

БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА И ФОРМИРОВАНИЕ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ ФОТОСИНТЕЗА

© 2000 г. **Ф. Ф. ЛИТВИН, О. Б. БЕЛЯЕВА,
Н. В. ИГНАТОВ**

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

I. Введение. II. Активные центры биосинтеза хлорофилла. III. Заключительная стадия биосинтеза хлорофилла из протохлорофиллида: последовательность и механизм реакций. IV. Пути биосинтеза пигментных компонентов фотосистемы 2. V. Биосинтез хлорофилла реакционных центров фотосистемы 1. VI. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез, как известно, служит основным двигателем глобальных потоков энергии вещества в биосфере. Этот уникальный, недоступный пока для воспроизведения человеком процесс утилизации солнечной энергии оказывается возможным благодаря существованию сложных внутриклеточных структур фотосинтетического аппарата, для построения которого потребовались миллиарды лет эволюции. Однако, возникновение аппарата фотосинтеза происходит буквально на наших глазах, в процессе онтоге-

Принятые сокращения: ПЛТ — проламеллярные тела; ПОР — протохлорофиллидоксиоредуктаза; РЦ ФС-1 и ФС-2 — реакционные центры фотосистемы 1 и фотосистемы 2.

Обозначения пигментов: Пд — протохлорофиллид, Пх — протохлорофилл, Хд — хлорофиллид, Хл — хлорофилл, П и Х — аналоги указанных пигментов, для которых не установлено отсутствие или наличие фитола, Фео — феофитин. В обозначениях нативных форм первая цифра после сокращенного названия пигмента указывает положение максимума в спектре низкотемпературной флуоресценции (нм), вторая — положение длинноволновой полосы поглощения, цифра в скобках — положение полосы Сор в спектре возбуждения флуоресценции. R697, R688 — нефлуоресцирующие интермедиаты биосинтеза с длинноволновыми полосами поглощения при 697 и 688 нм.

неза растений — биосинтеза хлорофилла и других пигментов, биогенеза сложных фотосинтетических структур. У высших растений этот процесс (биосинтез хлорофилла особенно) легко наблюдать: его заключительная стадия — превращение слабоокрашенного предшественника, протохлорофиллида, в хлорофилл включается только при действии света и протекает за несколько секунд в предварительно затемненных, лишенных хлорофилла (этиолированных) проростках. Этой заключительной стадии биогенеза фотосинтетического аппарата и посвящен данный обзор, причем внимание будет сосредоточено в основном на проблеме биосинтеза собственно молекул хлорофилла, нативных комплексов пигмента и роли света в этом процессе. Прямым подходом к проблеме были бы изолирование структур из клетки и анализ их молекулярной организации — путь, по которому идет исследование уже сформированных структур (например, реакционных центров фотосинтеза). Однако, по отношению к зарождающимся, значительно более лабильным, пигментным системам этот путь оказывается труднодоступным, не только вследствие низкого содержания пигментов, но, и главное, вследствие чрезвычайной лабильности структур, разрушающихся при попытке самого мягкого выделения их из клетки. Усилия в этом направлении, отраженные в обзоре, безусловно будут продолжены; но их успех во многом зависит от информации о действительной картине превращения пигментов непосредственно в целой, живой клетке, которую удастся наблюдать благодаря использованию методов абсорбционной и люминесцентной спектроскопии. Этот аспект проблемы и отражен в обзоре.

Чем интересны исследования заключительной стадии биосинтеза хлорофилла в растениях? Если говорить о практической стороне вопроса, то в значительной мере именно на этой стадии закладываются основы продуктивности растений; она оказывается наиболее уязвимой по отношению к повреждающему действию света (фотодеструкция, действие фотоингибиторов и фотогербицидов), чувствительной к управлению со стороны фотоморфогенетического контроля (фитохромная система регуляции), более зависимой, чем сформировавшиеся структуры, от влияния светового, температурного и других внешних факторов. Результаты онтогенетического исследования фотосинтетических структур безусловно окажутся полезными для понимания принципов строения реакционных центров — ключевых структур фотосинтеза, механизма их функционирования. Сопоставление онтогенетических и филогенетических исследований позволит ответить на важные вопросы об эволюции фотобиологических систем и самой биосферы.

Проблема природы заключительной стадии биосинтеза хлорофилла появилась в начале века и казалась относительно простой: из сопоставления известных к тому времени структур хлорофилла и его темнового предшественника было очевидно, что в основе процесса зеленения должна лежать реакция фотохимического восстановления двойной связи в пиррольном кольце макроцикла. Вместе с тем, по мере продвижения спектроскопических исследований целых клеток выяснилось, что реальная картина значительно сложнее и включает большое число интермедиатов (даже если учесть необходимость переноса двух электронов и двух протонов в ходе реакции фотовосстановления). Это противоречие становится понятным, если принять во внимание современные представления об участии в фотосинтезе не одной, а нескольких форм пигмента (пигментных комплексов), выполняющих функции реакционных центров двух фотохимических систем фотосинтеза (ФС–1 и ФС–2) и нескольких типов обслуживающих их светособирающих (антенных) пигментных комплексов. Таким образом, исследование процесса зеленения превращается из анализа одной реакции в изучение сложного многоступенчатого процесса биогенеза пигментных комплексов, структура каждого из которых соответствует его специфической функции при фотосинтезе. Перспективным для получения спектроскопической картины процесса в его динамике оказался метод торможения реакций глубоким охлаждением объектов (использованный впервые для исследования зеленеющих листьев А.А.Красновским и нами в 1956 году).

В обзоре отражены итоги развития и современное состояние исследований последовательности и природы темновых и фотохимических реакций биогенеза пигментных комплексов хлорофилла в этиолированных и зеленых листьях растений.

II. АКТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА

Основная реакция биосинтеза хлорофилла в листьях растений — фотовосстановление протохлорофиллида до хлорофиллида, осуществляется в пределах специального активного центра, основными элементами которого являются протохлорофиллид, катализирующий его фотовосстановление фермент протохлорофиллид–оксидоредуктаза (ПОР) и донор водорода НАДФН. Протохлорофиллид накапливается в этиолированных листьях в виде нескольких спектральных форм. Хорошо изучены три основных формы: Пд 655/650, Пд 643/639 и П 633/628 [4, 28–30, 54, 62, 71, 91, 133]. Кроме того обнаружено несколько минорных длинно-

волновых форм (поглощение в области 660—690 нм) [32]. Пд 655/650 и Пд 643/639 связаны между собой высокоэффективной миграцией энергии [4]. Под действием света обе эти формы активно превращаются в хлорофиллид даже при очень низких температурах [4, 10]. Форма П 633/628 способна к превращению только при температуре выше 278 К [10]; исследование спектров действия ее фотопревращения показало, что процесс осуществляется через стадию преобразования неактивной коротковолновой формы в более длинноволновую активную форму [1]. Длинноволновый сдвиг спектров активного протохлорофиллида может быть обусловлен хромофор—хромофорным взаимодействием молекул пигмента, о чем свидетельствуют результаты исследования кругового дихроизма [84, 127], поляризации флуоресценции и миграции энергии [132]. Предполагается, что молекулы протохлорофиллида образуют димеры или тетрамеры [84, 132].

Фотоактивный комплекс пигмента с белком был детально исследован в работах Гриффитса [73—78]. Был выделен и исследован фотофермент ПОР; обнаружено, что донором водорода служит НАДФН. Фотофермент массой 36 кДа [42] располагается на внутренних мембранах этиопластов [57, 120] и локализован на экстернальной (стромальной) стороне тилакоидов [130]. Результаты исследований аминокислотной последовательности [142] и вторичной структуры ПОР [50] показали, что этот фермент принадлежит к семейству короткоцепочечных алкоголь—дегидрогеназ. Пока не ясно, каким образом редуктаза расположена на мембране, однако, предполагается, что ее связь с мембраной электростатическая [130]. Согласно данным, приведенным в работе [50], редуктаза может быть сцеплена с мембраной или β -слоями, или λ -спиралями полипептида, содержащими триптофановые остатки. Кроме того с активным сайтом энзима электростатически связана C_{17} -пропионовая группа протохлорофиллида [77].

С помощью метода ЯМР—спектроскопии [44] показано, что протон, поступающий от НАДФН, присоединяется в положение C_{17} молекулы протохлорофиллида. Авторы предположили, что донором второго протона может служить или вода, или белковые группировки. Вилкс и Тимко [142] установили, что в состав активного сайта ПОР входят Tyr—275 и Lys—279. При исследовании мутантов гороха было показано, что мутации, связанные с этими аминокислотами, ведут к резкому понижению активности фермента. Авторы предположили, что тирозин может быть донором протона, тогда как лизиновый остаток играет важную роль в понижении рКа фенольной группы тирозина, т.е. облегчает депро-

тонирование. Согласно предложенной авторами модели протон от фенольной группы тирозина поступает к C_{18} атому молекулы протохлорофиллида, тогда как гидрид-ион от НАДФН переносится к C_{17} позиции.

Структуру фотоактивного комплекса биосинтеза хлорофилла в его нативном высокоактивном состоянии нельзя считать окончательно выясненной. Помимо ПОР в этиопластах были обнаружены и другие связанные с протохлорофиллидом полипептиды: 70, 41, 17 и 14 кДа [117]. Для интерпретации биогенеза фотосинтетического аппарата особый интерес представляет обнаружение в этиопластах полипептидов, входящих в состав реакционных центров фотосинтеза фотосистемы 2 [94, 111]. С помощью метода быстрой радиоактивной метки в неосвещенных этиопластах ячменя были обнаружены в небольших количествах практически все основные апобелки реакционных центров обеих фотосистем [63, 64, 93]. Однако, интенсивное накопление этих апобелков начиналось только после освещения.

Данные, полученные как спектроскопическими [85], так и препаративными методами [134], свидетельствуют о том, что в фотоактивном комплексе присутствуют также флавины, функция которых пока неясна. Уолкер и Гриффитс [134] высказали предположение о флавиновой природе коэнзима ПОР. Найар и соавт. [113] на основании исследования фотоиндуцированного взаимодействия порфиринов и флавинов в модельных системах предположили, что *in vivo* (также, как и в модельных системах) флавины могут служить донором электрона в реакции фотовосстановления протохлорофиллида. В наших экспериментах [85], проведенных на целых этиолированных листьях кукурузы, было обнаружено фотоиндуцированное при низкой температуре увеличение зеленой флуоресценции, принадлежащей флавинам, одновременно с тушением флуоресценции протохлорофиллида. Эти данные также свидетельствуют о возможности участия флавинов в первичных фотохимических реакциях фотовосстановления протохлорофиллида.

Таким образом, на основании результатов, полученных целым рядом исследователей, можно заключить, что основными компонентами активного комплекса фотобиосинтеза хлорофилла являются: активная форма протохлорофиллида Пд 655/650; фотофермент ПОР, тирозиновая группа которого служит одним из доноров протона (для позиции C_{17}); НАДФН, служащий донором второго протона (гидрид-иона) и, возможно, флавиновый коэнзим фермента.

Апелем и сотр. [41, 43, 81, 82, 101, 118, 119, 128] было обнаружено существование двух типов ПОР, кодирующихся двумя разными генами. Было показано, что один из них (ПОР–А) активен в молодых растениях (первые 4 часа зеленения), второй активен как в молодых, так и во взрослых зеленых растениях (ПОР–В). ПОР–А и ПОР–В кодируются двумя различными генами: *PogA* и *PogB* (с 75% гомологии). ПОР–А синтезируется в темноте и составляет основную массу кристаллических ПЛТ этиопластов. Однако, транскрипция *PogA* гена прекращается на свету, и энзим быстро разрушается (первые 4 часа зеленения) индуцируемой светом протеазой [118, 119]. С другой стороны транскрипция *PogB* гена осуществляется и в темноте и на свету с непрерывной последующей трансляцией в энзим, ответственный за биосинтез и накопление хлорофилла на дневном свету. Более того, пластидный импорт цитоплазматического предшественника ПОР–А является Пд–зависимым, чего не наблюдается для предшественника ПОР–В [128]. В низших растениях и фотосинтетически активных прокариотах была обнаружена только ПОР–В в дополнение к структурно не связанному, активному в темноте Пд–восстанавливающему энзиму. У спороносящих растений (*Spermatophyta*) появляется дополнительно ПОР–А [41].

РОЛЬ АГРЕГАЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА И ПОР В ОБРАЗОВАНИИ ФОТОХИМИЧЕСКИ АКТИВНОГО КОМПЛЕКСА

Уже в ранних работах [28–30] высказывалось предположение о том, что длинноволновая активная форма протохлорофиллида Пд 655/650 представляет собой агрегат пигментных молекул. Об агрегационной природе длинноволновых форм свидетельствуют характерные особенности их спектров: сужение полос поглощения и флуоресценции активной формы Пд 655/650 в полтора–два раза по сравнению с формой П 633/628 указывает на возникновение сильного взаимодействия между электронными структурами хромофоров. Действие дезагрегирующих агентов (нагревание, добавки органических растворителей или детергентов) приводит к уменьшению или исчезновению длинноволновых спектральных полос и увеличению коротковолновых [4].

Исследования спектральных свойств модельных систем в сравнении со спектральными свойствами пигмента *in vivo* также привело к результатам, подтверждающим предположение об агрегированности активной формы предшественника хлорофилла.

Характерное для агрегатов энергетическое взаимодействие молекул протохлорофиллида в этиолированных листьях подтверж-

дается результатами исследований поляризации флуоресценции, кругового дихроизма и миграции энергии. Интенсивный двойной сигнал КД, по мнению ряда исследователей, принадлежит димеру или тетрамеру протохлорофиллида [84, 127, 132].

Обнаружение переноса энергии между молекулами протохлорофиллида, а также с протохлорофиллида на вновь образованный хлорофиллид позволило оценить величину (количество молекул) агрегированного комплекса, в котором осуществляется миграция энергии. Перенос энергии между спектрально различающимися формами предшественника хлорофилла в этиолированных листьях был впервые обнаружен в работе Канна и др. [91]. Изучение спектров поглощения и возбуждения флуоресценции этиолированных листьев и протохлорофиллид–голохромов на различных этапах фотопревращения показало существование при 77 К миграции энергии с коротковолновой формы предшественника (поглощение 637 нм) на его длинноволновую форму Пд 655/650 и с обеих этих форм на образующийся хлорофиллид. Существование переноса энергии между нативными пигментными формами в этиолированных и зеленеющих листьях подтверждено в более поздних исследованиях [4]. Результаты целого ряда работ говорят об эффективной миграции энергии на короткоживущие нефлуоресцирующие интермедиаты, образующиеся на первом этапе фотостановления протохлорофиллида. Теоретический анализ эффективности миграции энергии между протохлорофиллидом и образующимся хлорофиллидом позволил оценить величину (количество молекул) субъединицы, в которой осуществляется миграция энергии. [4]. Полученные разными авторами размеры миграционных комплексов протохлорофиллида близки по величине и составляют в среднем 20 молекул. В работе Литвина и Игнатова [14] были рассчитаны межмолекулярные расстояния в комплексе, которые составляют 17–30 Å.

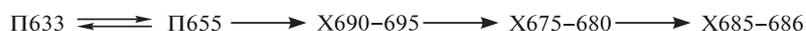
Таким образом, фотобиосинтез хлорофилла осуществляется в крупных комплексах, включающих около 20 молекул протохлорофиллида, ассоциированных с донором электрона НАДФН и ПОР. Поскольку с одной молекулой ПОР связаны 2–3 молекулы пигмента, строение активного пигмент–белкового комплекса представлялось как объединение нескольких комплексов пигмент–донор–фермент таким образом, что расстояние между молекулами пигмента позволяет осуществляться миграции энергии по индуктивно–резонансному механизму [4]. Следовательно фермент ПОР должен образовывать олигомеры. Предположения об агрегированном состоянии ПОР высказывались также Бедди с соавт. [51]. В

работе Викторсона и др. [141] осуществлялось фракционирование ПЛТ методом изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) на разных стадиях зеленения. Было показано, что даже на заключительном этапе образования хлорофилла во время сдвига Шибата пигмент и ПОР ассоциированы в одной и той же фракции ИЭФ. Авторы предположили, что коротковолновый спектральный сдвиг на этом этапе связан не просто с дезагрегацией пигмента, а прежде всего с разрушением агрегатов ПОР, что и приводит к дезагрегации пигмента. Исследование ПЛТ с помощью метода перекрестного связывания показало, что ПОР в проламеллярных телах пшеницы находятся в агрегированном состоянии, преимущественно в виде димеров. Прямая иллюстрация агрегированного состояния ПОР была приведена в работе Мартина и др. [108] при исследовании суммарного белка МСБ–ПОР (мальтозу связывающий белок—ПОР), полученного путем оверэкспрессии ПОР гороха в *Escherichia coli*. Методом гель–фильтрационной хроматографии очищенного МСБ–ПОР было показано, что нативный фермент существует преимущественно в димерном состоянии.

III. ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНАЯ СТАДИЯ БИОСИНТЕЗА ХЛОРОФИЛЛА ИЗ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА: ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ И МЕХАНИЗМ РЕАКЦИЙ

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ РЕАКЦИЙ В ПРОЦЕССЕ ОБРАЗОВАНИЯ ХЛОРОФИЛЛА ИЗ ПРЕДШЕСТВЕННИКА

Уже в конце 50–х годов было показано [28, 121, 122], что образование нативного хлорофилла из его предшественника протохлорофилла(ида) в зеленеющих листьях растений включает несколько промежуточных этапов: одну фотохимическую реакцию (собственно восстановление предшественника) и две температурозависимых темновых стадии. На основании исследования спектров флуоресценции [28] была предложена следующая схема реакций:



(цифра указывает положение максимума флуоресценции при 77 К. P633 — неактивная, P655 — активная форма предшественника.)

В то же время в этих ранних работах были получены указания на большую сложность процесса. В частности, в работе Литвина [29] было отмечено, что при низких интенсивностях действующего света первой обнаруживается не X690–695, а более коротковолновая форма с максимумом флуоресценции около 675 нм. Этот факт

нами (с помощью производной спектроскопии) дискретное превращение одной спектральной формы в другую (Хд 684/676 → Хд 690/680) возможно при малых размерах агрегата (две фотореакции в случае димера). Существование двух последовательных фотореакций в цепи биосинтеза хлорофилла было подтверждено исследованиями Торна [131], Матисса и Зауэра [110], Хеннингсена [80]. Результаты исследования кругового дихроизма в ходе последовательных реакций [110] позволили предположить образование смешанного димера (протохлорофиллид–хлорофиллид) в результате первой фотореакции и димера хлорофиллида в результате второй фотореакции.

При кратковременном (мсек) освещении, инициирующем протекание только первой фотореакции и последующем выдерживании освещенного листа в темноте обнаруживается, что в точке сопряжения двух фотореакций (продукт Хд 684/676) ответвляется боковой путь (1а на приведенной выше схеме), ведущий к образованию коротковолновой формы хлорофилла Хл 675/670. Эта реакция протекает с заметной скоростью только при температуре выше 273 К. Ее функционирование обнаруживается также и при длительном (минуты) облучении листьев светом низкой интенсивности при положительной температуре. При повышении интенсивности света вторая фотохимическая реакция начинает успешно конкурировать с боковой реакцией 1а, что приводит к торможению последней и переключению процесса на основной путь.

При отрицательных температурах темновая реакция заторможена, и процесс идет по основному пути как при низкой, так и при высокой интенсивности света.

Анализ экстрактов с помощью тонкослойной хроматографии показал, что продуктом боковой темновой реакции является не хлорофиллид, а хлорофилл. Таким образом, этерификация молекулы хлорофилла осуществляется не только во время сдвига Шибата (реакция 4 на схеме I), как считалось ранее [121, 122], но и со значительно большей (на порядок) скоростью на стадии обсуждаемой темновой реакции образования Хл 675/670 из продукта первой фотореакции. По-видимому, Хл 675/670 представляет собой одну из нативных форм хлорофилла. Наличие миграции энергии с этой формы на Хд 684/676 свидетельствует о ее близком расположении по отношению к центру биосинтеза основной массы пигмента.

Матисс и Зауэр [110], а позже Оливер и Гриффитс [115] подтвердили не только наш вывод о существовании двух последовательных фотореакций, но и всю приведенную выше схему световых и темновых стадий, включая боковую реакцию.

Судя по коротковолновому спектральному сдвигу, а также по фактам устойчивости продукта Хл 675/670 к дезагрегирующим воздействиям и лучшей (по сравнению с Хд 690/680) экстрагируемостью этого продукта, боковая реакция, по всей вероятности, сопровождается дезагрегацией пигмента. Подтверждением этому служит характер изменения спектров кругового дихроизма гомогенатов из освещенных этиолированных листьев на этом этапе процесса [110]. Можно предположить, что так же, как на стадии сдвига Шибата, дезагрегация способствует ферментативному процессу этерификации молекулы пигмента.

Реакция Хд 690/680 → Хд 695/685 (реакция 3 на схеме I), обнаруженная нами, как предполагалось, связана с изменениями пигмент–пигментного или пигмент–белкового взаимодействия. Позднее Эль Хамоури и Сиронваль [65], а затем Оливер и Гриффитс [115] пришли к заключению, что темновой длинноволновый сдвиг может быть связан с реконструкцией восстановленной формы нуклеотида НАДФН после фотореакции. Батохромное смещение спектральных полос может быть связано, как это показали исследования миграции энергии [14], и с уменьшением межмолекулярных расстояний в агрегате пигмента.

Следующая темновая реакция — сдвиг Шибата (реакция 4 на схеме I) связана с этерификацией хлорофиллида, дезагрегацией пигмента и с конформационной перестройкой хлорофилл–белкового комплекса, обеспечивающей возможность этерификации хлорофиллида [4].

ПЕРВИЧНЫЕ РЕАКЦИИ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА В ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ

Ранее считалось, что первым продуктом, образующимся под действием света из протохлорофиллида является нефлуоресцирующий интермедиат Х690 [4, 5, 46, 61, 35, 126], появление полосы поглощения которого наблюдали при 143–153 К. Тушение флуоресценции протохлорофиллида, сопровождающее появление этого интермедиата, приписывали миграции энергии с протохлорофиллида на Х690. Однако, некоторые данные позволяли предполагать более сложной как каритну первичных фотопревращений протохлорофиллида, так и их интерпретацию. В нашей работе [27, 106] было показано, что реакция образования нефлуоресцирующего интермедиата Х690 фотообратима. На основании исследования кинетики прямой и обратной фотореакций было высказано предположение о существовании еще одного короткоживущего интермедиата, предшествующего Х690.

Для выяснения возможности существования более ранних, чем X690, проявлений фотохимического акта казалось необходимым при исследовании первичных стадий фотовосстановления протохлорофиллида перейти к еще более низким температурам.

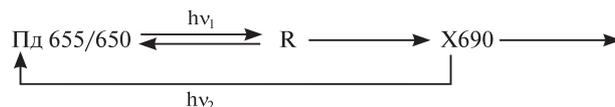
Нам удалось зафиксировать фотоиндуцированное тушение флуоресценции активной формы протохлорофиллида в этиолированных листьях не только при температуре жидкого азота (77 К), но и при температуре жидкого гелия (4,2 К) [47]. Это указывает на элементарный фотофизический характер первичной реакции, связанной с тушением флуоресценции протохлорофиллида.

Фотоиндуцированное тушение флуоресценции протохлорофиллида Пд 655/650 при глубоком охлаждении характеризуется очень низким квантовым выходом (на три порядка ниже, чем квантовый выход его фотовосстановления при комнатной температуре), который слабо изменяется при повышении температуры от 4,2 К до 153 К и резко возрастает при температурах выше 173—193 К [2].

Тушение флуоресценции активной формы протохлорофиллида, наблюдаемое при низких температурах, обратимо при повышении температуры до 233 К.

В более ранних работах фотоиндуцированное тушение флуоресценции протохлорофиллида П655/650 при низких температурах объясняли эффективной миграцией энергии с протохлорофиллида на интермедиат X690. Однако, первичный эффект действия света на этиолированный лист, проявляющийся по тушению флуоресценции протохлорофиллида, наблюдается в тех условиях, когда спектр поглощения листа практически неизменен [6, 49]. Таким образом, можно заключить, что эффект тушения флуоресценции отделен от реакции образования интермедиата X690. Об этом свидетельствует также факт фотоиндуцированного при 77 К тушения флуоресценции мономерного протохлорофиллида в разбавленных растворах, где отсутствует миграция энергии (см. ниже).

Расчеты показали, что причиной низкого квантового выхода процесса фотовосстановления протохлорофиллида в целом не может служить обнаруженная в работе [6, 49] фотообратимость реакции образования X690, а существует еще одно промежуточное звено, предшествующее образованию X690 и включающее быструю обратную реакцию, которая и понижает выход процесса в целом. Предполагаемый интермедиат обозначили индексом R (reversible):



Анализ спектральных изменений позволил предположить, что спектр поглощения первичного интермедиата R, преимущественно образующегося при 77 К, близок (если не идентичен) к спектру поглощения активной формы протохлорофиллида (при 80% тушении флуоресценции спектр поглощения практически не изменяется).

О появлении в цепи превращений протохлорофиллида короткоживущего интермедиата с полосой поглощения, близкой к полосе поглощения активной формы протохлорофиллида, свидетельствуют также данные спектроскопии высокого временного разрешения, полученные при физиологической температуре [90].

В нашей работе [86] существование нефлуоресцирующего интермедиата (предшествующего X690) со спектром поглощения, близким к спектру поглощения протохлорофиллида, было показано с помощью дифференциальной и производной спектроскопии этиолированных листьев, освещенных при 77 К. На основании анализа структуры дифференциальных спектров можно предположить, что полуширина полосы поглощения при 650 нм, принадлежащей интермедиату R, несколько больше, чем полуширина аналогичной полосы активной формы протохлорофиллида. Таким образом, первичный интермедиат R, образующийся в результате собственно фотореакции, близок по спектру поглощения к исходной форме протохлорофиллида, но отличается от нее очень низким квантовым выходом флуоресценции.

Повышение температуры освещения до 143 К приводит к увеличению константы скорости прямой реакции превращения интермедиата R в X690. С помощью низкотемпературной дифференциальной абсорбционной спектроскопии (77 К) было показано, что широкая полоса поглощения интермедиата X690 гетерогенна и состоит из двух полос: 688 и 697 нм, принадлежащих разным формам нефлуоресцирующих интермедиатов (R697 и R688), образующимся в параллельных реакциях, но отличающимся по скорости образования, которая выше для интермедиата R697. Повышение температуры освещенных листьев в темноте до 233 К приводит к превращению интермедиата X690 (R697 + R688) как в хлорофиллид, так и обратно в протохлорофиллид. Было установлено, что для образования первичных форм хлорофиллида (при повышении температуры) необходимо совместное накопление обоих нефлуоресцирующих интермедиатов: R697 и R688.

Таким образом, можно заключить, что фотовосстановление протохлорофиллида *in vivo* включает, по крайней мере, две элементарные реакции, которые можно зарегистрировать с помощью спектральных методов при очень низких температурах, при которых

стабилизируются продукты этих реакций — нефлуоресцирующие интермедиаты:



Образование нескольких лабильных короткоживущих интермедиатов процесса фотовосстановления протохлорофиллида удалось также наблюдать с помощью спектроскопии высокого временного разрешения при физиологических температурах [68, 90].

ПРЕДПОЛАГАЕМАЯ ПРИРОДА ПРОМЕЖУТОЧНЫХ ПРОДУКТОВ
ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА *IN VIVO*.
ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРОВ ЭПР

Обнаружение короткоживущих интермедиатов, стабилизирующихся при низких температурах, естественно позволяло предполагать, что эти интермедиаты являются промежуточными продуктами в ступенчатой реакции восстановления двойной связи в молекуле протохлорофиллида, которая может включать стадии переноса электронов, протонов и взаимодействия образующихся свободных радикалов. Нами были проведены сравнительные исследования низкотемпературных (77 К) оптических (поглощение и флуоресценция) и ЭПР спектров целых этиолированных листьев на разных стадиях фотовосстановления протохлорофиллида [6, 49]. В спектре ЭПР неосвещенного этиолированного листа при 77 К наблюдался очень слабый темновой сигнал. После освещения листьев интенсивным светом при низких температурах обнаружено возникновение бесструктурного синглетного сигнала ЭПР с g -фактором, 2,0021, характерным для свободного электрона. Ширина сигнала зависела от глубины процесса фотовосстановления протохлорофиллида (при разных температурах). Освещение этиолированных листьев при 77 К, когда преимущественно образуется нефлуоресцирующий интермедиат R, приводило к появлению синглетного сигнала ЭПР с шириной 1,1 мТл. При повышении температуры образца (непосредственно в радиоспектрометре) наблюдалось уменьшение ширины сигнала до 0,9 мТл при 213 К. Одновременно с накоплением интермедиата X690 (в листьях, освещенных при 153 К) в спектрах ЭПР обнаруживался синглетный сигнал с шириной 0,95 мТл. Одновременно с превращением нефлуоресцирующих интермедиатов в первичные формы хлорофиллида (при повышении температуры образца выше 223—233 К) резко уменьшается амплитуда сигнала ЭПР: при 253 К она достигает исходной темновой величины.

Таким образом, результаты сравнения оптических и ЭПР спектров позволяют заключить, что оба нефлуоресцирующих интерме-

диата R и X690 парамагнитны и характеризуются сигналами ЭПР с шириной соответственно 1,1 мТл и 0,95 мТл. Поскольку g-фактор сигнала ЭПР (2,0021) интермедиатов характерен для свободного электрона, то можно сделать вывод о том, что нефлуоресцирующие интермедиаты R и X690 представляют собой свободные радикалы пигмента (см. ниже).

ПЕРВИЧНЫЕ ПРОЦЕССЫ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРОТОХЛОРОФИЛЛА(ИДА) В МОДЕЛЬНЫХ СИСТЕМАХ

Другим путем выяснения механизма первичных стадий биосинтеза хлорофилла из предшественника и роли биологических структур в этом процессе послужило изучение реакции фотовосстановления протохлорофилла в простых системах. Попытки фотовосстановления протохлорофилла до хлорофилла вне клетки были предприняты в ряде работ. Наиболее ранние и систематические исследования в этом направлении проводились в лаборатории А.А.Красновского с использованием различных модельных систем (растворы, твердые пленки, мицеллярные растворы пигмента). В результате удалось достигнуть достаточно большого выхода продукта фотореакции (до 20%), идентифицированного как хлорофилл [9, 19]. Однако, в этих опытах реакция осложнялась побочными процессами, в частности, фотовосстановлением хромофора по системе сопряженных связей. В работе Бубличенко и соавт. [8] при проведении фотовосстановления протохлорофилла в растворах сильными восстановителями при низких температурах (243 К — 183 К) был обнаружен синглетный сигнал ЭПР, который, по мнению авторов, принадлежит анион-радикалу пигмента.

Оказалось, что осуществление первичных стадий фотовосстановления молекулы протохлорофилла в растворах и пленках возможно и без использования восстановителей [3, 6, 49]. По-видимому, донором водорода служит растворитель. При исследовании разбавленных растворов протохлорофилла и протохлорофиллида (10^{-6} М, мономерная форма) после освещения образцов при 77 К был обнаружен эффект тушения флуоресценции, который оказался практически полностью обратимым при последующем повышении температуры до 273 К. Однако, после освещения образца не наблюдалось уменьшения полос поглощения протохлорофилла, соизмеримого с изменением флуоресценции, и появления каких-либо новых полос. Другим эффектом, обнаруженным методом ЭПР, было возникновение при освещении образца (77К) синглетного сигнала ЭПР с g-фактором 2,0013 и шириной синглетной полосы 1,2 мТл, который появлялся одновременно с тушением флуоресценции и

быстро исчезал при повышении температуры, параллельно с возгоранием флуоресценции. Таким образом, можно заключить, что начальная (обратимая) стадия фотовосстановления мономерного протохлорофилла *in vitro* представляет собой образование продукта, близкого по положению красной полосы поглощения к исходному хромофору, но отличающегося от него низким выходом флуоресценции и парамагнитностью. Продукт исчезает при повышении температуры до 253 К, превращаясь обратно в исходное вещество. Полученные по спектрам ЭПР данные позволяют предположить, что механизм этой реакции включает перенос электрона с образованием свободного радикала пигмента. Сравнение с опытами на целых этиолированных листьях (см. выше) показывает, что в этих модельных экспериментах, по-видимому, воспроизводится самая начальная стадия реакции фотовосстановления предшественника хлорофилла, проявляющаяся *in vivo* в тушении флуоресценции активной формы протохлорофиллида Пд 655/650 с образованием парамагнитного интермедиата R.

Было показано, что в системах с агрегированным протохлорофиллом, осуществляется более глубокое превращение, включающее как первую (образование интермедиата R), так и следующую (образование интермедиата X690) стадию фотовосстановления протохлорофилла в листьях растений. Очевидно, что вторая стадия процесса связана с участием агрегированной длинноволновой формы пигмента. Большая по сравнению с мономером пигмента глубина превращения агрегата протохлорофилла может служить объяснением причины высокой активности длинноволновой формы протохлорофиллида Пд 655/650 *in vivo*, которую можно связать с взаимодействием в процессе двух хромофоров пигмента.

ПРЕДПОЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ПЕРВИЧНЫХ РЕАКЦИЙ ФОТОВОССТАНОВЛЕНИЯ ПРЕДШЕСТВЕННИКА ХЛОРОФИЛЛА

Если исходить из сопоставления структуры молекул хлорофиллида и его предшественника, фотохимическая стадия биосинтеза хлорофилла представляет собой восстановление полуизолированной двойной связи 7—8 в IV пиррольном кольце. Полученные нами результаты исследования фотовосстановления протохлорофиллида *in vivo* и *in vitro* позволяют предположить, что идентифицированные промежуточные стадии скорее всего соответствуют элементарным реакциям переноса двух электронов и двух протонов к пигментной молекуле.

Первичная фотореакция проявляется по тушению флуоресценции активной формы предшественника и по появлению сигнала ЭПР после освещения листа при глубоком охлаждении. Спектр

поглощения остается практически неизменным. Эта первичная фотореакция осуществляется и в разбавленных растворах протохлорофилла(ида), освещаемых при 77 К. Тушение флуоресценции при неизменном спектре поглощения возможно в случае преобразования под действием света слабого комплекса с переносом заряда в более устойчивый комплекс [11]. Разделение зарядов между донором электрона и протохлорофиллидом сопровождается образованием анион–радикалов пигмента ($P^{\cdot-}$). Поскольку продукт первичной реакции — нефлуоресцирующий интермедиат R характеризуется сигналом ЭПР с g–фактором свободного электрона, можно заключить, что он представляет собой анион–радикал пигмента, стабильный при низкой температуре в жесткой матрице. Близость спектра поглощения интермедиата R, образующегося в твердой фазе при глубоком охлаждении, к спектру исходного протохлорофиллида свидетельствует о том, что электрон, воспринимаемый молекулой пигмента, изолирован от π –электронной конъюгированной системы ее хромофора. Дальнейшее превращение (темновое образование хлорофиллида) говорит о локализации электрона по связи 7–8 IV пиррольного кольца. Такая локализация, по–видимому, возможна в результате специального взаиморасположения молекул пигмента и донора водорода в активном пигмент–белковом комплексе, обеспечиваемого ферментом протохлорофиллид–оксидоредуктазой.

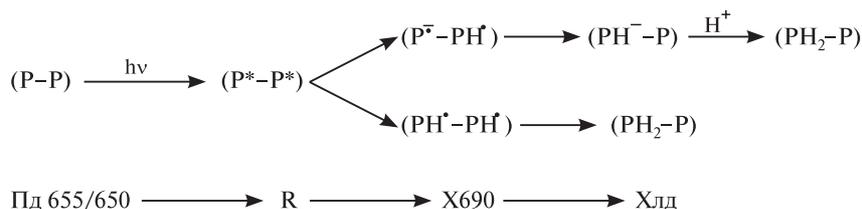
Следующая реакция ($R \rightarrow X690$) приводит к появлению второго нефлуоресцирующего парамагнитного продукта. Поскольку эта реакция эффективно протекает при более высоких температурах, чем образование интермедиата R, а соответствующий сигнал ЭПР имеет g–фактор свободного электрона, естественно предположить, что эта реакция представляет собой следующую стадию восстановления молекулы протохлорофиллида — присоединение протона с образованием нейтрального радикала (PH).

Наиболее вероятным механизмом дальнейшего превращения полувосстановленных интермедиатов в хлорофиллид, по нашему мнению, может быть диспропорционирование свободных радикалов (в условиях высокой локальной концентрации молекул пигмента *in vivo*). В пользу этого предположения свидетельствует целый ряд фактов, в частности: 1) димерное состояние активной формы протохлорофиллида *in vivo*; 2) тот факт, что в исследованных нами модельных системах необратимое фотовосстановление осуществляется только при наличии агрегатов пигмента; 3) описанное выше наблюдение, согласно которому интермедиат X690 представляет собой смесь двух компонентов: R697 и R688, превращение

которых в хлорофиллид осуществляется только при их совместном накоплении. Известно, что атомы водорода по связи 7—8 в молекуле хлорофиллида располагаются в транс-положении, поэтому можно предположить, что интермедиат X690 (R697 + R688) представляет собой смесь радикалов — стереоизомеров полувосстановленной формы пигмента.

Поскольку реакция фотовосстановления протохлорофиллида осуществляется в рамках жесткого донорно—акцепторного комплекса, включающего агрегат пигмента, вероятно возможна как диспропорционирование нейтральных радикалов: $\text{PH}^\cdot + \text{PH}^\cdot = \text{PH}_2 + \text{P}$, так и смешанного диспропорционирования между нейтральным радикалом и анион—радикалом: $\text{PH}^\cdot + \text{PH}^- = \text{PH}_2 + \text{P}$.

Исходя из данных о димерной форме активного протохлорофиллида, механизм первой фотореакции можно представить в виде следующей гипотетической схемы:



Однако, нельзя исключить некоторую вероятность завершения реакции путем последовательного переноса второго электрона и протона. Механизм второй фотореакции (Хд 684/676 → Хд 690/680), по-видимому, отличается от механизма первой фотореакции (Пд 655/650 → Хд 684/676), о чем свидетельствует ее на порядок большая энергия активации. Этот вопрос требует дальнейших исследований (см. схему I).

Дальнейшее темновое превращение нефлуоресцирующих интермедиатов приводит к образованию четырех первичных форм хлорофиллида, характеризующихся максимумами флуоресценции при 684, 690, 695 и 706 нм [48]. Образование нескольких спектрально различных первичных форм хлорофиллида на ранних этапах зеленения листьев свидетельствует об очень раннем дифференцировании нативного пигмента, которое, по-видимому, связано с разветвлением путей образования функционально различных форм хлорофилла, в частности, пигментов РЦ фотосистем и пигментов светособирающего комплекса.

IV. ПУТИ БИОСИНТЕЗА ПИГМЕНТНЫХ КОМПОНЕНТОВ ФОТОСИСТЕМЫ 2

Способность к фотосинтезу и активность двух фотосистем фотосинтеза начинают проявляться на достаточно ранних стадиях зеленения этиолированных листьев и мутантов водорослей [79, 116, 124, 137]. Однако, процесс возникновения фотосинтетической активности развивается более медленно, чем происходит фотовосстановление протохлорофиллида. Это позволяет предполагать, что «старт» фотосинтеза определяется не только биосинтезом молекул ключевого пигмента хлорофилла, но и иницируемым светом биогенезом специализированных пигмент–белковых комплексов — реакционных центров фотосинтеза. Возникает вопрос: нельзя ли проследить не только биосинтез основной массы хлорофилла (см. выше), но и биогенез реакционных центров фотосинтеза, формирующихся в процессе зеленения листьев. В последнее время предпринят ряд исследований биогенеза белковых компонентов реакционных центров фотосинтеза методами анализа белкового состава пигмент–белковых комплексов, формирующихся в листьях и водорослях в процессе их зеленения, и сопоставления их с комплексами зрелых растений [69, 95, 144]. Другой подход основан на исследовании биосинтеза пигментных компонентов, входящих в состав реакционных центров фотосинтеза, непосредственно в целых клетках и листьях растений с помощью спектральных методов.

БИОСИНТЕЗ ПИГМЕНТНЫХ КОМПОНЕНТОВ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФС–2 ПРИ ЗЕЛЕНЕНИИ РАЗВИТЫХ ЭТИОЛИРОВАННЫХ РАСТЕНИЙ

В работах А.А.Красновского, В.В.Климова, В.А.Шувалова [96, 97] была установлена роль феофитина *a* как важнейшего компонента реакционных центров фотосистемы 2 высших растений. Установлено [34, 136], что практически весь феофитин *a* сосредоточен в этих центрах. Вместе с тем путь биосинтеза феофитина до недавнего времени оставался неизвестным; его присутствие в препаратах обычно относилось за счет феофитинизации хлорофилла в процессе выделения и хроматографической очистки пигмента.

Путь образования феофитина в листьях растений был установлен при детальном исследовании ранее открытой [24] «боковой» реакции биосинтеза хлорофилла, наблюдающейся при освещении этиолированных листьев светом низкой интенсивности (см. выше). В работе [16] было обнаружено, что при освещении этиолированных листьев светом низкой интенсивности, наряду с хлорофиллом *a*,

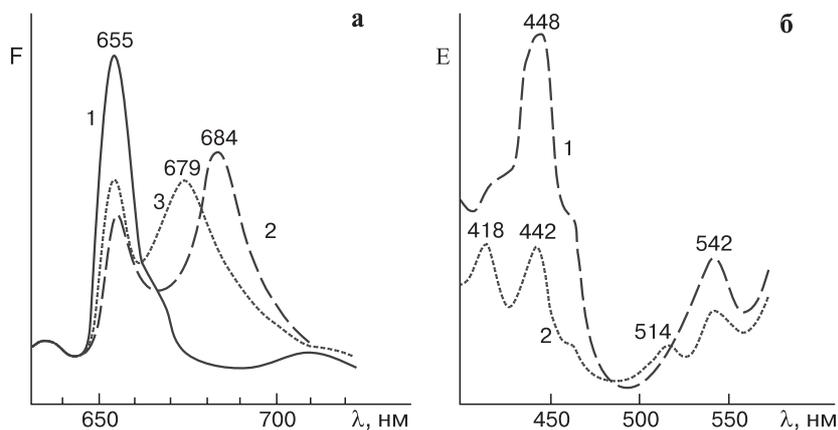


Рис. 1. Биосинтез феофитина *a* при освещении развитых этиолированных растений кукурузы.

а — изменение спектров флуоресценции этиолированных листьев при протекании реакций Пд 655/650 → Хд 684/676 → Фео 679/675.

1 — неосвещенный лист; 2 = 1 + 4 сек света 10^2 Вт/м², 3 = 2 + 15 сек в темноте при 27 °С.

б — изменение спектров возбуждения длинноволновой флуоресценции этиолированных листьев в ходе реакции Хд 684/676 → Фео 679/675.

1 — спектр возбуждения для Хд 684/676; 2 — спектр возбуждения для Фео 679/675.

синтезируется и феофитин *a* (рис. 1). При этом было показано, что первичная реакция фотовосстановления протохлорофиллида Пд 655/650 → Хд 684/676 является общей для синтеза хлорофилла *a* и феофитина *a*, затем пути их биосинтеза разветвляются (рис. 2). Основной путь, инициируемый второй фотореакцией Хд 684/676 → Хд 690/680, приводит через ряд хорошо изученных нативных форм (сдвиг Шибата) к образованию пула хлорофилла *a*. Судя по количеству хлорофилла, синтезируемого этим путем, его связи с каротиноидами и с позднее синтезирующимся хлорофиллом *a* [39, 40], этот пул можно идентифицировать с хлорофиллом антенны. «Боковая цепь» темновых реакций ведет к образованию как хлорофилла *a*, так и феофитина *a*. Конечный продукт этой реакции, который ранее обозначался как Хл 675/670, в действительности представляет собой совокупность двух форм хлорофилла (Хл 671/668 и Хл 675/668) и нативной формы феофитина Фео 679/675.

Было установлено также, что реакция образования феофитина имеет биосинтетический, а не деструктивный характер: она проте-

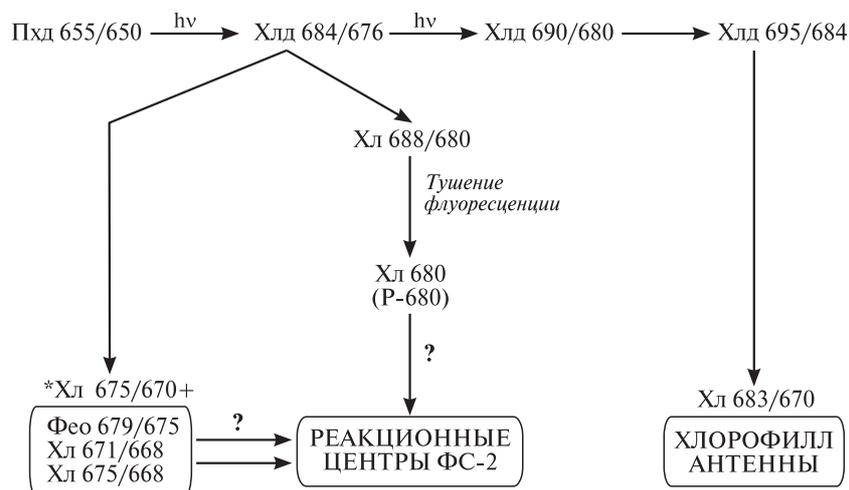


Рис. 2. Соотношение путей биосинтеза хлорофилла антенны и пигментов реакционных центров фотосистемы 2 в развитых этиолированных растениях.

кает только при сохранении целостности пигмент–белковых комплексов, которые разрушаются даже при получении гомогенатов. Реакция имеет температурный оптимум при физиологических условиях, необратимо подавляется при нагревании выше 50°C. Она активируется в присутствии АТФ и ингибируется АМФ.

Дальнейшие исследования указывали на сложность этого процесса [87]. Оказалось, что образовавшийся феофитин может претерпевать обратное превращение в хлорофилл Хл 671/668 в ходе темновой реакции и что эта реакция обращается под действием света. Можно предположить, что обнаруженная фотообратимая реакция Фео 679/675 → Хл 671/668 взаимопревращения двух пигментов с полосами поглощения, характерными для феофитина и коротковолнового хлорофилла D₁/D₂ комплексов реакционных центров фотосистемы 2 [59], служит причиной известного эффекта фотоиндуцированного изменения соотношения Фео/Хл в РЦ ФС–2 [99, 101].

Таким образом, можно считать установленным, что в этиолированных листьях осуществляется биогенез нативного комплекса феофитина и хлорофилла. Возникает вопрос, в какой мере этот комплекс идентичен феофитинсодержащим реакционным центрам ФС–2. Можно указать несколько черт их сходства, помимо основного факта — присутствия феофитина. К ним относятся: близость

(или идентичность) положения максимумов полос поглощения описанных выше нативных форм феофитина Фео 679/675, коротковолнового хлорофилла Хл 671/668 и их аналогов в высокоочищенных D_1/D_2 комплексах РЦ ФС–2 [59], положение спектра и данные измерений кругового дихроизма, свидетельствующие о том, что в обеих структурах эти пигменты представлены мономерами [66, 110, 127], близкое соотношение Фео/Хл (около 0,5) в сравниваемых комплексах [16, 112], раннее формирование активности фотосистемы 2 при освещении зеленеющих этиолированных листьев [79], наличие характерного для РЦ ФС–2 полипептида в пигментных комплексах этиолированного листа [94, 95, 111].

С другой стороны, высокий квантовый выход флуоресценции феофитина в зеленеющих листьях свидетельствует о различии состояния молекулы в этих структурах и в РЦ, а также об отсутствии фотохимической активности феофитинсодержащих комплексов зеленеющих этиолированных листьев. Возможно это связано с отсутствием второго, хлорофиллового компонента РЦ ФС–2 (Р–680), идентификация путей биосинтеза которого оказалась более трудной методической задачей, чем для биосинтеза феофитина.

Для решения этой проблемы авторами работы [13] была применена предварительная инкубация этиолированных листьев при 38 °С. Ранее [83, 139] было показано, что такого рода обработка может существенно изменять соотношение скоростей отдельных реакций биосинтеза хлорофилла у зеленеющих мутантов водорослей, не оказывая, в то же время, повреждающего воздействия на пигмент–белковые комплексы. В 7–10–дневных этиолированных листьях кукурузы и гороха, освещенных после темновой инкубации при 38 °С, обнаружена новая темновая реакция продукта фотовосстановления протохлорофиллида Пд 655/650: она проявляется (рис. 3) по батохромному смещению спектральных полос хлорофиллида Хд 684/676 и сопровождается этерификацией пигмента до хлорофилла: Хд 684/676 → Хл 688/680. После завершения этой реакции наблюдалось быстрое (20–30 сек) полное тушение флуоресценции ее продукта Хл 688/680 → Хл 680 (см. рис. 1 и 3). Авторы работы [13] отождествляют конечный продукт этой цепи темновых реакций — нефлуоресцирующий хлорофилл Хл 680, с пигментом реакционного центра ФС–2 — Р–680, приводя в пользу своей гипотезы следующие доводы: 1) положение максимума поглощения Хл 680 совпадает с положением максимума дифференциального спектра Р–680, который, как известно, послужил основой для идентификации этой формы пигмента реакционного центра. 2) Прямым предшественником Хл 688/680 служит интермедиат Хд 684/676,

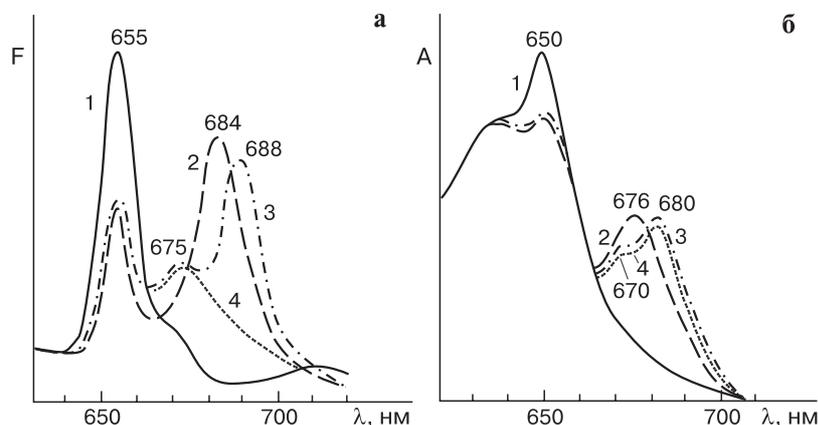
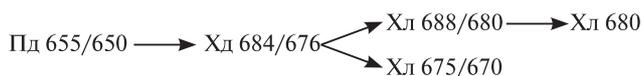


Рис. 3. Разветвление цепи темновых реакций биосинтеза хлорофилла в листьях развитых этиолированных растений, зеленеющих в условиях «теплого шока» (38 °С).



а — спектры низкотемпературной флуоресценции (–196 °С),

б — спектры поглощения (–196 °С) этиолированных листьев.

1 — неосвещенный лист; 2 = 1 + 4 сек света; 3 = 2 + 15 сек в темноте; 4 = 3 + 60 сек в темноте при 27 °С.

который является димером [110, 127]. С другой стороны, и Р–680, как предполагают, представляет собой димер хлорофилла [52, 53]. Оба пигмента служат акцепторами энергии возбуждения с других пигментов и вместе с тем их флуоресценция оказывается потушенной. 3) Конечная стадия образования хлорофилла Хл 688/680, проявляющаяся по тушению флуоресценции пигмента, не обнаруживается у мутантов гороха с нарушением функций реакционного центра фотосистемы 2 [13]. Дополнительные исследования показали [13, 17, 87], что соотношение скоростей двух конкурирующих темновых реакций хлорофиллида Хд 684/676 (реакции, ведущей к образованию феофитинсодержащего комплекса «Хл 675/670» и реакции, ведущей к образованию нефлуоресцирующего хлорофилла Хл 680) зависит от ряда внешних факторов (рис. 4). Реакция образования Хл 680 (в отличие от конкурирующего процесса) ингибируется в отсутствие кислорода и в присутствии цианидов; реакция образования «Хл 675/670» стимулируется в присутствии АТФ и ингибируется в среде с D₂O и при добавлении АМФ. Эти данные

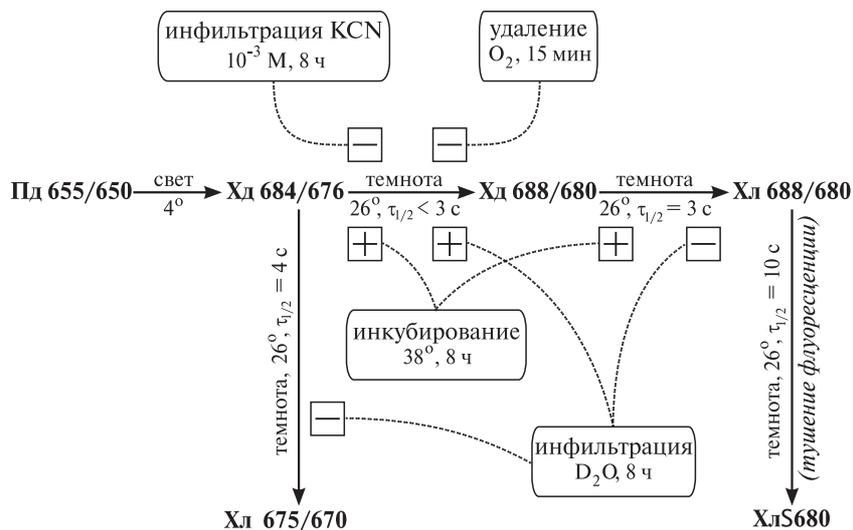


Рис. 4. Условия наблюдения темновых реакций хлорофиллида Хд 684/676 при 26 °С.

Штриховые линии — влияние ингибирующих (—) и стимулирующих (+) внешних факторов.

указывают на различный механизм формирования «Хл 675/670» и Хл 680.

Приведенные результаты (они обобщены на рис. 2) позволяют сделать ряд заключений. Протохлорофиллид Пд 655/650 в 7—10-дневных этиолированных листьях является общим предшественником пигментов РЦ ФС-2 (феофитина, хлорофилла Р-680 и коротковолновой формы хлорофилла РЦ) и хлорофилла антенны. Формирование этих комплексов происходит в результате протекания трех конкурирующих параллельных процессов — двух темновых и одной фотохимической реакции интермедиата Хд 684/676. Нативная форма хлорофиллида Хд 684/676, первой образующаяся из Пд 655/650, является точкой тройного разветвления цепи биосинтеза пигментов РЦ ФС-2 и хлорофилла антенны. Антенный хлорофилл формируется при освещении образцов, содержащих Хд 684/676, через реакции «Шибатовского сдвига». В темноте Хд 684/676 участвует в двух конкурирующих процессах: первый из них — реакция образования феофитина и коротковолнового хлорофилла со спектральными свойствами, близкими к аналогичным пигментам реакционного центра. Вторая темновая реакция ключевого интерме-

диата Хд 684/676 включает формирование более длинноволнового хлорофилл–содержащего комплекса Хл 688/680 и последующее полное тушение флуоресценции этого пигмента. Тушение флуоресценции блокируется в мутантах с дефектами РЦ ФС–2, что (учитывая спектр поглощения хлорофилла Хл 680) позволяет отождествить продукт этой цепи биосинтеза с первичным донором РЦ ФС–2 — хлорофиллом Р–680.

Основываясь на приведенной схеме следует ожидать, что при освещении этиолированных листьев светом низкой интенсивности должно наблюдаться ускорение биогенеза РЦ ФС–2 по сравнению с биосинтезом антенного хлорофилла. Это заключение подтверждается результатами прямых измерений относительного содержания РЦ и пигмент–белковых комплексов антенны в этиолированных листьях, зеленеющих при слабом и интенсивном освещении: доля РЦ возрастает при замене интенсивного освещения светом низкой интенсивности [109, 114].

Представляет интерес сопоставить сделанные выше заключения, основанные на интерпретации эффектов формирования феофитина и тушения флуоресценции Хл 680, рассматриваемых в качестве критериев биогенеза ФС–2, с наблюдениями авторов, использовавших иные подходы и критерии к исследованию проблемы формирования ФС–2. Судя по времени, прошедшему с начала освещения этиолированного листа (10–20 сек) оба описанных выше эффекта могут отражать наиболее раннюю стадию формирования ядра ФС–2 — биогенез фотоактивного комплекса РЦ ФС–2; первые признаки фотосинтетического выделения кислорода удается наблюдать позднее — через 20–30 минут освещения [79], индукцию флуоресценции при 77 К и 293 К — через 2 часа зеленения [36, 67]. Сопоставление этих данных позволяет предположить следующую последовательность формирования компонентов ядра ФС–2 и включения их в единый комплекс: биогенез РЦ ФС–2 → формирование кислородвыделяющего комплекса → формирование внутренней антенны комплекса.

БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА ФОТОСИСТЕМЫ 2 НА РАННИХ СТАДИЯХ РАЗВИТИЯ РАСТЕНИЙ

Основой для исследований заключительной стадии биосинтеза хлорофилла из его предшественника протохлорофиллида, в листьях растений в большинстве своем послужили наблюдения за протеканием этого процесса при освещении выращенных в темноте т.н. этиолированных растений. Как правило, в этих экспериментах использовались «развитые» этиолированные растения, выращиваемые

в темноте в течение достаточно длительного времени (7—12 суток) и благодаря этому накопившие удобные для измерений большие количества протохлорофиллида. Эти исследования оставили открытым вопрос о возможной эволюции процесса биосинтеза хлорофилла в ходе развития растения, в частности при прорастании растений на свету, в ювенильном периоде их развития. Этот глобальный процесс, приводящий каждую весну в планетарных масштабах к биосинтезу гигантских количеств пигмента, по-видимому, может также отличаться и от активно исследуемого в последнее время репарационного («ремонтного») биосинтеза хлорофилла во взрослых зеленых растениях (в их уже сформировавшихся хлоропластах) с участием протохлорофиллидредуктазы ПОР–В (см. выше и [103]). В качестве «промежуточного звена» между указанными крайними ситуациями (взрослыми этиолированными и взрослыми зелеными растениями) полезными оказались результаты [18], полученные для этиолированных растений, исследовавшихся на самой ранней стадии их развития — через 3—4 дня после прорастания семян (далее ювенильные растения), когда физиологические различия между растущими в темноте и на свету растениями [22], по-видимому, выражены еще не столь кардинально.

Кратковременное освещение ювенильных этиолированных растений приводит (как и в случае их развитых аналогов) к формированию хлорофиллида Хд 684/676, который при комнатной температуре участвует уже не в одной, а в двух темновых реакциях: $\text{Хд } 684/676 \rightarrow \text{Хл } 675/670$ и $\text{Хд } 684/676 \rightarrow \text{Хл } 688/680 \rightarrow \text{Хл } 680$ (рис. 5). Примечателен тот факт, что вторая из этих реакций хлорофиллида Хд 684/676 протекает естественным образом, без воздействия искусственных внешних факторов (тепловой шок, D_2O), которые были необходимы для инициирования аналогичного процесса в зрелых растениях. В целом, оба указанных темновых процесса, и реакция, ведущая к образованию Хл 680, и реакция формирования Хл 675/670, судя по соотношению концентраций конечных продуктов, положению спектров интермедиатов, скорости протекания, зависимости от внешних факторов (температура, O_2 , KCN) весьма схожи с аналогичными боковыми реакциями, наблюдавшимися в развитых этиолированных растениях после теплового шока. Тем не менее, ряд результатов позволяет предполагать, что превращение хлорофиллида Хд 684/676 в ювенильных и в зрелых этиолированных растениях протекает в пигментных комплексах различающегося состава. Так, несмотря на совпадение полос флуоресценции (684 нм) и длинноволновых полос поглощения (676 нм), спектры возбуждения флуоресценции интермедиата Хд 684/676 содержали для

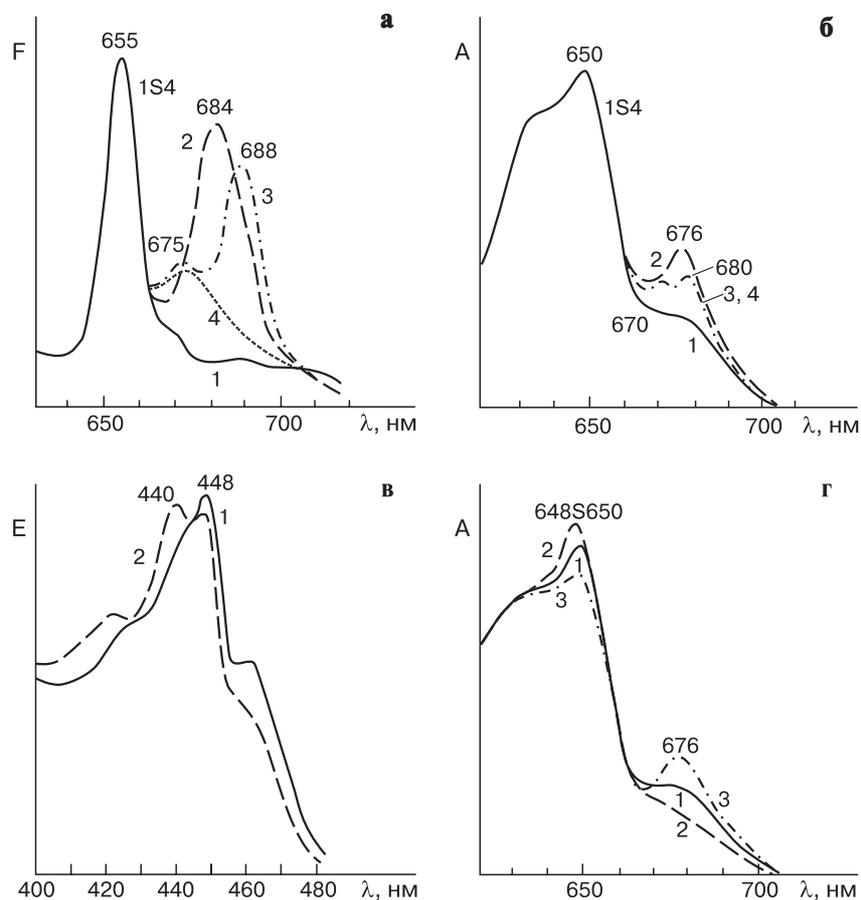


Рис. 5. Реакции заключительного этапа биосинтеза хлорофилла в этиолированных листьях ювенильных растений.

а и б — низкотемпературные спектры флуоресценции и поглощения листьев, соответственно: 1 — неосвещенный образец; 2 = 1 + 4 сек освещения белым светом 10^2 Вт/м²; 3 = 2 + 20 с в темноте, 4 = 3 + 2 мин в темноте.

в — спектры возбуждения низкотемпературной (-196 °С) флуоресценции интермедиата Хд 684/676 в развитых (1) и ювенильных (2) этиолированных растениях.

г — последовательное протекание цепи реакций Пд 686/676 → Пд 653/648 → Хд 684/676, прослеженное по спектрам поглощения ювенильных этиолированных растений: 1 — неосвещенный образец, 2 = 1 + 30 сек освещения монохроматическим светом 680 нм, 3 = 2 + 30 сек освещения монохроматическим светом 650 нм.

зрелых растений только одну полосу Соре 448 нм (Хд 684/676(448)). Полоса Соре у этого же интермедиата в ювенильных растениях состояла из двух равных составляющих при 440 и 448 нм (интермедиат Хд 684/676(440) рис. 5г). Также отличались полосы Соре и у флуоресцирующих продуктов длинноволновых боковых реакций Хл 688/680(448) и Хл 688/680(440) соответственно.

Вторым существенным отличием процесса в ювенильных растениях было то, что накопление Хд 684/676(440) в течение первых 3–5 секунд освещения белым светом 10^2 Вт/м² протекало без заметных изменений полос поглощения и флуоресценции протохлорофиллида Пд 655/650 (рис. 5а и 5б), хотя фотопревращение протохлорофиллида (судя по экстрактам) при этом происходило. Опыты с применением как монохроматического освещения (в области 680 нм — рис. 5г), так и освещения белым светом при различных температурах позволили прийти к заключению, что эта парадоксальная лаг-фаза является кажущейся и объясняется фотопревращением неизвестной ранее слабофлуоресцирующей формы протохлорофиллида Пд 686/676(440) в интермедиат Пд 653/648(440) и далее в хлорофиллид Хд 684/676(440). Кратковременное накопление интермедиата с полосами флуоресценции и длинноволнового поглощения, близкими к спектрам основной фотоактивной формы предшественника Пд 655/650(448), временно компенсирует убыль полос пигмента у упомянутого последним. В целом, процесс в ювенильных растениях при их освещении белым светом можно описать одновременным протеканием двух цепей реакций (схема II):

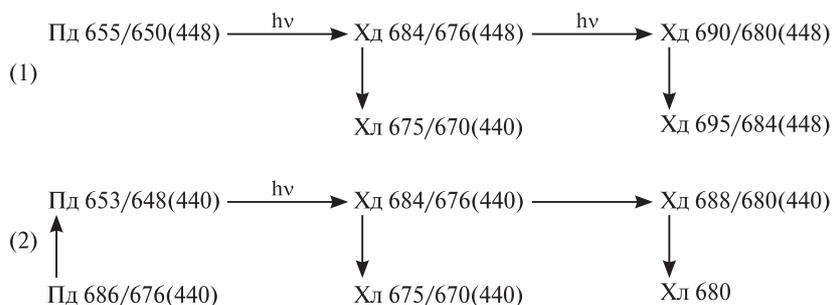


Схема II. Процессы, протекающие в ювенильных растениях при их освещении белым светом.

Относительное содержание Пд 686/676(440) по отношению к Пд 655/650(448) наиболее велико в 3–4-дневных этиолированных листьях (20–25%); в развитых 7–12-дневных растениях эту форму

и продукты ее фотопревращения на фоне 10—15-кратного возрастания концентрации Пд 655/650(448) и соответствующих фотопродуктов зарегистрировать уже не удастся. Но даже в таких оптимальных 3—4-дневных ювенильных образцах оказалось невозможным наблюдать изолированное протекание цепи реакций (2); более того, совместное протекание цепей реакций (1) и (2) удается наблюдать только до момента исчерпания фонда Пд 686/676(440): 5—10 сек при освещении белым светом 10^2 Вт/м². При более длительном освещении наблюдается только цепь реакций (1) — превращение доминирующей формы протохлорофиллида Пд 655/650(448) и последующих нтермедиатов.

Таким образом, в этиолированных листьях на начальной стадии их развития, кроме известного ранее комплекса Пд 655/650(448), формируется комплекс длинноволнового протохлорофиллида Пд 686/676(440), являющийся предшественником нефлуоресцирующего хлорофилла Хл 680 (РЦ ФС—2 см. выше). Дальнейший синтез протохлорофиллида с ростом этиолированных растений в темноте приводит в основном к увеличению фонда Пд 655/650(448), т.е. предположительно, к преимущественному накоплению предшественника антенного хлорофилла. Приоритетное формирование комплекса предшественника для РЦ при прорастании семян, по-видимому, не является случайным и обуславливает своим ранним биогенезом обсуждавшееся выше первоочередное формирование РЦ по сравнению с другими компонентами ФС—2.

В настоящее время трудно объяснить механизм переключения цепи реакций (1), наблюдавшегося для развитых этиолированных растений в условиях теплового шока, на путь формирования Хл 680, характерный для ювенильных растений. Однако, тот факт, что даже в условиях теплового шока ключевые для рассматриваемого процесса интермедиаты Хд 684/676(448) и Хл 688/680(448) сохраняют положение полос Соре, характерное для развитых этиолированных растений (т.е. 448 нм, а не 440 нм), свидетельствует о том, что эта искусственно стимулированная реакция образования Хл 680 протекает в комплексе, для которого она является в естественных условиях не главной, а минорной (в отличие от комплекса Хд 684/676(440) ювенильных растений, где она доминирует без дополнительной стимуляции).

Природа новой цепи реакций (2), ведущей к биосинтезу РЦ ФС—2 неясна. Вызванный светом коротковолновый сдвиг полос протохлорофиллида (1-я стадия цепи реакций (2) схемы II) и отсутствие прямого превращения Пд 686/676(440) в хлорофиллид могут быть связаны с фотодезагрегацией пигмента в активном

центре ПОР, что в свою очередь, возможно, обеспечивает необходимые конформационные условия для фотовосстановления Пд 653/647(440) до хлорофиллида. Деагрегация димера ПОР, предполагаемая в работе [129] в данном случае представляется маловероятной: фотореакция Пд 686/676(440) → Пд 653/647(440) протекает и при 77 К. В то же время фотодеагрегация Пхл, сопровождающаяся коротковолновым сдвигом полос пигмента и протекающая как при 293 К, так и при 77 К, обнаружена для агрегатов несвязанного с ПОР пигмента во внутренних оболочках семян тыквы [12, 15]). В пользу деагрегационной гипотезы свидетельствует и тот факт, что фотореакция Пд 686/676(440) → Пд 653/648 (440) блокируется в присутствии D₂O — ингибитора деагрегации пигментов в Хд/Пд—содержащих комплексах зеленеющих листьев [31].

РЕАКЦИИ БИОСИНТЕЗА ПИГМЕНТОВ РЦ ФС–2 В ЗЕЛЕННЫХ ЛИСТЬЯХ

Естественным представляется предположение, не станет ли цепь реакций (2) доминировать при фотопревращении протохлорофиллида, ресинтезирующегося в ненадолго затемненных зеленых листьях (хлоропластах): казалось бы, фактор этиоляции в этом случае должен быть выражен в еще меньшей степени, чем для ювенильных растений? Как показали измерения спектров поглощения, излучения и возбуждения флуоресценции [18], при затемнении зеленых листьев за несколько часов на фоне уже существовавших интенсивных полос хлорофилла формируются слабые полосы фотоактивной формы Пд 655/650(448) и более коротковолновых неактивных форм предшественника П 632/628 и П 644/637. Этот процесс ресинтеза был многократно описан для ряда высших растений ранее [21, 31, 70, 102, 133]. В частности, Лебедевым и сотр. был исследован ресинтез и фотопревращение ресинтезированного Пд 655/650 в затемнявшихся зеленых растениях фасоли [21, 102]. Однако в последнее время ими описаны мутанты *Arabidopsis* [101] и трансгенные комплексы ПОР–В из этиолированных листьев ячменя [104], в которых ресинтез Пд 655/650 не происходит: фотоиндуцированное накопление хлорофилла в этих образцах происходит за счет фотопревращения более коротковолновых форм ресинтезирующегося предшественника — с флуоресценцией при 645 и 633 нм.

Как оказалось, судить о темновом накоплении Пд 686/676(440) на фоне интенсивных спектральных полос хлорофилла в экспериментах с кратковременным затемнением зеленых листьев невозможно. Однако тот факт, что при последующем освещении затемнявших-

ся образцов полосы ресинтезированного в темноте Пд 655/650(448) сменялись равными по величине полосами Пд 653/648(440), свидетельствует, во-первых, об одновременном протекании начальных стадий цепей реакций (1) и (2) и, во-вторых, о примерно равном вкладе этих процессов в наблюдающийся эффект [18]. В соответствии с приведенной выше схемой, дальнейшее увеличение длительности освещения приводило к исчезновению из спектров в свою очередь и полос Пд 653/648(440) — вторая стадия цепи реакций (2). К сожалению, идентификация продуктов фотопревращения (Хл и Хд) по указанным выше причинам оказалась в этом случае невозможной.

Изложенные результаты позволяют проследить тенденцию возрастания доли цепи реакций (2) в общем биосинтезе хлорофилла по мере уменьшения длительности воздействия фактора этиоляции: развитые этиолированные растения, ювенильные этиолированные растения, зеленые листья, затемненные на несколько часов. Эта тенденция позволяет предположить связь цепи реакций (2) с ПОР-В — фотоферментом, функционирующим, в отличие от ПОР-А, не только в этиолированных, но и в зеленых листьях (см. выше). Естественным кажется в связи с этим, что именно ПОР-В — доминирующий фотофермент зеленых листьев, являющийся, видимо, основой «репарационного» биосинтеза хлорофилла, связан именно с реакционной цепью (2), ведущей к синтезу хлорофилла РЦ ФС-2 (Р-680), т.е. пигмента наиболее «загруженного» в фотохимическом плане и, вследствие этого, наиболее подверженного фотодеструкции.

V. БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛА РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИСТЕМЫ 1

Как было показано выше в этиолированных листьях, наряду с основными формами протохлорофилла(ида) (Пд 655/650, Пх(д) 642/637, Пх 633/628) присутствует ряд минорных длинноволновых форм предшественника с максимумами поглощения при 670—700 нм [32, 45]. Исследования гетеротрофного мутанта *Chlorella vulgaris* В-15 с полным генетическим блоком темнового биосинтеза хлорофилла показали, что при темновом культивировании в клетках этого мутанта, наряду с известными ранее формами протохлорофилла(ида) Пд 655/650 и Пх(д) 640/635, накапливается значительное количество этерифицированного предшественника — протохлорофилла, отличающегося более длинноволновым, чем обычно, расположением полос флуоресценции и поглощения — Пх 682/672 [88].

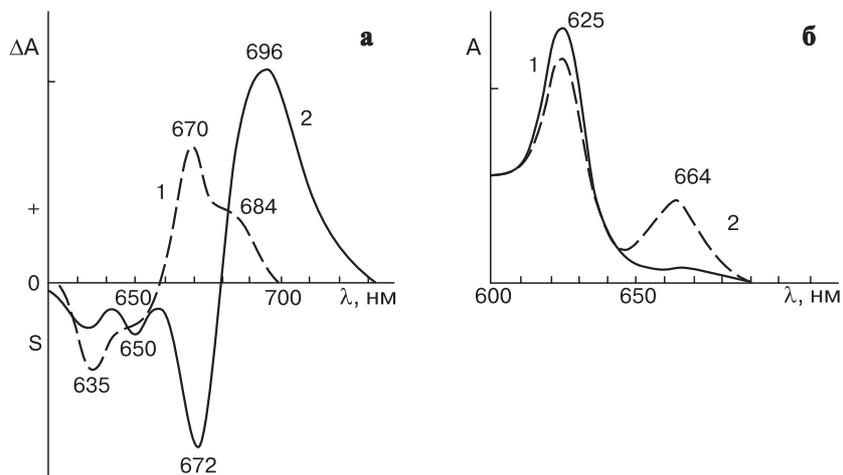


Рис. 6. Биосинтез хлорофилла ядра $\Phi C-1$ (P-700) в клетках зеленеющего мутанта *Chlorella vulgaris* В-15.

а — наблюдение трех фотохимических реакций Пх(д) 640/635 \rightarrow Хл(д) 680/670; Пд 655/650 \rightarrow Хд 695/684 и Пх 682/672 \rightarrow Хл 715/696 по дифференциальным спектрам поглощения «свет минус темнота». 1 — для 4-дневной культуры, 2 — для 8-дневной культуры.

б — изменение спектров поглощения экстрактов из 8-дневной культуры в ходе ее освещения. 1 — спектр до освещения, 2 — спектр после освещения.

Освещение клеток мутанта в диапазоне температур от 26 °С до -70 °С приводило (наряду с известными для зеленеющих водорослей [20, 13, 135] фотореакциями коротковолновых форм предшественника Пд 655/650 \rightarrow Хд 695/684 и Пх(д) 640/635 \rightarrow Хл(д) 680/670) к фотопревращению длинноволновой формы протохлорофилла Пх 682/672 в стабильную при 26 °С (конечную) форму хлорофилла Хл 715/696 (рис. 6). В работе [88] высказано предположение, что Хл 715/696 является пигментом ядра $\Phi C-1$. В пользу этой гипотезы свидетельствуют следующие факты: положение длинноволновой полосы поглощения Хл 715/696 близко к полосе поглощения хлорофилла РЦ $\Phi C-1$ — Р700 (697 нм у *Chlamydomonas* [92]). Полоса поглощения Хл 715/696 близка по положению и к спектру поглощения первичного акцептора электрона $\Phi C-1$ — пигмента $A_{1,1}$ (700 нм [125]). Максимум низкотемпературного спектра флуоресценции Хл 715/696 совпадает с флуоресценцией хлорофилла внутренней

антенны (core antenna) ядра ФС–1 [89]. Эта антенна, как известно, включена в комплекс фотосистемы 1 — СР–1, совместно с пигментом Р–700 и их общим апопротеином 66–68 кДа [55, 143]. Важно отметить, что комплекс СР–1, судя по его спектрам поглощения [143], содержит небольшое количество каротиноидов, это же свойственно, судя по спектрам возбуждения флуоресценции, и комплексу Хл 715/696 и его предшественнику Пх 682/672 [88]. Все эти факты позволяют предполагать подобие или идентичность Хл 715/696 и хлорофилла ядра ФС–1. Об этом же свидетельствуют результаты измерения фотоактивности ФС–1 (фотостимулированное выделение H_2): в зеленеющих клетках обсуждаемого мутанта [7] активность ФС–1 начинала проявляться практически одновременно с формированием Хл 715/696.

Фотопревращение Пх 682/672 → Хл 715/696 наблюдалось и при отрицательных температурах (до 70 °С), т.е. по всей вероятности, в ходе реакции, протекающей в жесткой матрице без заметных изменений структуры пигмент–белкового комплекса. Это подтверждается и результатами наблюдения миграции энергии электронного возбуждения с каротиноидов на Пх 682/672 и на Хл 715/696: в ходе фотореакции эффективность переноса энергии практически не менялась, что возможно при сохранении межмолекулярных расстояний и взаимной ориентации хромофоров каротиноидов и порфириринов. На этом основании авторами [88] предложена гипотеза о том, что структура ядра фотосистемы 1, содержащая протохлорофилл вместо хлорофилла, предсуществует в этиолированных образцах, а формирование ядра ФС–1 только завершается в результате внутрикомплексного фотовосстановления протохлорофилла до хлорофилла. Эта гипотеза подтверждается результатами работы [60], в которой доказан не только темновой характер биосинтеза переносчиков электрона ФС–1, но и показана их иммунохимическая идентичность с переносчиками электрона ФС–1 в зеленых образцах. С другой стороны, уже в выращенных в темноте мутантах водорослей обнаруживаются, хотя и в минорных количествах, полипептиды с молекулярным весом 65–68 кДа, характерные для ядра ФС–1 [98], на свету их биосинтез значительно ускоряется. Близкий по составу пигмент–белковый комплекс, содержащий одновременно протохлорофилл(ид) и хлорофилл(ид), и имевший необычно большой для протохлорофиллид–редуктазы молекулярный вес 65 кДа, удалось выделить в минорных количествах (наряду с доминирующей среди пигмент–связывающих белков, известной ранее протохлорофиллид–редуктазой 37 кДа) из зеленеющих листьев с небольшой глубиной превращения протохло-

рофиллида [38]. Этот факт позволяет предположить (в отличие от авторов цитируемой работы [38]) существование в этиолированных листьях протохлорофиллид–редуктазы нового типа — с молекулярной массой 65 кДа. Таким образом, изложенная выше гипотеза о предсуществовании ядра ФС–1 может быть справедливой не только для зеленеющих водорослей, но и для этиолированных листьев высших растений.

Сопоставляя данные о биосинтезе пигментов реакционных центров ФС–2 и ФС–1 можно сделать ряд заключений. Биосинтез пигментов реакционных центров двух фотосистем в зеленеющих водорослях (а возможно и в зеленеющих листьях) осуществляется независимыми друг от друга путями из различных форм протохлорофилла (ида). В отличие от пигментов РЦ ФС–2 (см. выше), хлорофилл ядра фотосистемы 1 (Р–700, внутренняя антенна, первичный акцептор) в зеленеющих мутантах водорослей образуется в результате одноступенчатого (интермедиаты не обнаружены) фотовосстановления длинноволновой формы предшественника Пх 682/672. Эта нативная форма отличается от предшественника пигментов фотосистемы 2 более сильным межхромороформным взаимодействием (красное смещение относительно спектров пигмента в растворе составляет около 50 нм), наличием фитола и близостью к молекулам каротиноидов. Не исключено, что в данном случае фотовосстановление протохлорофилла осуществляется с участием нового, неизвестного ранее типа протохлорофиллид–редуктазы. Так, данные Гриффитса [77] свидетельствуют о том, что протохлорофиллид–редуктаза 37 кДа специфична к субстрату и не восстанавливает экзогенный протохлорофилл; таким образом для объяснения фотовосстановления этерифицированной формы предшественника привлечение гипотезы о протохлорофилл–редуктазе нового типа является логически неизбежным.

Картина возможных путей биосинтеза пигментов РЦ еще более усложняется, если учесть уже отмечавшийся факт: субстратом для фотовосстановления служит как моновинилпротохлорофиллид, так и дивинилпротохлорофиллид [56, 138]. И, наконец, соотношение обсуждаемых путей биосинтеза пигментов РЦ может существенно отличаться при освещении полностью этиолированных (выросших в темноте) растений (синтез пигментов *de novo*) и при освещении временно затемнявшихся взрослых зеленых растений (ресинтез пигментов и репарация повреждений РЦ) [82, 101, 103].

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как видно, современная картина заключительной стадии биосинтеза хлорофилла оказывается достаточно сложной. Очевидно, однако, что и она еще весьма фрагментарна и неполна. Даже общая феноменология процесса, последовательность стадий остаются во многом неясными, в частности это касается биогенеза реакционных центров двух фотохимических систем фотосинтеза. Только предположения и не всегда достаточно обоснованные можно высказать о механизме отдельных стадий даже в отношении собственно пигментного компонента. Дискуссионным остается и вопрос о тождественности процессов, протекающих в зеленеющих и полностью сформировавшихся листьях растений. Вместе с тем можно, по-видимому, говорить о том, что завершается определенный и необходимый этап познания процесса (в основном, его феноменологической стороны), этап, который послужит основанием для более плодотворных завершающих исследований в будущем столетии.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 99—04—48704).

ЛИТЕРАТУРА

1. Акулович Н.К. // Формирование и состояние фотоактивного протохлорофиллового пигмента. Минск: Наука и техника. 1983. 152 с.
2. Беляева О.Б. // Заключительные стадии биосинтеза хлорофилла в листьях растений. Докторская диссертация в форме доклада. Пушкино. 1994. 47 с.
3. Беляева О.Б., Быстрова М.И., Сафронова И.А., Литвин Ф.Ф., Красновский А.А. // Биофизика. 1985. Т. 30. С. 933—938.
4. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. // Фотобиосинтез хлорофилла. М.: МГУ. 1989. 104 с.
5. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. // Биофизика. 1980. Т. 25. С. 617—623.
6. Беляева О.Б., Тимофеев К.Н., Литвин Ф.Ф. // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 104—109.
7. Бойченко В.А., Литвин Ф.Ф. // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 1309—1318.
8. Бубличенко Н.В., Умрихина А.В., Красновский А.А. // Биофизика. 1979. Т. 24. С. 588—593.
9. Быстрова М.И., Сафронова И.А., Красновский А.А. // Докл. АН СССР. 1983. Т. 270. С. 1227—1231.
10. Вальтер Г., Беляева О.Б., Игнатов Н.В., Красновский А.А., Литвин Ф.Ф. // Биологические науки. 1982. № 9. С. 35—39.
11. Гуринович Г.П., Севченко А.Н., Соловьев К.Н. // Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений. Минск: Наука и техника. 1988. С. 470—471.
12. Игнатов Н.В., Беляева О.Б., Тимофеев К.Н., Литвин Ф.Ф. // Биофизика. 1988. Т. 33. С. 500—505.

13. *Игнатов Н.В., Гостимский С.А., Сатина Л.Я., Литвин Ф.Ф.* // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 95–104.
14. *Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф.* // Биофизика. 1981. Т. 26. С. 664–668.
15. *Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф.* // Биофизика. 1987. Т. 32. С. 692–695.
16. *Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф.* // Биохимия. 1993. Т. 58. С. 1469–1480.
17. *Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф.* // Биохимия. 1997. Т. 62. С. 366–374.
18. *Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф.* // Биохимия. 2000. (в печати).
19. *Красновский А.А., Быстрова М.И., Ланг Ф.* // Докл. АН СССР. 1970. Т. 194. С. 1441–1444.
20. *Лебедев Н.Н., Желепова И.Д., Красновский А.А.* // Биофизика. 1991. Т. 36. С. 1022–1030.
21. *Лебедев Н.Н., Шиффел П., Красновский А.А.* // Биофизика. 1985. Т. 30. С. 44–49.
22. *Либберт Э.* // Физиология растений. М.: Мир. 1976. С. 472–480.
23. *Литвин Ф.Ф., Беляева О.Б.* // Биохимия. 1968. Т. 33. С. 928–936.
24. *Литвин Ф.Ф., Беляева О.Б.* // Биохимия. 1971. Т. 36. С. 615–622.
25. *Литвин Ф.Ф., Ефимцев Е.И., Игнатов Н.В., Беляева О.Б.* // Физиол. раст. 1976. Т. 23. С. 17–24.
26. *Литвин Ф.Ф., Ефимцев Е.И., Игнатов Н.В.* // Биофизика. 1976. Т. 21. С. 307–312.
27. *Литвин Ф.Ф., Игнатов Н.В.* // Докл. АН СССР. 1980. Т. 250. С. 1463–1465.
28. *Литвин Ф.Ф., Красновский А.А.* // Докл. АН СССР. 1957. Т. 117. С. 106–108.
29. *Литвин Ф.Ф., Красновский А.А.* // Докл. АН СССР. 1958. Т. 120. С. 4–7.
30. *Литвин Ф.Ф., Красновский А.А.* // Изв. АН СССР. Сер. физич. 1959. Т. 23. С. 82–85.
31. *Литвин Ф.Ф., Рихирева Т.Г., Красновский А.А.* // Биофизика. 1962. Т. 7. С. 578–591.
32. *Литвин Ф.Ф., Стадничук И.Н.* // Физиол. раст. 1980. Т. 27. С. 1024–1031.
33. *Лосев А.П., Лялькова Н.Д.* // Молекуляр. биол. 1979. Т. 13. С. 837–844.
34. *Пакина Е.В., Лебедев Н.Н., Лядыгин В.Г., Климов В.В., Красновский А.А.* // Физиол. раст. 1990. Т. 37. С. 47–53.
35. *Раскин В.И.* // Вести АН БССР. Сер. биол. наук. 1976. N 5. С. 43–46.
36. *Рахимбердиева М.Г., Каранетян Н.В.* // Докл. АН СССР. 1977. Т. 237. С. 224–227.
37. *Рубин А.Б., Минченкова Л.Е., Красновский А.А., Тумерман Л.А.* // Биофизика. 1962. Т. 7. С. 571–577.
38. *Стадничук И.Н., Полякова Е.Е., Беляева О.Б.* // Физиол. раст. 1995. Т. 42. С. 849–854.
39. *Фрадкин Л.И.* // Биогенез пигментного аппарата фотосинтеза / Ред. Ф.Ф. Литвин. Минск: Наука и техника. 1988. С. 164–191.
40. *Фрадкин Л.И., Шлык А.А.* // Журн. прикл. спектроскопии. 1978. Т. 29. С. 1029–1039.
41. *Apel K., Holtorf H., Armstrong G., Reinbothe S. and Reinbothe C.* // Chloroplast: from molecular biology to biotechnology / Eds. G.H. Argeroudy–Akoyounoglu, H. Senger. 1999. P. 179–184.
42. *Apel K., Santel H.J., Redlinger T.E., Falk H.* // Eur. J. Biochem. 1980. Vol. 111. P. 251–258.
43. *Armstrong G., Runge S., Frick G., Sperling U., Apel K.* // Plant Physiol. 1995. Vol. 108. P. 1505–1517.

44. *Begley J.R., Young M.* // J. Am. Chem. Soc. 1989. Vol. 111. P. 3095—3096.
45. *Belyaeva O.B., Boddi B., Ignatov N.V., Lang F., Litvin F.F.* // Photosynth. Res. 1984. Vol. 5. P. 263—271.
46. *Belyaeva O.B., Litvin F.F.* // Photosynthetica. 1981. Vol. 15. P. 210—215.
47. *Belyaeva O.B., Personova E.R., Litvin F.F.* // Photosynth. Res. 1983. Vol. 4. P. 81—85.
48. *Belyaeva O.B., Sundqvist C.* // Photosynth. Res. 1998. Vol. 55. P. 41—48.
49. *Belyaeva O.B., Timofeev K.N., Litvin F.F.* // Photosynth. Res. 1988. Vol. 15. P. 247—256.
50. *Birve S., Selstam E., Johansson L.* // Biochem. J. 1996. Vol. 317. P. 549—555.
51. *Boddi B., Lindsten A., Ryberg M., Sundqvist C.* // Physiologia Plantarum. 1989. Vol. 76. P. 135—143.
52. *Bosch M.K., Proskuryakov I.I., Gast P., Hoff A.J.* // J. Phys. Chem. 1995. Vol. 99. P. 5310—5316.
53. *Bosch M.K., Proskuryakov I.I., Gast P., Hoff A.J.* // J. Phys. Chem. 1996. Vol. 100. P. 2384—2390.
54. *Brouers M., Sironval C.* // Plant Sci. Lett. 1975. Vol. 4. P. 175—181.
55. *Chua N.H., Bennoun P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1975. Vol. 72. P. 2175—2179.
56. *Cohen C.E., Rebeiz C.A.* // Plant Physiol. 1981. Vol. 67. P. 98—103.
57. *Dehesh K., Klaas M., Hauser I., Apel K.* // Planta. 1986. Vol. 169. P. 162—171.
58. *Dobek A., Dujardin E., Franck F., Sironval C., Breton J., Roux E.* // Photobiochem. Photobiophys. 1981. Vol. 2. P. 35—44.
59. *van Dorssen R.J., Breton J., Plijster J.J., Satoh K., van Gorkom H.J., Amesz J.* // Biochim. Biophys. Acta. 1987. Vol. 893. P. 267—274.
60. *Dujardin E., Bertrand M., Radunz A., Schmid G.H.* // J. Plant Physiol. 1987. Vol. 128. P. 95—107.
61. *Dujardin E., Correia M.* // Photobiochem. Photobiophys. 1979. Vol. 1. P. 25—32.
62. *Dujardin E., Sironval C.* // Photosynthetica. 1970. Vol. 4. P. 129—138.
63. *Eichacker L.F., Muller B., Helfrich M.* // FEBS Lett. 1996. Vol. 395. P. 251—256.
64. *Eichacker L.F., Paulsen H., Rudiger W.* // Eur. J. Biochem. 1992. Vol. 205. P. 17—24.
65. *El Hamouri B., Brouers M., Sironval C.* // Plant Sci. Lett. 1981. Vol. 21. P. 375—379.
66. *Faier J., Davis M.S., Forman A., Klimov V.V., Dolan E., Ke B.* // J. Am. Chem. Soc. 1980. Vol. 102. P. 7143—7145.
67. *Franck F., Eullafroy P., Popovic R.* // Photosynth. Res. 1997. Vol. 51. P. 107—118.
68. *Frank F., Mathis P.* // Photochem. Photobiol. 1980. Vol. 32. P. 799—803.
69. *Funk C., Adamska J., Green B.R., Andersson B., Renger G.* // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. N 50. P. 30141—30146.
70. *Garab G.T., Sundqvist C., Faludi—Daniel A.* // Photochem. Photobiol. 1980. Vol. 31. P. 491—503.
71. *Gassman M.L.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1973. Vol. 53. P. 693—702.
72. *Goedheer J.C., Verhulsdonk C.A.H.* // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1970. Vol. 39. P. 260—266.
73. *Griffiths W.T.* // FEBS Lett. 1971. Vol. 49. P. 196—200.
74. *Griffiths W.T.* // Biochem. J. 1975. Vol. 152. P. 623—635.
75. *Griffiths W.T.* // Biochem. J. 1978. Vol. 174. P. 681—692.

76. *Griffiths W.T., Mapleston R.E.* // Chloroplast Development / Eds. G.Akoyunoglou, J.H.Argyroudi-Akoyunoglou. Amsterdam. 1978. P. 99—104.
77. *Griffiths W.T.* // Biochem. J. 1980. Vol. 186. P. 267—278.
78. *Griffiths W.T.* // Chlorophyll / Ed. H.Scheer. CRC Press, Boca Ration, FL 1991. P. 433—455.
79. *Henningsen K.W., Boardman N.K.* // Plant Physiol. 1973. Vol. 51. N 6. P. 1117—1126.
80. *Henningsen K.W., Thorne S.W.* // Plant Physiol. 1974. Vol. 30. P. 82—89.
81. *Holtorf H., Apel K.* // Plant Mol. Biol. 1996. Vol. 31. P. 387—392.
82. *Holtorf H., Reinbothe S., Reinbothe C., Berezina B., Apel K.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 3254—3258.
83. *Hooper J.K., Marks D.B., Keller B.J., Margulies M.M.* // J. Cell. Biol. 1982. Vol. 95. P. 552—558.
84. *Houssier C., Sauer K.* // Biochem. Biophys. Acta. 1969. Vol. 173. P. 492—502.
85. *Ignatov N.V., Belyaeva O.B., Litvin F.F.* // Photosynthetica. 1993. Vol. 29. P. 235—241
86. *Ignatov N.V., Belyaeva O.B., Litvin F.F.* // Photosynth. Res. 1993. Vol. 38. P. 117—124.
87. *Ignatov N.V., Litvin F.F.* // Photosynth. Res. 1995. Vol. 46. P. 445—453.
88. *Ignatov N.V., Litvin F.F.* // Photosynth. Res. 1996. Vol. 50. P. 271—283.
89. *Ish-Shalom D., Ohad I.* // Biochim. Biophys. Acta. 1983. Vol. 722. P. 498—507.
90. *Iwai J., Ikeuchi M., Inoue J.* // Protochlorophyllide Reduction and Greening / Eds. C.Sironval., M.Brouers. The Hague. 1984. P. 99—112.
91. *Kahn A., Boardman N.K., Thorne S.W.* // J. Mol. Biol. 1970. Vol. 48. P. 85—101.
92. *Karapetyan N.V., Rakhimberdieva M.G., Bukhov N.G., Gyurjan I.* // Photosynthetica. 1980. Vol. 14. P. 48—54.
93. *Kim J., Klein P., Mullet J.* // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269. P. 17918—17923.
94. *Klein R.R., Camble P.E., Mullet J.E.* // Plant Physiol. 1988. Vol. 88. P. 1246—1256.
95. *Klein R.R., Mullet J.E.* // J. Biol. Chem. 1986. Vol. 261. N 24. P. 11138—11145.
96. *Klimov V.V., Klevanik A.V., Shuvalov V.A., Krasnovsky A.A.* // FEBS Lett. 1977. Vol. 82. P.183—186.
97. *Klimov V.V., Krasnovsky A.A.* // Photosynthetica. 1981. Vol. 15. P. 592—609.
98. *Kotzabasis K., Schuring M.P., Senger H.* // Physiol. Plant. 1989. Vol. 75. P. 221—226.
99. *Lebedev N.N., Barskaya I.V.* // FEBS Lett. 1989. Vol. 255. P. 248—252.
100. *Lebedev N.N., Chan Van Ni., Krasnovsky A.A.* // FEBS Lett. 1989. Vol. 247. P. 97—100.
101. *Lebedev N., van Cleve B., Armstrong G., Apel K.* // Plant Cell. 1995. Vol. 7. P. 2081—2090.
102. *Lebedev N.N., Siffel P., Krasnovskii A.A.* // Photosynthetica. 1985. Vol. 19. P. 183—187.
103. *Lebedev N.N., Timko M.* // Photosynth. Res. 1998. Vol. 58. P. 5—22.
104. *Lebedev N.N., Timko M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 1999. Vol. 96. P. 9954—9959.
105. *Litvin F.F., Belyaeva O.B.* // Photosynthetica. 1971. Vol. 5. P. 200—209.
106. *Litvin F.F., Ignatov N.V., Belyaeva O.B.* // Photobiochem. Photobiophys. 1981. Vol. 2. P. 233—237.

107. *Litvin F.F., Ignatov N.V., Efimtsev E.I., Belyaeva O.B.* // *Photosynthetica*. 1978. Vol. 12. P. 375—381.
108. *Martin G., Timko M., Wilks H.* // *Biochem. J.* 1997. Vol. 325. P. 139—145.
109. *Mathis J.N., Burkey K.O.* // *Plant Physiol.* 1989. Vol. 90. P. 560—566.
110. *Mathis P., Sauer K.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1972. Vol. 267. P. 498—511.
111. *Mullet J.E., Klein P.G., Klein R.R.* // *Proc. Natl. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. P. 4038—4042.
112. *Nanba O., Satoh K.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. Vol. 84. P. 109—112.
113. *Nayar P., Brun A., Harriman A., Begley T.P.* // *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 1992. P. 395—397.
114. *Nyitrai P., Sarvari E., Lang F.* // *Photobiochem. Photobiophys.* 1986. Vol. 12. P. 143—145.
115. *Oliver R.P., Griffiths W.T.* // *Plant Physiol.* 1982. Vol. 70. P. 1019—1025.
116. *Plesnicar M., Bendall D.S.* // *Biochem. J.* 1973. Vol. 136. P. 803—812.
117. *Redlinger T.E., Apel K.* // *Arch. Biochem. Biophys.* 1980. Vol. 200. P. 253—260.
118. *Reinbothe C., Apel K., Reinbothe S.* // *Mol. Cell. Biol.* 1995. Vol. 15. P. 6206—6212.
119. *Reinbothe S., Reinbothe C.* // *Eur. J. Biochem.* 1996. Vol. 237. P. 323—343.
120. *Shaw P.J., Henwood J.A., Oliver R.P., Griffiths W.T.* // *Eur. J. Cell Biol.* 1985. Vol. 39. P. 50—55.
121. *Shibata K.* // *Carn. Inst. Wash. Year Book.* 1956. Vol. 55. P. 248—274.
122. *Shibata K.* // *J. Biochem.* 1957. Vol. 44. P. 147—172.
123. *Shioi Y., Sasa T.* // *Plant Cell Physiol.* 1984. Vol. 25. P. 139—149.
124. *Shlyk A.A., Fradkin L.I., Domanskii V.P.* // *Proc. FEBS Congr. Pt. B. VNU Science Press. Utrecht.* 1985. P. 61—66.
125. *Shuvalov V.A., Dolan E., Ke B.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. Vol. 76. P. 770—773.
126. *Sironval C., Kuyper P.* // *Photosynthetica.* 1972. Vol. 6. P. 254—475.
127. *Shultz A., Sauer K.* // *Biochem. Biophys. Acta.* 1972. Vol. 267. P. 320—340.
128. *Sperling U., Franck F., van Cleve B., Frick G., Apel K., Armstrong G.A.* // *Chloroplast: from molecular biology to biotechnology* / Eds. G.H. Argeroudy—Akoyounoglu, H. Senger. 1999. P. 97—102.
129. *Sundqvist C., Dahlin C.* // *Physiol. Plantarum.* 1997. Vol. 100. P. 748—759.
130. *Teakle R., Griffiths W.T.* // *Biochem. J.* 1993. Vol. 296. P. 225—230.
131. *Thorne S.W.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1971. Vol. 226. P. 128—134.
132. *Vaughan J.D., Sauer K.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1974. Vol. 347. P. 383—394.
133. *Virgin H.I.* // *Photosynthetica.* 1975. Vol. 9. P. 84—92.
134. *Walker C.J., Griffiths W.T.* // *FEBS Lett.* 1988. Vol. 239. P. 259—262.
135. *Wang W.J.* // *Plant Physiol.* 1979. Vol. 63. P. 1102—1106.
136. *Watanabe T., Nakazato M., Mazaki H.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. Vol. 807. P. 110—121.
137. *Wellburn A.R., Hampp R.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 1979. Vol. 547. P. 380—397.
138. *White B.I., Griffiths W.T.* // *Biochem. J.* 1993. Vol. 291. P. 939—944.
139. *White R., Hooper J.K.* // *Plant Physiol.* 1994. Vol. 106. P. 583—590.
140. *Wiktorsson B., Engdahl S., Zhong L.B., Boddi B., Ryberg M., Sundqvist C.* // *Photosynthetica.* 1993. Vol. 29. P. 205—218.
141. *Wiktorsson B., Ryberg M., Gough S., Sundqvist C.* // *Physiologia Plantarum.* 1992. Vol. 85. P. 659—669.

-
142. *Wilks H., Timko M.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. Vol. 92. P. 724–728.
143. *Wollman F.A., Bennoun P.* // Biochim. Biophys. Acta. 1982. Vol. 680. P. 352–360.
144. *Wollman F.A., Minai L., Nechushtai R.* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. Vol. 1411. P. 21–85.