

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ И СОСТАВ КАРОТИНОИДОВ ГЛАЗНОГО ПЯТНА У МУТАНТОВ *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

© В. Г. Ладыгин,^{1,*} Г. А. Семенова²

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН и

² Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушино, Московская обл.;

* электронный адрес: ladyginv@rambler.ru

С помощью пигментных мутантов исследовали развитие ультраструктуры глазного пятна в хлоропластах одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Установлено, что степень развития структуры глазного пятна коррелирует с накоплением каротиноидов. В зависимости от их накопления глазное пятно образует от 1 до 4 рядов липидно-каротиноидных глобул. Показано, что в глобулах глазного пятна накапливаются каротины. Впервые обнаружено, что в отличие от клеток дикого типа у мутантов состав каротинов в глазном пятне может изменяться в зависимости от генетического изменения их состава в мембранах хлоропластов.

Ключевые слова: *Chlamydomonas reinhardtii*, мутанты, хлоропласт, глазное пятно, ультраструктура, каротины, ксантофиллы.

Известно, что жгутиковые одноклеточные зеленые водоросли обладают фототаксическими способностями и образуют специфическую органеллу хлоропластов — глазное пятно (eyespot), часто называемое глазком или стигмой. Структурно оно содержит один или несколько (обычно 2—3) рядов круглых плотно упакованных и богатых каротиноидами липидных глобул, локализованных внутри хлоропласта. У *Chlamydomonas reinhardtii*, как правило, оно располагается непосредственно под оболочкой хлоропласта, которая плотно прилегает к плазмомембране, но не сливается с ней (Семенова, 1978; Inwood et al., 2008). В световой микроскоп глазное пятно или стигму можно видеть как желтую, оранжевую или светло-красную точку или пятно (Kreimer et al., 1992). Вначале полагали, что глазное пятно состоит только из 2—3 рядов липидно-каротиноидных глобул. Однако в ходе дальнейших исследований установлено, что липидные глобулы снаружи окружены белковыми мембранами (Семенова, 1978), которые формируются в процессе развития глазного пятна внутри хлоропласта.

Образование тилакоидов и глазного пятна обычно протекает почти одновременно. Каждый из 2—3 слоев липидно-каротиноидных глобул глазного пятна располагается на одном из тилакоидов (Семенова, Ладыгин, 1975; Foster, Smith, 1980; Melkonian, Robenek, 1984; Nultsch, Hader, 1988). У белых мутантов *Ch. reinhardtii*, у которых нет тилакоидов и каротиноидных пигментов, нет и глазного пятна или наблюдаются самые ранние этапы его формирования (Inwood et al., 2008). У желтых мутантов с высоким содержанием каротиноидов наблюдали формирование хорошо развитого глазного пятна, как правило, состоящего из двух слоев глобул (Семенова, Ладыгин, 1975).

Полученные нами пигментные мутанты *Ch. reinhardtii* представляют огромную ценность как для идентифика-

ции фоторецепторных пигментов, так и для анализа структуры и функции глазного пятна (Ладыгин, 1970, 1991).

Мы обратили внимание на очень интересный факт из одной статьи: область максимальной спектральной чувствительности фототаксиса для глазного пятна мутанта *CC1101 ey, mt(-)* смещена в коротковолновую часть длин волн в сравнении со штаммом дикого типа, что указывает на комплексное сочетание спектров поглощения фоторецептора глазного пятна и фотосинтетических пигментов, включенных в фотоориентацию (Синещеков и др., 1989). Эти данные позволили нам предположить, что смещение максимума фототаксиса может быть обусловлено изменениями состава каротиноидов как в мембранах хлоропластов, так и в глобулах глазного пятна. Нас заинтересовал вопрос: может ли изменяться у мутантов состав каротиноидов глазного пятна так же, как это происходит в мембранах хлоропластов? С целью проверки этого предположения мы провели исследования состава пигментов глазного пятна на серии пигментных мутантов *Ch. reinhardtii* с измененным составом каротиноидов в мембранах хлоропластов. Мутанты были получены нами ранее (Ладыгин, 1970, 1991; Ладыгин и др., 1973).

В настоящей работе мы ставили перед собой две задачи: 1) изучить развитие глазного пятна от образования 1—3 глобул до развития максимально структурированной органеллы; 2) установить состав каротиноидов в глобулах глазного пятна исходного дикого штамма и впервые доказать возможность экспериментального изменения их состава с помощью мутантов. Обе задачи можно было решить только с использованием пигментных мутантов от белых до темно-зеленых в первом случае а также мутантов с измененным составом каротиноидов в мембранах хлоропластов — во втором. Наличие бо-

льшого набора обоих типов мутантов (Ладыгин, 1970, 1991; Ладыгин и др., 1973) позволило нам решить обе задачи.

Материал и методика

Объектами исследования служили штаммы одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* Dang. дикого типа К(+) и пигментных мутантов: белых Б-1 и Б-3, не накапливающих никаких пигментов; желтого Ж-4, содержащего только каротиноиды; светло-зеленого С-41 с высоким содержанием дзета-каротина; зеленого нефотосинтезирующего А-90 с высоким содержанием альфа-каротина и темно-зеленого Т-8, содержащего все пигменты в 2—3 раза больше, чем клетки дикого типа К(+).

Для экспериментов все штаммы выращивали в течение 4—5 сут на ацетатной агаризованной среде (Ладыгин, 1970; Ладыгин и др., 1973) при 23—25 °С и круглосуточном освещении люминесцентными лампами ЛБ-40 (Россия) при освещенности 1—3 тыс. лк.

Для получения глобул глазного пятна и фрагментов мембран хлоропластов клетки суспендировали в среде, содержащей 0.3 М сахарозу, 0.05 М Трис-НСl, 0.01 М MgCl₂, pH 7.5, и разрушали при 4 °С ультразвуком на установке УЗДН-1 (Россия) путем двукратного озвучивания по 20 с при частоте 15 кГц и силе тока 0.2 А. Неразрушенные клетки отделяли центрифугированием при 1500 g в течение 5 мин на центрифуге ЦУМ-1 (Россия).

Полученные из надосадочной части фрагменты хлоропластов и глазного пятна промывали в 0.05 М Трис-НСl и 0.001 М EDTA, pH 8, и осаждали центрифугированием при 14 000 g в течение 20 мин. Затем для разделения липидно-каротиноидных глобул глазного пятна и фрагментов мембран хлоропластов мы проводили повторное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы (0.5 : 1.0 : 1.5 : 2.0 М) при 14 000 g в течение 20 мин. Фракция глобул глазного пятна (фракция 1) выявлялась в виде желтой или оранжевой полосы на границе между зонами 0.5 и 1.0 М растворов сахарозы. Желтую полосу в обоих случаях мы аккуратно собирали пипеткой в отдельную пробирку, а затем использовали для биохимических, спектральных и электронно-микроскопических исследований.

Количественное содержание хлорофиллов и каротиноидов определяли по спектрам поглощения экстрактов в 100%-ном ацетоне (Lichtenthaler, Wellburn, 1983).

Качественный состав каротиноидов анализировали методами бумажной и тонкослойной хроматографии (Nager, Meyer-Bertenrath, 1966; Ладыгин, Ширшикова, 1987). Полосы индивидуальных каротиноидов экстрагировали хлороформом, а полосы индивидуальных ксантофиллов — 96%-ным этанолом. Экстракты каротиноидов анализировали по спектрам поглощения и их вторым и четвертым производным, полученным на спектрофотометре Shimadzu-UV-160 или Hitachi-557 (Япония).

Для электронно-микроскопических исследований глазного пятна целых клеток или выделенных из него липидно-каротиноидных глобул мы использовали фиксацию в 2.5%-ном глутаральдегиде с последующей фиксацией раствором 1%-ного OsO₄ или без него. Образцы обезвоживали в серии растворов этанола (20—100 %) и в 100%-ном ацетоне и заливали в Epon-812. После полимеризации образцов срезы получали на микротоме LKB (Швеция) и просматривали их с помощью микроскопа JEM-7A (Япония) (Семенова, Ладыгин, 1975).

Результаты

Формирование и развитие глазного пятна у пигментных мутантов. Благодаря способности к темновому синтезу хлорофилла и каротиноидов в хлоропластах клеток дикого типа *Ch. reinhardtii* всегда наблюдается хорошее развитие мембранной системы и глазного пятна как на свету, так и в темноте. Поэтому, чтобы изучить различные этапы формирования глазного пятна и мембран хлоропластов, необходимо было получить пигментные мутанты в качестве модельных объектов, у которых искусственно блокировали на ранних этапах биосинтез пигментов. С этой целью методом мутагенеза нами получены белые, желтые, светло-зеленые и темно-зеленые мутанты (Ладыгин, 1970, 1991).

С помощью белого мутанта Б-1, не содержащего ни хлорофилла, ни каротиноидов, нам удалось обнаружить самые первые этапы начала формирования глазного пятна. Так, у мутанта Б-1 было обнаружено глазное пятно, состоящее всего из 2—3 липидно-каротиноидных глобул (рис. 1, а). У другого белого мутанта Б-3, содержащего следовые количества пигментов, мог формироваться первый ряд глобул глазного пятна, а иногда и 1—2 глобулы второго ряда (рис. 1, б).

Мы получили три типа желтых мутантов. Мутант Ж-1 — желтый в темноте и зеленеющий на свету подобно высшим растениям. Мутант Ж-3 — зеленый в темноте и фенотипически желтый на свету. Этот мутант терял хлорофилл на свету только при доступе кислорода. При посеве же иглой уколом внутрь столбика агара мутант Ж-3 и на свету оставался зеленым, следовательно, фотодеструкция хлорофилла и пожелтение клеток у этого мутанта имели место только на свету при доступе кислорода. Мутант Ж-4 постоянно был желтым как на свету так и в темноте (Семенова, Ладыгин, 1975). Исследование желтых мутантов показало, что степень развития глазного пятна четко коррелирует с содержанием каротиноидов. Наличие или отсутствие хлорофилла и соответствующая степень развития мембранной системы в меньшей степени влияли на формирование глазного пятна. Практически во всех вариантах в хлоропластах желтых мутантов мы наблюдали достаточно хорошо развитое глазное пятно, как правило состоящее из двух рядов глобул (рис. 1, в). В то же время у фенотипически желтых штаммов мы наблюдали только начальные этапы формирования тилакоидов (Семенова, Ладыгин, 1975).

У светло-зеленых мутантов с различным содержанием и соотношением хлорофиллов *a* и *b*, но накапливающих практически то же самое количество каротиноидов, что и у желтых мутантов, мы наблюдали близкий уровень развития глазного пятна, но с хорошо развитыми тилакоидами. Эти данные подтвердили мнение о том, что степень развития мембранной системы хлоропластов четко коррелирует с накоплением хлорофиллов, а глазного пятна — с накоплением каротиноидов.

На свету в клетках дикого типа, как правило, наблюдалось формирование глазного пятна, состоящего из 2—3 рядов липидно-каротиноидных глобул в зависимости от накопления пигментов (рис. 2, а).

У темно-зеленого мутанта Т-8, накапливающего каротиноиды и хлорофиллы в 2—3 раза больше, чем в контроле, глазное пятно могло формировать до четырех рядов глобул (рис. 2, б), что было обнаружено впервые. Причем после глутар-осмиевой фиксации клеток глазное пятно выявляется в виде четырех рядов ли-

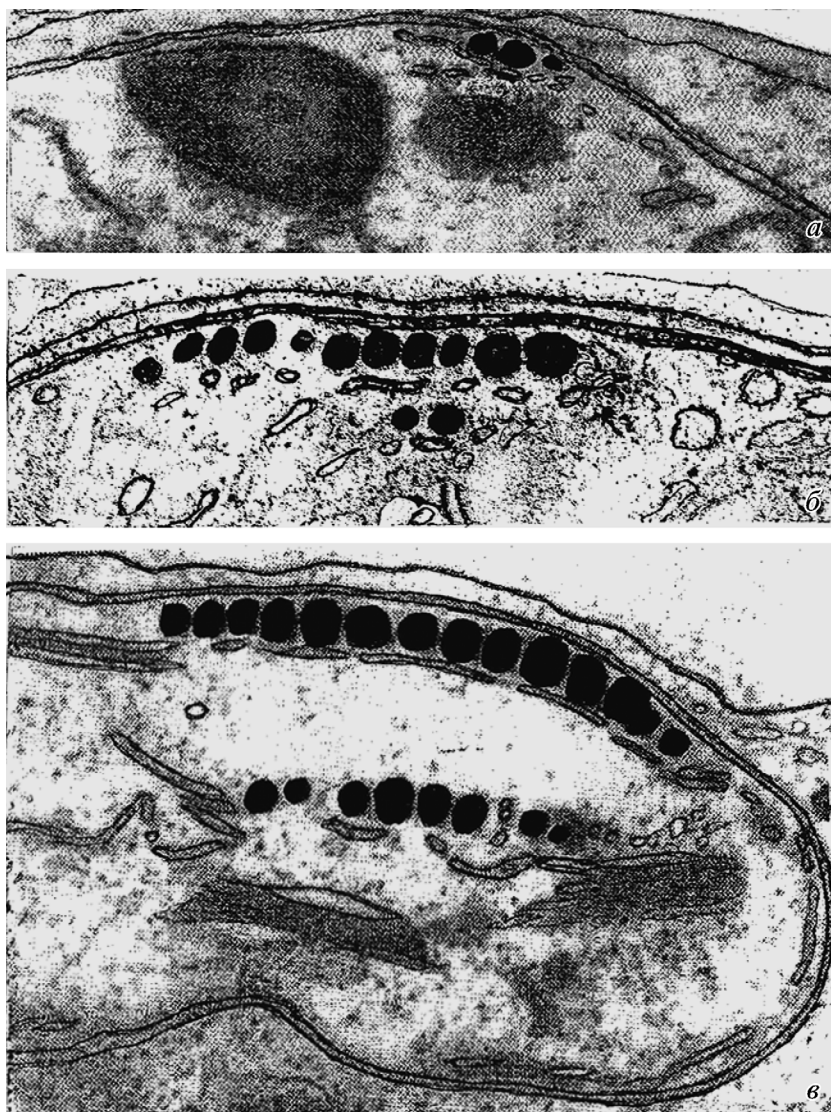


Рис. 1. Ультраструктурная организация глазного пятна на поперечных срезах в хлоропластах пигментных мутантов: белого Б-1 (а), белого светочувствительного Б-3 в темноте (б) и желтого Ж-4 на свету (в).

а — начало формирования глазного пятна из трех глобул; б — сформированный первый ряд и две глобулы второго ряда глазного пятна; в — развитое глазное пятно с двумя рядами сформированных глобул. Увел. 80 000×.

пидно-каротиноидных глобул черного цвета. Если же клетки фиксировать только глутаральдегидом, то в процессе обезвоживания липиды и каротиноиды экстрагируются этанолом и ацетоном, и остаются только белковые мембраны, окружающие каждую из глобул. При этом становится хорошо видно, что на поперечных срезах глобулы глазного пятна имеют округлую или овальную форму (рис. 2, в).

Таким образом, благодаря серии пигментных мутантов *Ch. reinhardtii* нам удалось установить ранние этапы формирования глазного пятна. Кроме того, было впервые показано, что у темно-зеленых мутантов может образоваться до четырех рядов глобул. Это больше, чем в клетках дикого типа. Степень развития глобул глазного пятна хорошо коррелирует с накоплением каротиноидов и в меньшей мере зависит от содержания хлорофиллов. Причем мы детально изучили все основные этапы биогенеза глазного пятна от 2—3 глобул у белых мутантов до формирования четырех рядов липидно-каротиноидных глобул у

темно-зеленых мутантов. Эти результаты нам удалось получить благодаря использованию пигментных мутантов. У дикого типа глазное пятно и тилакоиды хорошо развиты из-за высокого содержания пигментов как на свету, так и в темноте.

Состав и возможность изменения каротиноидов глазного пятна. В настоящей работе необходимо было выяснить два вопроса: 1) установить основные каротиноиды, входящие в состав глобул глазного пятна; 2) выяснить, может ли изменяться их состав при существенном изменении состава каротиноидов в мембранах хлоропластов у мутантов *Ch. reinhardtii*.

Для того чтобы ответить на эти вопросы, мы выделяли из разрушенных хлоропластов фракцию липидно-каротиноидных глобул глазного пятна путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (рис. 3, а). Желтую или оранжевую полосу 1 глобул глазного пятна переносили в отдельную пробирку. Затем фракцию глобул глазного пятна мы использовали для

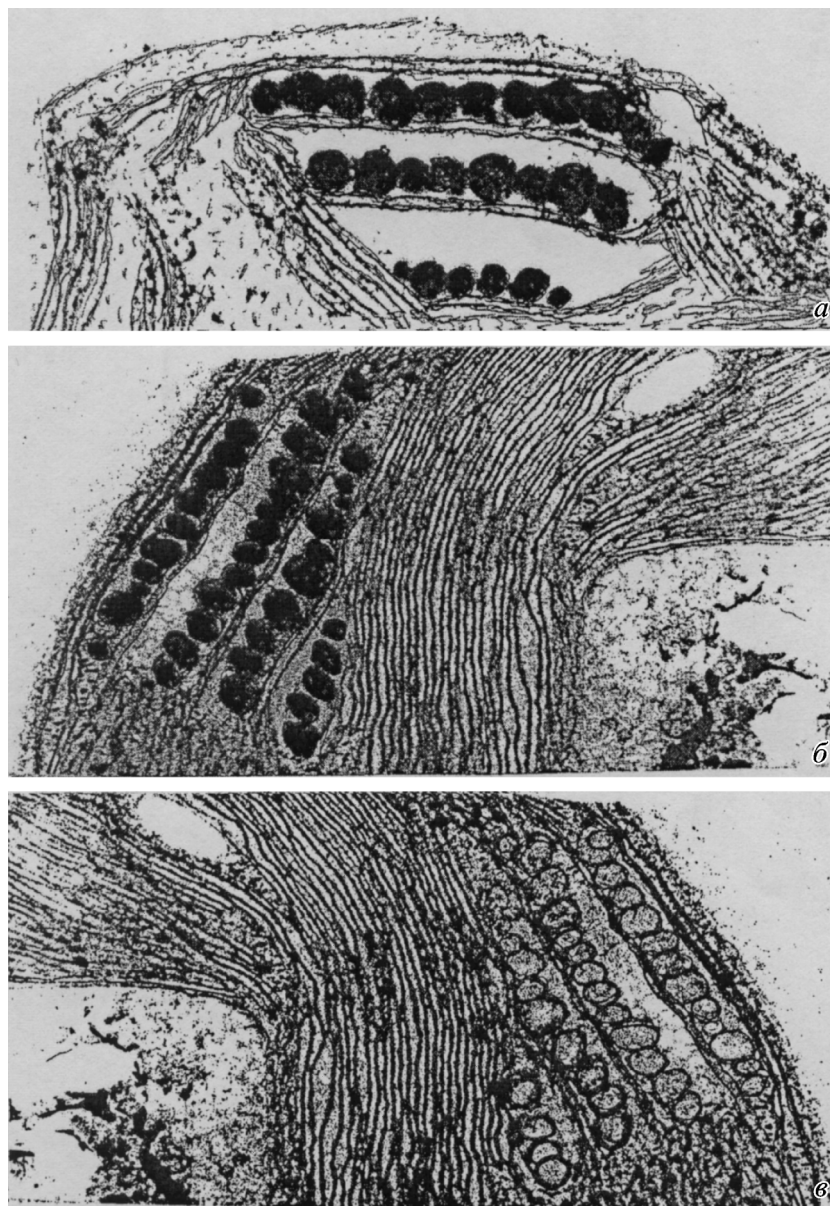


Рис. 2. Ультраструктурная организация глазного пятна на поперечных срезах в хлоропластах клеток дикого типа K(+) (а), темно-зеленого мутанта Т-8 на свету после глутар-осмиевой (б) и глутаровой (в) фиксации.

а — три ряда глобул нормально развитого глазного пятна; б, в — четыре ряда глобул наиболее развитого глазного пятна. Увел. 60 000×.

электронно-микроскопических, биохимических и спектрофотометрических исследований. Каждая глобула глазного пятна представляет собой мембранный пузырек, заполненный липидами и каротиноидами.

Электронная микроскопия показала, что выделенная нами фракция действительно содержала липидно-каротиноидные глобулы глазного пятна (рис. 3, б). При осмиевой фиксации липиды выглядели как черные округлые глобулы, часто связанные между собой в ассоциаты различной величины. Подобные структуры были описаны ранее для глазков *Spermatozopsis similis* (Renninger et al., 2001). Они образуются при различной степени обработки ультразвуком аппарата глазного пятна.

Биохимические и спектрофотометрические исследования, проведенные нами на глобулах глазного пятна, показали, что в клетках дикого типа K(+) основным кароти-

ноидом является β -каротин с максимумом поглощения при 464 нм (рис. 4, а). Учитывая, что в мембранах хлоропластов клеток дикого типа K(+) соотношение α - и β -каротинов составляет 5 : 95, можно заключить, что основным пигментом глобул глазного пятна штамма K(+) является β -каротин (табл. 1, 2). Входит ли в их состав α -каротин у клеток дикого типа, сказать трудно из-за очень низкого его содержания у штамма K(+). Заметного количества ксантофиллов в глобулах глазного пятна мы не обнаружили. На основании полученных нами данных можно утверждать, что в состав глобул глазного пятна входят главным образом каротины.

Для того чтобы выяснить, может ли α -каротин входить в состав глобул глазного пятна, мы провели дополнительные исследования на мутанте А-90, накапливающим в мембранах хлоропластов до 60 % α -каротина и

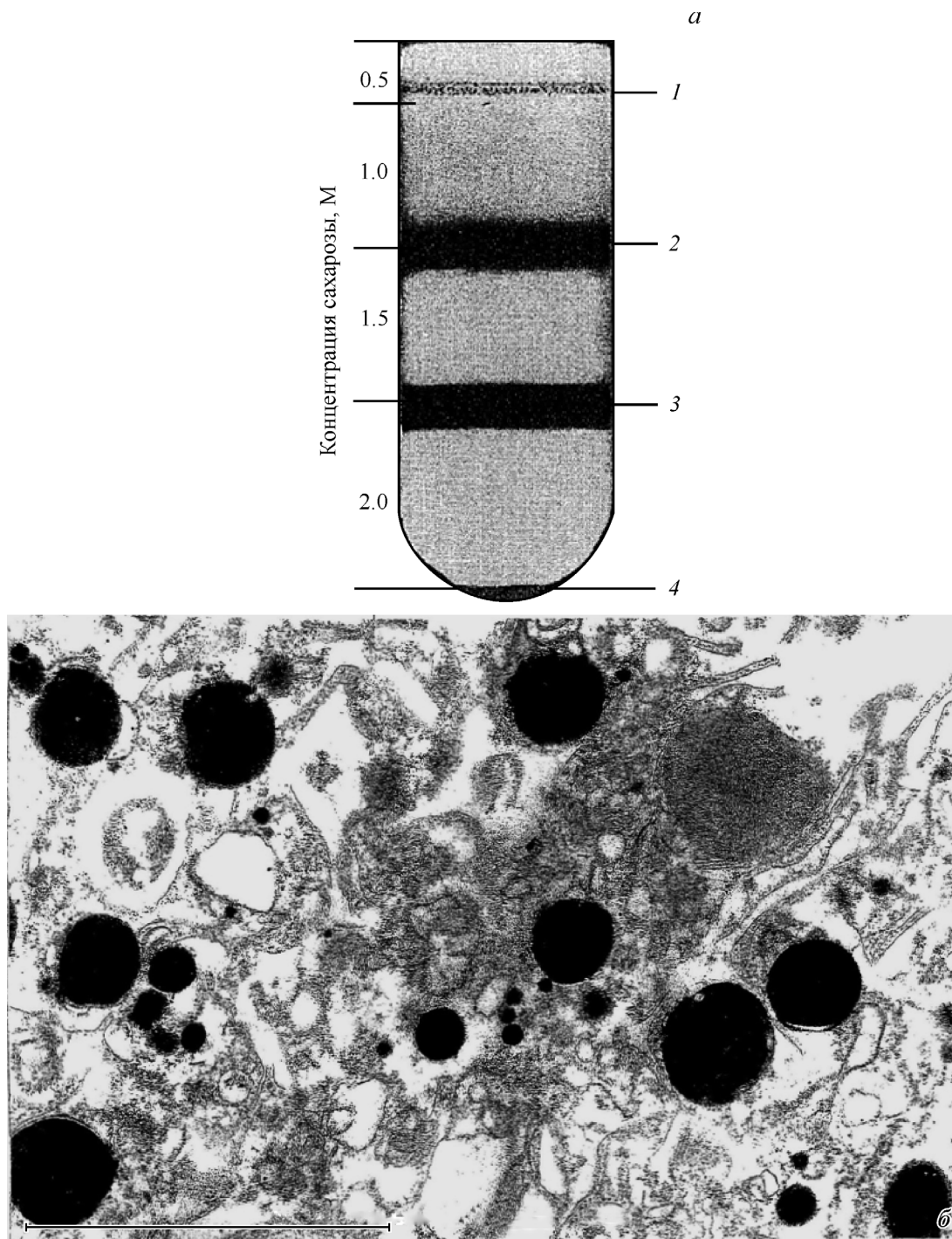


Рис. 3. Разделение фракций глазного пятна и мембран хлоропластов путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (а) и ультраструктура выделенных глобул глазного пятна (б).

а — фракции глазного пятна (полоса 1), тилакоидных мембран (полосы 2, 3) и неразрушенных целых клеток (полоса 4); б — липидно-каротиноидные глобулы черного цвета после глутар-осмиевой фиксации. Увел. 300 000×.

уменьшенное до 40 % содержание β -каротина (табл. 1). Анализ пигментов глобул глазного пятна мутанта А-90 показал, что основным пигментом глобул его глазного пятна является α -каротин с максимумом поглощения 457 нм (рис 4, б). Следовательно, можно утверждать, что состав каротинов глобул глазного пятна может изменяться одновременно с изменением их состава в мембранах хлоропластов. Очевидно, глазное пятно мутанта А-90 содержит примерно такую же долю α -каротина (до 60 %),

что и мембраны хлоропластов этого мутанта. Эти результаты дали нам основание считать, что основными пигментами глобул глазного пятна являются каротины. Причем состав α - и β -каротинов изменяется одновременно с изменением их состава в мембранах хлоропластов каждого из мутантных штаммов.

Чтобы окончательно убедиться в правильности нашей гипотезы, мы провели еще одно дополнительное исследование на мутанте С-41, у которого в мембранах

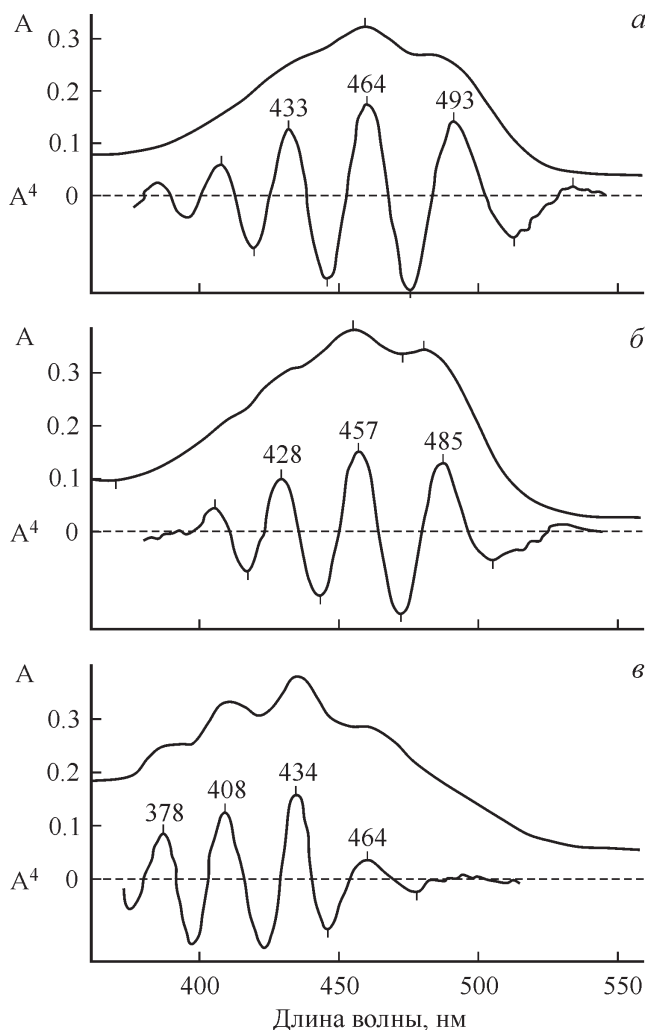


Рис. 4. Спектры поглощения (A) и их четвертые производные (A⁴) суммы каротиноидов фракции глазного пятна в хлороформе: из клеток дикого типа К(+), мутанта А-90 с высоким содержанием α-каротина и мутанта С-41 с высоким содержанием ζ-каротина.

хлоропластов накапливается до 38 % ζ-каротина, 19 % β-зеакаротина и 43 % β-каротина (табл. 1). Высокое содержание ζ-каротина в мембранах хлоропласта мутанта С-41 позволило нам изучить возможность его включения в состав глобул глазного пятна. Полученные результаты показали, что в глобулах глазного пятна мутанта С-41 содержится, по-видимому, такое же высокое количество

Таблица 1

Процентное содержание каротиноидов в мембранах хлоропластов клеток дикого типа К(+), мутантов А-90 и С-41 *Chlamydomonas reinhardtii*

Штамм	Содержание каротиноидов, %			
	α-каротин	β-каротин	β-зеакаротин	ζ-каротин
Дикий тип К(+)	4.9 ± 1.7	95.1 ± 3.2	0	0
Мутант А-90	57.4 ± 3.9	42.6 ± 2.8	0	0
Мутант С-41	0	46.4 ± 2.6	17.1 ± 2.7	36.5 ± 2.7

Примечание. Представлены результаты среднеарифметических величин 3–5 независимых экспериментов и их стандартные ошибки.

Таблица 2

Максимумы поглощения каротиноидов из клеток дикого типа К(+), мутантов А-90 и С-41 *Chlamydomonas reinhardtii*

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

ζ-каротина (рис. 4, в), что и в мембранах хлоропластов. В спектр поглощения глазного пятна существенный вклад вносит ζ-каротин с максимумами поглощения при 409 и 434 нм (рис. 5). Это хорошо видно при сравнении суммарного спектра поглощения каротиноидов мутанта С-41 (рис. 5, б) и хроматографически выделенных чистых спектров β-каротина (рис. 5, а) и ζ-каротина (рис. 5, в).

Таким образом, на основании полученных результатов на клетках дикого типа К(+), мутанта А-90 с высоким содержанием α-каротина и мутанта С-41 с высоким содержанием ζ-каротина мы пришли к выводу о том, что основными пигментами глазного пятна являются каротиноиды. Причем мы впервые установили, что состав и соотношение изомеров каротиноидов в глобулах глазного пятна мутантов могут изменяться в зависимости от изменения их

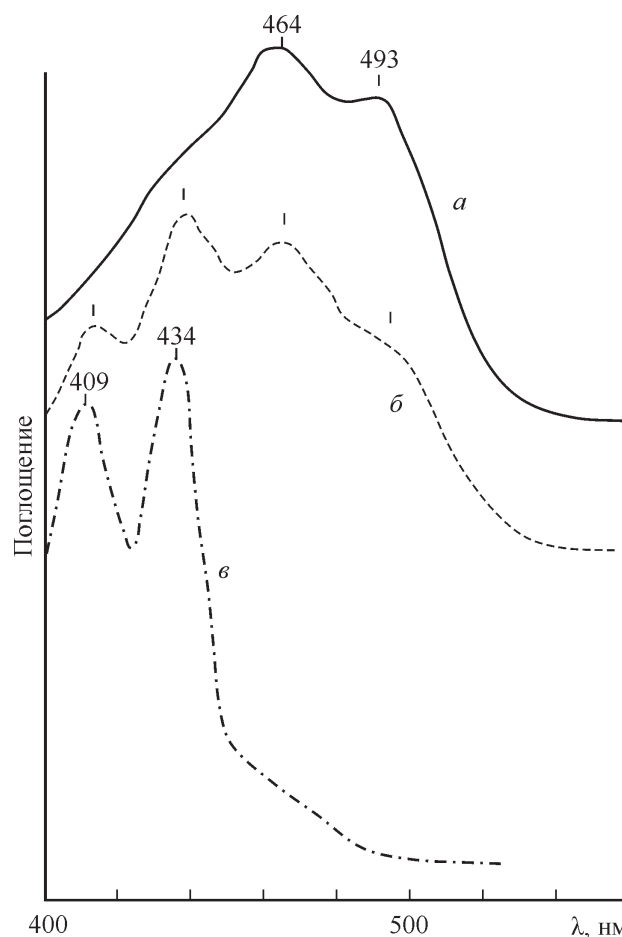


Рис. 5. Спектры поглощения каротиноидов в хлороформе: β-каротина из клеток дикого типа К(+), суммы каротиноидов (б) и ζ-каротина (в) из клеток мутанта С-41.

состава и соотношения в мембранах хлоропластов. Одновременно наши данные показали, что ксантофиллы не вносят существенного вклада в состав пигментов глобул глазного пятна *Ch. reinhardtii*.

Обсуждение

Изучение глазного пятна пигментных мутантов *Ch. reinhardtii* позволило нам обнаружить все основные этапы биогенеза от единичных липидно-каротиноидных глобул до полностью развитого глазного пятна, состоящего из 2—4 рядов глобул. У клеток дикого типа обнаружить различные этапы биогенеза невозможно из-за высокого содержания пигментов как на свету, так и в темноте. Поэтому пигментные мутанты мы использовали как модельные объекты, которые позволили выявить все основные этапы формирования и развития глазного пятна, а у темно-зеленого мутанта Т-8 даже его дальнейшее развитие до образования четырех рядов липидно-каротиноидных глобул.

Проведенные эксперименты показали, что в хлоропластах *Ch. reinhardtii* глазное пятно расположено в верхней части хлоропласта. Причем глобулы каждого ряда глазного пятна располагаются на одном из тилакоидов непосредственно под оболочкой хлоропласта, плотно прилегающей к плазмомембране. Ранее считалось, что они состоят из рядом расположенных липидно-каротиноидных глобул, не разделенных между собой. Впоследствии было установлено, что каждая липидно-каротиноидная глобула окружена белковой мембраной (Семенова, 1978; Renninger et al., 2001). Обнаружить наличие мембраны вокруг глобул можно различными способами. Первый — это фиксация белковых компонентов мембран глутаральдегидом и последующая экстракция липидов и пигментов этанолом и ацетоном в процессе обезвоживания образцов для электронной микроскопии. В этом случае мы наблюдали оставшиеся округлые белковые компоненты, окружавшие глобулы глазного пятна (рис. 2, в). Другой случай — это когда фиксируются очень старые клетки (более 30 сут роста на свету), в которых имеет место частичная деградация липидно-каротиноидных компонентов хлоропласта и в том числе глазного пятна. В результате мы наблюдали разрушение внутренней структуры глобул глазного пятна и сохранение окружающих их белковых мембран. При этом форма окружающих мембран полностью сохраняла контуры всех рядов глобул глазного пятна. Следует особо отметить, что на поперечных срезах глобулы глазного пятна имеют округлую или овальную форму.

В то же время на продольных срезах глазного пятна *Ch. reinhardtii* после экстракции липидно-каротиноидных компонентов хорошо видно, что внутри каждого слоя глобул глазка мембраны имеют четкую гексагональную структуру (Семенова, 1978). Продольный срез (вид сверху) из-за плотного слипания глобул глазного пятна по своей структуре напоминает структуру пчелиных сот. Подобные структуры глазного пятна были также обнаружены и у зеленой водоросли *Spermatozopsis similis* (Renninger et al., 2001).

Считается, что с белковыми мембранами ячеек глазного пятна связаны различные формы ретиналя и родопсина (Beckman, Hegemann, 1991; Derguini et al., 1991; Harz, Hegemann, 1991). Внутренняя структура каждой из ячеек заполнена липидно-каротиноидными глобулами.

Состав пигментов, входящих в эти глобулы, до сих пор окончательно не установлен, хотя он представляет очень большой интерес. Частично на этот вопрос ответила настоящая работа.

Наблюдения, основанные на фотоповедении мутантов с нарушениями биосинтеза каротиноидов при экзогенном добавлении ретиналя или некоторых его аналогов, таких как *11-cis*-ретиналь (Foster et al., 1984; Hegemann et al., 1988) или *all-trans*-ретиналь (Takahashi et al., 1991), показали, что эти рецепторные пигменты необходимы для процесса фототаксиса у *Ch. reinhardtii*. Установлено, что ретиналь может быть в форме *all-trans* (Hegemann et al., 1991) либо *all-trans* и *13-cis* (Renninger et al., 2001) изомеров из целых клеток, а также из изолированных интактных глазных пятен из *S. similis* в виде *all-trans* и *11-cis*-ретиналя (Kreimer et al., 1991). Эти фоторецепторные пигменты, по-видимому, локализованы в мембранах, окружающих глобулы глазного пятна (Melkonian, Robenek, 1984).

Во всех исследованиях глазного пятна жгутиковых зеленых водорослей проявление фототаксической активности на свету имеет место в тех случаях, когда падающий свет располагается перпендикулярно главному пятну (Kreimer, Melkonian, 1990). Сейчас считается, что у зеленых водорослей точная фототаксическая ориентация зависит как от отражающих, так и поглощающих свойств глазного пятна (Riiffer, Nultsch, 1991). Химические изменения, происходящие в глазном пятне и влияющие на его функциональные свойства, пока еще не установлены.

Нарушение структуры глазного пятна у мутанта *eu 627, mt (-) Ch. reinhardtii* в условиях быстрого деления клеток является идеально удобной моделью для изучения этих эффектов. Анализ с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа показал, что отражающие свойства глазного пятна этого мутанта схожи с таковыми штамма дикого типа и определяют фотоориентацию популяции клеток (Kreimer et al., 1992). Такие исследования проведены и на других мутантах *Ch. reinhardtii*, в том числе на мутантах с отсутствием глазного пятна (Renninger et al., 2001), на которых было установлено, что вспышки света с длинами волн 500 и 440 нм при редукции глазного пятна не приводили к фототаксической ориентации клеток. Функциональное состояние фоторецепторных пигментов также мало изменяло поведение мутантных клеток. В то же время инкубация клеток мутанта с высокой концентрацией *all-trans*-ретиналя (10 мМ) независимо от биосинтеза каротиноидов приводила к усилению отражающей способности глазного пятна. Эти данные показали важное значение глазного пятна как в поглощении фототаксически активного света, так и в четкой ориентации клеток к свету в процессе фототаксиса (Kreimer et al., 1992).

В последнее десятилетие активно изучается биохимический состав белков мембран глазного пятна (Wagner et al., 2008). Особое внимание уделяется исследованию родопсина и изомеров ретиналя (Dieckmann, 2003). Недавно была описана редукция каротинов и глазного пятна у белого светочувствительного мутанта с блокировкой синтеза фермента фитинсинтазы (Lawson, Satir, 1995; Inwood et al., 2008). Эти результаты подтверждают наше заключение о том, что без каротиноидов не образуется глазное пятно. Мы показали, что в зависимости от содержания каротиноидов в хлоропластах *Ch. reinhardtii* глазного пятна может содержать от 1 до 4 рядов липидно-каротиноидных глобул.

На основании проведенных нами исследований можно заключить, что липидно-каротиноидные глобулы глазного пятна содержат каротины. Причем нам впервые удалось показать, что у мутантов состав каротинов может изменяться в зависимости от изменения их состава в мембранах хлоропластов. Преобладающее накопление каротинов в глобулах глазного пятна было обнаружено и у зеленой водоросли *S. similis* (Grung et al., 1994). Можно предположить, что ксантофиллы в значительной степени связаны с белковыми компонентами мембран хлоропластов, в то время как каротины могут быть локализованы в липидах глазного пятна и мембран тилакоидов.

Список литературы

- Ладыгин В. Г. 1970. Пигментные мутанты *Chlamydomonas reinhardtii*, индуцированные нитрозоэтилмочевинной и УФ-лучами. Генетика. 6 (3): 127—131. (Ladygin V. G., 1970. Pigment mutations of *Chlamydomonas reinhardtii* induced by N-nitrosoethylurea and by UV-irradiation. Genetika. 6 (3): 127—131.)
- Ладыгин В. Г. 1991. Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas* Института почвоведения и фотосинтеза АН СССР, г. Пушкино. В кн.: Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. М.: Изд-во РАН. 152—173. (Ladygin V. G. 1991. Collection of the mutant strains *Chlamydomonas* of Institute Soil Science and Photosynthesis Pushchino. In: Catalog of microalgal cultures in the collections of the USSR. M.: Edition RAS. 152—173.)
- Ладыгин В. Г., Семенова Г. А., Тажеева С. В. 1973. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*. Цитология. 15 (7): 810—819. (Ladygin V. G., Semenova G. A., Tazeeva S. V. 1973. Plastid lamellar structure development in the *Chlamydomonas reinhardtii* pigment mutants. Tsitologiya. 15 (7): 810—819.)
- Ладыгин В. Г., Ширишкова Г. Н. 1987. Участие фотосистемы I в светоиндуцированном превращении виолаксантина в зеаксантин. Физиол. раст. 34 (6): 1068—1072. (Ladygin V. G., Shirshikova G. N. 1987. Involvement of photosystem-I in light-induced conversion of violaxanthin to zeaxanthin. Physiol. Rast. 34 (6): 1068—1072.)
- Семенова Г. А. 1978. Ультраструктурная организация глазка хламидомонады. Цитология. 20 (6): 603—606. (Semenova G. A. 1978. Ultrastructural organization of *Chlamydomonas* eyespot. Tsitologiya. 20 (6): 603—606.)
- Семенова Г. А., Ладыгин В. Г. 1975. Ультраструктура пластид трех типов мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, фенотипически желтых на свету или в темноте. Цитология. 17 (9): 1003—1008. (Semenova G. A., Ladygin V. G. 1975. The ultrastructure of plastids of three mutant types of *Chlamydomonas reinhardtii* phenotypically yellow in the light or in the darkness. Tsitologiya. 17 (9): 1003—1008.)
- Синецков О. А., Говорунова У. Г., Литвин Ф. Ф. 1989. Роль фотосинтетического аппарата и стигмы в формировании спектральной чувствительности фототаксиса у жгутиковой зеленой водоросли. Биофизика. 34 (2): 255—258. (Sineschekov O. A., Govorunova U. G., Litvin F. F. 1989. Role of photosynthetic apparatus and stigma in the formation of spectral sensitivity of phototaxis in flagellated green algae. Biophysics. 34 (2): 255—258.)
- Beckmann M., Hegemann P. 1991. *In vitro* identification of rhodopsin in the green alga *Chlamydomonas*. Biochemistry. 30: 3692—3697.
- Derguini F., Mazur P., Nakanishi K., Starace D.M., Saranak J., Foster K.W. 1991. All-trans-retinal is the chromophore bound to the photoreceptor of the alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Photochem. Photobiol. 54: 1017—1021.
- Dieckmann C. L. 2003. Eyespot placement and assembly in the green alga *Chlamydomonas*. BioEssays. 25: 410—416.
- Foster K. W., Saranak J., Patel N., Zarilli G., Okabe M., Kline T., Nakanishi K. 1984. A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas*. Nature. 311: 756—759.
- Foster K. W., Smyth R. D. 1980. Light antennas in phototactic Algae. Microbiol. Rev. 44: 572—630.
- Grung M., Kreimer G., Calenberg M., Melkonian M., Liaaen-Jensen S. 1994. Carotenoids in the eyespot apparatus of the flagellate green alga *Spermatozopsis similis*: adaptation to the retinal-based photoreceptor. Planta. 193: 38—43.
- Hager A., Meyer-Bertenrath T. 1966. Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide und Chlorophylle von Beeten, Algen und isolierten Chloroplasten mit Hilfe dunnschichtchromatographischer Methoden. Planta. 69 (3): 198—217.
- Harz H., Hegemann P. 1991. Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas*. Nature. 351: 489—491.
- Hegemann P., Gfirtner W., Uhl R. 1991. All-trans retinal constitutes the functional chromophore in *Chlamydomonas* rhodopsin. Biophys. J. 60: 1477—1489.
- Hegemann P., Hegemann U., Foster K.W. 1988. Reversible bleaching of *Chlamydomonas reinhardtii* rhodopsin *in vivo*. Photochem. Photobiol. 48: 123—128.
- Inwood W., Yoshihara C., Zalpur R., Kim K.-S., Kustu S. 2008. The ultrastructure of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain lacking phytoene synthase resembles that of a colorless alga. Mol. Plant. 1: 925—937.
- Kreimer G., Brohson U., Melkonian M. 1991. Isolation and partial characterization of the photoreceptive organelle for phototaxis of a flagellate green alga. Eur. J. Cell Biol. 55: 318—327.
- Kreimer G., Melkonian M. 1990. Reflection confocal laser scanning microscopy of eyespots in flagellated green algae. Eur. J. Cell Biol. 53: 101—111.
- Kreimer G., Overlander C., Sineschekov O. A., Stolzis H., Nultsch W., Melkonian M. 1992. Functional analysis of the eyespot in *Chlamydomonas reinhardtii* mutant *ey 627, mt(-)*. Planta. 188: 513—521.
- Lawson M. A., Satir P. 1995. Characterization of the eyespot regions of «Blind» *Chlamydomonas* mutants after restoration of photophobic responses. J. Eukaryotic Microbiol. 41: 593—601.
- Melkonian M., Robenek H. 1984. The eyespot apparatus of flagellated green algae: a critical review. Prog. Phycol. Res. 3: 193—268.
- Nultsch W., Hader D.-P. 1988. Photomovement in motile microorganisms-II. Photochem. Photobiol. 47: 837—869.
- Renninger S., Backendorf E., Kreimer G. 2001. Sub fractionation of eyespot apparatuses from the green alga *Spermatozopsis similis*: isolation and characterization of eyespot globules. Planta. 213: 51—63.
- Rüffer U., Nultsch W. 1991. Flagellar photoresponses of *Chlamydomonas* cells held on micropipettes. II. Change in flagellar beat pattern. Cell Motil. Cytoskeleton. 18: 269—278.
- Takahashi T., Yoshihara K., Watanabe M., Kubota M., Johnson R., Derguini F., Nakanishi K. 1991. Photoisomerization of retinal at 13-ene is important for phototaxis of *Chlamydomonas reinhardtii*: simultaneous measurements of phototactic and photophobic responses. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178: 1273—1279.
- Wagner V., Ulmann K., Mollwo A., Kaminski M., Mittag M., Kreimer G. 2008. Phosphoproteome of *Chlamydomonas reinhardtii* eyespot fraction includes key proteins of light signaling pathway. Plant Physiol. 146: 772—788.

ULTRASTRUCTURAL ORGANIZATION AND COMPOSITION OF CAROTENOIDS
IN THE EYESPOT IN THE MUTANT *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII**V. G. Ladygin*¹, * *G. A. Semenova*²¹ Institute of Basic Biological Problems RAS and² Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region;

* e-mail: ladyginv@rambler.ru

Biogenesis of the ultrastructure of the eyespot in the chloroplasts of unicellular green algae *Chlamydomonas reinhardtii* has been studied. We have found that the development of the structure of the eyespot correlates with the accumulation of carotenoids. Depending on their accumulation, the eyespots form from 1 to 4 lines of lipid-carotenoid globules. It has been shown that only carotenes are accumulated in the globules of the eyespots. We first have found that the composition of carotenes in the eyespots of the mutants may vary due to the changes in their composition in the membranes of chloroplasts.

Key words: *Chlamydomonas reinhardtii*, mutants, chloroplast, eyespot, ultrastructure, carotenes, xanthophylls.
