

ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ ПИГМЕНТНЫХ ФОРМ НА ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНОЙ ФОТОХИМИЧЕСКОЙ СТАДИИ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА

©2009 г.

О. Б. БЕЛЯЕВА, Ф. Ф. ЛИТВИН

*Биологический факультет Московского государственного
университета им. М.В.Ломоносова, Москва*

I. Введение. II. Общая схема последовательности реакций фото-биосинтеза хлорофилла *in vivo*. III. Циклическая схема превращений компонентов активного протохлорофиллид-ферментного комплекса в процессе биосинтеза хлорофилла. IV. Биосинтез хлорофилла в зеленых листьях растений. V. Последовательность реакций при фотовосстановлении протохлорофиллида в искусственных тройных комплексах: НАДФН-протохлорофиллид-ПОР. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Синтез хлорофилла *a* в отсутствие света тормозится на стадии образования и накопления в этиолированных листьях непосредственного предшественника хлорофилла – протохлорофиллида. Этот пигмент отличается от хлорофилла отсутствием фитольного заместителя и наличием двойной (а не одинарной) связи в пиррольном кольце D макроцикла. Завершение процесса протекает как быстрая фотореакция. Эту заключительную стадию можно наблюдать при включении света по изменениям спектров поглощения и флуоресценции этиолированных листьев и появлению продукта реакции – хлорофиллида *a* в экстракте пигментов.

Таким образом, с химической точки зрения, в основе завершающей стадии биосинтеза хлорофилла лежит фотохимическая реакция избирательного гидрирования двойной связи в макроцикле тетрапиррола и возникновением структуры хлорина, принципи-

Принятые сокращения: Пхлд – протохлорофиллид; Хлд – хлорофиллид; Хл – хлорофилл; ПОР – протохлорофиллид-оксидоредуктаза; ФС II – фотосистема II; ФС I – фотосистема I; ПЛТ – проламеллярные тела.

Адрес для корреспонденции: olgabelyeva@mail.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 08-04-01210-а.

ально отличающегося от предшественника спектральными и химическими свойствами, что и позволило ему играть роль основного фотосинтетического пигмента. Несколько позднее на этом завершающем этапе осуществляется присоединение фитила, т.е. превращение хлорофиллида в хлорофилл.

В начале исследований фотопревращение предшественника рассматривали как простую фотохимическую реакцию, аналогичную фотореакциям, протекающим в растворах пигментов. Однако уже в первых исследованиях при освещении этиолированных листьев было замечено несколько быстро сменяющих друг друга спектральных полос. С развитием спектроскопической техники и особенно низкотемпературной флуоресцентной спектроскопии, усилиями нескольких лабораторий удалось выяснить сложную картину взаимопревращений пигмент-белковых комплексов предшественника и хлорофиллида и получить важную информацию о разветвленной цепи темновых и фотохимических реакций, ответственных за наблюдаемые спектральные эффекты (см. рис. 1).

Прогресс исследований основного механизма заключительной стадии биосинтеза хлорофилла в последние десятилетия связан с открытием протохлорофиллид-оксидоредуктазы – «фотофермента», который катализирует фотореакцию превращения протохлорофиллида в хлорофиллид. Сам акт фотохимического гидрирования осуществляется в особом комплексе, в состав которого, помимо фермента, входят восстанавливаемый предшественник и донор водорода-НАДФН.

Моделирование естественного процесса в искусственных тройных комплексах позволило получить новую информацию о механизме фотореакции и перейти к более глубокому исследованию физической природы первичных фотопроцессов и структуры комплекса. В то же время сопоставление картины процессов, наблюдаемых в модельных системах и в целых клетках, заставляет прийти к выводу, что естественный процесс, по-видимому, намного сложнее и не только по числу промежуточных пигментных форм, участвующих в нем, но и по многообразию образующихся продуктов.

В ходе исследований стало ясным, что заключительные стадии биосинтеза хлорофилла нужно рассматривать не только как завершение химического синтеза пигмента, но и как начало пути трансформации пигмент-белковых комплексов предшественника в пигмент-белковые комплексы, составляющие структурную основу аппарата фотосинтеза. Удалось проследить момент включения образующихся из предшественника форм хлорофилла в состав двух фотохимических

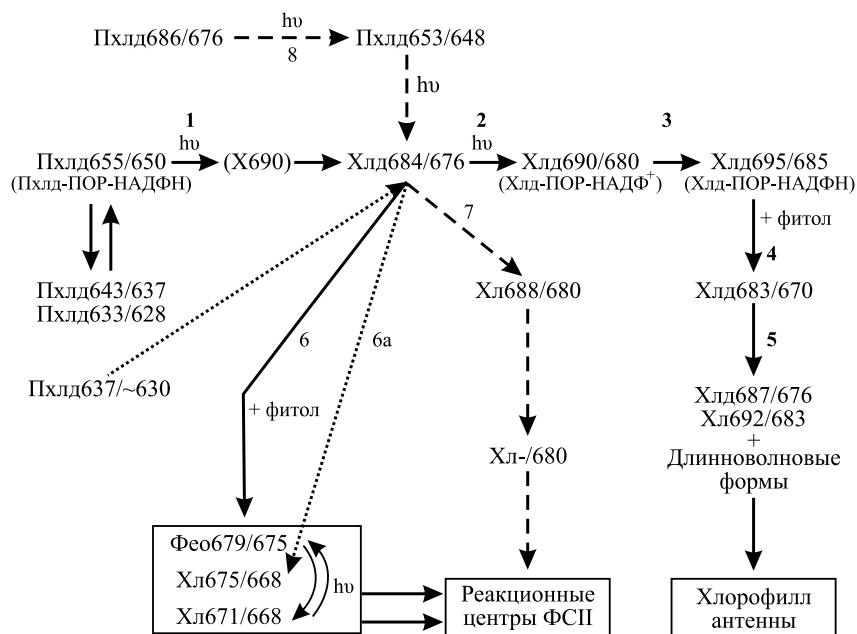


Рис.1. Общая схема превращений хромофора пигмента на световой стадии биосинтеза хлорофилла в листьях растений [3–25; 41–48; 56–58].

Пхлд – протохлорофиллид, Хлд – хлорофиллид, Хл – хлорофилл.

Цифрами указаны положения максимумов флуоресценции (первый индекс) и поглощения (второй индекс) пигментных форм. Интерпретация реакций 1–8, см. текст. Пунктирными стрелками обозначен путь формирования пигмента Хл680 (пигмент Р680) из длинноволновой формы протохлорофиллида. Точечные стрелки показывают путь превращения коротковолнового протохлорофиллида в зародышевых листьях. Х690 – нефлуоресцирующий интермедиат [80–89].

систем фотосинтеза. Таким образом, изучение заключительной стадии биосинтеза хлорофилла приобретает более общий характер как исследование проблемы биогенеза фотоактивных пигментных структур фотосинтеза.

«Онтогенетический» подход к изучению пигментного аппарата фотосинтеза представляется весьма перспективным для понимания эволюции фотосинтеза, тех путей, которыми природа пришла к открытию уникального, необычайно эффективного и экологически чистого способа аккумуляции и трансформации солнечной энергии. Возможно, итоги такого рода исследований окажутся в будущем полезными и для решения проблемы самообновления элементов искусственных систем аккумуляции солнечной энергии.

Обзор в основном посвящен изложению и обобщению результатов, касающихся схемы путей превращения основных компонентов активного комплекса – хромофора пигмент-белковых комплексов, протохлорофиллид-оксидоредуктазы (ПОР) и донора водорода на заключительной фотозависимой стадии биосинтеза хлорофилла в листьях растений.

II. ОБЩАЯ СХЕМА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ РЕАКЦИЙ ФОТОБИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА *in vivo*

В результате работ многих исследователей постепенно становилась ясной общая последовательность и механизмы реакций, участвующих в заключительной светозависимой стадии образования хлорофилла из его предшественника протохлорофиллида (см. обзоры [1, 2]). Итоги этих исследований можно обобщить в виде схемы (рис. 1), которая представляется в данный момент времени достаточно обоснованной и наиболее полной. Схема представляет собой разветвляющуюся цепь превращений пигмент-белковых комплексов, приводящую к образованию нескольких нативных форм хлорофилла – основной массы пигмента светособирающей антенны и минорных, но функционально важных пигментных форм, входящих в состав двух фотохимических систем фотосинтеза.

Линейная цепь реакций (реакции (1)–(5)) включает две последовательные фотохимические реакции (1) и (2) на схеме и дальнейшие темновые процессы [3–13]. Судя по изменению характера спектров кругового дихроизма гомогенатов из освещенных этиолированных листьев растений, можно предположить, что в первой фотохимической реакции (1) участвует одна из молекул димера протохлорофиллида, в результате чего образуется комплекс из двух слабо связанных молекул: протохлорофиллида и хлорофиллида. В ходе второй световой реакции осуществляется фотопревращение второй молекулы протохлорофиллида [7, 8].

Температурнозависимый длинноволновый спектральный сдвиг Хлд690/680 → Хлд695/685 (реакция (3) на схеме) осуществляется без участия света [3, 4, 12]. Он обусловлен реконструкцией восстановленной формы донора водорода НАДФН в пигмент-белковом комплексе (восстановление образовавшегося в ходе первичной фотореакции НАДФ⁺) [11, 14–17]. Исходя из исследований миграции энергии, было высказано предположение, что батохромное смещение спектральных полос в этой реакции может быть связано с уменьшением межмолекулярных расстояний в агрегированном

активном комплексе [18]. Возможно, рассматриваемый этап процесса может быть обусловлен обоими факторами: изменением структуры агрегированного комплекса и реконструкцией НАДФН при условии, что структура комплекса ПОР и хромофор-хромофорное взаимодействие зависят от состояния НАДФН (окисленного или восстановленного).

Реакция (4) на рис.1 проявляется как коротковолновый сдвиг спектральных полос пигмента: Хлд 695/685 → Хл683/670, связанный с именем японского исследователя К.Шибата – «сдвиг Шибаты» [19, 20]. Однако первыми, наблюдавшими этот спектральный эффект при освещении этиолированных листьев, были российские ученые Монтеверде и Любименко [21]. «Сдвиг Шибаты» наблюдается как в целых этиолированных листьях, так и в гомогенатах из них, и в препаратах пигмент-белковых комплексов [22–25]. На этой стадии в листьях растений происходит этерификация молекулы хлорофиллида с образованием хлорофилла [22, 23, 26–28].

Целый ряд экспериментальных фактов позволяет предполагать, что коротковолновый «сдвиг Шибаты» связан с дезагрегацией пигмента. Об этом свидетельствует увеличение выхода флуоресценции хлорофилла [29–31], исчезновение двойного сигнала кругового дихроизма [8, 32, 33], нарушение миграции энергии от протохлорофиллида на хлорофилл [30, 31, 34]. Оценивая первоначальное расстояние между молекулами протохлорофиллида в активном комплексе порядка 25Å, Торн предположил, что нарушение миграции энергии свидетельствует о том, что на этом этапе хлорофилл и непревратившийся протохлорофиллид удаляются друг от друга приблизительно на 10Å [31]. Результаты исследований с использованием фракционирования проламельлярных тел с помощью метода изоэлектрического фокусирования позволили высказать предположение, что во время «сдвига Шибаты» происходит не разрушение комплекса пигмент–фермент, а его дезагрегация с превращением больших агрегатов фермента ПОР в меньшие [35]. Дезагрегация ПОР может приводить и к дезагрегации пигмента. Возможно, именно разрыхление комплекса способствует этерификации – присоединению гидрофобного спирта фитола к молекуле пигмента.

Завершающее звено линейной цепи реакций (реакция (5) на рис. 1) проявляется по длинноволновому спектральному сдвигу Хл683/670 → Хл 687/676; Хл692/683. Этот этап не связан с действием света, он начинается с понижения квантового выхода флуоресценции формы хлорофилла Хл683/670, которая образовалась в результате «сдвига Шибаты». Этот завершающий этап соответствует конечной

интеграции хлорофилла в различные пигмент-белковые комплексы тилакоидной мембраны, к формированию спектральных форм хлорофилла, характерных для взрослого зеленого листа [36].

Линейная цепь реакций ведет, по-видимому, к образованию основной массы хлорофилла светособирающих комплексов фотосистем. Судя по количеству хлорофилла, синтезируемого этим путем, его энергетической связи (перенос энергии электронного возбуждения) с каротиноидами и хлорофиллом *b* [37, 38], этот пул хлорофилла можно идентифицировать с хлорофиллом антенны.

РАЗВЕТВЛЕНИЕ ЦЕПИ РЕАКЦИЙ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА.
БИОСИНТЕЗ ФЕОФИТИНА А – КОМПОНЕНТА РЕАКЦИОННОГО
ЦЕНТРА ФОТОСИСТЕМЫ II

Интермедиат Хлд684/676, образующийся в результате первой фото-реакции (реакция (1) на рис. 1), служит точкой разветвления цепи реакций. В темновых условиях наблюдается боковая реакция – превращение этого интермедиата в коротковолновую форму хлорофилла Хл675/670 (реакция (6) на схеме рис. 1) [5, 6, 8, 11]. Эта реакция идет с заметной скоростью только при температуре выше 273К. Ее также можно наблюдать при освещении этиолированных листьев светом низкой интенсивности при положительных температурах. Наличие миграции энергии с формы Хл675/670 на Хлд684/676 свидетельствует о ее близком расположении по отношению к центру биосинтеза основной массы пигмента [18]. Анализ экстрактов пигментов с помощью тонкослойной хроматографии показал, что продуктом боковой темновой реакции является не хлорофиллид, а хлорофилл [5, 6]. Следовательно, этерификация молекулы хлорофилла осуществляется не только во время «сдвига Шибата» (как считалось ранее), но и со значительно большей (на порядок) скоростью на стадии обсуждаемой темновой реакции образования Хл675/670 из продукта первой фото-реакции. Существование в процессе биосинтеза хлорофилла двух путей этерификации хлорофиллида: быстрого и медленного, было также продемонстрировано в работах [39, 40].

Судя по тому, что эта реакция проявляется по коротковолновому спектральному сдвигу, а также по устойчивости продукта Хл675/670 к дезагрегирующим воздействиям и более высокой (по сравнению с Хлд690/680) экстрагируемостью этого продукта [5, 6], боковая реакция, по всей вероятности, сопровождается дезагрегацией пигмента. Подтверждением этому служат результаты исследования спектров кругового дихроизма гомогенатов из освещенных этиолированных листьев на этом этапе процесса [7]. Можно предположить, что так

же, как на стадии «сдвига Шибаты», дезагрегация способствует ферментативному процессу этерификации молекулы пигмента. Кроме того, оказалось, что конечная форма хлорофилла, образующаяся в результате боковой реакции, ранее обозначавшаяся как Хл675/670, в действительности представляет собой совокупность двух форм хлорофилла Хл671/668 и Хл675/668 [41, 42].

С помощью метода низкотемпературной флуоресцентной спектроскопии [41–43] было обнаружено, что в результате «боковой реакции» наряду с хлорофиллом *a* синтезируется феофитин *a* (Фео679/675, реакция (ба)), о чем свидетельствуют характерные спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции освещенных этиолированных листьев и экстрактов пигментов.

Реакция образования феофитина имеет биосинтетический, а не деструктивный характер: она протекает только в листьях при сохранении целостности пигмент-белковых комплексов и не обнаруживается даже в гомогенатах из этиолированных листьев. Дальнейшие исследования указали на еще большую сложность «боковой» реакции процесса [44]. Оказалось, что феофитин может претерпевать превращение в хлорофилл Хл671/668 в ходе темновой реакции и что эта реакция фотообратима.

Комплекс феофитина и хлорофилла этиолированных листьев по целому ряду признаков идентичен феофитинсодержащим реакционным центрам ФС II [41–44]. Однако высокий квантовый выход флуоресценции феофитина в зеленеющих листьях свидетельствует о различном состоянии молекулы феофитина в этих структурах и в реакционных центрах.

БИОСИНТЕЗ ДЛИННОВОЛНОВОГО ХЛОРОФИЛЛА,
ВОЗМОЖНОГО КОМПОНЕНТА РЦ ФС II
(последовательность реакций (7) на рис. 1, пунктир)

Образование длинноволновой формы хлорофилла, по спектральным характеристикам близкой к хлорофиллу – компоненту реакционного центра второй фотосистемы фотосинтеза, впервые удалось наблюдать при освещении этиолированных листьев, находящихся в условиях теплового шока [45, 46]. При этом была обнаружена новая темновая реакция продукта фотовосстановления протохлорофиллида Хлд684/676, локализованного в точке разветвления цепи реакций. Реакция проявляется по батохромному смещению спектральных полос хлорофиллида и сопровождается этерификацией пигмента до хлорофилла: Хлд684/676 → Хл688/680. После ее завершения наблюдалось быстрое (20–30 сек) полное тушение флуоресценции ее продукта: Хл688/680 → Хл-/680. Авторы предположили, что конечный продукт

этой цепи темновых реакций – нефлуоресцирующий хлорофилл Хл-680 является пигментом реакционного центра ФС II – P-680 [45, 46].

Исследование процесса фотобиосинтеза хлорофилла в молодых (3–4-дневных) этиолированных листьях позволило получить дополнительные данные о механизме биосинтеза хлорофилла P-/680 в естественных условиях [47, 48]. Оказалось, что в таких ювенильных листьях, как и в 7–10-дневных листьях, выращенных в условиях теплового шока, интермедиат Хлд684/676 при комнатной температуре участвует в двух темновых реакциях: Хлд684/676 → Хл675/670 («боковая реакция») и Хлд684/676 → Хл688/680 → Хл-680. Особенностью процесса в молодых растениях было накопление Хлд684/676 в течение первых 3–5 секунд освещения белым светом без заметных изменений полос поглощения и флуоресценции протохлорофиллида Пхлд655/650, хотя фотопревращение протохлорофиллида (судя по экстрактам) при этом происходило. Опыты с использованием монохроматического освещения в длинноволновой области (680 нм), или освещения белым светом при различных температурах позволили прийти к заключению, что этот эффект объясняется фотопревращением неизвестной ранее слабо флуоресцирующей длинноволновой формы протохлорофиллида Пхлд686/676 в протохлорофиллид Пхлд653/648 (реакция 8, рис. 1), который в результате следующей световой реакции превращается в хлорофиллид Хлд684/676. Таким образом, на ранних стадиях развития растений кроме основной разветвленной цепи реакций, удалось обнаружить существование параллельного разветвленного процесса, приводящего к синтезу нефлуоресцирующего хлорофилла Хл-/680 (возможно, пигмента РЦ ФС-II) из длинноволнового протохлорофиллида Пхлд686/676 через стадию образования активной формы протохлорофиллида Пхлд653/648.

Таким образом, нативная форма хлорофиллида Хлд684/676, продукт первой фотохимической реакции, образующийся из Пхлд655/650, является точкой тройного разветвления цепи биосинтеза минорных форм хлорофилла и феофитина, связанных с реакционными центрами ФСII и основной массы хлорофилла антенны.

О БИОСИНТЕЗЕ ХЛОРОФИЛЛА РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИСТЕМЫ I

Исследование образования хлорофилла в клетках гетеротрофного мутанта *Chlorella vulgaris B-15* с полным генетическим блоком темнового синтеза хлорофилла [49, 50] позволило обнаружить фотоактивность еще одной длинноволновой минорной формы протохлорофилла – Пхл682/672 (этерифицированная форма), значи-

тельное количество которой накапливается в клетках мутанта при темновом культивировании. При освещении клеток мутанта в диапазоне температур от -70°C до $+26^{\circ}\text{C}$ наряду с известными для зеленеющих водорослей [51, 52] фотореакциями коротковолновых форм предшественника хлорофилла (Пхлд655/650 \rightarrow Хлд695/684 и Пхлд640/635 \rightarrow Хлд680/670) обнаружено фотопревращение длинноволновой формы протохлорофилла Пхл682/672 в стабильную (конечную) форму хлорофилла Хл715/696 [49,50]: Пхл682/672 \rightarrow Хл715/696. Высказано предположение, что Хл715/696 является пигментом ядра ФС-1. В пользу этой гипотезы свидетельствует положение его длинноволновой полосы поглощения (696нм), близкое к положению полосы поглощения P700 (697 нм у хлорофилла реакционного центра ФС-I в *Chlamydomonas* [53]). Фотоактивность ФС-1 (фотостимулированное выделение H_2) начинает проявляться одновременно с формированием на свету Хл715/696 [54].

Эффективность переноса энергии электронного возбуждения с каротиноидов на Пхл682/672 и на Хл715/696 в ходе фотореакции практически не изменялась [49, 50], что возможно при сохранении межмолекулярных расстояний и взаимной ориентации хромофоров каротиноидов и порфириринов. На этом основании авторами предложена гипотеза о том, что в этиолированных клетках мутанта уже существует структура ядра фотосистемы I, содержащая протохлорофилл Пхл682/672 вместо хлорофилла, а внутрикомплексное фотовосстановление протохлорофилла до хлорофилла завершает формирование ядра. Поскольку известно, что ПОР специфична к субстрату и не восстанавливает этерифицированный протохлорофилл [55], можно предположить, что в данном случае фотовосстановление протохлорофилла происходит с участием неизвестного ранее типа протохлорофилл-редуктазы.

ФОТОБИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА В ЗАРОДЫШЕВЫХ ЛИСТЬЯХ РАСТЕНИЙ

Пути биосинтеза хлорофилла в зародышевых листьях двудольных растений отличаются от последовательностей реакций, описанных выше для ювенильных и развитых этиолированных растений. В зародышевых листьях в темноте накапливается преимущественно коротковолновая форма предшественника, характеризующаяся полосой низкотемпературной флуоресценции около 632–635 нм. Одновременно существует и более длинноволновая форма с полосой флуоресценции при 653–655 нм. В спектрах флуоресценции, измеренных при комнатной температуре, основной максимум расположен при

636–637 нм [56–58]. Коротковолновая форма зародышевых листьев оказалась фотоактивной. Под действием света осуществляется ее превращение в коротковолновую форму хлорофиллида Хл675/670. По данным [56, 58], превращение осуществляется через образование интермедиата Хлд684/676, то-есть по пути «боковой» реакции (точечные стрелки на рис. 1). В зародышевых листьях «боковая» реакция осуществляется с большой скоростью: в течение 5 сек [56]. Известно, что в пропластидах очень молодых (2–3-дневных) листьев проламеллярные тела еще отсутствуют (ПЛТ), формируются только небольшие стромальные мембраны [57, 59–61]. Большая скорость коротковолнового сдвига Хлд684/676 → Хл675/670, наблюдающаяся в зародышевых листьях при комнатной температуре [56], свидетельствует о быстром освобождении пигмента из активного сайта ПОР.

III. ЦИКЛИЧЕСКАЯ СХЕМА ПРЕВРАЩЕНИЙ КОМПОНЕНТОВ АКТИВНОГО ПРОТОХЛОРОФИЛЛИД-ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА

В настоящее время большое внимание исследователей уделяется изучению поведения белкового компонента активного комплекса и донора водорода НАДФН при фотовосстановлении протохлорофиллида.

Уже в ранних исследованиях пигмент-белкового комплекса протохлорофиллида высказывалось предположение о «челночном» (много-разовом) механизме работы фотофермента в процессе биосинтеза хлорофилла. В недавней работе [57] была предложена общая схема процессов образования хлорофилла, включающая два пути биосинтеза хлорофилла и регенерации фотоактивного комплекса протохлорофиллида – два цикла многократного использования ПОР (рис. 2).

Схема Чоэфса и Франка, в отличие от схемы, предложенной на рис. 1, включает только одну светозависимую реакцию – образование хлорофиллида с максимумом поглощения при 678 нм, максимумом флуоресценции при 688 нм, который превращается в более длинноволновую форму посредством темновой реакции. Поскольку при комнатной температуре и высокой интенсивности света трудно наблюдать раздельно две последовательные фотореакции [3–6], спектральные характеристики зарегистрированной Чоэфсом и Франком первичной формы хлорофиллида (максимум поглощения при 678 нм, максимум флуоресценции при 688 нм) в освещенных интенсивной

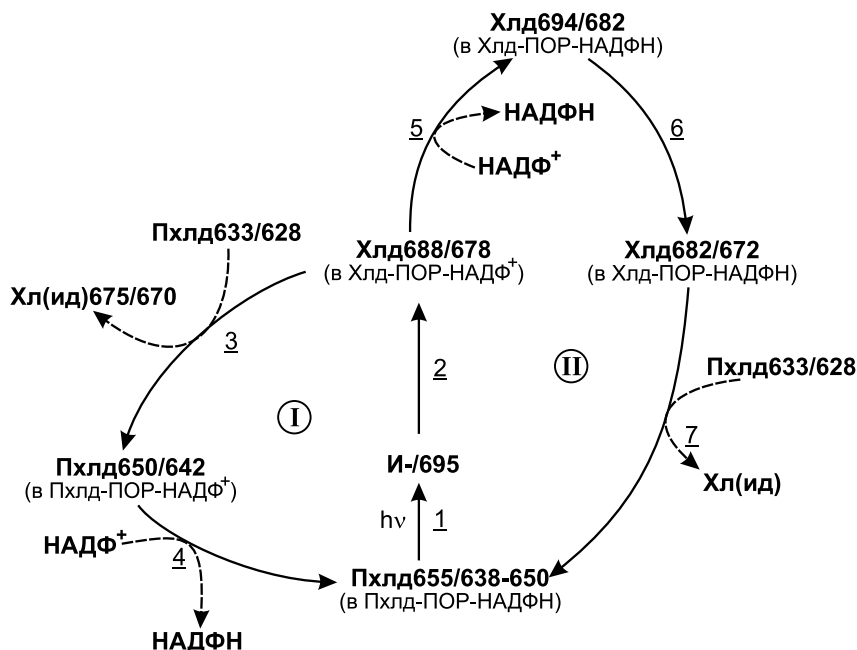


Рис. 2. Пути биосинтеза хлорофилла и регенерации фотоактивного комплекса протохлорофиллида [17].

Цифрами обозначены положения максимумов в спектрах флуоресценции (первая цифра) и поглощения (вторая цифра) пигментных форм; И-/695 – нефлуоресцирующий интермедиат.

вспышкой листьях, по-видимому, соответствуют одновременному накоплению продуктов как первой, так и второй фотореакции. Из сравнения спектральных характеристик интермедиатов можно заключить, что цикл I на схеме Чоэфса и Франка отражает тот же процесс, что описанная в наших работах «боковая» реакция (реакция (6) на схеме 1). Цикл II соответствует прямой последовательности реакций (реакции 1→4 схемы 1).

Обобщая результаты исследований разных авторов, Чоэфс и Франк пришли к выводу о том, что цикл I осуществляется в случае, когда концентрация нефотоактивного протохлорофиллида достаточно велика по отношению к концентрации образовавшегося хлорофиллида. Согласно предположению авторов, в этом случае хлорофиллид быстро покидает фермент, замещаясь протохлорофиллидом в агрегате ПОР. Этот путь осуществляется в мембранах этиопластов, в зародышевых листьях, в изолированных проламеллярных телах,

при низкой интенсивности освещения. Цикл II соответствует более полному фотопревращению пула протохлорофиллида (соотношение неактивного протохлорофиллида и образовавшегося хлорофиллида невелико). Авторы полагают, что в этом случае хлорофиллид остается связанным с ферментом более продолжительное время, в течение которого происходит распад агрегата фермента (на стадии коротковолнового «сдвига Шибата»).

IV. БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ

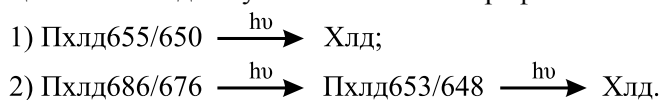
Все вышеизложенные результаты изучения путей биосинтеза нативных форм хлорофилла были получены при исследовании процесса в зеленеющих этиолированных листьях. Естественно, возникал вопрос о том, одинаковы или нет пути и механизмы фотобиосинтеза хлорофилла в зеленеющих листьях и при накоплении и обновлении его запаса во взрослых зеленых листьях растений, когда синтезируется основная масса пигмента. Высокая скорость биосинтеза хлорофилла должна одновременно обеспечивать не только накопление пигмента в растущих листьях, но и компенсировать его убыль в процессах деструкции, в частности, фотодеструкции, особенно сильной на ярком свете. Поэтому вопрос о механизмах биосинтеза хлорофилла непосредственно в нормальных зеленых листьях интересовал исследователей достаточно давно. Однако здесь на пути его изучения возникают большие трудности, поскольку накопление и превращение ничтожных количеств предшественника хлорофилла приходится исследовать на фоне сильно поглощающего и флуоресцирующего хлорофилла, уже накопленного в зеленых листьях (концентрация хлорофилла на несколько порядков превосходит стационарную концентрацию предшественника).

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ФОТОБИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЯХ ПОСЛЕ ИХ ЗАТЕМНЕНИЯ

С использованием метода низкотемпературной (77 К) флуоресцентной спектрофотометрии, позволяющего уменьшить перекрытие спектральных полос хлорофилла и протохлорофиллида, появилась возможность преодоления вышеуказанных трудностей. Первым исследованием спектральных форм протохлорофилл(ида) в зеленых листьях и их фотохимической активности была работа Ф.Ф.Литвина и соавт. [62]. Исследовали изменения низкотемпературных спектров флуоресценции зеленых листьев фасоли и экстрактов пигментов

после временного помещения листьев в темноту и последующего освещения. Авторы обнаружили, что при затемнении зеленых растений фасоли в листьях накапливается предшественник хлорофилла, спектроскопически идентичный основной активной форме протохлорофиллида в этиолированных листьях (максимум флуоресценции при 655 нм). Эта полоса быстро исчезала при последующем освещении затемненных листьев. Количественные измерения концентрации накапливающегося в темноте предшественника по спектрам экстрактов (с использованием метода внутреннего стандарта) и сопоставление с данными о скорости обновления хлорофилла, полученными с помощью изотопного метода [63], позволили заключить, что процесс обновления хлорофилла в зеленых листьях осуществляется через ту же основную форму предшественника, что и в этиолированных листьях. Данные о накоплении в затемненных зеленых листьях фотохимически активного протохлорофиллида с максимумом флуоресценции при 655 нм были позднее подтверждены в ряде работ [64–67].

Исследования биосинтеза хлорофилла в зеленых листьях в нашей лаборатории получили продолжение лишь в 2002 г. Для выяснения участия различных форм протохлорофиллида в биосинтезе хлорофилла *a* в зеленых листьях исследовались низкотемпературные спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции зеленых листьев и экстрактов из них у нескольких видов растений в условиях затемнения и последующего освещения [68]. Было обнаружено, что после 16 часов затемнения в листьях накапливаются три формы протохлорофиллида с такими же спектральными параметрами, что и формы в этиолированных листьях (максимумы флуоресценции при 633, 642 и 655 нм). Основной фотоактивной формой оказалась форма Пхлд655/650. Пигмент с полосой при 642 нм исчезал очень медленно. Авторы обнаружили, что в зеленых листьях так же, как и в молодых этиолированных проростках, в биосинтез хлорофилла *a* включается форма предшественника Пхлд653/648, которая в свою очередь является продуктом фотохимической реакции минорной длинноволновой формы протохлорофиллида с максимумом поглощения около 680 нм. Следовательно, в зеленых листьях, так же как в этиолированных, осуществляются два пути биосинтеза хлорофилла:



Таким образом, во взрослых зеленых листьях растений после их затемнения фотобиосинтез хлорофилла осуществляется через те же

активные формы протохлорофиллида, что и в этиолированном листе, а пути их превращения аналогичны наблюдаемым в зеленеющих этиолированных листьях. С использованием спектральных методов установлено, что центры биосинтеза протохлорофиллида и хлорофилла в зеленых листьях растений локализованы преимущественно в клетках верхнего столбчатого мезофилла на верхней стороне листовой пластинки и практически отсутствуют в клетках нижней, менее освещенной, стороны листовой пластинки [69].

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ФОТОБИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЯХ, ВЫРАЩИВАЕМЫХ В ЕСТЕСТВЕННЫХ ФОТОПЕРИОДИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ

Для понимания полной картины механизмов биосинтеза хлорофилла в листьях растений было важно обратиться к изучению процесса во взрослых зеленых листьях, выращенных в естественных фотопериодических условиях. Оказалось, что при периодическом освещении аппарат биосинтеза хлорофилла различен в молодых (до 7 дней) и взрослых листьях. Во время темного периода в молодых листьях образуются проламеллярные тела, в то время как в более взрослых листьях образования проламеллярных тел не наблюдалось [57].

Чоэфс и соавторы [67] исследовали биосинтез хлорофилла во взрослых (20 дней) вторичных зеленых листьях фасоли, выращенных при нормальном периодическом освещении (16 часов свет–8 часов темнота). Для инициирования фотопревращения предшественника хлорофилла листья освещали мощными световыми вспышками в разные периоды суток. Измеряли и анализировали разностные спектры флуоресценции свет (вспышка) минус темнота (до вспышки). Выяснилось, что во время светового периода (освещение листьев интенсивной вспышкой проводилось в середине 16-часового светового периода) под действием вспышки происходит превращение протохлорофиллида с максимумом флуоресценции при 653 нм. Идентичный результат был получен для ячменя и кукурузы. Фотоактивная форма протохлорофиллида была также обнаружена в зеленеющих листьях ячменя после 2–3 часов освещения, когда разрушаются ПЛТ и развиваются тилакоиды [70]. Авторы полагают, что активная в зеленых листьях форма Пхлд653/648 связана с тилакоидами.

При исследовании биосинтеза хлорофилла в молодых зеленых листьях фасоли (от одного дня выращивания) в условиях периодического освещения (16 часов свет–8 часов темнота) в спектре флуоресценции наблюдали две полосы протохлорофиллида: при 632–636 нм и при 653–654 нм, наряду с принадлежащими хлорофиллу максимумами при 685, 695 и 735 нм [57]. В конце

первого светового периода преобладала более коротковолновая полоса. С помощью оригинальной методики исследования кинетики изменений оптической плотности листьев в дальней красной области (при 700 нм) авторы обнаружили, что в молодых листьях фасоли превращение активной формы протохлорофиллида (флуоресценция при 654 нм) под действием интенсивной вспышки света осуществлялось через те же промежуточные стадии, что и в зеленеющих этиолированных листьях. В 6-дневных листьях, выращенных при периодическом освещении, в результате освещения мощной вспышкой из активного протохлорофиллида образуется первичная форма хлорофиллида (по данным авторов – Хлд688/678), которая может в дальнейшем превращаться или в коротковолновый продукт Хлб75/670, или в более длинноволновую форму Хлд694/682 (что, в основном, соответствует предложенной нами схеме на рис. 1). В первый световой период (однодневные листья) преимущественно образуется коротковолновая форма (как и в зародышевых листьях). С увеличением количества циклов свет–темнота после освещения вспышкой процесс идет по второму пути: образуется длинноволновая форма (максимум флуоресценции при 694 нм), которая, так же как и в зеленеющих этиолированных листьях, претерпевает превращение, характеризующееся коротковолновым спектральным сдвигом (сдвиг Шибата). При освещении листьев вспышкой во время светового периода этот сдвиг завершается в течение одной минуты, то есть на порядок быстрее, чем в зеленеющих листьях. С такой же высокой скоростью осуществляется этерификация хлорофиллида и регенерация активной формы протохлорофиллида. При освещении листьев во время темного периода (когда образуются ПЛТ) скорость коротковолнового сдвига понижается.

Таким образом, можно сделать вывод, что в зеленых листьях растений, выращенных в нормальных фотопериодических условиях, светозависимый синтез хлорофилла осуществляется с участием активной длинноволновой формы протохлорофиллида Пхлд654/648, по спектральным характеристикам близкой к его основной активной форме в зеленеющих этиолированных листьях. Так же, как в зеленеющих листьях, в зеленых листьях существует не менее двух путей биосинтеза хлорофилла в зависимости от состояния биосинтетического аппарата и его структуры (формирование ПЛТ и тилакоидов), которые в свою очередь зависят от возраста листьев и различны во время световых и темновых периодов.

V. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РЕАКЦИЙ ПРИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА В ИСКУССТВЕННЫХ ТРОЙНЫХ КОМПЛЕКСАХ: НАДФН–ПРОТОХЛОРОФИЛЛИД–ПОР

В последнее время все большее число исследователей использует для изучения механизма реакции фотовосстановления искусственные тройные комплексы, включающие протохлорофиллид, НАДФН и фотофермент ПОР и служащие моделью фотоактивных комплексов в живых системах. Однако спектральные свойства реконструированных тройных комплексов заметно отличаются от их свойств в целых этиолированных листьях. В искусственных системах максимумы поглощения и флуоресценции протохлорофиллида смещены в коротковолновую сторону по сравнению с основной активной формой Пхлд655/650 целых этиолированных листьев.

В ряде работ исследовались активные тройные комплексы с полосой поглощения около 630 нм [71–74]. Под действием света коротковолновый протохлорофиллид превращался в хлорофиллид с полосой поглощения около 670 нм, смещенной в коротковолновую сторону относительно соответствующей полосы в этиолированных листьях растений. Некоторые авторы высказывали предположение о том, что *in vitro* ПОР катализирует реакцию в мономерном комплексе [72, 74]. Однако хроматографически было показано, что молекулярная масса очищенной ПОР в растворе соответствует димеру фермента [73].

При исследовании фотохимической активности реконструированных тройных комплексов, характеризующихся полосой флуоресценции при 633 нм, с помощью разностных спектров «свет минус темнота», кроме фотопревращения коротковолнового протохлорофиллида, было обнаружено небольшое превращение более длинноволновой формы с максимумом флуоресценции при 645 нм [75]. По спектральным характеристикам и способности к фотовосстановлению при низкой температуре эта форма протохлорофиллида оказалась близкой к одной из активных форм протохлорофиллида *in vivo* – Пхлд645/639.

В нашей совместной с Т.Гриффитсом и К.Тимофеевым работе [76] при использовании высокой концентрации протохлорофиллида были получены искусственные тройные активные комплексы: Пхлд–ПОР–НАДФН, характеризующиеся более длинноволновой полосой поглощения (при 648 нм). В спектре флуоресценции наблюдались максимумы при 651 и 708 нм. Положение первого из них близко к положению максимума одной из активных форм протохлорофиллида *in vivo* (653 нм). Полоса флуоресценции при 708 нм, по-видимому, состоит из двух компонентов: колебательного

максимума, соответствующего полосе флуоресценции при 651 нм, и максимума флуоресценции, принадлежащего крупным агрегатам протохлорофиллида (их количество невелико, о чем свидетельствует отсутствие соответствующей полосы в спектре поглощения). Большую интенсивность длинноволновой полосы можно объяснить эффективной миграцией энергии с формы Пхлд 651/648 на агрегированную форму. В результате освещения интенсивным белым светом при температуре 77 К наблюдалось тушение обеих полос флуоресценции (без возникновения новых полос). Это можно объяснить образованием нефлуоресцирующего интермедиата, которое сопровождалось появлением в спектре ЭПР синглетного сигнала с g -фактором свободного электрона. Эффективное тушение полосы при 708 нм, по-видимому, объясняется уменьшением миграции энергии после фотопревращения Пхлд651/648 в нефлуоресцирующий интермедиат. При повышении температуры нефлуоресцирующий интермедиат превращался в хлорофиллид с максимумом флуоресценции при 695 нм, что соответствует положению максимума первичного флуоресцирующего интермедиата, образующегося *in vivo*. Образование хлорофиллида было идентифицировано по спектрам метанолового экстракта из освещенных образцов.

В работах Хайса и соавт. [77–79] получены искусственные тройные комплексы с двумя активными формами протохлорофиллида, характеризующимися полосами поглощения приблизительно равной интенсивности при 630 и 642 нм и соответствующими полосами флуоресценции при 631 и 644 нм. Более длинноволновая форма Пхлд644/642 была активна при очень низких температурах: при 180 К наблюдалось ее фотопревращение под действием световой вспышки в первичный нефлуоресцирующий интермедиат с полосой поглощения около 696 нм [78, 79]. При повышении температуры (до ~200 К) нефлуоресцирующий интермедиат превращался в промежуточный продукт с полосой поглощения при 681 нм и полосой флуоресценции при 684 нм. Следует отметить, что и положение максимума поглощения нефлуоресцирующего интермедиата, и температурная зависимость его дальнейшего темнового превращения совпадают с обнаруженным *in vivo* [80–89]. 200 К – это критическая температура, при которой начинаются динамические изменения в ферменте, называемые «glass transition». По-видимому, с таким изменением фермента связано темновое превращение нефлуоресцирующего интермедиата в первичный продукт. При дальнейшем повышении температуры выше 200 К в тройном комплексе осуществлялась вторая темновая реакция, характеризующаяся коротковолновым сдвигом полос поглощения и флуоресценции до 671 и 674 нм, соответственно. По спектральным

характеристикам интермедиатов и окончательного продукта цепь реакций превращения протохлорофиллида в тройном комплексе аналогична последовательности реакций биосинтеза хлорофилла *in vivo*, протекающих при низких интенсивностях света и приводящих к образованию коротковолновой формы хлорофилла («боковая ветвь: реакции (1) и (6) на схеме 1).

При исследовании с помощью низкотемпературной спектроскопии тройных комплексов, включающих термофильную протохлорофиллид-оксидоредуктазу [90], удалось обнаружить несколько промежуточных темновых реакций на пути превращения Пхлд644/642 в хлорофиллид. При повышении температуры образца после первичной фотореакции протохлорофиллида при 185 К было обнаружено четыре темновых этапа (см. схему на рис. 3). Сравнение спектральных характеристик зафиксированных интермедиатов с характеристиками комплексов хлорофиллида с ПОР и НАДФН (или НАДФ⁺) позволило авторам интерпретировать образование интермедиатов. Была предложена гипотетическая схема, включающая собственно фотовосстановление протохлорофиллида и четыре темновые стадии, связанные с окислением НАДФН, выходом НАДФ⁺ из комплекса, последующим включением в комплекс НАДФН, и, наконец, с выходом из комплекса свободного хлорофиллида и включением нового протохлорофиллида (см. схему рис. 3).

С использованием для инициирования фотовосстановления протохлорофиллида лазерного импульса (6 нс, 450 нм) была исследована кинетика промежуточных реакций цикла [91]. Оказалось, что выход НАДФН из комплекса представляет собой двухфазный процесс, для которого были рассчитаны константы скоростей темновых реакций. Хайс и соавт. показали, что образование тройного активного комплекса протохлорофиллида, НАДФН и ПОР включает шесть этапов конформационных изменений молекулы фотофермента [92].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключение представляется целесообразным кратко остановиться на возможных ближайших и отдаленных перспективах лишь тех аспектов общей проблемы механизма заключительной стадии биосинтеза и его роли в формировании аппарата фотосинтеза, которые затронуты в обзоре.

Прежде всего, это выяснение механизмов отдельных темновых и фотохимических реакций и установление реальных структур участвующих в них пигмент-белковых комплексов с известными

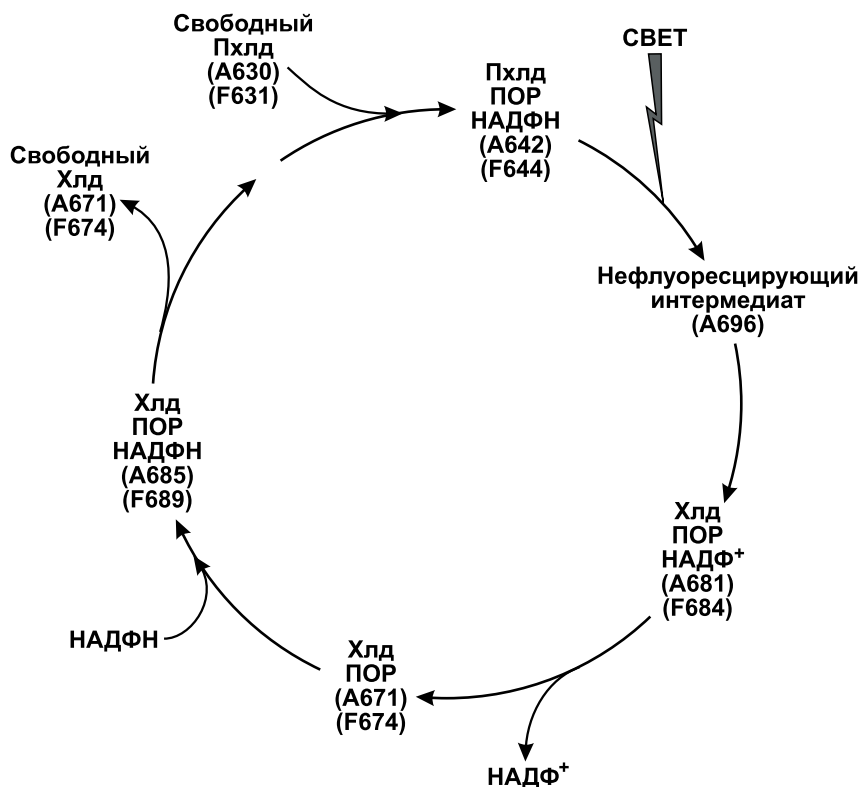


Рис. 3. Схема каталитического цикла протохлорофиллид-оксидоредуктазы [90].

Цифрами обозначены положения максимумов в спектрах поглощения (A) и флуоресценции (F) пигмент-белковых комплексов.

спектральными характеристиками. Сложность задачи, как мы подчеркивали, обусловлена лабильностью пигмент-белковых структур, однако можно надеяться на развитие новых препаративных методов и других подходов, в частности, физических, возможности которых продемонстрированы в последних исследованиях модельных тройных систем.

В приведенной схеме (рис. 1) только намечены «конечные точки» различных путей биосинтеза хлорофилла и феофитина, однако именно они указывают на смысл существования столь сложной разветвленной цепи реакций. Можно надеяться, что в недалеком будущем будет найден переход между системой биосинтеза пигмент-белковых комплексов и системой самосборки функционирующего фотосинтетического аппарата.

Крайне интересен и вопрос о процессе формирования пигментных структур, предшествующих заключительной фотозависимой стадии биосинтеза хлорофилла, т.е. пигмент-белковых комплексов протохлорофиллида. Здесь важную роль может сыграть повышение чувствительности флуоресцентных методов, позволяющих в настоящее время исследовать их формирование и функционирование в живой клетке на всех стадиях развития растений, начиная от семян, при физиологических условиях.

Несомненно, в дальнейшем изучении нуждается и проблема фотобиосинтеза хлорофилловых пигментов в полностью сформированных зеленых листьях растений. Небольшое число имеющихся работ служит лишь началом изучения этого процесса, обеспечивающего глобальную роль фотосинтеза в биосферных процессах и в сельскохозяйственном производстве.

Наконец, важно и развитие мало затронутого в обзоре направления, связанного с проблемой регуляции синтеза пигментов и биогенезом фотосинтетических структур, его сопряжением с другими клеточными процессами. Кроме того, в фундаментальном и прикладном аспектах полезно использовать уже имеющуюся информацию о зависимости скорости и направления различных ветвей биосинтетического процесса от внешних условий (температуры, освещения, стадии развития растений и т.п.) в целях регулирования заключительной стадии биосинтеза хлорофилла и построения фотосинтетического аппарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Литвин Ф.Ф., Беляева О.Б. и Игнатов Н.В. (1998) Биологические мембраны, **15**, 490–503.
2. Литвин Ф.Ф., Беляева О.Б. и Игнатов Н.В. (2000) Успехи биологической химии, **40**, 3–42.
3. Беляева О.Б. (1966) Молекулярная биофизика, изд. «Наука», Москва, 156–158.
4. Литвин Ф.Ф., Беляева О.Б. (1968) Биохимия, **33**, 928–936.
5. Литвин Ф.Ф., Беляева О.Б. (1971) Биохимия, **36**, 615–622.
6. Litvin F.F., and Belyaeva O.B. (1971). Photosynthetica, **5**, 200–209.
7. Mathis, P., and Sauer, K. (1972) Biochim. et Biophys Acta, **267**, 498–511.
8. Mathis, P., and Sauer, K. (1973) Plant Physiol., **51**, 115–119.
9. Литвин Ф.Ф., Ефимцев Е.И., Игнатов Н.В., Беляева О.Б. (1976) Физиол. раст., **23**, 17–24.
10. Litvin, F., Ignatov, N., Efimtsev, E., and Belyaeva, O. (1978) Photosynthetica, **12**, 375–381.
11. Oliver, R.P., and Griffiths, W.T. (1982). Plant Physiol., **70**, 1019–1025.
12. Sironval, C., Kuypers, Y., Michel, J.M., and Brouers, M. (1967). Stud. Biophys., **5**, 43–50.
13. Henningsen, K.W., and Thorne, S.W. (1974) Physiol. Plant., **30**, 82–89.
14. El Hamouri, B., and Sironval, C. (1980) Photobiochem. Photobiophys., **1**, 219–223.
15. El Hamouri, B., and Sironval, C. (1981) Plant Science Lett., **21**, 375–379.

16. *Franck, F., Bereza, B., and Boddi, B.* (1999) *Photosynth. Res.*, **59**, 53–61.
17. *Schoefs, B., and Franck, F.* (2008) *Photosynth. Res.*, **96**, 15–26.
18. *Игнатов Н.В. и Литвин Ф.Ф.* (1981) *Биофизика*, **26**, 664–668.
19. *Shibata, K.* (1956) *Carn. Inst. Wash. YB.*, **55**, 248–250.
20. *Shibata, K.* (1957) *J. Biochem. (То-кью)*, **44**, 147–173.
21. *Монтеверде Н.А. и Любименко В.Н.* (1911) *Изв. Имп. Акад. Наук (Санкт-Петербург)*, Сер. V1, **5**, 73–101.
22. *Красновский А.А., Быстрова М.И., Сорокина А.В.* (1961) *Докл. АН СССР*, **136**, 1227–1230.
23. *Воробьева Л.М., Быстрова М.И. и Красновский А.А.* (1963) *Биохимия*, **28**, 524–534.
24. *Boardman, N.K.* (1966) In: *The Chlorophylls* (Ed by L.P. Vernon and G.R. Seely), Academic Press, NY., 437–479.
25. *Schopfer, P., and Siegelman, H.W.* (1968) *Plant Physiol.*, **43**, 990–996.
26. *Ланг Ф., Воробьева Л.М., Красновский А.А.* (1971) *Молекулярная биология*, **5**, 366–374.
27. *Nielsen, O.F., and Kahn, A.* (1973) *Biochem. Biophys. Acta*, **292**, 117–129.
28. *Henningsen, K.W., Thorne, S.W., and Boardman, N.K.* (1974) *Plant Physiol.*, **53**, 419–425.
29. *Butler, W.L.* (1961) *Arch. Biochem. Biophys.*, **92**, 287–295.
30. *Thorne, S.W.* (1971a) *Biochem. Biophys. Acta*, **226**, 113–127.
31. *Thorne, S.W.* (1971b) *Biochem. Biophys. Acta*, **226**, 128–134.
32. *Henningsen, K.W., Kahn, A., and Houssier, C.* (1973) *FEBS Lett.*, **37**, 103–109.
33. *Schultz, A., and Sauer, K.* (1972) *Biochem. Biophys. Acta*, **267**, 320–340.
34. *Раскин В.И.* (1981) *Наука и техника*, Минск, 159 с.
35. *Wiktorsson, B., Ryberg, M., Gough, S., and Sundqvist, C.* (1992) *Physiol. Plant*, **85**, 659–669.
36. *Беляева О.Б., Карнеева Н.В., Стадничук И.Н. и Литвин Ф.Ф.* (1975) *Биохимия*, **40**, 951–961.
37. *Фрадкин Л.И.* (1988) В сб.: *Биогенез пигментного аппарата фотосинтеза* (Ред. Литвин Ф.Ф.), Наука и техника. Минск, 164–191.
38. *Фрадкин Л.И., Шлык А.А.* (1978) *Журн. прикл. спектроскопии*, **29**, 1029–1039.
39. *Domanski, V.P., Rudiger, W.* (2001) *Photosynth. Res.*, **68**, 131–139.
40. *Domanski, V., Rassadina, V., Gus-Mayer, S., Wanner, G., Schoch, S., and Rudiger, W.* (2003) *Planta*, **216**, 475–483.
41. *Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф.* (1993) *Биохимия*, **58**, 1469–1480.
42. *Игнатов Н.В. и Литвин Ф.Ф.* (1993) *Биохимия*, **58**, 1645–1657.
43. *Ignatov, N.V., and Litvin, F.F.* (1994) *Photosynth. Res.*, **42**, 27–35.
44. *Ignatov, N.V., and Litvin, F.F.* (1995) *Photosynth. Res.*, **46**, 445–453.
45. *Игнатов Н.В., Гостимский С.А., Сатина Л.Я. и Литвин Ф.Ф.* (1998) *Биохимия*, **63**, 95–104.
46. *Ignatov, N.V., Satina, L.Y., and Litvin, F.F.* (1999) *Photosynth. Res.*, **62**, 185–195.
47. *Игнатов Н.В. и Литвин Ф.Ф.* (2002a) *Биохимия*, **67**, 949–955.
48. *Ignatov, N.V., and Litvin, F.F.* (2002) *Photosynth. Res.*, **71**, 195–207.
49. *Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф.* (1995) *Биохимия*, **60**, 1429–1438.
50. *Ignatov, N.V., and Litvin, F.F.* (1996) *Photosynth. Res.*, **50**, 271–283.
51. *Лебедев Н.Н., Джелепова И.Д., Красновский А.А.* (1991) *Биофизика*, **36**, 1022–1030.
52. *Wang, W.J.* (1979) *Plant Physiol.*, **63**, 1102–1106.
53. *Karapetyan, N.V., Rakhimberdieva, M.G., Bukhov, N.G., Gyurjan, I.* (1980) *Photosynthetica*, **14**, 48–54.
54. *Бойченко В.А., Литвин Ф.Ф.* (1990) *Биохимия*, **55**, 1309–1318.
55. *Griffiths, W.T.* (1980) *Biochem. J.*, **186**, 267–278.

56. Schoefs, B., and Franck, F. (1993) *J. Exp. Bot.*, **44**, 1053–1057.
57. Schoefs, B., and Franck, F. (2008) *Photosynth. Res.*, **96**, 15–26.
58. Дубровский В.Т. и Литвин Ф.Ф. (2008) Биологические мембраны, **25**.
59. Klein, S., and Schiff, J.A. (1972) *Plant Physiol.*, **49**, 619–626.
60. Deng, X.-W., Gruissem, W. (1987) *Cell*, **49**, 379–384.
61. Khandakar, K., and Bradbeer, J.W. (1989) *Cytologia*, **54**, 409–417.
62. Литвин Ф.Ф., Красновский А.А. и Рихирева Г.Т. (1959) Докл. АН СССР, **127**, 699–701.
63. Шлык А.А. (1965). Минск, Изд. «Наука и техника».
64. Garab, G.T., Sundqvist, C., and Fahludi-Daniel, A. (1980) *Photochem. Photobiol.*, **31**, 491–503.
65. Лебедев Н.Н., Шиффел П., Красновский А.А. (1985) *Биофизика*, **30**, 44–49.
66. Lebedev, N.N., Siffel, P., Krasnovsky, A.A. (1985) *Photosynthetica*, **19**, 183–187.
67. Schoefs, B., Bertrand, M., and Franck, F. (2000a) *Photochem. Photobiol.*, **72**, 85–93.
68. Игнатов Н.В. и Литвин Ф.Ф. (2002б) *Биохимия*, **67**, 1142–1150.
69. Игнатов Н.В. и Литвин Ф.Ф. (2002в) Биологические мембраны, **19**, 153–159.
70. Franck, F., and Strazlka, K. (1992) *FEBS Lett.*, **309**, 73–77.
71. Knaust, R., Seyfried, B., Schmidt, L., Schulz, R., and Senger, H. (1993) *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, **20**, 161–166.
72. Birve, S., Selstam, E., Johansson, L. (1996) *Biochem. J.*, **317**, 549–555.
73. Martin, G.E.M., Timko, M.P., and Wilks, H.M. (1997) *Biochem. J.*, **325**, 139–145.
74. Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S., and Rudiger, W. (1999) *Eur. J. Biochem.* **265**, 862–874
75. Lebedev, N., and Timko, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 17954–17959.
76. Беляева О.Б., Гриффитс В.Т., Ковалев Ю.В., Тимофеев К.Н., Литвин Ф.Ф. (2001) *Биохимия*, **66**, 173–177.
77. Heyes, D.J., Ruban, A.V., Wilks, H.M., and Hunter, C.N. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 11145–11150.
78. Heyes, D.J., Ruban, A.V., Hunter, C.N. (2003) *Biochemistry*, **42**, 523–528.
79. Heyes, D.J., Heathcote, P., Rigby, S.E.J., Palacios, M.A., Grondelle, R., and Hunter, C.N. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 26847–26853.
80. Раскин В.И. (1976) *Вести АН БССР. Сер. биол. наук*, **5**, 43–46.
81. Лосев А.П., Лялькова Н.Д. (1979) *Мол. биол.*, **13**, 837–844.
82. Dujardin, E., and Correia, M. (1979) *Photobiochem. Photobiophys.*, **1**, 25–32.
83. Dujardin, E., Correia, M., Sironval, C. (1981) In: *Photosynthesis Proc. 5th Int. Congr. On Photosynthesis: Chloroplast development* (Eds Akoyunoglou G.) *Phyladelphia* 1981, **5**, 21–29.
84. Franck, F., and Mathis, P. (1980) *Photochem. Photobiol.*, **32**, 799–803.
85. Inoue, Y., Kobayashi, T., Ogawa, T., and Shibata, K. (1981) *Plant Cell Physiol.*, **22**, 197–204.
86. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. (1980) *Биофизика*, **25**, 617–623.
87. Belyaeva, O.B., Litvin, F.F. (1981) *Photosynthetica*, **15**, 210–215.
88. Belyaeva, O.B., Personova, E.R., Litvin, F.F. (1983) *Photosynth. Research*, **4**, 81–85.
89. Ignatov, N., Belyaeva, O., and Litvin, F. (1993) *Photosynthesis Research*, **38**, 117–124.
90. Heyes, D.J., and Hunter, C.N. (2004) *Biochemistry*, **43**, 8265–8271.
91. Heyes, D.J., and Hunter, C.N. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 32015–32020.
92. Heyes, D.J., Menon, B.R.K., Sakuma, M., Scrutton, N. (2008) *Biochemistry*, **47**, 10991–10998.