, уровень транскриптов примерно 80 генов меняется более чем в 1.8 раз уже за 15 минут воздействия цитокининов [Brenner et al., 2005]. Около 70 из этих генов активируются цитокининами, а 11 подавляются. У табака также были обнаружены гены раннего ответа на цитокинины [Аверина и Яронская, 2012].

Пониманию активации транскрипции ранних цитокинин-чувствительных генов помогло обнаружение семейства *arr*-генов (*arabidopsis response regulator*) – регуляторов ответа на цитокинины, которые делятся на группы А и В [Yamada et al., 1998]. Гены группы В (*arr1*, *arr2*, *arr10*, *arr12*, *arr19* и др.) кодируют семейство транскрипционных факторов, которые ответственны как за индукцию, так и за репрессию генов раннего ответа на цитокинины. Белки ARR-В локализованы в ядре. Эти транскрипционные факторы связываются с промоторами различных генов с помощью GARP-домена [Аверина и Яронская, 2012].

Перенос фосфатной группы от домена RD на транскрипционные факторы группы В осуществляют фосфотрансмиттеры (фосфопереносчики), представленные белками АНР1 и АНР2 (ARABIDOPSIS HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSFER PROTEIN) [Miyata et al., 1998]. В геноме *A. thaliana* обнаружено шесть гистидиновых фосфотрансмиттеров (АНР1 – АНР6) [Hwang and Sheen, 2001], которые под действием цитокининов перемещаются из цитоплазмы в ядро. Механизмом передачи сигнала от рецептора к транскрипционному фактору может являться образование комплекса между АНР1, АНР2, АНР3 и белком ARR10 группы В [Sakai et al., 2001].

Негативными регуляторами ответа в *A. thaliana* являются 10 ARR-белков группы А. Под действием транскрипционных факторов группы В происходит включение генов раннего ответа группы А (*arr4*, *arr5*, *arr6*, *arr7*, *arr8*, *arr9*, *arr15* и др.), которые являются для них мишенями. Транскрипция *arr*-генов группы А активируется уже через 5 минут после начала действия цитокининов [D'Agostino et al., 2000]. ARR-белки группы А не являются транскрипционными факторами и не содержат ДНК-связывающий домен [Ferreira and Kieber, 2005], однако, также как и ARR-белки группы В, способны воспринимать активированный фосфат [Аверина и Яронская, 2012].



**Рисунок 7. Общая схема биосинтеза и деградации цитокининов.** Непрерывные стрелки указывают пути с известными генами, пунктирные стрелки указывают пути с генами, которые еще предстоит идентифицировать. Ферменты отмечены красными рамами: IPT, аденозин фосфат-изопентенилтрансфераза; tRNA-IPT, тРНК-изопентенилтрансфераза; LOG (LONELY GUY), цитокинин рибозид 5'-монофосфатфосфорибогидролаза; CYP735A, цитохром P450-монооксигеназа; CKX, цитокинин оксидаза/дегидрогеназа. iP (изопентениладенин), cZ (цис-зеатин), tZ (транс-зеатин) и их рибозиды (внутри пунктирных рамок) могут быть деградированы CKX. DMAPP, диметилаллилпирофосфат [Модифицировано по Cai et al. 2018].

#### 1.4.2 Микробные продуценты цитокининов

Микроорганизмы способны синтезировать кинетин, зеатин, изопентениладенин и некоторые другие производные цитокинина. Цитокинины образуют ризобактерии (принадлежащие родам *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Arthrobacter*, *Bacillus* и *Pseudomonas*) и некоторые стрептомицеты. Способность синтезировать цитокинины присуща метилотрофным и метанотрофным бактериям (относящимся к родам *Methylobacterium*, *Methylovorus*, *Aminobacter*, *Methylophila*, *Methyloarcula*, *Xanthobacter*, *Paracoccus*, *Blastobacter*, *Hyphomicrobium*, *Methylophylus*, *Methylobacillus*, *Methylomonas*,

*Methylobacter* и *Methylosinus*). Экзометаболиты, проявляющие активность цитокинина, также выделяют из культуральной жидкости фототрофной пурпурной несерной бактерии *Rhodospirillum rubrum* [Tsavkelova et al., 2006].

Штаммы фитопатогенных бактерий (*Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas solanacearum*, *P. syringae* и *Rhodococcus fascians*) помимо цитокининов также синтезируют и ауксины. Цитокинины были обнаружены в культуральных жидкостях цианобактерий (родов *Anabaena*, *Chlorogloeopsis* и *Calothrix*), коричневых и красных водорослей, а также дрожжей (*Saccharomyces* spp. и *Schizosaccharomyces* spp.).

Соединения, проявляющие активность цитокининов, обнаружены у микоризных (родов *Suillus*, *Paxillus* и *Rhizopogon*) и фитопатогенных грибов (родов *Uromyces*, *Schizophyllum* и *Taphrina*). Изопентениладенин был выделен из культуральной жидкости слизевого гриба *Dictiostellium discoideum* [Tsavkelova et al., 2006].

В патогенных штаммах *A. tumefaciens*, *E. herbicola* и *R. fascians* гены, ответственные за синтез цитокининов, локализованы в Ti-плазмидах [Vereecke et al., 2000]. Пример *A. tumefaciens* демонстрирует, что определенные гены могут контролироваться эукариотическим промотором, что позволяет экспрессировать их исключительно в клетках растения-хозяина. Проникая в клетку растения-хозяина, плазмиды обеспечивают чрезмерный синтез фитогормонов, что стимулирует развитие опухолей. С другой стороны, биосинтез цитокининов в клубеньковых бактериях рода *Rhizobium* стимулирует образование симбиотических конкреций у бобовых растений [Tsavkelova et al., 2006].

Синтез цитокининов *de novo* из изопентенилпирофосфата и 5'-АМФ (катализируемый изопентенилтрансферазой) имеет место во множестве патогенных галообразующих бактерий (*Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae*, *Rhodococcus fascians* и *Erwinia herbicola*) [Trotsenko et al., 2001]. За биосинтез свободных цитокининов в фитопатогенных бактериях ответственны следующие гены или комбинации генов (локализованные в Ti-плазмидах): (1) *ipt* и *tzs* (у *A. tumefaciens*, *Pseudomonas solanacearum* и *P. syringae* pv. *savastanoi*); (2) *ptz* (у *P. savastanoi* и *P. solanacearum*); (3) *ipt* (у *R. fascians*); и (4) *etz* (у *E. herbicola*) [Лутова, 2000]. Изопентениладенозина-5-фосфат подвергается дальнейшим модификациям с образованием изопентениладенина, зеатина-рибозида и зеатина.

### 1.4.3 Цитокинины у фотосинтезирующих микроорганизмов

У цианобактерий был предсказан относительно простой метаболизм цитокининов, основанный на поиске гомологичных генов, участвующих в биосинтезе и деградации цитокинина. Подтверждено, что изопентентрансферазы (IPT), катализирующие первую стадию биосинтеза цитокинина в цианобактериях, имеют высокий уровень сходства с изопентенилтрансферазами тРНК (tRNA-IPT) бактерий и аденилат изопентенилтрансферазами (АМФ/АДФ/АТФ-IPTs) [Frébert et al., 2011]. В геноме цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7120 был найден ген, кодирующий аденилат-IPT, при этом, он больше схож с последовательностью растительной тРНК-IPT [Frébertova et al., 2015].

Интересно, что предполагаемая последовательность гомологичного гена NsCKX1, кодирующего цитокининоксидазу/дегидрогеназу (СКХ), которая участвует в деградации цитокининов, была обнаружена в *Nostoc* sp. PCC 7120, но предсказанное сходство NsCKX1 с белками СКХ растений было очень низким. Более того, функциональный анализ рекомбинантного белка СКХ, названный в исследовании как NoCKX1, не проявил активности в регуляции цитокининов [Frébertova et al., 2015]. Кроме того, у *Synechocystis* sp. PCC 6803 и *Prochlorococcus marinus* не обнаружены соответствующие последовательности СКХ, в отличие от некоторых других видов цианобактерий [Frébert et al., 2011]. С другой стороны, регуляторный эффект цитокининов на метаболизм цианобактерий был показан для штаммов *Synechocystis* sp. PCC 6803, где 6-бензиладенин и *транс*-зеатин усиливали синтез РНК *in vitro*. Усиленная транскрипция РНК в присутствии *транс*-зеатина и цитокинин-связывающего белка предполагала существование потенциальной системы распознавания сигнала цитокининов в цианобактериях. Хотя у *Synechocystis* sp. PCC 6803 была обнаружена последовательность с высоким сходством с геном, кодирующим мембранный рецептор цитокининов CRE1, до сих пор нет данных относительно экспрессии и функции этого гена [Žižková et al., 2017].

Что касается генов, связанных с биосинтезом цитокининов, представляется, что цианобактерии содержат минимальный генетический аппарат, необходимый для регуляции биосинтеза и контроля метаболизма цитокининов, который эволюционно позднее, у высших растений, превратился в более сложную систему. Система сигнальной трансдукции цитокининов, которая сформировалась у растений во время распространения по суше, не встречается в цианобактериях. Типичная последовательность CHASE, которая содержит ключевой для связывания цитокинина остаток рецепторной гистидинкиназы, обнаруженная в растениях, не была идентифицирована у цианобактерий. Анализ NCBI BLAST последовательности домена АНК4 CHASE по доступным базам данных

последовательностей цианобактерий не обнаружил каких-либо существенных гомологий в *Nostoc* spp. или в других цианобактериях. Даже если у них имеется CHASE-подобный домен, регуляторный белок *sll0267* у *Synechocystis* sp. PCC 6803 не содержит ключевых остатков, связывающих цитокинин [Frébert et al., 2011].

С другой стороны, цианобактерии реагируют на действие экзгенных цитокининов, что проявляется в стимуляции роста и усиленной транскрипции. Разумно ожидать, что существует сигнальный путь цитокининов, отличающийся от известного в растениях.

#### 1.4.4 Цитокинины микроводорослей

Водоросли представляют собой разнородную, немонафилетическую группу фотосинтетических эукариот, встречающихся в морских, пресноводных и наземных местообитаниях, где имеется достаточный для фотосинтеза свет [Lewis and McCourt, 2004]. Переменные профили как изопреноидных, так и ароматических цитокининов были выявлены у различных таксонов водорослей с некоторыми общими тенденциями, включая распространенность *цис*-зеатина и низкое или неопределяемое содержание форм дегидрозеатина и конъюгатов цитокининов [Stirk et al., 2013]. Кроме того, варьирование уровня эндогенных цитокининов было продемонстрировано во время цикла деления клеток *Chlorella minutissima* при чередовании светового и темного периодов культивирования, что указывает на потенциальную потребность в цитокинах для роста водорослей [Stirk et al., 2011]. Хотя гены, кодирующие метаболические пути цитокининов, были идентифицированы у нескольких видов водорослей, большинство из них обнаруживают нерегулярно в сравнении с сосудистыми растениями [Pils and Heyl, 2009]. Как и цианобактериальные IPT, водорослевые IPT связаны с тРНК-IPT, а не с аденилатными IPT, поддерживая происхождение цитокининов из тРНК [Lu and Xu, 2015]. Объединяя эти данные, можно предположить, что полный набор белков, участвующих в метаболизме цитокининов, появился у высших растений, хотя, существуют эволюционно более древние организмы, такие как цианобактерии и водоросли, механизмы контроля гомеостаза цитокининов у которых еще не изучены [Žižková et al., 2017].

В *Arabidopsis* первый фиксированный этап биосинтеза цитокининов катализируют изопентенилтрансферазы (IPTs), которые образуют два функциональных класса: IPTs tRNA прокариотического типа (AtIPT2 и 9) и ATP/ADP IPTs (AtIPT1, 3–8). Предполагаемые IPTs водорослей содержат консервативные домены, найденные в *Arabidopsis*, и имеют более высокое сходство с tRNA IPTs, чем ATP/ADP IPTs (Рисунок 8)

[Lu et al., 2014]. Таким образом, ATP/ADP IPTs, по-видимому, возникли уже после расхождения между хлорофитами и наземными растениями [Frébert et al., 2011].

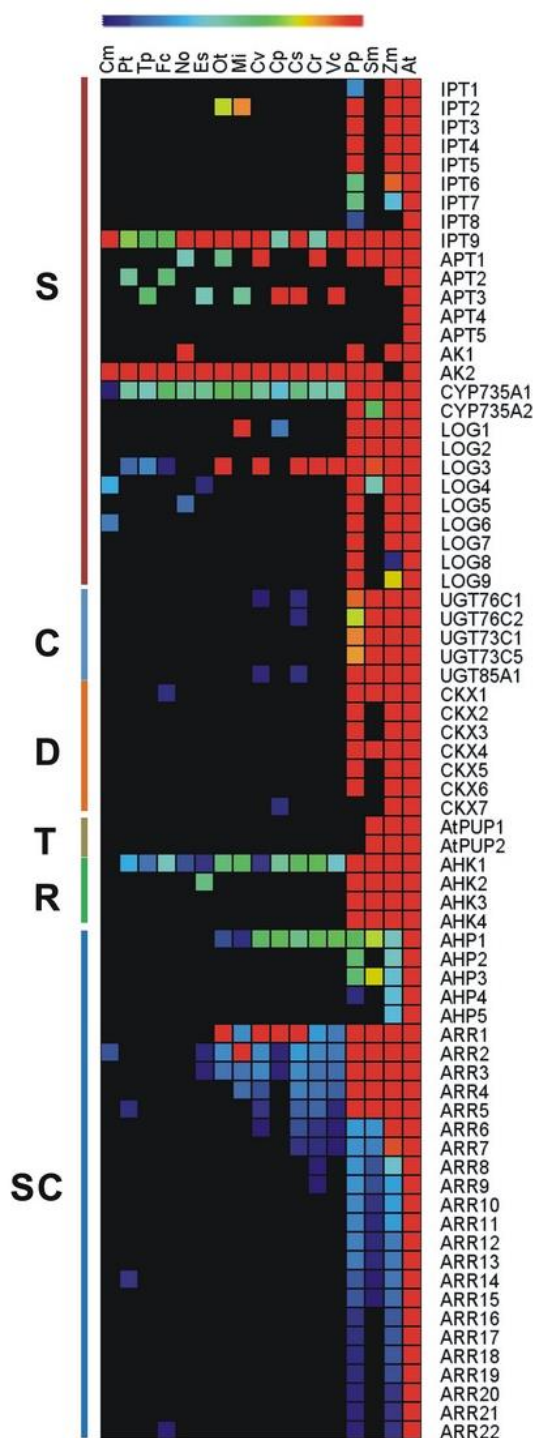
Филогения аденозинкиназ (АК), которые превращают цитокинины в соответствующие нуклеотиды, выявила высокий уровень их консервативности среди фотосинтезирующих эукариот, начиная от одноклеточных водорослей и заканчивая растениями [Lu et al., 2014]. Более того, предполагаемые АК водорослей содержат мотив связывания пентозного фрагмента, встречающийся в соответствующем ферменте мха *Physcomitrella patens*, который является функциональным [von Schwartzberg et al., 1998].

Цитокинин рибозид 5`-монофосфатфосфорибогидролаза (LOG) катализирует окончательную стадию синтеза биоактивных цитокининов [Kurakawa et al., 2007; Kuroha et al., 2009]. Предполагаемые гены, кодирующие LOG, найдены у многих исследованных видов водорослей [Lu et al., 2014]. Интересно, что геномы большинства наземных растений содержат несколько копий генов, кодирующих LOG, тогда как страменопилы и несколько видов зеленых водорослей (например, *C. pyrenoidosa*, *C. subellipsoidea* C-169, *C. reinhardtii* и *V. carteri*) содержат только одну копию этого гена [Lu et al., 2014].

Клеточный уровень цитокининов зависит от баланса между процессами биосинтеза, конъюгации (образование неактивных форм) и деградации. Фермент деградации цитокининоксидаза/дегидрогеназа, которая отвечает за полное расщепление боковой цепи основания и нуклеозидных форм изопреноидных цитокининов, обнаружен далеко не у всех исследованных водорослей (Рисунок 8) [Lu et al., 2014]. По-видимому, механизмы деградации гормонов, сформировавшиеся у высших растений, впервые в эволюции возникали у микроводорослей.

Сигнальные пути цитокинина и ауксина более сложны, чем сигнальные пути этилена, абсцизовой кислоты и гиббереллинов, т.к. у высших растений обнаружено как минимум два каскада для каждого гормона. Гомологи первого обнаруженного рецептора цитокининов, АНК1, распространены в геномах водорослей. Более того, гомологи основных составляющих сигнального каскада цитокининов (регуляторы ответа группы В и гистидиновые фосфотрансмиттеры) были найдены у растений, включая зеленые микроводоросли. По-видимому, компоненты сигнального пути цитокининов формировались с у различных водорослях, но только у сосудистых растений сформировался полный набор генов, кодирующих все необходимые белки, участвующие в регуляции метаболизма и сигнальной трансдукции цитокининов.





**Рисунок 8. Консервативность генов биосинтеза цитокининов у оксигенных фотосинтезирующих эукариот.** Цвет указывает на сходство гена с наибольшим соответствием: от малого сходства (черный цвет) до высокого сходства (красный цвет). Ортологи упорядочены по функциям: S, синтез; D, деградация; C, конъюгация; T, транспортер; R, рецептор; SC, сигнальный компонент. См, красная водоросль *Cyanidioschyzon merolae*; Pt, диатомовая водоросль *Phaeodactylum tricornutum*; Тр, диатомовая водоросль *Thalassiosira pseudonana*; Fc, диатомовая водоросль *Fragilariopsis cylindrus*; No, *Nannochloropsis oceanica*; Es, бурая водоросль *Ectocarpus siliculosus*; Mi, зеленая водоросль *Micromonas* sp. RCC299; Ot, зеленая водоросль *Ostreococcus tauri*; Cv, зеленая водоросль *Chlorella variabilis* NC64A; Cr, зеленая водоросль *Chlorella pyrenoidosa*; Cs, зеленая водоросль *Coccomyxa subellipsoidea* C-169; Cr, зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii*; Vc, зеленая водоросль *Volvox carteri*; Pp, мох *Physcomitrella patens*; Sm, *Selaginella moellendorffii*; Zm, *Zea mays*; At, *Arabidopsis thaliana* [Lu et al., 2014].

Известно, что экзогенные фитогормоны, цитокинины в частности, стимулируют рост биомассы *Chlamydomonas reinhardtii* [Park et al., 2013]. При этом, ничего неизвестно о метаболических путях эндогенных цитокининов у этой зеленой водоросли. В клетках *C. reinhardtii* обнаружены различные изопреноидные цитокинины: *транс*-зеатин, *транс*-зеатин-О-глюкозид, *транс*-зеатин-9-глюкозид, *цис*-зеатин, *цис*-зеатин-О-глюкозид, *цис*-зеатинрибозид-О-глюкозид, *цис*-зеатинрибозидмонофосфат, дигидрозеатин, дигидрозеатинрибозид, дигидрозеатинрибозидмонофосфат, изопентениладенин и

изопентениладенозинмонофосфат [Романенко и др., 2016]. Филогенетический анализ позволил обнаружить у *C. reinhardtii* ИПТ-подобный белок, схожий с изопентенилтрансферзой тРНК *A. thaliana* (AtIPT9) [Lu and Xu, 2015]. В геноме *C. reinhardtii* была также найдена одна последовательность, гомологичная последовательности гистидинового фосфотрансмиттера, и четыре последовательности, сходных с последовательностями регуляторов ответа на цитокинины [Pils and Heyl, 2009]. Важно отметить, что транскрипционный фактор PSR1 *C. reinhardtii*, усиливающий экспрессию генов, кодирующих ферменты биосинтеза хлорофилла, на 60 % идентичен последовательности регулятора ответа на цитокинины группы В [Waters et al., 2009].

На сегодняшний день мало что известно о функциональной роли фитогормонов у микроводорослей, которые являются объектами биотехнологии. Усилия должны быть направлены на исследования молекулярных механизмов биосинтеза и сигнальной трансдукции фитогормонов, которые позволят сформировать представления о возникновении и эволюции сложного аппарата метаболизма фитогормонов, сформировавшегося у сосудистых растений. В свою очередь, такие исследования откроют новые двери для генетической или химической инженерии микроводорослевых производств.

### 1.5 Супрессия как метод генетического анализа

Анализ любого биологического процесса методами классической генетики требует наличия нескольких типов мутантов для идентификации генов, участвующих в этом процессе. Одна стратегия, обычно используемая для определения функций генов интереса, предполагает наличие штамма, который уже содержит мутацию, влияющую на интересующий метаболический путь. Мутации, которые восстанавливают фенотип дикого типа, на фоне исходной мутации, называют супрессорами. Исторически, супрессоры были чрезвычайно ценны для определения отношения между двумя генными продуктами *in vivo*, даже в отсутствие сведений о молекулярной природе исследуемых мутаций. В современную эпоху проектов полногеномного секвенирования, где последовательности ДНК не дают точной информации относительно функции ~ 60% открытых рамок считывания, супрессоры продолжают быть полезными для определения функциональной роли белков *in vivo* [Prelich, 1999].

Супрессоры все чаще используются для анализа генетического контроля биохимических каскадов по двум основным причинам. Во-первых, многие гены не могут быть идентифицированы прямым генетическим отбором. Первичная мутация часто

помогает сенсibilизировать этот путь, а идентификация супрессора позволяет выявлять его дополнительные компоненты. Супрессия мутантного фенотипа позволяет обнаружить взаимосвязь между двумя генами, которую невозможно установить другими методами. Понимание механизмов взаимодействия генных продуктов невозможно без выяснения механизмов супрессии мутантного признака.

### 1.5.1 Механизмы супрессии

**Внутригенная супрессия.** Простейшим механизмом подавления является внутригенная супрессия, где фенотип, вызванный первичной мутацией, улучшается в результате возникновения второй мутации в том же гене. Супрессия может быть результатом обратной мутации (истинной реверсией), когда восстанавливается исходная последовательность ДНК. Это может быть изменением одного и того же кодона, или влияние на другой кодон, вызывающий изменение аминокислоты в другой позиции, которая теперь восстанавливает функцию этого белка до уровня активности дикого типа. Внутригенный супрессор отличают от экстрагенного супрессора по результатам гибридологического анализа; по определению, внутригенные супрессоры должны быть очень тесно сцеплены с первоначальной мутацией, тогда как экстрагенные супрессоры наследуются независимо. Несмотря на то, что внутригенные супрессоры предоставляют ценную информацию о структурно-функциональных особенностях белка, они не идентифицируют никаких новых белков, которые функционально связаны с первоначальным мутантом [van Leeuwen et al., 2017].

**Информационные супрессоры.** Супрессорные мутации, затрагивающие компоненты трансляционной машины, подавляют эффекты нонсенс-мутаций или мутаций типа «сдвиг рамки считывания». Такие супрессоры были названы информационными, поскольку они изменяли процесс трансляции мутантный иРНК. Информационные супрессоры оказались чрезвычайно ценными инструментами для изучения таких явлений, как распознавание кодон-антикодон, триплетной природы генетического кода и точности трансляции [Murgola, 1985]. Поскольку информационные супрессоры являются специфическими для отдельных типов мутации, а не для конкретного продукта гена, их отличительной генетической характеристикой считается аллель-специфичность.

Хотя информационные супрессоры несут ценную информацию о механизмах и точности трансляции, они не особенно полезны, когда цель супрессорного отбора – изучение биосинтетических и регуляторных процессов [Michels, 2002].

**Изменение количества мутантного белка.** Первичная мутация может снизить общую активность кодируемого белка, либо путем снижения его удельной активности, либо путем уменьшения фактического количества белка. Одним из ожидаемых классов супрессоров являются мутации, которые увеличивают количество исходного белка. Супрессор может влиять на экспрессию генов на многих уровнях: *цис*-действующие промоторные мутации, мутации в аппарате транскрипции, изменения в процессинге мРНК, трансляции, РНК или стабильности белка, или дублирования мутантного гена; все это, вероятно, может увеличить количество мутантного белка. Этот класс супрессоров идентифицирует либо специфические регуляторы гена интереса, либо общие компоненты его экспрессии [van Leeuwen et al., 2017]. Например, мутации в субъединице Рр3 $\rho$  протеасом 20S подавляют температурно-чувствительные мутации (Ts<sup>-</sup>) в субъединице Рр26 $\rho$  РНК-полимеразы II в *S. cerevisiae* путем повышения стабильности мутантного Рр26 $\rho$  [Nouraini et al., 1997]. Подавление специфично для Рр26 $\rho$ , и не влияет на другие Ts<sup>-</sup> субъединицы Pol II, что указывает на чувствительность Рр26 $\rho$  к протеолизу. Гены *smg*, которые были идентифицированы у *Caenorhabditis elegans* как супрессоры мутаций в различных, казалось бы, не связанных путях, представляют собой пример подавления мутантного фенотипа через общие пути реализации экспрессии генов [Prelich, 1999]. Гены *smg* участвуют в нонсенс-опосредованном распаде мРНК; и супрессия скорее всего, связана с повышенной стабильностью мРНК, закодированных исходными генами.

**Изменение активности мутантного белка.** Другой механизм увеличения общей активности дефектного белка заключается в усилении его специфической активности, которая может быть достигнута, по меньшей мере, тремя способами: за счет внутригенной супрессии, повышения активности мутантного белка путем изменения прямых взаимодействий с регулируемыми субъединицами, или путем изменения посттрансляционных модификаций [Michels, 2002].

Мутации, которые приводят к изменениям взаимодействия между двумя белками, являются одним из наиболее часто встречающихся супрессорных мутаций. В наиболее упрощенном сценарии аминокислотная замена на границе между двумя белками нарушает их взаимодействие, и компенсаторная аминокислотная замена во втором белке восстанавливает это взаимодействие. Супрессия благодаря этому механизму «замка и ключа» требует экстремальной аллелеспецифичности. Альтернатива модели «замка и ключа» была предложена на основе тщательного изучения мутаций в актин-связывающем белке *S. cerevisiae* (Sac $\rho$ ), которые подавляют чувствительные к температуре мутации в актине [Sandrock et al., 1997]. Очищенные мутантные белки Sac $\rho$  связываются с мутантным актином крепче, чем белки Sac $\rho$  дикого типа. Неожиданно оказалось, что т

эти мутантные белки Sacbr также связываются крепче с актином дикого типа. По-видимому, произошло не восстановление исходного взаимодействия, а создание новых контактов между двумя белками. Основываясь на большем целевом размере, доступном для создания новых контактов, вполне вероятно, что этот механизм встречается чаще, чем обычно предусмотренный механизмом «замка и ключа».

**Изменение активности метаболического пути.** В многоступенчатом метаболическом пути мутация, которая изменяет одну стадию пути, часто может быть подавлена мутациями в генах, которые влияют на другие этапы того же самого пути. Этот класс супрессоров часто чрезвычайно информативен, поскольку помимо идентификации других компонентов интересующего пути, супрессоры могут также облегчить упорядочение пути [Prelich, 1999]. Самым сильным доказательством того, что супрессор функционирует в рамках одного и того же пути, является тот факт, что только супрессор создает фенотип, связанный с фенотипом исходной мутации.

Супрессор, затрагивающий другие этапы одного и того же метаболического пути, может функционировать либо выше, либо ниже исходного гена и зависит от природы исходной мутации. В сигнальном пути, где наличие или отсутствие сигнала определяет, является ли путь «включен» или «выключен», частичное подавление аллеля потери функции не позволяет надежно воссоздать этот путь. Предполагается, что подавление нулевой аллели обусловлено последующими мутациями, которые активируют путь, не зависящий от исходного (подавленного) пути. Напротив, в биосинтетических путях, таких как сборка фагов или клеточный цикл, где происходит накопление промежуточных продуктов или появление последовательных зависимых стадий, супрессорная мутация обычно находится выше исходной [van Leeuwen et al., 2017].

**Изменение другого метаболического пути.** Мутация, которая инактивирует один путь, часто может быть супрессирована путем изменения второго пути. Супрессор может повлиять на регулирование пути, имеющего сходную или перекрывающуюся функцию, или изменить специфику функционально несвязанного пути [Michels, 2002].

Супрессоры, которые изменяют «клеточную среду», также должны рассматриваться как влияющие на другой путь. Эти мутации изменяют общую физиологию клетки (например, путем изменения внутриклеточного pH или концентрации  $Ca^{2+}$ ), так, что функция исходного мутантного белка восстанавливается в этой измененной среде. Неясно, как часто этот косвенный механизм на самом деле реализуется.

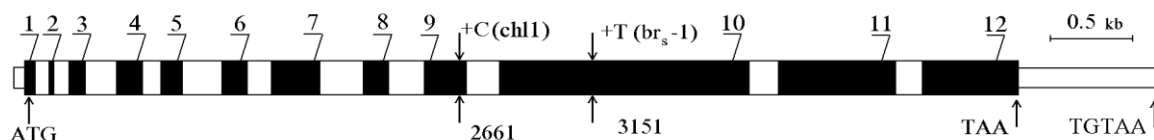
## 1.5.2 Использование супрессии при изучении биосинтеза хлорофилла

Биосинтез функциональных тетрапирролов в фотосинтезирующей клетке начинается с образования из глутамата 5-аминолевулиновой кислоты (АЛК), которая через серию последовательных реакций превращается в протопорфирин IX – общий предшественник гема и ХЛ [Beale, 1999]. Первым специфическим ферментом биосинтеза хлорофилла является магний-хелатаза, осуществляющая превращение ПП в Mg-протопорфирин IX (MgПП), которая представляет собой комплекс, состоящий из трех типов субъединиц: CHLI, CHLD и CHLN. Помимо ферментативных функций, а именно встраивания  $Mg^{2+}$  в молекулу протопорфирина IX, большая субъединица магний-хелатазы (CHLN) участвует в передаче сигналов от хлоропласта к ядру, задействована в транскрипционной регуляции и является компонентом путей гормонального и редокс-контроля [Юрина и др., 2012]. Метилирование MgПП и формирование циклопентанового кольца завершаются последовательным образованием протохлорофиллида, хлорофиллида и хлорофилла.

Исследования гена *LTS3 C. reinhardtii* позволили установить, что кодируемый им белок (транскрипционный фактор семейства GATA) является важным компонентом транскрипционных комплексов, регулирующих экспрессию фотозависимых генов ферментов биосинтеза ХЛ: магний-хелатазу и АЛК-синтезирующий комплекс. Одним из подходов к поиску альтернативных путей биосинтеза являлось изучение супрессии мутантных признаков.

Для выявления факторов, обеспечивающих образование хлорофилла у *C. reinhardtii* в условиях отсутствия функционального белка LTS3, из клеточной культуры штамма, несущего мутацию *brc-1* в гене *LTS3* был отобран спонтанный ревертант Brc-8, способный синтезировать ХЛ в темноте. Результатом исследования супрессии *lts3*-мутаций стало обнаружение двух новых ядерных генов *SUP-3* и *SUP-1 C. reinhardtii*, кодирующих факторы регуляции активности MX. *SUP-3* сцеплен с *LTS3* и кодирует белок-репрессор альтернативного LTS3 пути регуляции MX. Молекулярная идентификация гена *SUP-1* позволила предположить, что его продукт является компонентом LTS3-пути, и контролирует процесс зеленения [Чекунова и др., 2014].

У одноклеточной зеленой водоросли *C. reinhardtii* мутации *chl1* и *brs-1* в гене *CHLN*, кодирующем большую субъединицу магний-хелатазы (Рисунок 9), блокируют биосинтез ХЛ. Бесхлорофильные клетки мутантов по этому гену светочувствительны и в темноте формируют оранжевые колонии, окраска которых обусловлена накоплением субстрата MX – протопорфирина IX, и наличием каротиноидов [Chekounova et al., 2001].



**Рисунок 9. Структура гена *CHLH* *C. reinhardtii* (7035 пн).** Темные области – экзоны, белые – интроны. 5'UTR и 3'UTR –прямоугольники меньших размеров. Указаны положения иницирующего кодона (ATG), стоп-кодона (TAA), сигнала полиаденилирования (TGTAА) и мутаций (+1 frameshift) *chl1* и *brs-1*.

В результате мутагенеза, индуцированного УФ ( $\lambda_{260}$ ), оранжевых светочувствительных мутантов по гену *CHLH*, накапливающих протопорфирин IX (ПП), было получено 6 зеленых светоустойчивых ревертантов, синтезирующих ХЛ в темноте и на свету. Три из них (штаммы R1-chl, R2-chl и R3-chl) были отобраны в культуре мутанта Chl1, а остальные (R1-brs, R5-brs и R6-brs) – в культуре второго мутанта Brs-1. Эти ревертанты стали предметом исследований механизмов, восстанавливающих биосинтез хлорофилла в условиях нарушения функций магний-хелатазы.

Ревертанты, полученные от мутантов по гену *CHLH* *C. reinhardtii*, в отличие от исходных мутантов, в темноте не накапливают ПП. Их клетки синтезируют ХЛ в темноте и на свету в количестве, сходном с таковым у штамма дикого типа CC124. Исключением стал штамм R6-brs, у которого на свету этот пигмент накапливается втрое больше нормы. Соотношения хлорофиллов *a/b*, у ревертантов оказались сходным с таковым у дикого типа (1.81), за исключением штамма R2-chl, для которого эта величина на свету составляет 18.42, а в темноте – 27 (Таблица 1).

**Таблица 1. Содержание гема, Хл и их предшественников в клетках ревертантов, выращенных на свету (нмоль/10<sup>9</sup> клеток).**

Штамм	Генотип	Содержание пигментов				Гем	Хл/ Гем	АЛК*
		ПП	MgПП(Э)	Хл <i>a + b</i>	Хл <i>a</i> /Хл <i>b</i>			
CC124	<i>wt</i>	н.о.	0.15	5518	1.81	8.7	635	22.5
R1-brs	<i>SUP1,brs1</i>	н.о.	н.о.	4945	1.90	8.3	599	83.6
R1-chl	<i>SUP1,chl1</i>	н.о.	н.о.	3819	1.95	10.8	355	48.5
R2-chl	<i>SUP1,chl1</i>	н.о.	н.о.	3095	18.42	24.2	128	88.4
R6-brs	<i>SUP2,brs1</i>	н.о.	17.14	27518	1.98	38.0	786	635.1

\*АЛК, накопленная клетками в течение 17 часов их обработки 40 мМ раствором левулиновой кислоты; MgПП(Э) – (монометилловый эфир) Mg-протопорфирин IX

Восстановление способности синтезировать ХЛ у ревертантов от мутантов по гену *CHLH* могло произойти либо в случае обратной мутации в этом гене, или в результате мутации другого гена, способной супрессировать мутантную аллель гена *CHLH*. Для определения генетической природы реверсий был проведён гибридологический анализ ревертантов. Его результатом стало обнаружение двух ядерных мутаций *sup-1* и *Sup-2* *C. reinhardtii*, восстанавливающих способность синтезировать хлорофилл у ревертантов на фоне мутаций в гене *CHLH* кодирующем большую субъединицу МХ. Мутация *Sup-2* оказалась тесно сцеплена с мутацией *brs-1* в гене *CHLH* (Таблица 2).

**Таблица 2. Оценка сцепления супрессорных мутаций с мутациями в гене *CHLH*.**

Пары маркеров	P : N : T	P (P = N)	D* (сМ)
<i>sup1- chl1</i>	192 : 43 : 68	< 0,01	25.4 сМ
<i>sup2 - brs-1</i>	73 : 0 : 0	< 0,01	< 1.3 сМ

\*Расстояние между маркерами рассчитывали по формуле:

$$D \text{ (сМ)} = N + 0.5T / P + N + T \times 100$$

У зеленого в темноте и на свету ревертанта R6-*brs* супрессорная мутация привела к возрастанию в 28 раз способности к синтезу АЛК и к увеличению содержания Хл и гема (в 5 и 4 раза соответственно) по сравнению с диким типом. При этом, она не повлияла на величину отношения *Хла/Хлв* и, следовательно, на структуру фотосинтетического аппарата. По-видимому, повышение АЛК-синтезирующей способности у ревертантов связано с восстановлением функциональной активности комплекса МХ.

Настоящая работа является продолжением изучения ревертанта R6-*brs*, у которого восстановление биосинтеза хлорофилла на фоне мутации бесхлорофильности *brs-1* в гене *CHLH*, кодирующем большую субъединицу магний-хелатазы, произошло в результате доминантной супрессорной мутации, тесно сцепленной с мутацией *brs-1*.



## 2 Материалы и методы

### 2.1 Растительный материал

В работе использовали штаммы *Chlamidomonas (C.) reinhardtii* из Петергофской Генетической Коллекции (ПГК) – штаммы дикого типа 137С и СС124, мутант по гену *CHLH*, кодирующему большую субъединицу магний-хелатазы *C. reinhardtii*, *brs-1*, и ревертант R6-*brs*, полученный от мутанта *brs-1*.

### 2.2 Условия культивирования

Для культивирования клеток *C. reinhardtii* использовали стандартные питательные среды, состав которых представлен в таблице 3. Культуры выращивали при температуре 20-25 °С на белом свете (200-300 мкЕ/м<sup>2</sup>сек) и в темноте.

**Таблица 3. Состав сред, используемых в работе.**

Компоненты	Состав		на 1 л среды		
			ТАР	ТАР <sub>обог.</sub>	Т
Раствор Бейеринка	На 1 л H <sub>2</sub> O		25 мл	25 мл	25 мл
	NH <sub>4</sub> Cl	16 г			
	MgSO <sub>4</sub>	4 г			
Фосфатный буфер	На 100 мл H <sub>2</sub> O		1 мл	1 мл	1 мл
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.36 г			
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.3 г			
Tris буфер	На 1 л H <sub>2</sub> O		100 мл	100 мл	100 мл
	Tris base	24.2 г			
	HCl	15 мл			
Ацетат натрия			2 г	2 г	–
Раствор микроэлементов	На 1 л H <sub>2</sub> O		1 мл	1 мл	1 мл
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1 г			
	ZnSO <sub>4</sub> ...7H <sub>2</sub> O	1 г			
	MnSO <sub>4</sub> ...4H <sub>2</sub> O	0.4 г			
	CoCl <sub>2</sub> ...6H <sub>2</sub> O	0.2 г			
	CuSO <sub>4</sub>	0.04 г			
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ...2H <sub>2</sub> O	0.2 г			
Дрожжевой автолизат			–	4 г	–
Агар			15 г	15 г	15 г

### **2.3 Изучение потребности штамма R6-brs в дрожжевом экстракте для роста**

Готовили питательные среды TAP ac<sup>-</sup> (TAP без добавления ацетата натрия), TAP ac<sup>+</sup>, TAP обог. ac<sup>-</sup> (TAP обог. без добавления ацетата натрия), TAP обог. ac<sup>+</sup>. Культуры клеток дикого типа 137C и ревертанта R6-brs выращивали на этих средах на свету. В темноте штаммы 137C и R6-brs выращивали на средах TAP ac<sup>+</sup>, TAP обог. ac<sup>+</sup>.

### **2.4 Определение размеров клеток**

Трехдневные несинхронизированные культуры клеток штаммов 137C, brs-1 и R6-brs выращенных на среде TAP обог. суспендировали в воде и использовали для исследования с помощью инвертированного полуавтоматизированного флуоресцентного микроскопа DM13000B. Для каждого штамма фотографировалось 40 полей, после чего подсчитывался объем 300 клеток каждого штамма.

### **2.5 Измерение скорости деления клеток**

Суспензии культур клеток дикого типа 137C и ревертанта R6-brs готовились в 1 мл жидкой среды TAP обог. Пробирки с суспензиями оставляли на свету. На следующий день проводился подсчет концентрации клеток с помощью камеры Горяева. Затем, в пробирки с 7 мл жидкой среды TAP обог. вносили по 70 мкл суспензии клеток. Пробирки помещали на сутки в темноту для синхронизации клеточного цикла. На следующий день пробирки переносили на свет, и далее культивировали при постоянном освещении. В течение 5 дней проводили подсчет концентрации клеток с помощью камеры Горяева.

### **2.6 Сортировка клеток по размеру методов цитометрии**

Культуры клеток дикого типа 137C и ревертанта R6-brs сортировали с помощью проточного сортирующего цитофлуориметра BD FACS Aria 3 на предмет наличия фракций различного размера. Для этого готовили жидкие суспензии трехдневных несинхронизированных культур клеток дикого типа 137C и ревертанта R6-brs, выращенных на среде TAP обог. Для анализа флуоресценции хлорофилла использовался синий лазер 488 нм (мощность 20 мВт). Регистрация сигнала осуществлялась от двух флуорохромов: 695/40 ----- PerCP-Cy5-5 и 616/23 ----- PE-CF594.

## 2.7 Выделение ДНК

Для выделения ДНК из культуры клеток *C. reinhardtii* (137C, brs-1, R6-brs) применялся метод СТАВ, когда в составе экстракционного буфера используется цетилметиламмоний бромид (ЦТАБ) – детергент, разрушающий клеточные мембраны и образующий комплексы с белками и кислыми полисахаридами. Клетки, ресуспензировали в экстрагирующем буфере, 100 мл которого содержали: ЦТАБ – 2 г, 5 М NaCl – 28 мкл, 0.5 М EDTA (pH8) – 4 мл, 2 М Tris-HCl (pH 8) – 5 мл. Культуры клеток фиксировали в жидком азоте, затем культивировали при постоянном перемешивании при 56 °С в течение одного часа в шейкер-инкубаторе ES-20/60 Biosan. После инкубации добавляли равный объем хлороформа. Содержимое пробирок перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа в мультитротаторе Multi Bio RS-24 Biosan. Смесь центрифугировали, образующийся супернатант переносили в чистую пробирку, добавляли 2/3 объема изопропанола, перемешивали, нуклеиновые кислоты затем осаждали этанолом. Просушенные образцы ДНК растворяли в буфере TE, хранили в холодильнике (+4 °С) и использовали для ПЦР-амплификации генов.

## 2.8 Выделение РНК

Для выделения РНК культуры клеток *C. reinhardtii* (137C, brs-1, R6-brs) фиксировали в жидком азоте. Использовались культуры, выращенные в темноте на средах TAP и TAP обог., темновые культуры с индукцией светом (2 часа и 4 часа), культуры, выращенные на свету на средах TAP и TAP обог. К 250 мг фиксированной культуры добавляли 750 мкл реагента TRIzol, инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 150 мкл хлороформа, пробирки трясли в течение 15 сек, после чего инкубировали 3 минуты при комнатной температуре. Центрифугировали (12 тыс.об./мин в течение 15 минут при 4 °С) и отбирали верхнюю водную фазу, которую переносили в новые пробирки. В пробирки с водной фазой добавляли 375 мкл 100% изопропанола и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Пробирки центрифугировали (12 тыс.об./мин в течение 10 минут при 4 °С) и удаляли супернатант. Приливали 750 мкл 75% этанола, центрифугировали (7500 об./мин в течение 5 минут при 4 °С), после чего удаляли супернатант. Осадок РНК сушили, затем растворяли в 15 мкл воды. Измеряли концентрацию РНК с помощью спектрофотометра, после чего концентрацию РНК всех образцов доводили до 0.1 мкг/мкл. Выделенную РНК хранили при –70 °С.

## 2.9 Получение кДНК

Для удаления геномной ДНК из фракции РНК обрабатывали ДНКазой. К 15 мкл РНК добавляли 1.7 мкл буфера для проведения реакции и 0.3 мкл ДНКазы I. Смесь инкубировали 30 мин при 37 °С. РНК переосаждали хлороформенной экстракцией. Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции. Реакцию проводили в 10 мкл: 3 мкл – РНК, 6 мкл – буфера для реакционной смеси, 0.6 мкл – праймеров Олиго(dT), 4.8 мкл – воды, 0.6 мкл – MMLV-RT. Пробирки инкубировали 1 час при 42 °С, обратную транскриптазу инактивировали при 92 °С в течение 3 мин.

## 2.10 Анализ экспрессии генов биосинтеза хлорофилла методом ПЦР-РВ

Аmplификацию ДНК-фрагментов на матрице кДНК проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Праймеры, использованные для анализа экспрессии генов биосинтеза хлорофилла, представлены в таблице 4. Последовательности праймеров подбирались в соответствии с данными базы данных Phytozome. Праймеры создавались таким образом, чтобы ампликоны с геномной и кДНК отличались по размеру. В качестве референсного гена использовался ген тубулина (праймеры к гену тубулина: tub-F – GAGTTCACTGAGGCCGAGTC; tub-R – TCCTTTGTCCAGGGTCAGTC) [Mou et al., 2015]. Условия амплификации включали начальную денатурацию при 94 °С в течение 5 мин и 40 циклов, состоящих из трех стадий: денатурация – 19 сек, 94 °С; отжиг праймера – 30 сек, 60 °С; элонгация – 40 сек, 72 °С. На последней стадии проводили заключительную элонгацию при 72 °С в течение 4 мин. По окончании ПЦР наличие ампликонов нужного размера проверяли методом гель-электрофореза. Анализ экспрессии проводили методом  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  [Livak and Schmittgen, 2001].

**Таблица 4. Последовательности праймеров к генам биосинтеза хлорофилла у *C. reinhardtii*.**

Ген – продукт	Праймер	Последовательность праймера 5`-3`	Размер на ген. ДНК	Размер на кДНК
<i>GTS</i> – Глутамил-тРНК синтетаза	GTS-F	GCGCATCCAAGAACATCACG	526	303
	GTS-R	CGGTGATGACGGCGTTGCC		
<i>HEMA</i> – Глутамил-тРНК редуктаза	HEMA-F	GCCCATCGCTCCTTCCACTC	556	440
	HEMA-R	CGCAGCAGGAACAGGTAGGG		
<i>GSA1</i> – Глутамат-1- семиальдегид аминотрансфераза	GSA-F	CAAGACGCTGGAGATCCTGG	549	415
	GSA-R	GGTCTGCTGCTCCATCATCC		
<i>CHLI2</i> – I субъединица магний-хелатазы	CHLI-F	CGAGGTGACCACGAATGACG	567	288
	CHLI-R	CGACAGGCCTACACCAGCC		
<i>CHLD</i> – D субъединица магний-хелатазы	CHLD-F	CAGCGAGGGCAAGGTGCAG	528	360
	CHLD-R	GCCTGGCTGGCCTGCATGC		
<i>CHLH</i> – H субъединица магний-хелатазы	CHLH-F	GTCGATTTACAGCGGCAACAAC	496	324
	CHLH-R	CTGCCGTTTCAGCGCCTCTAC		
<i>GUN4</i> – Тетрапиррол- связывающий белок	GUN4-F	CGATGCGCGTCACCGTCG	549	382
	GUN4-R	CAGATCTCCTTCTGAACGCTG		

## **2.12 Анализ экспрессии предположительных генов биосинтеза цитокининов методом ПЦР-РВ**

Для изучения влияния предполагаемых эндогенных цитокининов на экспрессию возможных генов биосинтеза цитокининов у штаммов *Chlamydomonas reinhardtii* были сконструированы праймеры к генам *C. reinhardtii*, последовательности которых наиболее идентичны генам синтеза цитокининов у *Arabidopsis thaliana*: *ATIPT9* (кодирует изопентенилтрансферазу 9), *ATAPT1* (кодирует аденин фосфорибозилтрансферазу 1), *ADK2* (кодирует аденозин киназу 2), и *AT2G37210* (кодирует белок семейства лизин декарбоксилаз) [Lu et al., 2014]. Амплификацию кДНК-фрагментов проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Праймеры для генов биосинтеза цитокининов представлены в таблице 5. Праймеры создавались таким образом, чтобы ампликоны с

геномной и кДНК отличались по размеру. Последовательности праймеров подбирались в соответствии с данными базы данных Phytozome. Праймеры создавались таким образом, чтобы ампликоны с геномной и кДНК отличались по размеру. В качестве референсного гена использовался ген тубулина (праймеры к гену тубулина: tub-F – GAGTTCACTGAGGCCGAGTC; tub-R – TCCTTTGTCCAGGGTCAGTC) [Mou et al., 2015]. Условия амплификации включали начальную денатурацию при 94 °С в течение 5 мин и 40 циклов, состоящих из трех стадий: денатурация – 19 сек, 94 °С; отжиг праймера – 30 сек, 60 °С; элонгация – 40 сек, 72 °С. На последней стадии проводили заключительную элонгацию при 72 °С в течение 4 мин. По окончании ПЦР наличие ампликонов нужного размера проверяли методом гель-электрофореза. Анализ экспрессии проводили методом 2<sup>-ΔΔCt</sup> [Livak and Schmittgen, 2001].

**Таблица 5. Последовательности праймеров к генам биосинтеза цитокининов *S. reinhardtii*.**

Ген – продукт	Праймер	Последовательность праймера 5`-3`	Размер на ген. ДНК	Размер на кДНК
<i>TRII</i> – тРНК диметилаллилтрансфераза/ тРНК пренилтрансфераза	TRNA-F	GGAGCTGTGCGGGGAGCTG	626	314
	TRNA-R	GGAACGGTTTACTTGTCTGGC		
<i>APT</i> – Аденин фосфорибозилтрансфераза	APT-F	CGTGGCATTCCTGACTTTCCC	354	205
	APT-R	GCACAAAGGCTACCCCAAGC		
<i>ADK</i> – Аденозин киназа	ADK-F	CCCTACATTTGACTTCCTGTTCG	579	217
	ADK-R	GCAGCATCACGGGGTAGCG		
<i>LOG</i> – Белок LOG семейства YJL055W	LOG-F	CCTGATCGTGTTCATCGGAACC	481	136
	LOG-R	CGCCTCCTGAGAGCTGAGG		

### 2.13 Гель-электрофорез

Разделение продуктов амплификации проводили при помощи электрофореза в 1%-ном агарозном геле с прокрашиванием бромистым этидием. Электрофорез проводили в 0.5X буфере TAE при 100В. В качестве маркера длин фрагментов ДНК на агарозный гель дополнительно наносили маркер молекулярного веса.

## 2.14 Секвенирование гена *CHLH*

Аmplification ДНК-фрагментов проводили методом ПЦР. Для амплификации использовалась реакционная смесь объемом 10 мкл, содержащая 1 мкл MgCl<sub>2</sub>, 1 мкл dNTP, 1 мкл буфера, 6 мкл воды, 1 мкл матричной ДНК, по 1 мкл прямого и обратного праймера, 0.15 мкл Taq-полимеразы. Праймеры для секвенирования гена *CHLH* подбирались в соответствии данным о его структуре. Последовательности праймеров для секвенирования, использованных в работе, представлены в таблице 6. Условия амплификации включали начальную денатурацию при 94 °С в течение 5 мин и 40 циклов, состоящих из трех стадий: денатурация – 19 сек, 94 °С; отжиг праймера – 30 сек, 60 °С; элонгация – 2 мин, 72 °С. На последней стадии проводили заключительную элонгацию при 72 °С в течение 4 мин. Пробы с амплифицированными фрагменты секвенировали на капиллярной секвенаторе.

**Таблица 6. Последовательности праймеров для секвенирования гена *CHLH*.**

Праймер	Последовательность праймера 5`-3`
F2-CHLH	GTCGATTTACAGCGGCAACAAC
R2-CHLH	CTGCCGTTTCAGCGCCTCTAC
CHLH-F1N	GCTGAAGAACCTGCAGCGCG
CHLH-R1N	GTTGTTGCCGCTGTAAATCGAC
CHLH-R2N	CGTCGCGCTGCATCTCGCC

## 2.15 Полногеномное секвенирование

Выделяли ДНК их культур клеток ревертанта R6-brs и мутанта brs-1, которую затем отправляли на секвенирование. Качество данных оценивали с помощью FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). С помощью Trimmomatic удаляли все риды и основания низкого качества, а также все непарные прочтения. Для выравнивания прочтений использовали последнюю версию (ver 5.5) сборки референсного генома *Chlamydomonas reinhardtii* и аннотацию (<https://genome.jgi.doe.gov/>). С помощью “bowtie2-build” создавали индекс генома, выравнивали риды на геном (bowtie2). С помощью набора утилит “Sam-tools”, sam-файл с полученными данными о выравнивании переводили в bam-формат с целью уменьшить его размер и ускорить работу. Полученный

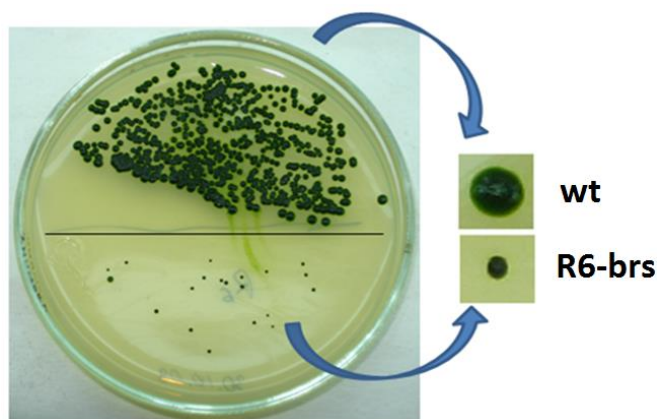
bam-файл отсортировали и проиндексировали (также sam-tools). На первом этапе определяли все SNP и инделы с помощью samtools mpileup. В процессе работы алгоритм рассматривает каждую позицию и считает количество соответствий или несоответствий данного нуклеотида референсу. На выходе получали mpileup-файл со всеми SNP и инделами. Применив VarScan с опцией mpileup2snp и mpileup2indel мы отфильтровывали истинные мутации от ошибок секвенирования, при этом мы подбирали параметр опции - var- frequency таким образом, чтобы захватить максимальное количество реальных мутаций. Визуализацию результатов осуществляли в геномном браузере IGV.



## 3 Результаты

### 3.1 Изучение морфологических особенностей ревертанта R6-brs

При изучении фенотипа клеток ревертанта R6-brs, у которого произошло восстановление биосинтеза хлорофилла на фоне мутации *brs-1* в гене *CHLH*, удалось установить, что они морфологически отличаются от штамма дикого типа. При выращивании на свету, клетки ревертанта R6-brs формируют мелкие колонии (Рисунок 10). Малый размер колоний, формируемых клетками ревертанта R6-brs, может быть обусловлен уменьшением скорости деления клеток, а также значительным увеличением скорости синтеза АЛК и ее возможной утилизацией в синтезе эндогенных цитокининов, избыточное содержание которых может привести к подавлению процессов роста и деления клеток водоросли [Яронская и др., 2004].




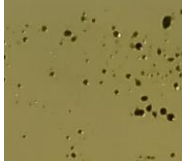




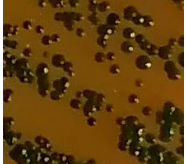
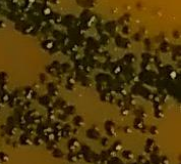
**Рисунок 10.** Колонии, формируемые клетками штамма дикого типа и ревертанта R6-brs, растущими на свету в течение двух недель, при одновременном посеве на среду TAP.

**Изучение потребности для роста штамма R6-brs в дрожжевом экстракте.** Выращивание штаммов дикого типа 137С и ревертанта R6-brs на средах различного состава (TAP ас<sup>-</sup>, TAP ас<sup>+</sup>, TAP обог. ас<sup>-</sup>, TAP обог. ас<sup>+</sup>) в темноте и на свету показало, что дрожжевой экстракт необходим для роста штамма R6-brs на свету, однако в условиях темноты он не оказывает такого же сильного эффекта, как при культивировании на свету (Таблицы 7 и 8). При этом ацетат не является необходимым компонентом для роста культур ревертанта R6-brs на свету.

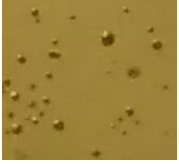


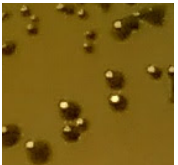
Клетки ревертанта оказались более требовательны к составу питательной среды, чем клетки дикого типа штамма 137С. В частности, они очень медленно формируют

колонии на минеральной среде (без дрожжевого экстракта), что может указывать на нарушения в метаболизме их клеток, для компенсации которых требуются соединения, содержащиеся в дрожжевом экстракте.

**Таблица 7. Рост штаммов 137C и R6-brs на питательных средах различного состава на свету.**

Штамм	Питательная среда			
	TAP ac <sup>-</sup>	TAP ac <sup>+</sup>	TAP обог. ac <sup>-</sup>	TAP обог. ac <sup>+</sup>
R6-brs				
Дикий тип 137C				

**Таблица 8. Рост штаммов 137C и R6-brs на питательных средах различного состава в темноте.**

Штамм	Питательная среда	
	TAP ac <sup>+</sup>	TAP обог. ac <sup>+</sup>
R6-brs		
137C		

**Определение размеров клеток исследуемых штаммов.** Вычислены средние размеры клеток штаммов: 137C, brs-1 и R6-brs, которые составили соответственно  $201 \pm 14$   $\mu\text{м}^3$ ,  $290 \pm 18$   $\mu\text{м}^3$  и  $890 \pm 105$   $\mu\text{м}^3$ . Микрофотографии штаммов представлены на рисунке 11. Объем клеток ревертанта оказался почти в 4.5 раза больше такового у клеток дикого типа. Возможно, увеличенный объем клеток может быть обусловлен замедленной скоростью деления.

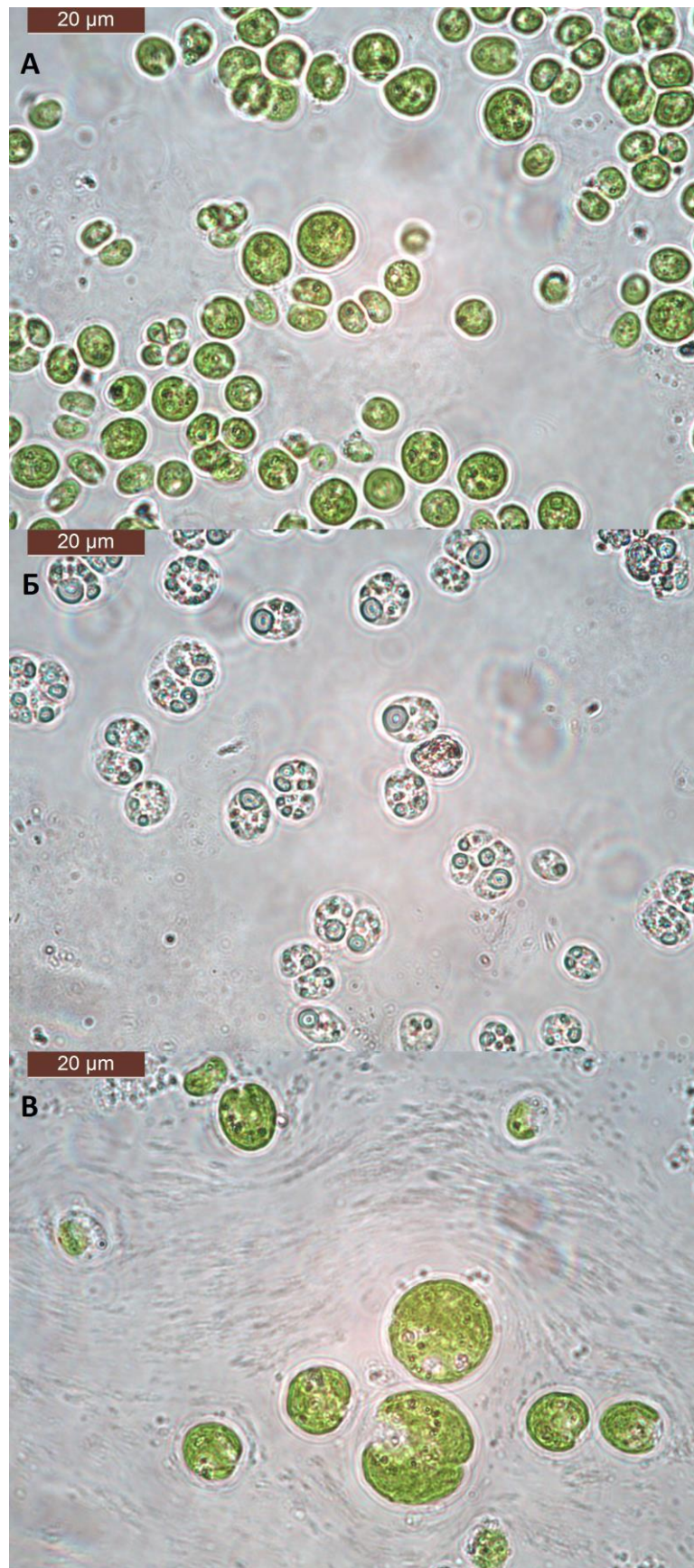
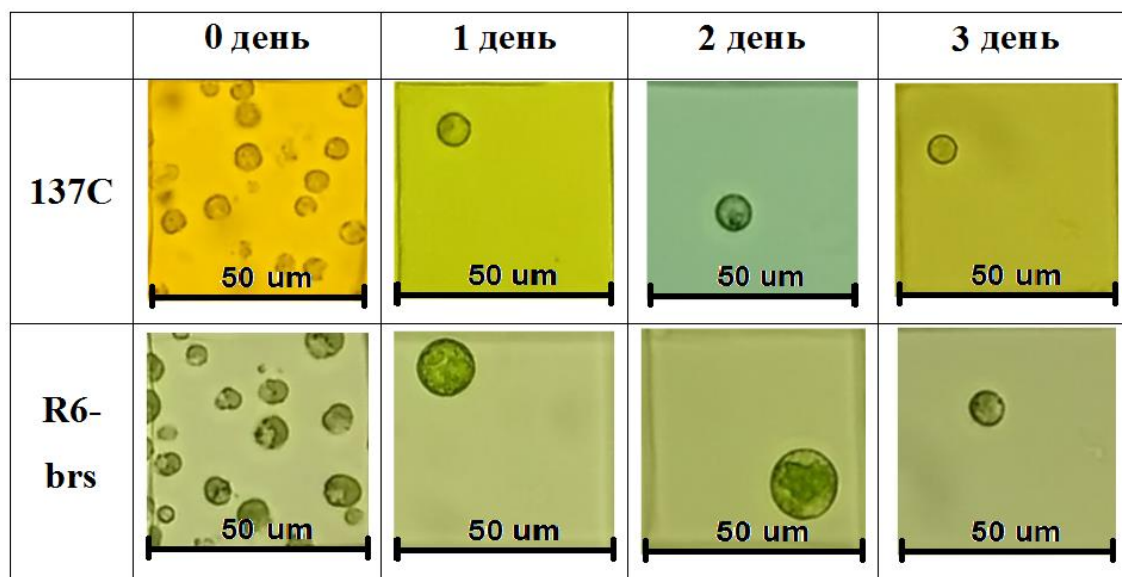


Рисунок 11. Микрофотографии клеток штаммов *Chlamydomonas reinhardtii*: дикого типа 137C (А), мутанта *brs-1* (Б) и ревертанта R6-*brs* (В). Несинхронизированные культуры клеток выращивали в течение трех дней на среде TAP обог. ас<sup>+</sup>.

**Измерение скорости деления клеток.** При измерении скорости деления клеток исследуемых штаммов отмечено, что деление клеток ревертанта занимает значительно больше времени, чем требуется для деления клеток дикого типа 137С (Рисунок 12).

Маленький размер колоний ревертанта R6-brs обусловлена, по-видимому, пониженной скоростью деления, – установлено, что время генерации клеток ревертанта на свету почти втрое превышает показатели, характерные для штамма дикого типа 137С (Таблица 9).



**Рисунок 12.** Клетки исследуемых штаммов, растущие в жидкой синхронизированной культуре на свету. Синхронизированные культуры клеток выращивали на свету на жидкой питательной среде ТАР обог.

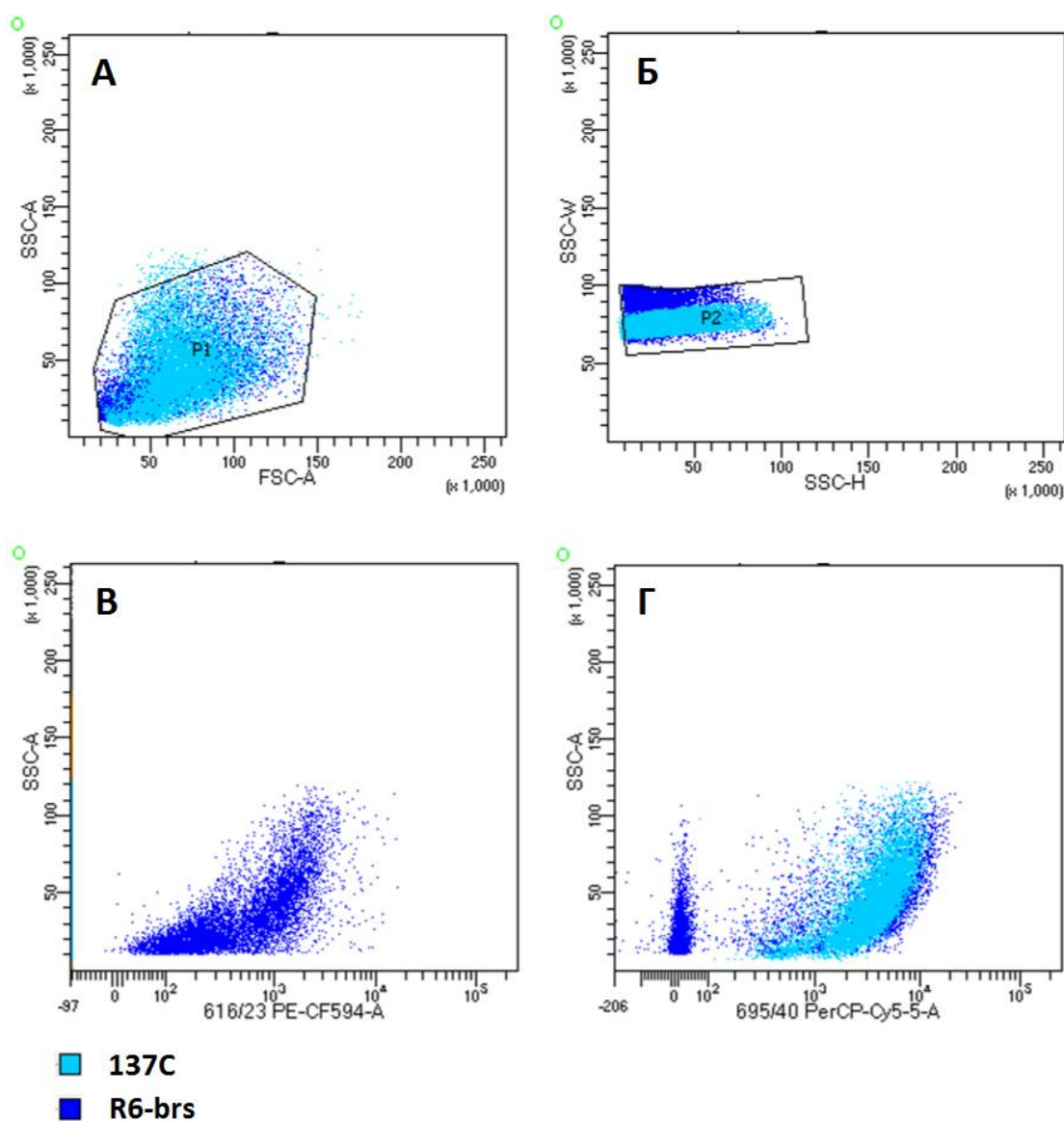
**Таблица 9.** Время генерации (ВГ) клеток ревертантов\*.

штамм	137С	R6-brs
ВГ (час.)	15.6	43.3

ВГ – время генерации рассчитывали по формуле:  $11 + 0.75 \text{ ВУ}$  (время удвоения) [Harris, 1989].

**Сортировка клеток по размеру.** Для проверки гипотезы, согласно которой увеличенный размер клеток ревертанта может быть обусловлен формированием диплоидов, была проведена сортировка клеток методом проточной цитометрии. При сортировке клеток дикого типа 137С и ревертанта R6-brs показано, что минимальные размеры клеток обоих штаммов не различаются, т.е. при делении клеток дикого типа и ревертанта образуются клетки одинакового размера (Рисунок 13А). При этом клетки ревертанта не являются диплоидами (Рисунок 13Б). Сортировка выявила небольшое

увеличение области размера клеток ревертанта, а также более сильную флуоресценцию хлорофилла у его клеток (Рисунок 13В,13Г). Повышенный уровень автофлуоресценции обусловлен повышенным содержанием хлорофилла в клетках R6-brs.



**Рисунок 13. Данные сортировки клеток в культурах штаммов дикого типа 137С и ревертанта R6-brs. (А)** Наложение гистограмм прямого светорассеяния суспензий клеток штаммов дикого типа 137С и ревертанта R6-brs. **(Б)** Наложение гистограмм бокового светорассеяния суспензий клеток штаммов дикого типа 137С и ревертанта R6-brs. **(В)** Гистограмма флуоресценции хлорофилла в суспензии клеток R6-brs при регистрации сигнала флуорохромом 616/23 PE-CF594. **(Г)** Наложение гистограмм флуоресценции хлорофилла суспензий клеток штаммов дикого типа 137С и ревертанта R6-brs при регистрации сигнала флуорохромом 695/40 PerCP-Cy5-5-A. Несинхронизированные клетки выращивали в течение трех дней на среде TAP обог.

### 3.2 Анализ экспрессии генов, кодирующих основные ферменты биосинтеза ХЛ и цитокининов в клетках *C. reinhardtii*

**Анализ экспрессии генов биосинтеза хлорофилла.** Оценка уровня экспрессии генов биосинтеза хлорофилла, кодирующих два основных ферментативных комплекса: комплекса синтеза АЛК (*GTS*, *HEMA*, *GSA1*) и магний-хелатазного комплекса (*CHL12*, *CHLD*, *CHLH*), а также регуляторных белков (*GUN4*, *LTS3*), в клетках ревертанта и дикого типа была осуществлена с помощью метода ПЦР-РВ (Рисунок 14). Экспрессия гена *GTS*, кодирующего глутамил-тРНК синтетазу, у ревертанта в темноте несколько выше таковой у дикого типа. При освещении в течение 2 и 4 часов экспрессия этого гена становится в 3.9 и 5.3 раза выше, чем у дикого типа, соответственно. При длительном освещении ген *GTS* экспрессируется на уровне, сходим с таковым для дикого типа.

Ген *HEMA*, кодирующий глутамил-тРНК редуктазу, в темноте у ревертанта экспрессируется в 2.5 раза слабее, чем у дикого типа. Однако двухчасовая индукция светом повышает уровень экспрессии этого гена до значения, в 12 раз превышающего таковой у дикого типа. При четырехчасовом облучении уровень экспрессии падает и составляет лишь 10% от данного показателя у дикого типа. При длительном освещении ген *HEMA* экспрессируется на уровне, сходим с таковым для дикого типа.

У ревертанта гена *GSA1*, кодирующий глутамат-1-семиальдегид аминотрансферазу, в темноте в 1.5 превышает аналогичный показатель для дикого типа. При 2 и 4 часах световой индукции экспрессия этого превышает таковую у дикого в 2.3 и 1.9 раза, соответственно. Однако при длительном освещении экспрессия гена *GSA1* составляет 30% от показателя для дикого типа.

Ген *CHL12*, кодирующий I субъединицу магний-хелатазы, у ревертанта в темноте экспрессируется в 2 раза сильнее, чем у дикого типа. Двухчасовая индукция вызывает резкое и многократное усиление экспрессии этого гена (в 34.5 раза сильнее, чем у дикого типа). При четырехчасовой индукции ген *CHL12* экспрессируется в 3.6 раза сильнее по сравнению с диким типом. При длительном освещении экспрессия этого гена почти в 4 раза слабее, чем у дикого типа.

Экспрессия гена *CHLD*, кодирующего D субъединицу магний-хелатазы, в темноте и при двухчасовой индукции у ревертанта в 1.7 выше, чем у дикого типа. После четырехчасовой индукции светом экспрессия этого гена снижается до уровня, характерного для дикого типа. При постоянном освещении ген *CHLD* экспрессируется 1.6 раза слабее, чем у дикого типа.

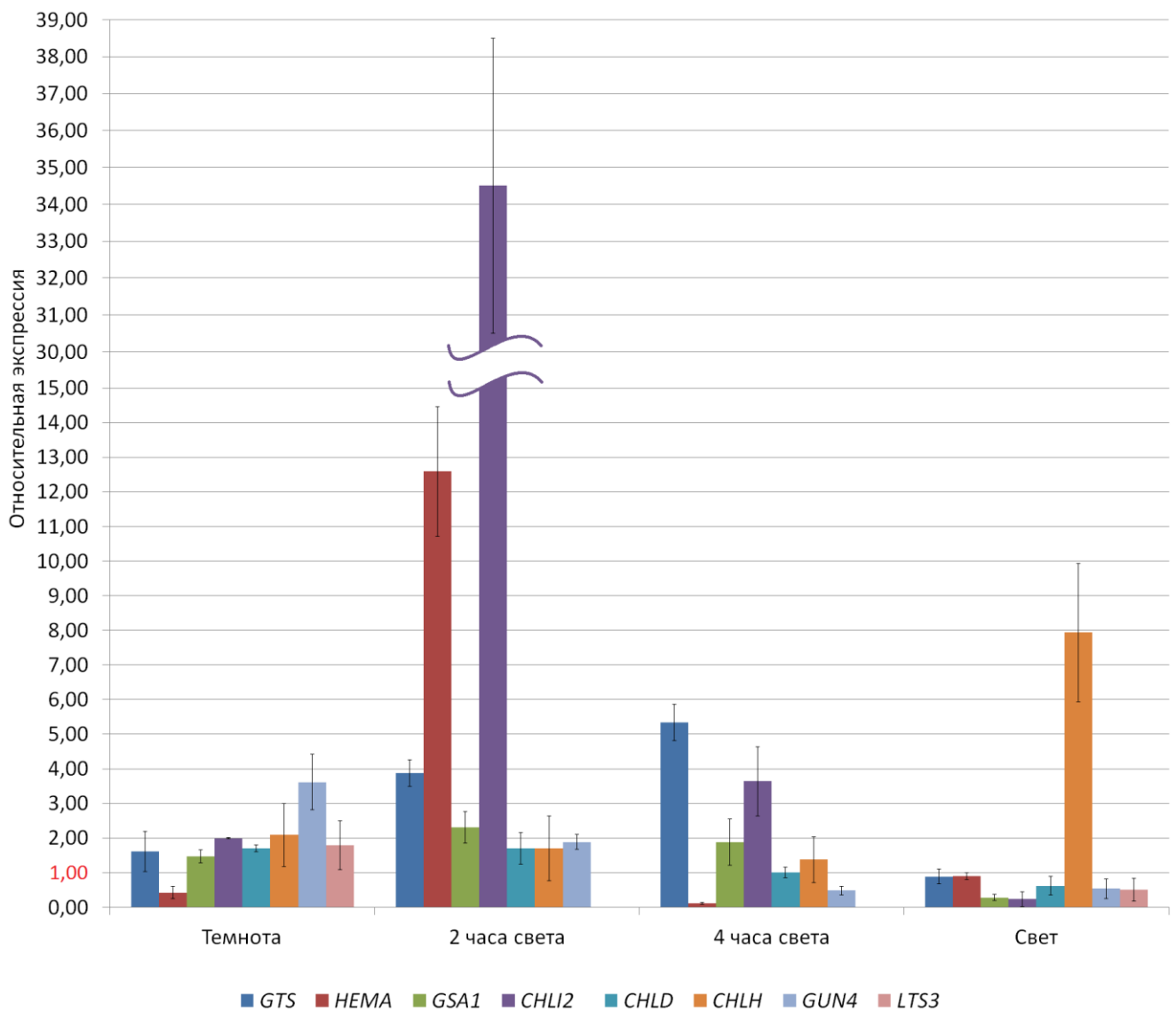
Ген *CHLH*, кодирующий Н субъединица магний-хелатазы, в темноте у ревертанта экспрессируется в два раза сильнее, чем у дикого типа. При освещении светом в течение 2 и 4 часов у ревертанта экспрессия этого гена увеличивается в 1.7 и 1.4 раза, соответственно. При длительном освещении ген *CHLH* экспрессируется почти в 8 раз сильнее, чем у дикого типа.

Экспрессия гена *GUN4*, кодирующего регуляторный тетрапиррол-связывающий белок, у ревертанта в темноте в 3.6 раз больше, чем данная величина у дикого типа. При двухчасовой индукции светом этот ген экспрессируется в 1.8 раз сильнее, чем у дикого типа. Однако при четырехчасовой индукции светом, и также при продолжительном освещении, экспрессия гена *GUN4* составляет лишь 50% от величины, характерной для дикого типа.

Ген *LTS3*, кодирующий фактор транскрипции, активатор темновой экспрессии генов биосинтеза хлорофилла, у ревертанта в темноте экспрессируется в 1.8 раз сильнее, чем у дикого типа. При двух- и четырехчасовой световой индукции экспрессия гена не была отмечена ни у ревертанта, ни у дикого типа. При продолжительном освещении ген *LTS3* экспрессируется в 2 раза слабее, чем у дикого типа.

**Поиск в геноме *Chlamydomonas reinhardtii* последовательностей, связанных с синтезом цитокининов.** В соответствии с литературными данными [Lu et al., 2014], а также поиска, проведенного с использованием баз данных, в геноме *Chlamydomonas reinhardtii* были найдены последовательности, наиболее похожие на последовательности ферментов синтеза цитокининов у *Arabidopsis thaliana* (Таблица 10).

Эти последовательности были использованы для дизайна праймеров и последующего их использования при изучении экспрессии генов биосинтеза цитокининов в клетках хламидомонады.



**Рисунок 14.** Анализ относительной экспрессии генов *GTS*, *HEMA*, *GSA1*, *CHLI2*, *CHLD*, *CHLH*, *GUN4*, *LTS3* у штамма *Chlamydomonas reinhardtii* R6-brs по сравнению с диким типом. Значение 1 по оси ординат соответствует уровню экспрессии дикого типа.



**Таблица 10. Гены, кодирующие ферменты синтеза цитокининов у *Arabidopsis thaliana* и *Chlamydomonas reinhardtii*.**

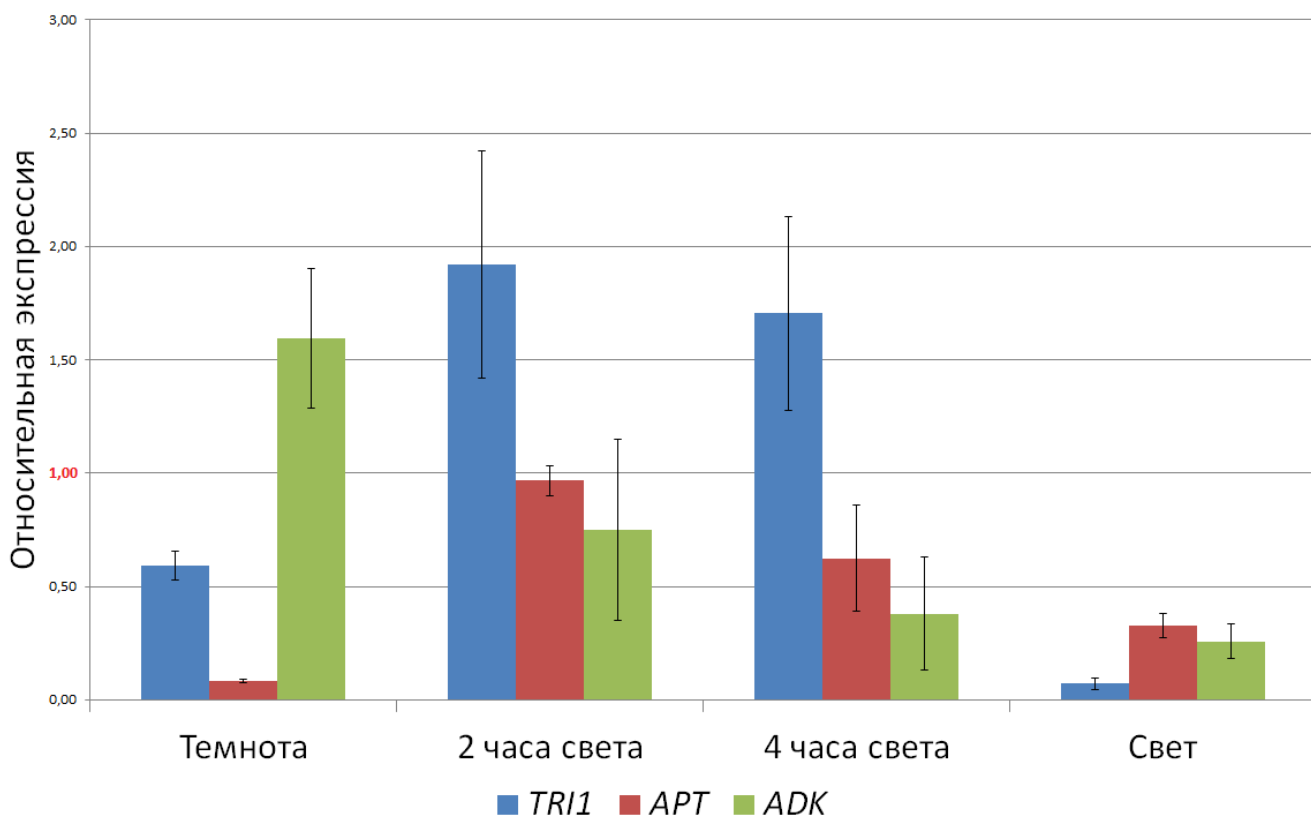
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Идентичность аминокислотных последовательностей
<i>ATIPT9</i> – Изопентенилтрансфераза 9	<i>TRII</i> – тРНК диметилаллилтрансфераза/ тРНК пренилтрансфераза	44 %
<i>ATAPT1</i> – аденин фосфорибозилтрансфераза 1	<i>APT</i> – Аденин фосфорибозилтрансфераза	62 %
<i>ADK2</i> – аденозин киназа 2	<i>ADK</i> – Аденозин киназа	58 %
<i>LOG3</i> – Цитокинин рибозид 5`- монофосфатфосфорибогидролаза (LOG)	<i>LOG</i> – Белок LOG семейства YJL055W	51 %

**Анализ экспрессии генов биосинтеза цитокининов.** Оценка уровня экспрессии генов биосинтеза цитокининов в клетках ревертанта и дикого типа была осуществлена с помощью метода ПЦР-РВ (Рисунок 15). При анализе экспрессии предположительных генов биосинтеза цитокининов у *Chlamydomonas reinhardtii* установлено, что экспрессия гена *TRII* в темноте 2 два раза ниже, чем у дикого типа. При двухчасовой световой индукции экспрессия этого гена почти в 2 раза превышает таковую у дикого типа, однако длительное освещение сильно снижает экспрессию гена *TRII*.

Экспрессия гена *APT* в темноте у ревертанта почти в 10 раз меньше чем у дикого типа, однако при двухчасовой освещении уровень экспрессии этого гена становится равным показателю для дикого типа. Длительное освещение понижает экспрессию гена *APT*.

Экспрессия гена *ADK* в темноте у ревертанта в 1.5 раза выше, чем у дикого типа. При индукции светом экспрессия этого гена постепенно снижается, достигая минимум при постоянном освещении, когда уровень его транскрипции составляет лишь 25 % от дикого типа.

Использование праймеров к ген *LOG* не дало однозначных результатов, что, возможно, вызвано неудачно подобранными праймерами.



**Рисунок 15.** Анализ экспрессии генов *TRI1*, *APT*, *ADK* у штамма *Chlamydomonas reinhardtii* R6-brs по сравнению с диким типом. Значение 1 по оси ординат соответствует уровню экспрессии дикого типа.

### 3.3 Поиск супрессорной мутации в геноме ревертанта R6-brs

**Секвенирование гена *CHLH*.** В работе методом секвенирования по Сэнгеру были прочитаны последовательности ряда фрагментов гена *CHLH*, амплифицированных на матрице ДНК, выделенной из клеток ревертанта R6-brs, перекрывающих 65 % последовательности этого гена. Сравнение последовательностей этих фрагментов с базой данной Phytozome не выявило отличий от референсного геномом.

**Полногеномное секвенирование геномов ревертанта R6-brs и исходного мутанта *brs-1*.** Осуществлено полногеномное секвенирование геномов ревертанта R6-brs и исходного мутанта *brs-1*, и проведена биоинформатическая обработка полученных данных. В настоящее время осуществляется обработка данных и выравнивания геномов

## ОБСУЖДЕНИЕ

У ревертанта R6-brs под действием супрессорной мутации восстановилась способность синтезировать хлорофилл, но морфологически клетки ревертанта отличаются от клеток штамма дикого типа 137C. На среде клетки ревертанта образуют мелкие, долго растущие колонии (Таблица 7), что может быть связано с нарушениями либо в метаболических путях, либо в клеточном цикле. Учитывая тот факт, что на свету рост колоний R6-brs можно ускорить добавлением в питательную среду дрожжевого экстракта, представляется возможным, что клеткам ревертанта требуются какие-то дополнительные компоненты для восполнения недостатка собственных, вызванного нарушением метаболизма. Ранее было показано, что в клетках ревертанта повышены уровни синтеза 5-аминолевулиновой кислоты, хлорофилла и гема (Таблица 1). По-видимому, это приводит к дефициту других соединений, которые клетка ревертанта способна устранить лишь с помощью экзогенных питательных компонентов, а именно, дрожжевого экстракта, добавленного в среду. Стоит, однако, отметить, что в темновой культуре не наблюдается значительной разницы в характере роста колоний клеток ревертанта в зависимости от состава питательной среды (Таблица 8).

Клетки дикого типа и исходного бесхлорофильного мутанта brs-1 почти равны по объему, однако объемы клеток штамма R6-brs почти в 4.5 раза больше (Рисунок 11). Увеличение размера клеток ревертанта может быть связано либо с нарушением клеточного цикла (увеличением времени удвоения), либо с диплоидизацией этих клеток. По-видимому, крупный размер клеток R6-brs является результатом не быстрого роста, а медленного деления, потому было установлено, что деление клеток ревертанта занимает почти в 3 раза больше времени, чем требуется клеткам дикого типа (Таблица 9). По данным проточной цитометрии, крупный размер клеток R6-brs не связан с диплоидией (Рисунок 13).

Еще одной, более «экзотической», причиной замедленного роста культуры клеток ревертанта может являться накопления больших количеств эндогенных цитокининов. Основываясь на гипотезе об участии продуктов расщепления АЛК в синтезе эндогенных цитокининов [Яронская и др., 2004], а также учитывая тот факт, что в клетках R6-brs образуется в несколько раз больше АЛК, чем в клетках дикого типа, предположение о возможности влияния цитокининов на скорость роста клеток ревертанта представляется разумным. Необходимо отметить, что в геноме *Chlamydomonas reinhardtii* найдены последовательности, сходные с последовательностями *Arabidopsis thaliana*, кодирующими ферменты синтеза цитокининов (Таблица 10). В то же время, у *C. reinhardtii* не было

найденно компонентов, которые могли бы участвовать в деградации цитокининов (Рисунок 8). Таким образом, в клетках ревертанта R6-brs синтезируемая в больших количествах АЛК может частично быть использована на синтез эндогенных цитокининов, избыточные количества которых не могут быть деградированы, что влечет за собой замедление клеточного деления.

Увеличенное количество эндогенных цитокининов может приводить к повышенному содержанию хлорофилла в клетках ревертанта. Это связано с тем, что цитокинины и свет активируют транскрипцию гена *POR*, кодирующего протохлорофиллид-оксидоредуктазу, которая играет ключевую роль в синтезе хлорофилла [Brenner et al., 2012].

По-видимому, увеличенное количество АЛК, синтезируемое на свету в клетках ревертанта R6-brs, является результатом нарушения регуляции не на транскрипционном, а на посттрансляционном уровне. Результаты изучения экспрессии свидетельствуют, что в условиях постоянного освещения в клетках ревертанта гены АЛК-синтезирующего комплекса *GTS*, и *HEMA* экспрессируются на уровне, сходным с таковым у дикого типа, а ген *GSA1* экспрессируется в 3 раза слабее, чем у штамма дикого типа (Рисунок 14).

С другой стороны, увеличенная экспрессия гена *CHLH* у ревертанта на свету может являться причиной накопления больших количеств Mg-протопорфирина IX, а также приводить к усилению синтеза хлорофилла. В норме избыточные количества Mg-протопорфирина IX связывает белок GUN4 и ингибирует работу глутамил-тРНК-редуктазы, тем самым снижая уровень синтеза АЛК. У ревертанта R6-brs наблюдается усиленный синтез АЛК на свету, несмотря на большие количества Mg-протопорфирина IX, что можно объяснить ослабленной экспрессией гена *GUN4*.

Ген *LTS3*, кодирующий транскрипционный фактор, активатор темновой экспрессии генов биосинтеза хлорофилла, в темноте в клетках ревертанта R6-brs экспрессируется на уровне, сопоставимом с экспрессией генов *GTS*, *GSA1*, *CHLI2*, *CHLD* и *CHLH* в этих же условиях. Это свидетельствует о скоординированности в темноте транскрипция генов, кодирующих компоненты АЛК-синтезирующего и магний-хелатазы. Такая согласованная экспрессия при отсутствии освещения может быть результатом более активной экспрессии гена *GUN4*, белковый продукт которого регулирует как формирование АЛК, так и образование хлорофилла.

Световая индукция вносит разлад в процессы транскрипции исследуемых генов. В первые два часа освещения многократное возрастание экспрессии генов *HEMA* и *CHLI2* может быть связано как с необходимостью резкого накопления мРНК этих для адаптации к меняющимся условиям освещенности, так и с нарушением восприятия клеткой

ревертанта светового сигнала. Сверхэкспрессия гена *CHLI2* заслуживает особого внимания, поскольку функция белкового продукта этого гена недостаточно изучена. Если *CHLI1* функционирует в магний-хелатазном ферментном комплексе, то *CHLI2* выполняет скорее регуляторную функцию [Grovenstein et al., 2013; Brzezowski et al., 2016]. По последним данным, *CHLI2* фосфорилирует субъединицу D магний-хелатазы, тем самым стимулируя активность всего магний-хелатазного комплекса [Sawicki et al., 2017]. Это может объяснять повышенное количество хлорофилла в клетках ревертанта при небольшой экспрессии гена *CHLD*. После четырех часов освещения экспрессия многих генов начинает уменьшаться.

В клетках ревертанта, выращенных на свету, экспрессия изучаемых генов снижена по сравнению с диким типом. Ослабленная транскрипция может быть связана с большими количествами Mg-протопорфирина IX (Таблица 1), играющим роль в передаче сигнала из хлоропласта в ядро, который, накапливаясь, может генерировать потенциально токсичный синглетный кислород при освещении. Возможно, накопление такого интермедиата создает стрессовую ситуацию внутри клетки, при которой снижается транскрипция.

Экспрессия генов, кодирующих ферменты, предположительно участвующие в синтезе цитокининов, в клетках ревертанта R6-bgs подвержена световой регуляции. Так, гены *TRII* и *APT* экспрессируется в переносе темновой культуры на свет сильнее, однако при постоянной освещении транскрипция *TRII* резко снижена, в то время как *APT* транскрибируется активнее, чем в темноте. Другой ген, продукт которого, возможно, участвует в синтезе цитокининов, *ADK*, активнее всего экспрессируется в темноте, а при переносе на свет его экспрессия постепенно ослабевает. Подобная световая репрессия экспрессии генов *TRII* и *ADK* может быть связана, во-первых, как уже упоминалось выше, с большими количествами Mg-протопорфирина IX, а во-вторых, с тем, что в клетках ревертанта синтезируется избыточное количество эндогенных цитокининов из АЛК, поэтому нет необходимости транскрибировать гены, продукты которых участвуют в синтезе этих фитогормонов *de novo*.

Поиски супрессорной мутации в геноме ревертанта R6-bgs проводятся методами секвенирования. К сожалению, эта работа еще не завершена, и пока нет возможности делать вывод о генетической природе этой мутации.

Таким образом, можно сказать, что в результате супрессорной мутации у ревертанта R6-bgs восстановился биосинтез хлорофилла, однако при этом нарушилась сложная регуляция многоступенчатого процесса синтеза тетрапирролов, что привело к серьезным изменениям на фенотипическом уровне, затрагивающим процессы деления клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Генетическую детерминацию механизмов биосинтеза хлорофиллов и его регуляции светом у модельного объекта генетики фотосинтеза – водоросли *C. reinhardtii* изучали на модели мутантов по гену *CHLH*, кодирующему большую (H) субъединицу ключевого фермента биосинтеза хлорофилла, магний-хелатазы. Предмет исследований – зеленый в темноте и на свету ревертант R6-brs, полученный в результате УФ-мутагенеза клеток оранжевого светочувствительного мутанта brs-1 по гену *CHLH*. У ревертанта R6-brs восстановление биосинтеза хлорофилла на фоне мутации бесхлорофильности brs-1 в гене *CHLH*, произошло в результате ядерной доминантной супрессорной мутации.

В ходе работы были изучены морфологические особенности штамма R6-brs. Установлено, что клетки ревертанта формируют мелкие колонии. Для нормального роста клеток ревертанта в питательную среду необходимо добавлять дрожжевой экстракт. Объемы клеток ревертанта почти в 4.5 раза превышает таковой у дикого типа и время их удвоения втрое больше показателей штамма дикого типа 137C. Методом проточной цитометрии подтверждено, что клетки ревертанта не являются диплоидами. По-видимому, крупный размер клеток R6-brs обусловлен продолжительным временем их роста без деления.

При изучении штамма ревертанта R6-brs был проведен анализ экспрессии генов биосинтеза хлорофилла, который показал, что в условиях темноты транскрипция многих исследованных нами генов идет скоординировано на одном уровне. При световой индукции в клетках ревертанта наблюдалось многократное увеличение экспрессии генов *HEMA* и *CHLI2*. В условиях постоянного освещения экспрессия генов *GTS* и *HEMA* у штамма R6-brs соответствовала уровню дикого типа. Транскрипция гена *CHLH* была в несколько раз выше, чем у дикого типа. У остальных исследованных генов биосинтеза хлорофилла экспрессия на свету подавлена.

В работе были идентифицированы последовательности в геноме *C. reinhardtii*, кодирующие ферменты, предположительно участвующие в синтезе цитокининов. На основании этих последовательностей были созданы праймеры, с помощью которых провели анализ экспрессии этих генов. Установлено, что транскрипция генов *TRII* и *APT* усиливается светом. Экспрессия гена *ADK* у ревертанта максимальна в темноте и ослабевает на свету. В условиях постоянного освещения в клетках R6-brs все три гены экспрессируются слабее, чем у дикого типа.

Причиной фенотипических особенностей ревертанта может быть избыточное содержание в его клетках эндогенных цитокининов. Анализ экспрессии генов биосинтеза

цитокининов показал, что на свету в клетках ревертанта их экспрессии снижена, по-видимому, за счет ингибирования эндогенными цитокининами.

Таким образом, в результате супрессорной мутации у ревертанта R6-brs был восстановлен биосинтез хлорофилла, при этом нарушилась сложная регуляция многоступенчатого синтеза тетрапирролов, что привело к серьезным изменениям на фенотипическом уровне, затрагивающим процессы деления клеток.

## ВЫВОДЫ

1. Фенотип клеток ревертанта R6-brs, полученного от мутанта по гену *CHLH*, кодирующему большую субъединицу магний хелатазы у *C. reinhardtii*, имеет следующие особенности: формирование мелких колоний; потребность в дрожжевом экстракте; увеличенный в 4.5 раза объем клеток по сравнению с клетками штамма дикого типа; время деления клеток ревертанта втрое превышает показатели клеток дикого типа.

2. У ревертанта R6-brs в результате супрессорной мутации нарушена световая регуляция генов биосинтеза хлорофиллов. При световой индукции многократно возрастает экспрессия генов *HEMA* и *CHLI2*. В условиях постоянного света, в клетках активируется в несколько раз экспрессия гена *CHLH*; экспрессия остальных изученных генов в этих условиях снижена.

3. Экспрессия генов биосинтеза цитокининов в клетках ревертанта R6-brs, выращенных на свету, снижена по сравнению с диким типом, по-видимому, за счет ингибирования эндогенными цитокининами. Транскрипция генов биосинтеза цитокининов *TRII* и *APT* индуцируется светом. Экспрессия гена *ADK* у ревертанта максимальна в темноте и ослабевает при освещении.

4. Восстановление биосинтеза хлорофилла у ревертанта R6-brs привело к нарушению регуляции многоступенчатого синтеза тетрапирролов, что стало причиной серьезных изменений физиологии клетки, затрагивающих процессы ее деления.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Аверина Н.Г., Яронская Е.Б.* Биосинтез тетрапирролов в растениях. Минск: «Белорусская наука», 2012. 413 с.
2. *Лутова Л.А.* Генетическая инженерия растений: свершения и надежды // Соросовский Образовательный Журнал. 2000. Т. 6. С. 10–17.
3. *Мионов А.Ф.* Биосинтез тетрапиррольных пигментов // Соросовский образовательный журнал. 1998. Т. 7. С. 35–42.
4. *Романенко Е.А., Косаковская И.В., Романенко П.А.* Фитогормоны микроводорослей: биологическая роль и участие в регуляции физиологических процессов. Ч. II. Цитокинины и гиббереллины // Альгология. 2016. Т. 26. С. 203–229.
5. *Чекунова Е. М., Яронская Е. Б., Ярцева Н. В., Аверина Н. Г.* Новые факторы регуляции магний-хелатазы у зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиология растений. 2014. Т. 61. С. 187–196.
6. *Чекунова Е.М., Шалыго Н.В., Яронская Е.Б., Аверина Н.Г., Чунаев А.С.* Регуляция биосинтеза предшественников хлорофилла у мутантов зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Биохимия. 1993. Т. 58. Вып. 9. С.70–73.
7. *Юрина Н.П., Осипенкова О.В, Одинцова М.С.* Тетрапирролы высших растений: биосинтез, его регуляция и их роль в передаче ретроградных сигналов // Физиология растений. 2012. Т. 59. С. 3–16.
8. *Яронская Е.Б., Вершиловская И.В., Аверина Н.Г.* Содержание зеатина и его производных в проростках ячменя (*Hordeum vulgare* L.) с повышенным уровнем 5-аминолевулиновой кислоты // Весці НАН Беларусі, сер. біял. навук. 2004. №3. С.70–73.
9. *Alberti M., Burke D. H., Hearst J. E.* // Anoxygenic Photosynthetic Bacteria / R. E. Blankenship, M. T. Madigan and C. E. Bauer, Eds.; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 1995. P. 1083–1106.
10. *Averina N.G., Yaronskaya E.B., Rassadina V.V., Walter G.* Response of magnesium chelatase activity in green pea (*Pisum sativum* L.) leaves to light, 5-aminolevulinic acid and dipyriddy supply // J. Photochem. Photobiol. 1996. V. 36. P. 17–22.
11. *Banerji D., Laloraya M.M.* Chlorophyll formation in isolated pumpkin cotyledons in presence of kinetin and chloramphenicol // Plant and Cell Physiology. 1967. V. 8. P. 263–268.

12. Baroli I., Do A.D., Yamane T., Niyogi K.K. Zeaxanthin accumulation in the absence of a functional xanthophyll cycle protects *Chlamydomonas reinhardtii* from photooxidative stress // *Plant Cell*. 2003. V. 15. P. 992–1008.
13. Beale S. I. Enzymes of chlorophyll biosynthesis // *Photosynthesis Research*. 1999. V. 60. P. 43–73.
14. Bollivar D.W., Suzuki J.Y., Beatty J.T., Dobrowolski J.M., Bauer C.E. Directed mutational analysis of bacteriochlorophyll a biosynthesis in *Rhodobacter capsulatus* // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 237. P. 622–640.
15. Brenner W.G., Ramireddy E., Heyl A., Schmölling T. Gene regulation by cytokinin in *Arabidopsis* // *Front Plant Sci*. 2012. V. 3. doi: 10.3389/fpls.2012.00008.
16. Brenner W.G., Romanov G.A., Köllmer I., Bürkle L., Schmölling T. Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades // *Plant J*. 2005. V. 44. P. 314–333.
17. Brzezowski P., Sharifi M.N., Dent R.M., Morhard M.K., Niyogi K.K., Grimm B. Mg chelatase in chlorophyll synthesis and retrograde signaling in *Chlamydomonas reinhardtii*: CHLI2 cannot substitute for CHLI1 // *J. Exp. Bot.* 2016. V. 67. P. 3925–3938.
18. Buchanan B.B., Balmer Y. Redox regulation: a broadening horizon // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2005. V. 56. P. 187–220.
19. Cai L., Zhang L., Fu Q., Xu Z.F. Identification and expression analysis of cytokinin metabolic genes IPTs, CYP735A and CKXs in the biofuel plant *Jatropha curcas* // *PeerJ*. 2018. 6:e4812.
20. Chekounova E., Voronetskaya V., Papenbrock J., Grimm B., Beck C.F. Characterization of *Chlamydomonas* mutants defective in the H subunit of Mg-chelatase // *Mol. Genet. Genomics*. 2001. V. 266. P. 363–373.
21. Cornah J.E., Roper J.M., Pal Singh D., Smith A.G. Measurement of ferrochelatase activity using a novel assay suggests that plastids are the major site of haem biosynthesis in both photosynthetic and nonphotosynthetic cells of pea (*Pisum sativum* L.) // *Biochem. J*. 2002. V. 362. P. 423–432.
22. Cortleven A., Marg I., Yamburenko M.V., Schlicke H., Hill K., Grimm B., Schaller G.E., Schmölling T. Cytokinin Regulates the Etioplast-Chloroplast Transition through the Two-Component Signaling System and Activation of Chloroplast-Related Genes // *Plant Physiol*. 2016. V. 172. P. 464–478.

23. Cortleven A., Schmölling T. Regulation of chloroplast development and function by cytokinin // *J Exp Bot.* 2015. V. 66. P. 4999–5013.
24. D'Agostino I.B., Deruère J., Kieber J.J. Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin // *Plant Physiol.* 2000. V. 124. P. 1706–1717.
25. Ferreira F.J., Kieber J.J. Cytokinin signaling // *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005. V. 8. P. 518–525.
26. Ferreira G.C. Ferrochelatase // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999. V. 31. P. 995–1000.
27. Fletcher R.A., Teo C., Ali A. Stimulation of chlorophyll synthesis in cucumber cotyledons by benzyladenine // *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique.* 1973. V. 51. P. 937–939.
28. Fodje M.N., Hansson A., Hansson M., Olsen J.G., Gough S., Willows R.D., Al-Karadaghi S. Interplay between an AAA module and an integrin I domain may regulate the function of magnesium chelatase // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 311. P. 111–122.
29. Frank H.A., Brudvig G.W. Redox functions of carotenoids in photosynthesis // *Biochemistry.* 2004. V. 43. P. 8607–8615.
30. Fré'bertova J., Greplova M., Seidl M.F., Heyl A., Fré'bert I. Biochemical characterization of putative adenylate dimethylallyltransferase and cytokinin dehydrogenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 // *PLoS One.* 2015. V. 10: e0138468.
31. Fré'bert I., Kowalska M., Hluska T., Fré'bertová J., Galuszka P. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation // *J. Exp. Bot.* 2011. V. 62. P. 2431–2452.
32. Galuszka P., Fré'bertová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmölling T., Fré'bert I. Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat: cloning and heterologous expression // *Eur. J. Biochem.* 2004. V. 271. P. 3990–4002.
33. Gibson L.C., Marrison J.L., Leech R.M., Jensen P.E., Bassham D.C., Gibson M., Hunter C.N. A putative Mg chelatase subunit from *Arabidopsis thaliana* cv C24. Sequence and transcript analysis of the gene, import of the protein into chloroplasts, and in situ localization of the transcript and protein // *Plant Physiol.* 1996. V. 111. P. 61–71.
34. Gibson L.C., Jensen P.E., Hunter C.N. Magnesium chelatase from *Rhodobacter sphaeroides*: initial characterization of the enzyme using purified subunits and evidence for a BchI-BchD complex // *Biochem J.* 1999. V. 337. P. 243–251.
35. Gorchein A. Cell-free activity of magnesium chelatase in *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus* // *Biochem. Soc. Trans.* 1997. V. 25. P. 82S

36. *Gorchein A., Gibson L.C., Hunter C.N.* Gene expression and control of enzymes for synthesis of magnesium protoporphyrin monomethyl ester in *Rhodobacter sphaeroides* // *Biochem. Soc. Trans.* 1993. V. 21. P. 201S.
37. *Goslings D., Meskauskiene R., Kim C., Lee K.P., Nater M., Apel K.* Concurrent interactions of heme and FLU with Glu tRNA reductase (HEMA1), the target of metabolic feedback inhibition of tetrapyrrole biosynthesis, in dark- and lightgrown *Arabidopsis* plants // *Plant J.* 2004. V. 40. P. 957–967.
38. *Grossman A.R.* *Chlamydomonas reinhardtii* and photosynthesis: genetics to genomics // *Curr. Opin. Plant. Biol.* 2000. V. 3. P. 132–137.
39. *Grossman A.R., Lohr M., Im C.S.* *Chlamydomonas reinhardtii* in the landscape of pigments // *Annu Rev Genet.* 2004. V. 38. P. 119–173.
40. *Grovenstein P.B., Wilson D.A., Lennox C.G., Smith K.P., Contractor A.A., Mincey J.L., Lankford K.D., Smith J.M., Haye T.C., Mitra M.* Identification and molecular characterization of a novel *Chlamydomonas reinhardtii* mutant defective in chlorophyll biosynthesis // *F1000Res.* 2013. V. 2. doi: 10.12688/f1000research.2-138.v2.
41. *Hansson A., Kannangara C.G., von Wettstein D., Hansson M.* Molecular basis for semidominance of missense mutations in the XANTHA-H (42-kDa) subunit of magnesium chelatase // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1999. V. 96. P. 1744–1749.
42. *Hansson A., Willows R.D., Roberts T.H., Hansson M.* Three semidominant barley mutants with single amino acid substitutions in the smallest magnesium chelatase subunit form defective AAA+ hexamers // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. V. 99. P. 13944–13949.
43. *Hansson M., Kannangara C.G.* ATPases and phosphate exchange activities in magnesium chelatase subunits of *Rhodobacter sphaeroides* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997. V. 94. P. 13351–13356.
44. *Harris E.H.* *Chlamydomonas* as a model organism // *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2001. V. 52. P. 363–406.
45. *Harris E.H.* *The Chlamydomonas Sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use.* San Diego: California, 1989. 789 p.
46. *Havaux M., Niyogi K.K.* The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism // *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999. V. 96. P. 8762–8767.
47. *Henningsen K.W., Boynton J.E., Wettstein D.* v. Mutants at xantha and albina loci in relation to chloroplast biogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) // *The Royal Danish Academy of Sciences and Letters: Copenhagen.* 1993. V. 42. P. 165–166.

48. *Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M.* Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts // *Plant J.* 1999. V. 17. P. 615–626.
49. *Hudson A., Carpenter R., Doyle S., Coen E.S.* Olive: a key gene required for chlorophyll biosynthesis in *Antirrhinum majus* // *EMBO J.* 1993. V.12. P. 3711–3719.
50. *Hunter G.A., Al-Karadaghi S., Ferreira G.C.* FERROCHELATASE: THE CONVERGENCE OF THE PORPHYRIN BIOSYNTHESIS AND IRON TRANSPORT PATHWAYS // *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 2011. V. 15. P. 350–356.
51. *Hwang I., Sheen J.* Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction // *Nature.* 2001. V.413. P. 383–389.
52. *Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T.* Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis* // *Nature.* 2001. V. 409. P. 1060–1063.
53. *Jensen P., Stummann B., Hansen N., Karlebjerg K., Henningsen K.* Characterization of a gene for a Mg-chelatase subunit from *Synechocystis* PCC 6803 // *Plant. Mol. Biol.* 1996. V. 30. P. 1075–1076.
54. *Jensen P.E., Gibson L C.D., Henningsen K.W., Hunter C.N.* Expression of the *chlI*, *chlD*, and *chlH* Genes from the Cyanobacterium *Synechocystis*PCC6803 in *Escherichia coli* and Demonstration That the Three Cognate Proteins Are Required for Magnesium-protoporphyrin Chelatase Activity // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 16662–16667.
55. *Jensen P.E., Gibson L.C., Hunter C.N.* ATPase activity associated with the magnesium-protoporphyrin IX chelatase enzyme of *Synechocystis* PCC6803: evidence for ATP hydrolysis during Mg<sup>2+</sup> insertion, and the MgATP-dependent interaction of the ChII and ChID subunits // *Biochem. J.* 1999. V. 339. P. 127–134.
56. *Jensen P.E., Reid J.D., Hunter C.N.* Modification of cysteine residues in the ChII and ChIH subunits of magnesium chelatase results in enzyme inactivation // *Biochem. J.* 2000. V. 352. P. 435–441.
57. *Jensen P.E., Willows R.D., Petersen B.L., Vothknecht U.C., Stummann B.M., Kannangara C.G., von Wettstein D., Henningsen K.W.* Structural genes for Mg-chelatase subunits in barley: Xantha-f, -g and -h // *Mol. Gen. Genet.* 1996. V. 250. P. 383–94.
58. *Kakimoto T.* Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. P. 677–685.

59. Karger G.A., Reid J.D., Hunter C.N. Characterization of the binding of deuteroporphyrin IX to the magnesium chelatase H subunit and spectroscopic properties of the complex // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 9291–9299.
60. Kim H.J., Ryu H., Hong S.H., Woo H.R., Lim P.O., Lee I.C., Sheen J., Nam H.G., Hwang I. Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. V. 103. P. 814–819.
61. Koncz C., Mayerhofer R., Koncz-Kalman Z., Nawrath C., Redei G.P., Schell J. Isolation of a gene encoding a novel chloroplast protein by T-DNA tagging in *Arabidopsis thaliana* // *EMBO J.* 1990. V. 9. P. 1337–1346.
62. Korszun Z.R., Knight C., Chen C.M. A Stereochemical Model for Cytokinin Activity // *FEBS Lett.* 1989. V. 243. P. 53–56.
63. Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H. and Kyojuka J. Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme // *Nature*. 2007. V. 445. P. 652–655.
64. Kuroda H., Masuda T., Fusada N., Ohta H., Takamiya K. Cytokinin-induced transcriptional activation of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase gene in cucumber // *Journal of Plant Research*. 2001. V. 114. P. 1–7.
65. Kuroda H., Masuda T., Ohta H., Shioi Y., Takamiya K. Effects of light, developmental age and phytohormones on the expression of the gene encoding NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase in *Cucumis sativus* // *Plant Physiology and Biochemistry*. 1996. V. 34. P. 17–22.
66. Kuroha T., Tokunaga H., Kojima M., Ueda N., Ishida T., Nagawa S., Fukuda H., Sugimoto K. and Sakakibara H. Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis* // *Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 3152–3169.
67. Kusnetsov V., Herrmann R.G., Kulaeva O.N., Oelmüller R. Cytokinin stimulates and abscisic acid inhibits greening of etiolated *Lupinus luteus* cotyledons by affecting the expression of the light-sensitive protochlorophyllide oxidoreductase // *Molecular and General Genetics*. 1998. V. 259. P. 21–28.
68. Larkin R.M., Alonso J.M., Ecker J.R., Chory J. GUN4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling // *Science*. 2003. V. 299. P. 902–906.
69. Lee J.O., Bankston L.A., Arnaout M.A., Liddington R.C. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? // *Structure*. 1995. V. 12. P. 1333–1340.

70. *Lew R., Tsuji H.* Effect of benzyladenine treatment duration on  $\delta$ -aminolevulinic-acid accumulation in the dark, chlorophyll lag phase abolition, and long-term chlorophyll production in excised cotyledons of dark-grown cucumber seedlings // *Plant Physiology*. 1982. V. 69. P. 663–667.
71. *Lewis L.A., McCourt R.M.* Green algae and the origin of land plants // *American Journal of Botany*. 2004. V. 91. P. 1535–1556.
72. *Livak K.J., Schmittgen T.D.* Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method // *Methods*. 2001. V. 25. P. 402–408.
73. *Lohr M., Im C.S., Grossman A.R.* Genome-based examination of chlorophyll and carotenoid biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 490–515.
74. *Lu Y., Tarkowská D., Turečková V., Luo T., Xin Y., Li J., Wang Q., Jiao N., Strnad M., Xu J.* Antagonistic roles of abscisic acid and cytokinin during response to nitrogen depletion in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica* expand the evolutionary breadth of phytohormone function // *Plant J.* 2014. V. 80. P. 52–68.
75. *Lu Y., Xu J.* Phytohormones in microalgae: a new opportunity for microalgal biotechnology? // *Trends in Plant Science*. 2015. V. 20. P. 273–282.
76. *Luo D., Coen E.S., Doyle S., Carpenter R.* Pigmentation mutants produced by transposon mutagenesis in *Antirrhinum majus* // *Plant J.* 1991. V. 1. P. 59–69.
77. *Ma Y.Z., Holt N.E., Li X.P., Niyogi K.K., Fleming G.R.* Evidence for direct carotenoid involvement in the regulation of photosynthetic light harvesting // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003. V. 100. P. 4377–4382.
78. *Masuda T.* Recent overview of the Mg branch of the tetrapyrrole biosynthesis leading to chlorophylls // *Photosynth Res.* 2008. V. 96. P. 121–143.
79. *Masuda T., Komine Y., Inokuchi H., Kannangara C.G., Tsuji H.* Sequence and expression of tRNA glu gene of cucumber chloroplast genome // *Plant Physiology and Biochemistry*. 1992. V. 30. P. 235–243.
80. *Masuda T., Ohta H., Shioi Y., Tsuji H., Takamiya K.* Stimulation of glutamyl-transfer RNA reductase activity by benzyladenine in greening cucumber cotyledons // *Plant and Cell Physiology*. 1995. V. 36. P. 1237–1243.
81. *Masuda T., Tanaka R., Shioi Y., Takamiya K., Kannangara C.G., Tsuji H.* Mechanism of benzyladenine-induced stimulation of the synthesis of 5-aminolevulinic acid in greening cucumber cotyledons - benzyladenine increases levels of plastid tRNA-glu // *Plant and Cell Physiology*. 1994. V. 35. P. 183–188.

82. *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. P. 27–30.
83. *Meskauskiene R., Nater M., Goslings D., Kessler F., Op den Camp R., Apel K.* FLU: A negative regulator of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 12826–12831.
84. *Michels C.A.* Genetic Techniques for Biological Research: A Case Study Approach. John Wiley & Sons, Ltd. 2002. 254 p.
85. *Miyata S., Urao T., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K.* Characterization of genes for two-component phosphorelay mediators with a single Hpt domain in *Arabidopsis thaliana* // *FEBS Lett.* 1998. V. 437. P. 11–14.
86. *Miyawaki K., Matsumoto-Kitano M., Kakimoto T.* Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate // *Plant J.* 2004. V. 37. P. 128–138.
87. *Mok D.W., Mok D.C.* Cytokinin metabolism and action // *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 2001. V. 52. P. 89–118.
88. *Mou S., Zhang X., Miao J., Zheng Z., Xu D., Ye N.* Reference genes for gene expression normalization in *Chlamydomonas* sp. ICE-L by quantitative real-time RT-PCR // *J. Plant Biochem. Biotechnol.* 2015. V. 24. P. 276–282.
89. *Murgola, E.J.* tRNA, suppression and the code // *Annu. Rev. Genet.* 1985. V. 19. P. 57–80.
90. *Nouraini, S., Xu, D., Nelson, S., Lee, M., Friesen, J.D.* Genetic evidence for selective degradation of RNA polymerase subunits by the 20S proteasome in *Saccharomyces cerevisiae* // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 3570–3579.
91. *Papenbrock J., Mock H.P., Tanaka R., Kruse E., Grimm B.* Role of magnesium chelatase activity in the early steps of the tetrapyrrole biosynthetic pathway // *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 1161–1169.
92. *Park W.K., Yoo G., Moon M., Kim C.W., Choi Y.E., Yang J.W.* Phytohormone supplementation significantly increases growth of *Chlamydomonas reinhardtii* cultivated for biodiesel production // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2013. V. 171. P. 1128–1142.
93. *Peter E., Grimm B.* GUN4 is required for posttranslational control of plant tetrapyrrole biosynthesis // *Mol. Plant.* 2009. V. 2. P. 1198–1210.
94. *Petersen B.L., Jensen P.E., Gibson L.C., Stummann B.M., Hunter C.N., Henningsen K.W.* Reconstitution of an Active Magnesium Chelatase Enzyme Complex from the bchI, -D,



- and -H Gene Products of the Green Sulfur Bacterium *Chlorobium vibrioforme* Expressed in *Escherichia coli* // J. Bacteriol. 1998. V. 180. P. 699–704.
95. Petersen B.L., Kannangara C.G., Henningsen K.W. ATPase and Phosphate Exchange Activities in Mg-Chelatase Subunits of *Chlorobium* and *Synechocystis* // Photosynth.: Mech. Eff. 1998. V. 4. P. 3241–3244.
  96. Petersen B.L., Moller M.G., Jensen P.E., Henningsen K.W. Identification of the Xan-g gene and expression of the Mg-chelatase encoding genes Xan-f, -g and -h in mutant and wild type barley (*Hordeum vulgare* L.) // Hereditas. 1999. V. 131. P. 165–170.
  97. Pils B., Heyl A. Unraveling the Evolution of Cytokinin Signaling // Plant Physiol. 2009. V. 151. P. 782–791.
  98. Pöpperl G., Oster U., Blos I., Rüdiger W. Magnesium Chelatase of *Hordeum vulgare* L. Is Not Activated by Light but Inhibited by Pheophorbide // Z. Naturforsch. 1997. V. 52. P. 144–152.
  99. Prelich, G. Suppression mechanisms: themes from variations // Trends Genet. 1999. V. 15. P. 261–266.
  100. Reid J.D., Hunter C.N. Magnesium-dependent ATPase activity and cooperativity of magnesium chelatase from *Synechocystis* sp. PCC6803 // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 26893–26899.
  101. Rissler H.M., Collakova E., DellaPenna D., Whelan J., Pogson B.J. Chlorophyll biosynthesis. Expression of a second chl I gene of magnesium chelatase in *Arabidopsis* supports only limited chlorophyll synthesis // Plant Physiol. 2002. V. 128. P. 770–779.
  102. Rochaix J.-D. Chlamydomonas as the photosynthetic yeast // Annu. Rev. Genet. 1995. V. 29. P. 209–230.
  103. Rochaix J.D. Chlamydomonas, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes // FEBS Lett. 2002. V. 529. P. 34–38.
  104. Romanov G.A. Cytokinins and tRNA: A New Insight into an Old Problem // Sov. Plant Physiol. 1990. V. 37. P. 922–935.
  105. Romanov G.A. How Do Cytokinins Affect the Cell? // Russian Journal of Plant Physiology. 2009. V. 56. P. 268–290.
  106. Romanov G.A. How Do Cytokinins Affect the Cell? // Russian Journal of Plant Physiology. 2009. V. 56. P. 268–290.
  107. Sakai H., Honma T., Aoyama T., Sato S., Kato T., Tabata S., Oka A. ARR1, a transcription factor for genes immediately responsive to cytokinins // Science. 2001. V. 294. P. 1519–1521.

108. Sandrock, T.M., O'Dell, J.L., Adams, A.E. Allele-specific suppression by formation of new protein–protein interactions in yeast // *Genetics*. 1997. V. 147. P. 1635–1642.
109. Sawicki A., Zhou S., Kwiatkowski K., Luo M., Willows R.D. 1-N-histidine phosphorylation of ChlD by the AAA+ ChlI2 stimulates magnesium chelatase activity in chlorophyll synthesis // *Biochem J*. 2017. V. 474. P. 2095–2105.
110. Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I. Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species // *J. Plant Res*. 2003. V. 116. P. 241–252.
111. Sirijovski N., Olsson U., Lundqvist J., Al-Karadaghi S., Willows R.D., Hansson M. ATPase activity associated with the magnesium chelatase H-subunit of the chlorophyll biosynthetic pathway is an artefact // *Biochem. J*. 2006. V. 400. P. 477–484.
112. Srivastava A., Lake V., Nogaj L.A., Mayer S.M., Willows R.D., Beale S.I. The *Chlamydomonas reinhardtii* gtr gene encoding the tetrapyrrole biosynthetic enzyme glutamyl-trna reductase: structure of the gene and properties of the expressed enzyme // *Plant Mol. Biol*. 2005. V. 58. P. 643–658.
113. Stirk W.A., Ördög V., Novák O., Rolcik J., Strnad M., van Staden J. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains // *Journal of Phycology*. 2013. V. 49. P. 459–467.
114. Stirk W.A., van Staden J., Novák O., Doležal K., Strnad M., Dobrev P.I., Sipos G., Ördög V., Bálint P. Changes in endogenous cytokinin concentrations in *Chlorella* (Chlorophyceae) in relation to light and the cell cycle // *Journal of Phycology*. 2011. V. 47. P. 291–301.
115. Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J.R., Chory J. Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX // *Nature*. 2003. V. 421. P. 79–83.
116. Strnad M. The Aromatic Cytokinins // *Physiol. Plant*. 1997. V. 101. P. 674–688.
117. Sugiura M. Promotion of chlorophyll synthesis by kinetin // *Botanical Magazine Tokyo*. 1963. V. 76. P. 309–310.
118. Susek R.E., Ausubel F.M., Chory J. Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development // *Cell*. 1993. V. 74. P. 787–799.
119. Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. Identification of Genes Encoding Adenylate Isopentenyltransferase, a Cytokinin Biosynthesis Enzyme, in *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. P. 26405–26410.

120. *Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M., Sugiyama T.* Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator // *Plant Cell Physiol.* 2001. V. 42. P. 85–93.
121. *Takei K., Yamaya T., Sakakibara H.* *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 Encode Cytokinin Hydroxylases That Catalyze the Biosynthesis of trans-Zeatin // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 41866–41872.
122. *Tanaka R., Kobayashi K., Masuda T.* Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana* // *The Arabidopsis Book.* 2011. V. 9. e0145.
123. *Tanaka R., Tanaka A.* Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants // *Annu Rev Plant Biol.* 2007. V. 58. P. 321–346.
124. *Trotsenko Iu.A., Ivanova E.G., Doronina N.V.* Aerobic methylotroph bacteria as phytosymbionts // *Mikrobiologija.* 2001. V. 70. P. 725–736.
125. *Tsavkelova E.A., Klimova S.Yu., Cherdyntseva T.A., Netrusov A.I.* Microbial Producers of Plant Growth Stimulators and Their Practical Use: A Review // *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2006. V. 42. P. 117–126.
126. *Vale R.D.* AAA Proteins. Lords of the Ring // *J. Cell Biol.* 2000. V. 150. P. F13–F20.
127. *van Leeuwen J., Pons C., Boone C., Andrews B.J.* Mechanisms of suppression: The wiring of genetic resilience // *Bioessays.* 2017. V. 39. doi: 10.1002/bies.201700042.
128. *Verdecia M.A., Larkin R.M., Ferrer J.L., Riek R., Chory J., Noel J.P.* Structure of the Mg-chelatase cofactor GUN4 reveals a novel hand-shaped fold for porphyrin binding // *PLoS Biol.* 2005. V. 3. e151.
129. *Vereecke D., Burskens S., Simón-Mateo C., Inzé D., Van Montagu M., Goethals K., Jaziri M.* The *Rhodococcus fascians*-plant interaction: morphological traits and biotechnological applications // *Planta.* 2000. V. 210. P. 241–251.
130. *von Gromoff E.D., Alawady A., Meinecke L., Grimm B., Beck C.F.* Heme, a plastid-derived regulator of nuclear gene expression in *Chlamydomonas* // *Plant Cell.* 2008. V. 20. P. 552–567.
131. *von Schwartzenberg K., Kruse S., Reski R., Moffatt B., Laloue M.* Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism // *Plant J.* 1998. V. 13. P. 249–257.
132. *Walker C.J., Weinstein J.D.* Further characterization of the magnesium chelatase in isolated developing cucumber chloroplasts: substrate specificity, regulation, intactness, and ATP requirements // *Plant Physiol.* 1991. V. 95. P. 1189–1196.

133. Walker C.J., Weinstein J.D. In vitro assay of the chlorophyll biosynthetic enzyme Mg-chelatase: resolution of the activity into soluble and membrane-bound fractions // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1991. V. 88. P. 5789–5793.
134. Walker C.J., Weinstein J.D. The magnesium-insertion step of chlorophyll biosynthesis is a two-stage reaction // Biochem J. 1994. V. 299. P. 277–284.
135. Walker C.J., Willows R.D. Mechanism and regulation of Mg-chelatase // Biochem J. 1997. V. 327. P. 321–333.
136. Waters M.T., Wang P., Korkaric M., Capper R.G., Saunders N.J., Langdale J.A. GLK transcription factors coordinate expression of the photosynthetic apparatus in Arabidopsis // Plant Cell. 2009. V. 21. P. 1109–1128.
137. Wilde A., Mikolajczyk S., Alawady A., Lokstein H., Grimm B. The gun4 gene is essential for cyanobacterial porphyrin metabolism // FEBS Lett. 2004. V. 571. P. 119–123.
138. Willows R.D. Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX // Nat. Prod. Rep. 2003. V. 20. P. 327–341.
139. Willows R.D., Beale S.I. Heterologous Expression of the *Rhodobacter capsulatus* BchI, -D, and -H Genes That Encode Magnesium Chelatase Subunits and Characterization of the Reconstituted Enzyme // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. P. 34206–34213.
140. Willows R.D., Hansson M., Beale S.I., Laurberg M., Al-Karadaghi S. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the *Rhodobacter capsulatus* magnesium chelatase BchI subunit // Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 1999. V. 55. P. 689–690.
141. Yamada H., Hanaki N., Imamura A., Ueguchi C., Mizuno T. An Arabidopsis protein that interacts with the cytokinin-inducible response regulator, ARR4, implicated in the His-Asp phosphorylation signal transduction // FEBS Lett. 1998. V. 436. P. 76–80.
142. Yaronskaya E., Vershilovskaya I., Poers Y., Alawady A.E., Averina N., Grimm B. Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings // Planta. 2006. V. 224. P. 700–709.
143. Žižková E., Kubeš M., Dobrev P.I., Příbyl P., Šimura J., Zahajská L., Závěská Drábková L., Novák O., Motyka V. Control of cytokinin and auxin homeostasis in cyanobacteria and algae // Ann. Bot. 2017. V. 119. P. 151–166