

ФОТОАКТИВНЫЕ ПИГМЕНТ-ФЕРМЕНТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПРЕДШЕСТВЕННИКА ХЛОРОФИЛЛА В ЛИСТЯХ РАСТЕНИЙ

©2007 г.

О. Б. БЕЛЯЕВА, Ф. Ф. ЛИТВИН

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

I. Введение. II. К истории исследования пигмент-белкового комплекса протохлорофилла. III. Фотофермент НАДФН-протохлорофиллид-оксидоредуктаза (ПОР). IV. Гетерогенность протохлорофиллид-оксидоредуктазы. V. Локализация активного комплекса в пластидах, связь фотофермента с мембранами. VI. Множественность форм предшественника хлорофилла *in vivo*. VII. Роль агрегации протохлорофиллида и ПОР в образовании фотохимически активного комплекса. VIII. Дополнительные компоненты, ассоциированные с активным пигмент-ферментным комплексом этиолированных листьев. IX. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Процесс биосинтеза хлорофилла служит основой формирования фотосинтетического аппарата, обеспечивающего функционирование фотосинтеза, а следовательно, и само существование биосферы. Биосинтез хлорофилла из его предшественника – протохлорофилла(ида) может осуществляться двумя путями. Более примитивный путь – это независимое от света (темновое) превращение протохлорофилла(ида) в хлорофилл(ид). Темновой синтез хлорофилла из предшественника обнаружен у цианобактерий, зеленых водорослей, мхов, папоротников и голосеменных. Другой, более сложно регулируемый, путь заверше-

Принятые сокращения: ПОР – протохлорофиллид оксидоредуктаза; Пхлд – протохлорофиллид; Пхл – протохлорофилл; ПЛТ – проламеллярные тела; ПТ – протилакоиды; ФС 2 – фотосистема 2.

Адрес для корреспонденции: olgabelyaeva@mail.ru

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 05-04-49377-а.

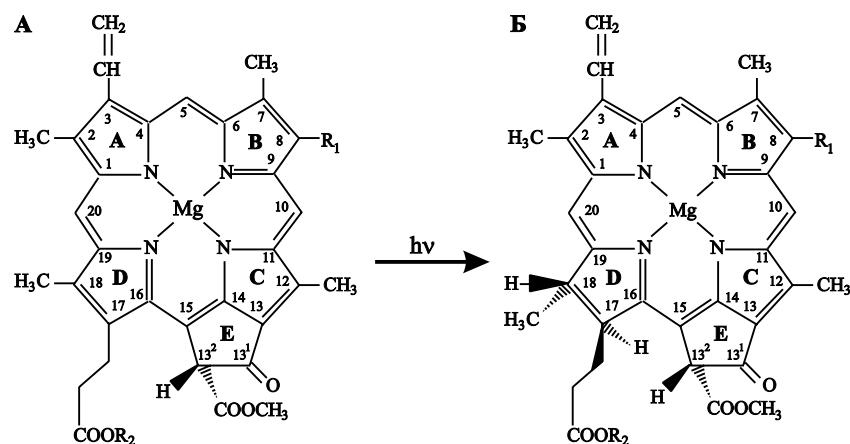


Рис. 1. Структурные формулы молекул протохлорофилла(ида) – А и хлорофилла(ида) – Б. R_1 равно $\text{CH}_2\text{—CH}_3$ для моновинильной формы пигмента и $\text{CH}=\text{CH}_2$ – для дивинильной формы. R_2 равно $\text{C}_{20}\text{H}_{39}$ для протохлорофилла и хлорофилла и соответствует атому водорода для протохлорофиллида и хлорофиллида.

ния биосинтеза хлорофилла из предшественника осуществляется в ходе светозависимой реакции (у всех высших растений а также у некоторых низших растений и голосеменных). Заключительная светозависимая стадия биосинтеза хлорофилла давно привлекала интерес исследователей – простым глазом можно увидеть мгновенное появление зеленой окраски при освещении выросших в темноте (этиолированных) проростков растений.

Непосредственным предшественником хлорофилла служит протохлорофилл, точнее его бесфитольная форма – протохлорофиллид (Пхлд). Структурные формулы хлорофилла(ида) и протохлорофилла(ида) (рис. 1) были установлены благодаря аналитическим и синтетическим исследованиям Фишера [1–3].

Хлорофилл и его предшественник являются магний-порфиринами. Молекулы представляют собой замкнутую тетрапиррольную систему (пиррольные кольца А, В, С, Д) с сопряженными двойными связями. Четыре пиррольных кольца соединены между собой метиновыми мостиками, по периферии большого кольца имеется восемь замещающих групп. Дополнительное гомоциклическое кольцо Е имеет карбонильный кислород и этерефицированную метиловым спиртом карбоксильную группу. Молекула протохлорофилла(ида) отличается от молекулы хлорофилла(ида) отсутствием двух атомов водорода в положении 17–18 четвертого пиррольного кольца (кольца Д) макроцикла (рис. 1) [1–3]. Таким образом, в основе

заключительного этапа биосинтеза хлорофилла лежит реакция фотохимической гидрогенизации полуизолированной двойной связи C17–C18 в молекуле предшественника. Восстановление этой связи порфиринового макроцикла сопровождается существенным изменением симметрии молекулы и вследствие этого – изменением спектра поглощения с резким усилением интенсивности длинноволновой полосы в красной области спектра. Новое свойство хромофора (хлороинового типа) не только повышает способность молекулы к поглощению света в широкой спектральной области, но и определяет его функциональную активность: участие в акте захвата энергии света, переносе энергии электронного возбуждения, разделении зарядов в реакционных центрах фотосинтеза.

Включение светозависимой стадии, позволяющей регулировать скорость биосинтетического процесса, можно рассматривать как важное эволюционное достижение всех высших растений. Оно обеспечивает возможность регуляции не только процесса биосинтеза хлорофилла, но и развития растения в целом. Прорастание растений, их «появление на свет» сопровождается быстрым (несколько часов) формированием всего фотосинтетического аппарата, обеспечивающим его самостоятельное автотрофное существование.

Первоначально заключительный этап биосинтеза хлорофилла рассматривался в чисто химическом аспекте – как элементарная фотохимическая реакция, завершающая построение молекулы пигмента. Однако, по мере развития исследований, становилось ясным, что так же как и при фотосинтезе, участниками реакции следует считать не изолированные хромофоры, а сложные пигмент-белковые комплексы. Проблема биосинтеза хлорофилла может рассматриваться как часть более общей проблемы биогенеза функционально активных структур фотосинтетического аппарата. В связи с этим естественно возникает вопрос о специфических путях биогенеза пигмент-белковых комплексов антенн и реакционных центров двух фотохимических систем фотосинтеза.

Сравнительно недавно удалось осуществить реакцию превращения протохлорофиллида в хлорофиллид в искусственно собранных комплексах. Однако реальная картина фототрансформации пигмент-белковых комплексов, прослеживаемая спектроскопически на целых листьях растений оказалась гораздо сложнее, чем в модельных системах.

Схемы путей биосинтеза хлорофилла, представленные разными авторами, свидетельствуют о многоступенчатости и разветвленности процесса, идущего в живой клетке, а также о существовании

нескольких путей трансформации комплексов предшественника хлорофилла в пигмент-белковые комплексы хлорофилла. Сложность процесса фотобиосинтеза хлорофилла в живой клетке в значительной степени определяется строением, состоянием и гетерогенностью пигмент-белковых комплексов предшественника хлорофилла, сформированных перед световой стадией. Настоящий обзор посвящен проблеме структуры и функции фотоактивных комплексов протохлорофилла(ида) и их роли в процессе образования хлорофилла.

II. К ИСТОРИИ ИССЛЕДОВАНИЯ ПИГМЕНТ-БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА ПРОТОХЛОРОФИЛЛА

Открытие предшественника хлорофилла и первоначальное изучение его превращения в хлорофилл во многом связаны с именами отечественных исследователей: К.А.Тимирязева, Н.А.Монтеверде и В.Н.Любименко (краткий исторический обзор отечественных исследований см. в работе [4]).

Характерной особенностью образования хлорофилла является то, что этот процесс осуществляется лишь в целостных биологических системах – листьях растений и их гомогенатах. Фотохимическую реакцию превращения протохлорофилла(ида) в хлорофилл(ид) в простых системах – растворах, до сих пор не удается осуществить. Уже в самых ранних работах было установлено, что биосинтез хлорофилла протекает в специальных нативных комплексах пигмента с неким носителем, обеспечивающим его физиологическую активность и характерные спектральные свойства *in vivo*. Еще Любименко высказывал мысль, что специфика протохлорофилла и хлорофилла в растении определяется наличием пигмент-белкового соединения [5, 6]. Физиологически активные нативные комплексы назвали голохромами (от греческих слов: *holos* – целый и *chroma* – цвет) [7, 8]. Красновский и Кособуцкая впервые сумели получить активные экстракты таких комплексов протохлорофилла в водной среде [9, 10]. В исследованных ими «коллоидных растворах» вещества этиолированных листьев протохлорофилл характеризовался полосой поглощения при 637 нм, в то время как в спектрах поглощения целых этиолированных листьев обнаруживался и более длинноволновый максимум – при 650 нм. Протохлорофилл коллоидных растворов сохранял фотохимическую активность, превращаясь под действием света в хлорофилл.

Выделение протохлорофилл-белкового комплекса в глицерине было осуществлено в работах Смита [8, 11]. Положение основных

полос поглощения выделенных частиц «протохлорофилл-голохрома» зависело от вида растений и температурных условий выделения. Смит и Бенитс, исследуя температурную зависимость реакции превращения протохлорофилла в хлорофилл, обнаружили, что температурный коэффициент инактивации этой реакции совпадает с температурным коэффициентом денатурации некоторых белков [12]. Позднее, с помощью дифференциального центрифугирования, были получены протохлорофилл-белковые комплексы [13–17], характеризующиеся спектрами поглощения, близкими к спектру целого этиолированного листа (максимумы при 637 и 650 нм), однако, коротковолновый максимум был более интенсивным.

Позднее было установлено, что предшественник хлорофилла в листьях растений представлен бесфитольной формой пигмента – протохлорофиллидом, и таким образом, фотохимическая реакция представляет собой превращение протохлорофиллида в хлорофиллид [18, 19].

III. ФОТОФЕРМЕНТ НАДФН-ПРОТОХЛОРОФИЛЛИД-ОКСИДОРЕДУКТАЗА (ПОР)

В семидесятых годах прошлого века в лаборатории профессора Гриффитса в Бристольском университете были проведены исследования, позволившие выяснить природу донора водорода в реакции фотовосстановления протохлорофиллида и состав активного пигментного комплекса. Гриффитс показал, что добавление НАДФН к мембранам этиопластов кукурузы и ячменя приводит к превращению неактивного протохлорофиллида (максимум поглощения около 630 нм) в его активные формы с максимумами поглощения около 640 и 652 нм [20, 21]. Возникло предположение об образовании активного комплекса НАДФН-белок-Пхлд, в котором НАДФН может быть восстановителем в реакции превращения Пхлд в хлорофиллид [20]. Используя экзогенный протохлорофиллид и меченый тритием НАДФН, Гриффитс и Меплестон нашли [22], что в препаратах мембран этиопластов образуется меченый тритием хлорофиллид. Это явилось прямым доказательством того, что специфическим восстановителем в фотоэнзиматической реакции образования хлорофиллида *in vivo* является НАДФН. Гриффитс, детально исследовавший фотовосстановление Пхлд в искусственном активном комплексе, включающем протохлорофиллид, НАДФН и мембраны этиопластов ячменя, назвал фермент, катализирующий фотовосстановление протохлорофиллида, протохлорофиллид оксидоредуктазой (ПОР) [23].

Первоначально считали, что фотофермент ПОР распространен только среди покрытосемянных растений. К настоящему времени выяснилось, что ПОР является универсальным фотоферментом, имеющимся у всех видов растений – от цианобактерий до высших растений [24–26]. В последние годы развитие молекулярно-биологических методов, в том числе методов геномной инженерии, позволило получить ряд ценнейших данных о строении белкового компонента активного пигмент-белкового комплекса предшественника хлорофилла.

Молекулярная масса полипептида ПОР, равная 36 кДа, была независимо определена в работах Оливера и Гриффитса [27] и Апеля с соавт. [28]. С помощью гель-электрофореза было обнаружено два полипептида ПОР с молекулярной массой 35 и 37 кДа [29].

ПОР кодируется в ядре и транслируется в цитоплазму в виде более высокомолекулярного предшественника (41–44 кДа) [30], который импортируется в пластиды через пластидную оболочку [30–32]. Транзитный белок (около 8 кДа) отрезается стромальной пептидазой, в результате чего образуется фермент с молекулярным весом около 36 кДа.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА

Результаты исследований аминокислотной последовательности [33–34] и вторичной структуры ПОР [35] позволили сделать вывод, что этот фермент принадлежит к семейству алкогольдегидрогеназ короткоцепочечных спиртов суперсемейства ферментов «RED» (редуктазы – эпимеразы – дегидрогеназы), которое также называется суперсемейством «SDR» (Short-chain Dehydrogenases-Reductases) [33, 36].

Ферменты этого семейства в основном представляют собой гомодимеры или гомотетрамеры [37]. Они катализируют НАДФ(Н) и НАД(Н)-зависимые реакции, включающие перенос гидрид-иона и протона. Для некоторых членов этого семейства ферментов была определена кристаллическая структура [38, 39], и они затем использовались в качестве шаблона для создания гомологической модели ПОР [40]. Авторы предложили трехмерную модель структуры тройного комплекса Пхлд-НАДФН-ПОР *Synechocystis* на основе структурной гомологии между ПОР и белками суперсемейства «RED» (рис. 2). Две основные особенности отличают ПОР от других членов семейства короткоцепочечных дегидрогеназ-редуктаз:

1. Использование порфирина в качестве субстрата.
2. Строгая зависимость активности фермента от действия света.

Первичная структура ПОР была впервые определена по комплементарной ДНК гена ПОР ячменя, клонированного в *Escherichia coli*. ПОР включает 388 а.о. и 74 а.о. транзитного белка [41]. Она

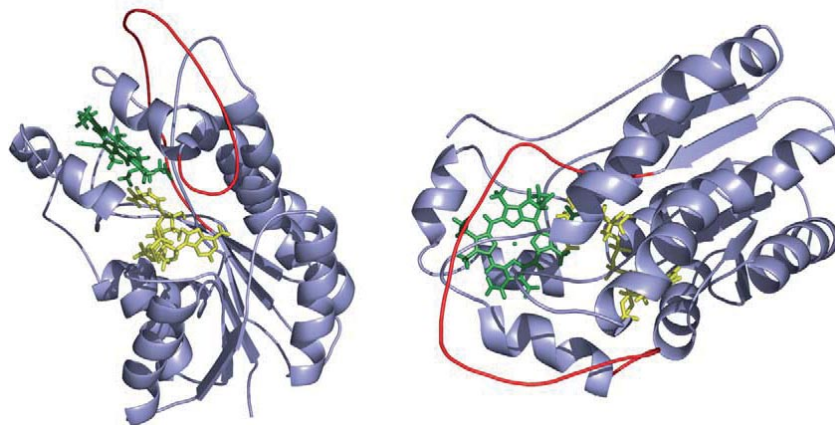


Рис. 2. Модель вторичной структуры молекулы ПОР [40].

Структура состоит из центрального параллельного β -складчатого слоя, включающего 7 β -цепей, окруженного девятью α -спиралями. Уникальной особенностью ПОР по сравнению с другими членами RED суперсемейства является внешняя петля (33 а. о.) между пятой и шестой β -цепями, обозначенная на рисунке красным цветом. НАДФН включается с амино-терминальную часть молекулы фермента.

характеризуется высоким содержанием основных а.о. и большой долей гидрофобных аминокислот. Все ПОР высших растений содержат четыре консервативных Cys остатка (119, 170, 280 и 307), за исключением ПОР гороха, которая в позиции 170 содержит Asp. У зеленых водорослей и цианобактерий ПОР имеет дополнительный, но не консервативный цистеиновый остаток. По крайней мере, один из консервативных цистеиновых остатков, скорее всего Cys-307, может быть вовлечен в связывание Пхлд, как показали эксперименты с использованием меченого N-фенилмалеимида [31, 42]. С активным сайтом энзима электростатически связана C₁₇-пропионая группа Пхлда [43].

ВТОРИЧНАЯ СТРУКТУРА ПОР

Для выяснения вторичной структуры фермента был использован метод кругового дихроизма в УФ-области [35]. Исследования очищенной мономерной ПОР показали наличие в ней 33% α -спиралей, 19% β -складчатых слоев, 20% поворотов и 28% нерегулярной структуры. Уникальной особенностью ПОР по сравнению с другими членами суперсемейства RED суперсемейства является наличие внешней гидрофобной петли между пятой и шестой β -цепями, включающей 33 а.о.

В работах [40, 44] было высказано предположение, что по аналогии с другими ферментами группы алкогольдегидрогеназ короткоцепочечных спиртов, структура которых выяснена с помощью рентгеноструктурного анализа, протохлорофилл оксидоредуктаза состоит из центрального параллельного β -складчатого слоя, построенного из семи β -цепей, окруженного девятью α -спиралями. Гомологическая модель ПОР *Synechocystis* была создана с использованием в качестве структурной матрицы 7α -гидроксистероидной дегидрогеназы *E. coli* (рис. 2) [40]. По своим характеристикам предложенная модель соответствует глобулярному растворимому белку, в структуре которого, в amino-терминальной области, содержится типичная узкая складка, связывающая кофактор НАДФН («Rossmann fold»). Точная функция широкой гидрофобной внешней петли (красная линия на рисунке) не ясна, однако, высказываются предположения, что она участвует в связывании Пхлда, в протеин-протеиновом взаимодействии, или отвечает за связь фермента с мембраной («заякоривание» фермента) [35].

Сравнительно недавно было показано, что активная ПОР *in vivo* находится в агрегированном (димерном) состоянии [45, 46]. Авторы полагают, что именно димерное состояние ПОР способствует агрегации Пхлд.

АКТИВНЫЙ САЙТ ПОР

В последние годы многие ученые пытаются понять механизмы реакции фотовосстановления протохлорофиллида, используя искусственные (реконструированные) тройные комплексы, включающие основные компоненты естественных комплексов: Пхлд, НАДФН и фотофермент ПОР. Анализ зависимости реакции фотовосстановления Пхлда в реконструированных тройных комплексах от концентрации субстрата и фермента показал, что *in vitro* одна молекула пигмента связана с мономером ПОР [46, 48]. Посредством количественного анализа пигмента и белка было показано, что отношение Пхлд/ПОР (моль/моль) *in vivo* (в этиопластах овса) также близко к единице [49].

В семействе дегидрогеназ короткоцепочечных спиртов субстрат восстанавливается гидрид-ионом, поступающим от НАДФН, который фиксируется на дне субстрат-связывающей щели вблизи консервативных остатков тирозина и лизина, участвующих в переносе протона к субстрату. В экспериментах с трансгенной фотосинтетической бактерией *Rhodobacter Capsulatus* с оверэкспрессией гена ПОР гороха Вилкс и Тимко [34] обнаружили, что при замене Tug-275 на Cys, а Lys-279 на Arg фермент теряет активность. В этом состоит отличие ПОР от

В работе [51] приведены результаты исследования фотовосстановления протохлорофиллида в реконструированных тройных комплексах (Пхлд, ПОР, НАДФН) с использованием спектральных методов и направленного мутагенеза ПОР гороха (замена Tyr275 и Lys279 ПОР гороха на Phe и Ile). Подтвердилось, что остаткам Tyr275 и Lys279 принадлежит особая роль в создании фотоактивного состояния пигмент-белкового комплекса, однако, эти аминокислоты не столь важны для связывания субстрата или кофактора. Авторы полагают, что Tyr275 и Lys279 способствуют правильной (необходимой для осуществления фотореакции) координации НАДФН и Пхлд в каталитическом сайте фермента и таким образом контролируют эффективность формирования фотоактивного состояния ПОР. Поскольку замена аминокислот с полярной (Tyr) или несущей заряд (Lys) R-группой на аминокислоты с неполярной (нейтральной) R-группой приводит к изменению спектральных свойств комплекса – уменьшению способности к созданию фотоактивного состояния, авторы считают, что именно поверхностный заряд ПОР играет важную роль в создании оптимальной для фотореакции конформации.

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ПОР К СУБСТРАТУ

В этиолированных листьях растений существует несколько химических разновидностей молекул предшественника хлорофилла: бесфитольный протохлорофиллид; этерифицированный фитолом, или его предшественниками (геранилгераниол, дигидрогеранилгераниол, тетрагидрогеранилгераниол), протохлорофилл; моно и дивинил- формы этих пигментов. Фотохимическая активность указанных форм различна и определяется способностью пигментов к взаимодействию с ферментом ПОР. Специфичность ПОР к субстрату *in vitro* изучали с использованием выделенного фермента. Оказалось, что для связи молекул протохлорофилла(ида) с ПОР и фотохимической активности комплекса важны определенные группы атомов молекулы пигмента. Для выяснения специфичности ПОР к субстрату Клемент и соавт. [49] исследовали способность различных производных к фотовосстановлению Пхлда в искусственных комплексах с НАДФН и ПОР. Авторы проанализировали 13 аналогов протохлорофилла(ида). Шесть из них с различными боковыми группами колец А и В проявляли себя как активные субстраты, тогда как остальные аналоги с заменой боковых цепей колец Д и Е потеряли способность быть субстратами ПОР. Удалось выяснить, что по крайней мере три сайта пигментной молекулы играют важнейшую роль для связывания с активным центром фермента, а именно: центральный атом металла, пропионовая кислота (боковая цепь кольца Д) и структура кольца Е.

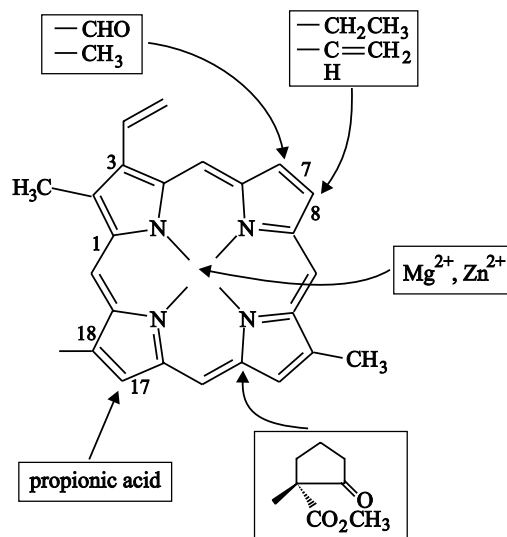


Рис. 4. Ключевые позиции порфиринового кольца молекулы протохлорофиллида, необходимые для активности ПОР. В рамках показаны химические группы, ответственные за фотовосстановление субстрата при участии ПОР [52].

Авторы работы [52] на основании результатов ряда исследований обобщили в виде схемы основные черты химического строения молекулы протохлорофилла(да), необходимые для того, чтобы она могла быть субстратом ПОР (рис. 4).

Оказалось, что изолированная ПОР способна восстанавливать протохлорофиллид *a*, но не протохлорофилл (этерифицированную форму) [20, 43, 53, 54]. Для активности комплекса важны размер и природа боковой группы в положении С17. Эта группа должна быть пропионовой кислотой, содержащей в положении С17 свободную карбоксильную группу. Более длинные спирты, например, фитол или акрильная группа, делают невозможным фотовосстановление молекулы [49, 55]. Замена пропионата боковой цепи кольца Д на метиловый эфир пропионовой кислоты или на акрилат приводили к падению фотохимической активности [49]. Для акрилата еще возможно ионная связь с ферментом, но эта связь более жесткая, чем связь пропионата. Однако, встречаются и исключения из этого правила. Так, ПОР, выделенная из С-2А мутанта зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus*, могла восстанавливать протохлорофиллид, этерифицированный длинноцепочечным спиртом [56]. При изучении механизма фотовосстановления длинноволновой этерифицированной

формы протохлорофилла Пхл682/672 в клетках мутанта хлореллы Игнатова и Литвина показали, что эта форма протохлорофилла способна превращаться в длинноволновую форму хлорофилла [57, 58]. Авторы предположили, что у водорослей, возможно, существует особая форма ПОР, катализирующая фотовосстановление этерифицированной молекулы предшественника хлорофилла. Следует заметить, что и в более ранних работах [59–67] были получены данные, свидетельствующие о способности этерифицированного протохлорофилла превращаться в хлорофилл, хотя и с низкой эффективностью.

Что касается моно- и дивинил форм протохлорофиллида, то обе они могут быть субстратом ПОР. Боковая группа в положении С8 может быть или винильной (ДВ-Пхлд), или этильной (МВ-Пхлд) [68–70]. Боковая группа в положении С7 может быть метильной, как у протохлорофиллида *a*, или альдегидной, как у протохлорофиллида *b* [54]. Однако, вопрос о существовании протохлорофиллида *b* в этиолированных листьях растений является спорным.

Важную роль для связи с ПОР играет центральный атом Mg^{2+} . При его замене на атомы других металлов (за исключением атома Zn^{2+}) теряется активность комплекса. При замещении же магния цинком активность тройного комплекса сохраняется [43, 71, 72].

Для активности тройного комплекса очень важны строение и стерическая конфигурация кольца Е (сайта связи с ферментом) молекулы Пхлда [49]. Протохлорофиллид с химическими модификациями кольца Е в положениях С13¹ и С13² не способен быть субстратом ПОР [49]. Изменение стереохимии групп $-H$ и $-CO_2CH_3$ в положении С13² [49, 73] также приводит к ингибированию реакции фотовосстановления Пхлда. Эти модификации пигмента утрачивали способность к образованию энлатов путем кето-энол таутомеризации. На основании этих данных авторы пришли к выводу, что образование энлатов посредством кето-энол таутомеризации необходимо для фотореакции. Таким образом, протохлорофиллид *a'* (стереоизомер в положении С13²) не может быть использован как субстрат ПОР. Следовательно, хлорофилл *a'*, функционирующий в РЦ ФС I, по-видимому, должен образовываться не из протохлорофилла, а из хлорофилла [74].

Если принять предположение, что щель (Rossmann fold) является формой активного центра, как и в гомологичных алкоголь-дегидрогеназах [34], фиксация колец Д и Е на дне щели согласуется с экспериментальными данными работы [49].

IV. ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИД ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Как уже говорилось, в работе Оливера и Гриффитса [29] с помощью гель-электрофореза были обнаружены две полосы полипептидов ПОР гороха и фасоли с молекулярной массой 35 и 37 кДа, соответственно. Однако, у целого ряда растений первоначально был обнаружен единственный полипептид ПОР. По данным ряда авторов размер ПОР различных видов растений варьировал от 33 до 38 кДа [29, 30, 75, 77–79]. Методом изоэлектрического фокусирования было установлено существование, по крайней мере четырех различных видов протохлорофиллид редуктазы [76, 80]

В 1995 г. в лаборатории Апеля было продемонстрировано, что в *Arabidopsis thaliana* и в ячмене существует два типа ядерных генов, кодирующих ПОР: *Por A* и *Por B* (с 75% гомологии) [81, 82]. В соответствии с этим две соответствующие формы фермента ПОР были названы ПОР А и ПОР В. Молекулярный вес ПОР В несколько больше, чем молекулярный вес ПОР А – 37 кДа [83]. Биохимическая активность ПОР А и ПОР В была продемонстрирована *in vivo* в трансгенных растениях с оверэкспрессией этих ферментов [84–87].

Экспрессия гена *Por A* была зарегистрирована в этиолированных проростках, следовательно ПОР А синтезируется в темноте и составляет основную массу паракристаллических проламеллярных тел этиопластов. Однако транскрипция гена *PorA* прекращается на свету, и энзим быстро разрушается (в первые 4 часа зеленения) протеазой, индуцируемой светом [88–90]. С другой стороны, транскрипция гена *PorB* осуществляется и в темноте, и на свету с непрерывной последующей трансляцией в энзим, ответственный за биосинтез и накопление хлорофилла на дневном свету. Перенос цитоплазматического предшественника ПОР А в пластиды является протохлорофиллид-зависимым процессом, чего не наблюдается для предшественника ПОР В [85]. Исследования зависимости экспрессии генов ПОР от возраста выращиваемых на свету растений (арабидопсиса и ячменя) показали, что экспрессия *PorA* наблюдается почти исключительно в молодых проростках, а экспрессия *PorB* – как в проростках, так и во взрослых растениях [81, 91]. Поскольку этиоляция и образование проламеллярных тел являются частью естественного последовательного цикла темнота – свет в течение суток, следует ожидать, что ПОР А и ПОР В играют определенную роль в течение биосинтеза и накопления хлорофилла *a* в естественных фотопериодических условиях. Образование в этиопластах проламеллярных тел и активной формы протохлорофиллида Пхлд655/650

связано с наличием ПОР. Для выяснения роли двух видов ПОР в формировании фотоактивных структур были исследованы мутанты *Arabidopsis thaliana* с дефицитом проламеллярных тел и Пхлда655/650 после оверэкспрессии в них генов обеих ПОР [85]. Было показано, что реставрация как ПОР А, так и ПОР В ведет к формированию этиопластов, содержащих обширные проламеллярные тела и большое количество фотоактивного Пхлда655/650. Авторы заключили, что оба энзима (ПОР А и ПОР В) являются причиной дифференцирования этиопластов.

Количество генов ПОР различно у разных видов растений. В прокариотах была обнаружена только ПОР В в дополнение к структурно не связанному, активному в темноте энзиму, восстанавливающему протохлорофиллид. У спороносящих растений (*Spermatophyta*) появляется дополнительно ПОР А. У *Arabidopsis thaliana* вначале находили только два гена: *PorA* и *PorB* и лишь сравнительно недавно был обнаружен третий ген – *PorC* (см. ниже). В листьях ладанной сосны обнаружено два семейства генов ПОР: семейство *porA* содержит два гена, семейство *porB* – по крайней мере 11 генов [92]. Появление более чем одного гена не является общим правилом. Ряд растений содержит только один ген. К ним относятся некоторые цианобактерии [93, 94] и зеленые водоросли [95], зеленые листья огурца [96] и садовый горошек [97].

Недавно была обнаружена третья разновидность ПОР. При секвенировании генома *Arabidopsis thaliana* был идентифицирован ген, кодирующий новый, неизвестный ранее белок, подобный ПОР [98, 99], который назвали ПОР С. Его молекулярная масса 38 кДа [83]. В отличие от *PorA* и *PorB* экспрессия гена *PorC* в этиолированных листьях не наблюдалась, а накопление соответствующей мРНК началось сразу после начала освещения [98, 99]. Подобные результаты ранее были получены для ПОР огурцов [100] и *Marchantia* [101]. Возник вопрос о функциональной роли ПОР С – является ли этот фермент «лишним» или же служит для адаптации растений к синтезу хлорофилла в различных световых условиях. Авторы работы [99] обнаружили активность ПОР С *in vitro* (ген *PorC* экспрессировали в *E.coli*). Выяснилось, что активность ПОР С (как и активность ПОР А и ПОР В) зависит от света и наличия НАДФН. Во взрослых, адаптированных к свету растениях, обнаружены только мРНК ПОР В и мРНК ПОР С. Различие между ПОР В и ПОР С было найдено в проростках, выращенных под непрерывным белым светом. При помещении таких растений в темноту концентрация мРНК ПОР С быстро уменьшалась и вскоре падала ниже предела регистрации, концентрация же мРНК ПОР В не изменялась. При экспонировании растений на свету разной

интенсивности количество мРНК ПОР В оставалось неизменным, а количество мРНК ПОР А и мРНК ПОР С зависело от изменения интенсивности света. Установлено, что мРНК ПОР А обнаруживается только в проростках, выращенных на свету низкой интенсивности, и исчезает при высокой интенсивности света, тогда как концентрация мРНК ПОР С увеличивается с повышением интенсивности света. Такие различные ответы на действие света позволили предположить, что у *Arabidopsis thaliana* функционируют все три ПОР. Они позволяют растению обеспечивать его потребности в биосинтезе хлорофилла более селективно, путем предпочтительного использования одного из трех ферментов при разных световых режимах. Эти выводы получили подтверждение при исследовании мутантов *Arabidopsis thaliana* не способных синтезировать ПОР В или ПОР С [83, 102]. В этиолированных проростках мутанта *porB* наблюдалось понижение фотоактивности протохлорофиллида и уменьшение размеров проламеллярных тел. При освещении этиолированные проростки мутанта *porB* обладали способностью синтезировать хлорофилл в той же степени, как и растения дикого типа, однако эта способность заметно снижалась в условиях низкой интенсивности света. Зеленение же мутантов, лишенных ПОР С, угнеталось с увеличением интенсивности света. Это привело к заключению, что ПОР С, накапливающаяся при высоких интенсивностях света, при зеленении этиолированных проростков может служить для их защиты от повреждающего действия света. По мнению авторов, ПОР В также несет защитные функции при зеленении, поскольку было обнаружено, что этиолированные проростки мутантов *porB* более чувствительны к блокированию зеленения дальним красным светом, чем проростки дикого типа.

Таким образом, к настоящему времени можно считать установленным, что в листьях растений существует три разновидности протохлорофиллид оксдоредуктазы – ПОР А, ПОР В и ПОР С, кодирующиеся разными генами. Эти белки очень близки по своей структуре, о чем свидетельствует высокая гомология аминокислотной последовательности [98] и близость молекулярных масс (36, 37 и 38 кДа, соответственно).

Вместе с тем установлено, что синтез трех видов ПОР также, как и синтез соответствующих мРНК, по-разному регулируются светом. Транскрипция *PorA* строго ингибируется светом; транскрипция *PorB* стимулируется светом при деэтиоляции растений, но не зависит от интенсивности света при выращивании растений при непрерывном освещении белым светом [81, 82]. Уровень транскрипции *PorC*, не обна-

руживаемой в темноте, увеличивался в течение освещения, и ее накопление стимулировалось светом высокой интенсивности [98, 99, 102].

Интересно отметить, что для организмов, имеющих только один ген ПОР, зависимость транскрипции фермента от действия света различна: для одних растений она не зависит от освещения [97, 103], для других – увеличивается под действием света [96, 100], для третьих – ингибируется [104]. Возможно, причину таких различий удастся выяснить при дальнейшем изучении механизмов фоторегуляции биосинтеза ПОР и протохлорофиллида.

V. ЛОКАЛИЗАЦИЯ АКТИВНОГО КОМПЛЕКСА В ПЛАСТИДАХ, СВЯЗЬ ФОТОФЕРМЕНТА С МЕМБРАНАМИ

Первая попытка выяснения локализации протохлорофиллида была предпринята Бордманом и Андерсоном (1964) с помощью флуоресцентной микроскопии [105]. Они обнаружили, что флуоресценция не равномерно распределена по этиопласту, а сосредоточена в ограниченной области, которую авторы назвали «центром стромы». Ультраструктура этиопластов была изучена с помощью электронной микроскопии [106, 107]. Были обнаружены трубчатые мембраны, образующие паракристаллическую структуру, получившие название «проламеллярные тела» (ПЛТ). И «центр стромы» был переименован в ПЛТ.

Ламеллярные мембраны, окружающие ПЛТ, были названы протилакоидами (ПТ). Позднее с помощью спектроскопического [108, 109] и биохимического анализа [110], а также иммуноферментного метода [111, 112], было показано, что ПОР и активная форма протохлорофиллида Пхлд 655/650 локализованы в основном в проламеллярных телах, однако в небольших количествах они обнаруживаются и в мембранах стромальных протилакоидов. Причем ПОР протилакоидов оказалась более устойчивой к разрушающему действию света по сравнению с ПОР, локализованной в ПЛТ [111]. Корреляция количества ПОР с образованием ПЛТ подтвердилась позже дургими авторами [87]. Однако, в молодых (2–3 дневных) этиолированных листьях, в которых еще не образовались проламеллярные тела [113], активная форма протохлорофиллида сосредоточена в протилакоидах.

Фотофермент ПОР не является интегральным белком мембран, он скорее может быть классифицирован как периферический мембранный белок, локализованный на стромальной стороне тилакоидов, поскольку в его гидрофобной области не обнаружено участка, достаточно

длинного для пронизывания мембраны [24, 31, 79, 97, 114–116]. Подтверждением перифирической природы ПОР служит также его солубилизация при низкой концентрации детергента (n-октил- β -D-глюкозид), типичной для солубилизации наружных белков мембран [49].

Иммунологический анализ показал, что в хлоропластах адаптированных к свету растений и зеленых водорослей ПОР и Пхлд локализованы на стромальной стороне тилакоидных мембран и в мембранах хлоропластной оболочки [117–121]. Активность ПОР в реакции фотовосстановления протохлорофиллида проявлялась при освещении мембран хлоропластных оболочек в присутствии НАДФН [118, 122]. Далин с соавторами [119], исследовавшие *in vitro* импорт ПОР в хлоропласты гороха, показали, что ПОР присоединяется к стромальной стороне тилакоидных мембран как перифирический белок. По-видимому, распределение белка ПОР между стромальными тилакоидами и внутренними мембранами оболочек хлоропластов зависит от вида растений [120].

СВЯЗЬ ПОР С МЕМБРАНАМИ

Результаты исследования вторичной структуры ПОР [35] позволили высказать предположение, что ПОР прикрепляется к мембране с помощью амфифильного сегмента, локализованного в С-терминальной части белка и содержащего триптофановый остаток, или с помощью длинной гидрофобной экстра-петли, расположенной в той же области, которая осуществляет «заякоривание» фермента [35]. Аронсон с соавт. [123, 124], использовавшие для исследования мутанты гороха с делециями ПОР в С-терминальной области, показали, что аминокислоты этой области (с 362 остатка) необходимы для соединения ПОР с мембраной и, по-видимому, именно С-конец ПОР выполняет роль мембранного якоря.

Еще в работе 1993 года Тикле и Гриффитс высказали предположение об электростатической природе связи ПОР с мембраной [31]. В последнее время появился ряд работ о роли поверхностного заряда на аминокислотных остатках ПОР для ее связи с тилакоидами [51, 125]. Методом мутагенеза, с заменой заряженных аминокислот незаряженным аланином, было показано [125], что именно при замене аминокислот в центральной части белка (между остатками 86 и 342) ПОР теряет способность к надлежащему прикреплению к тилакоидам, что ведет к снижению ее каталитической функции.

Таким образом, закрепление ПОР на мембране осуществляется с помощью С-терминальной части молекулы, но ее положение, необходимое для каталитической функции, контролируется поверхностным зарядом на аминокислотах центральной части фермента.

VI. МНОЖЕСТВЕННОСТЬ ФОРМ ПРЕДШЕСТВЕННИКА ХЛОРОФИЛЛА *IN VIVO*

Гетерогенность активных пигмент-ферментных комплексов предшественника хлорофилла проявляется также в существовании целого ряда модификаций пигмента, входящего в состав активного комплекса, которые различаются либо по химическому строению молекул (что обнаруживается при экстрагировании и последующем исследовании пигмента), либо по их различному состоянию непосредственно в составе комплекса. Такие различия проявляются при спектральных исследованиях целых клеток или выделенных из них комплексов.

ХИМИЧЕСКИ РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМЫ ПРЕДШЕСТВЕННИКА ХЛОРОФИЛЛА

Протохлорофилл и хлорофилл

Как было сказано выше (см. раздел «Специфичность ПОР к субстрату»), в состав активного комплекса предшественника хлорофилла в основном входит бесфитольная форма – протохлорофиллид. Еще Годневым [126] было высказано мнение о том, что длинная фитольная цепь создает серьезное стерическое затруднение при связывании этерифицированной молекулы со специфическим белковым носителем. Исследования Гриффитса [43] показали, что для образования пигмент-белкового комплекса первостепенное значение имеет свободная карбоксильная группа у 17-го атома углерода. При этерификации пропионового остатка даже небольшой метильной группой пигмент теряет способность к образованию связи с белком. В то же время целый ряд исследователей наблюдали, что этерифицированные фитолом молекулы предшественника хлорофилла могут участвовать в реакции фотохимического восстановления с образованием хлорофилла, хотя и с малой эффективностью [59, 61, 66, 67, 127–131]. Поэтому можно думать, что существует минорный пул активных комплексов, включающих этерифицированную фитолом форму предшественника хлорофилла. Интересно отметить, что этерифицированный протохлорофилл в основном локализован в протилакоидах [132].

Методами масс-спектрометрического анализа и газо-жидкостной хроматографии установлено, что этерифицирующими спиртами протохлорофиллов могут быть также и предшественники фитола: геранилгераниол (GG) – $C_{20}H_{33}OH$, дигидрогеранилгераниол – $C_{20}H_{35}OH$ и тетрагидрогеранилгераниол – $C_{20}H_{37}OH$ [133–137]. Протохлорофиллы, этерифицированные различными спиртами, предшественниками фитола, были выделены из этиолированных

проростков различных видов растений [136, 137]. Обнаружено, что в листьях ячменя часть GG-протохлорофилла под действием света может превращаться в GG-хлорофилл *a* [135].

Моновинил и дивинил- протохлорофилл(ид)

Рядом авторов [64–66, 138–141] было установлено, что оба пула предшественника хлорофилла (протохлорофиллид и этерифицированная форма) гетерогенны – они могут включать как моновинил, так и дивинил-модификации хромофора (а не только моновинил-протохлорофиллид, как это предполагалось ранее). Эти модификации различаются по наличию боковых винильных групп в макроцикле молекулы: у 3-го углеродного атома в пиррольном кольце А (моновинил-протохлорофиллид) или двух боковых винильных групп: у 3-го и 8-го атомов в пиррольных кольцах А и В (дивинил-протохлорофиллид). В молекуле моновинил-Пхлд вместо второй винильной группы в положении 8 макроцикла находится этильная группа. Моно и дивинил-протохлорофиллы(иды) были разделены с помощью тонкослойной хроматографии.

Моно- и дивинильные формы протохлорофилла(ида) различаются по спектрам поглощения (или спектрам возбуждения флуоресценции) в синей области (в «полосе Соре»). Моновинил- протохлорофилл в эфире при 77К характеризуется максимумом поглощения при 437 нм (с менее выраженным сателлитом при 443 нм), дивинил-протохлорофилл – максимумом при 443 нм (с плечом при 451 нм) [64–66, 140]. Под действием света обе формы протохлорофиллида превращаются в две разные формы хлорофиллида, различающиеся по положению полос поглощения в синей области спектра. Затем моновинил- и дивинил-хлорофиллид в результате темновых параллельных реакций превращаются в две соответствующие формы хлорофилла *a*, также различающихся положением коротковолновых полос поглощения [142].

Относительный вклад моновинил- и дивинил-компонентов в общий фонд протохлорофилловых пигментов определяется таксономической принадлежностью растения. В этиолированных однодольных растениях накапливаются в основном моновинильные формы предшественника хлорофилла [65, 143]. У двудольных видов преобладают дивинил-протохлорофиллы (иды) [143, 144]. Для некоторых двудольных растений (огурцы, бобы) характерно образование приблизительно равных количеств обеих разновидностей протохлорофилловых пигментов [143].

Относительно недавно (20–30 лет назад) существовала точка зрения [131, 139, 145], согласно которой дивинильные пигменты

служат предшественниками моновинильных. Однако, в результате систематических исследований Рибайза и соавт. [64–67, 140, 141, 146, 148, 149] выяснилось, что оба компонента фонда предшественника хлорофилла в высших растениях образуются независимо друг от друга. Темновой процесс биосинтеза предшественника осуществляется четырьмя параллельными путями (разветвление на стадии копропорфириногена) и приводит к накоплению моновинил- и дивинил производных Пхлда и протохлорофилла, которые при освещении восстанавливаются, соответственно, до моновинил- и дивинил- хлорофиллида и хлорофилла. Затем дивинил-хлорофилл восстанавливается до моновинил-хлорофилла. Эта реакция катализируется 8-винил редуктазой. В высших растениях весь функциональный хлорофилл находится в моновинильной форме. Позднее, Рибайз с соавт. предложили еще более сложную схему [150], включающую шесть параллельных путей образования молекулы предшественника хлорофилла. Два дополнительных пути берут начало от дивинил- и моновинил-протопорфириногена, этерифицированного алкильной группой с неизвестной длиной цепи.

Оба существующих в этиолированном растении пула протохлорофиллида: активный (превращающийся в хлорофиллид под действием света) и неактивный, состоят из смеси дивинил- и моновинил- форм пигмента в приблизительно равном отношении [87]. Высказывались предположения, что разные химические формы хлорофилла, образующиеся из химически различных форм предшественника, могут обладать определенной функциональной специфичностью в процессе фотосинтеза [149], однако, эта гипотеза до сих пор не получила подтверждения.

Итак, можно заключить, что в этиолированных листьях растений присутствуют четыре основные химические разновидности предшественника хлорофилла: этерифицированный фитолом в положении 17 протохлорофилл, Пхлд, а также их дивинил- и моновинил- формы. Активный пул предшественника состоит в основном из бесфитольного Пхлда, включающего дивинил- и моновинил- формы в пропорциях, определяемых таксономической принадлежностью растений.

СПЕКТРАЛЬНО РАЗЛИЧНЫЕ ФОРМЫ ПРЕДШЕСТВЕННИКА ХЛОРОФИЛЛА

Спектры поглощения протохлорофилла (ида) *in vivo* и *in vitro* существенно отличаются друг от друга. Основной красный максимум протохлорофилла в серном эфире расположен при 621–623 нм, в пиридине – при 633–640 нм [151, 152]. В естественном состоянии,

то-есть, в целом неразрушенном этиолированном листе красная полоса поглощения протохлорофилла была обнаружена при 650 нм [151–154], а в водных гомогенатах (коллоидных растворах) вещества этиолированных листьев – при 635–636 нм [9, 10].

В конце 50-х годов, используя специальную методику измерения светорассеивающих объектов, Шибата смог впервые зарегистрировать два красных максимума в спектре поглощения интактных этиолированных листьев: при 636 и 650 нм [155, 156], принадлежащих по его мнению двум формам предшественника хлорофилла: более длинноволновой, способной к фотопревращению в хлорофилл, форме Пхлд650 и неактивной более коротковолновой форме. Однако, позднее выяснилось, что форма протохлорофилла, характеризующаяся полосой поглощения при 636 нм, также способна превращаться в хлорофилл(ид), но менее активна по сравнению с основной формой предшественника Пхлд650.

Спектры флуоресценции протохлорофиллида *in vivo* удалось зарегистрировать благодаря торможению процесса его фотопревращения с помощью глубокого охлаждения объекта жидким азотом. Этот метод, впервые примененный Литвиным и Красновским [157–159] для исследования пигментов этиолированных и зеленеющих листьев, получил широкое распространение при исследовании свойств и функций всех фотосинтетических пигментов. Было обнаружено, что в низкотемпературных спектрах флуоресценции этиолированных листьев основной максимум расположен при 655 нм и значительно менее интенсивный максимум – при 633 нм. В длинноволновой области были зарегистрированы небольшие максимумы – при 690 и 705–707 нм. В более поздних исследованиях удалось обнаружить в красной области спектра флуоресценции этиолированных листьев еще несколько менее интенсивных максимумов. Было зарегистрировано шесть полос: при 629–635, 655–657, 674, 686–690, 712–713, 725–728 нм [160–165].

Применение методов производной спектроскопии и математического разложения спектров на составляющие гауссовы компоненты позволило обнаружить еще несколько дополнительных полос в спектрах поглощения и флуоресценции этиолированных листьев [166]. В длинноволновой области спектра поглощения были обнаружены полосы при 669, 676, 686, 696 и 710 нм, в спектре флуоресценции – полосы при 669, 686, 710–712 и 728 нм. Авторы пришли к заключению, что только полоса около 712 нм является колебательным сателлитом основной полосы при 656 нм. Результаты разложения спектров на гауссовы компоненты позволили сделать вывод, что пол-

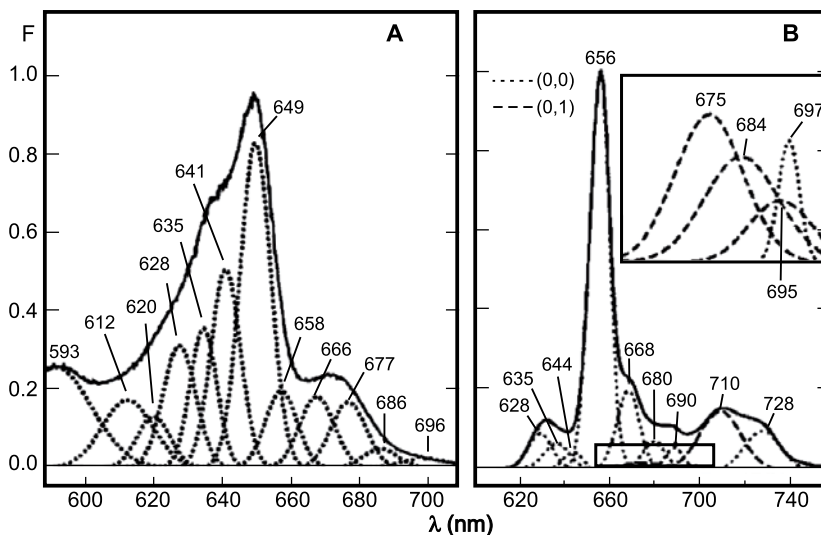


Рис. 5. Разложение на Гауссовы компоненты низкотемпературных спектров флуоресценции (В) и возбуждения флуоресценции (А) этиолированных листьев кукурузы. (0,0) – электронные переходы, (0,1) – колебательные компоненты. Спектры возбуждения флуоресценции измерены для эмиссии при 740 нм [170].

ный набор форм протохлорофилла *in vivo* представлялся в следующем виде: П633/628, П642/637, П655/650, П669/657, П682/669, П692/675, П?/685, П?/697, П730/711 (первая цифра – максимум флуоресценции, вторая – максимум поглощения). Разложение спектральных кривых на составляющие гауссовы компоненты применялось и в более поздних работах другими исследователями для выяснения количества и параметров спектрально различных форм протохлорофилла. Полученные результаты [132, 167–169] в основном совпадали с результатами предыдущих исследований. Исследование спектральных форм Пхлда в этиолированных листьях двенадцати видов растений с помощью разложения спектров флуоресценции на гауссовы компоненты позволило авторам работы [167] высказать предположение о существовании в этиолированных растениях разных видов четырех универсальных форм протохлорофиллида, характеризующихся полосами флуоресценции при 633, 645, 657 и 670 нм.

На рис. 5 приведены результаты недавней работы [170] – комплексного спектрального исследования этиолированных листьев разных видов растений (в том числе мутантов) с различным отношением спектральных форм по спектрам флуоресценции и возбуждения флуоресценции и по соответствующим производным

спектрам. Проводилось разложение спектральных кривых на составляющие гауссовы компоненты. В работе удалось разграничить колебательные сателлиты основных форм Пхлд и длинноволновые полосы, принадлежащие самостоятельным формам Пхлд. Кроме колебательных сателлитов в длинноволновой области (при 675, 684, 695 и 712 нм), было выявлено пять полос, принадлежащим формам протохлорофиллида – при 666, 680, 690, 698 и 728 нм, и соответствующие им полосы в спектре возбуждения флуоресценции – при 658, 668, 677, 686 и 696 нм. В результате был уточнен перечень форм протохлорофиллида и их спектральные параметры. По сравнению с данными более ранней работы [166] в коротковолновой области были обнаружены дополнительные формы Пхлд 627/620 и Пхлд 646/640, а также показано, что полосам поглощения при 686 и 696 нм соответствуют максимумы флуоресценции при 697 и 728 нм (формы Пхлд697/686 и Пхлд728/696), которые ранее не удавалось идентифицировать.

Таким образом, в этиолированных листьях существуют три основные спектральные формы протохлорофиллида: Пхлд633/628, Пхлд643/637, Пхлд655/650 (доминирующая форма), и пять минорных длинноволновых форм: Пхлд666–669/658, Пхлд680–682/668, Пхлд690–692/677, Пхлд698/686 и Пхлд728/696.

Основные спектральные формы протохлорофиллида

Три основные спектральные формы предшественника хлорофилла проявляются по разному в спектрах поглощения и флуоресценции. Полоса при 628 нм в абсорбционном спектре нормального этиолированного листа либо не разрешается вовсе (из-за наложения соседних полос поглощения), либо проявляется в виде очень слабого плеча. Поскольку коротковолновая форма Пхлд 633/628 характеризуется очень слабой фотоактивностью при комнатной температуре и вовсе не подвергается фотопревращению при отрицательных температурах, ее полосу поглощения при 628 нм можно отчетливо видеть в спектре поглощения освещенного этиолированного листа после исчезновения полос двух активных форм Пхлда. В виде небольшого максимума полоса при 628 нм проявляется в производных спектрах поглощения и возбуждения флуоресценции и при разложении спектров на составляющие гауссовы компоненты. В коротковолновой области спектра поглощения формы Пхлд633/628 основной максимум расположен при 440 нм (рис. 6).

Коротковолновая форма Пхлд628/633 считается неактивной формой, она не подвергается превращению при кратковременном

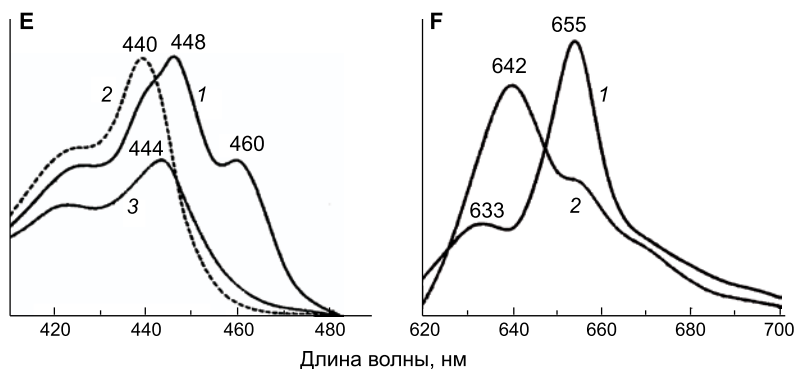


Рис. 6. Низкотемпературные (77 К) спектры возбуждения флуоресценции (А) и флуоресценции (Б) основных форм протохлорофиллида, измеренные в 7-дневных этиолированных листьях фасоли [194].

А: флуоресценция регистрировалась при 655 нм (1), при 633 нм (2) и при 642 нм (3), спектр 3 измерен для этиолированного листа фасоли, инкубированного 2 суток в растворе δ -аминолевулиновой кислоты для накопления формы Пхлд643/639.

Б: 1 – спектр флуоресценции 7-дневного этиолированного листа фасоли; 3 – спектр этиолированного листа, инкубированного 2 суток в темноте в растворе δ -аминолевулиновой кислоты (10 мМ) для накопления формы протохлорофиллида Пхлд 643/639.

освещении [167, 171]. Однако, в растениях, обогащенных этой формой, наблюдалось ее медленное превращение в хлорофиллид [172–175]. Как было показано в наших исследованиях, эта форма способна к превращению в хлорофилл только при температуре выше 5°C [176]. Согласно результатам ряда исследователей, обсуждаемая форма Пхлда является предшественником основной фотоактивной формы Пхлд 655/650 в цепи темнового синтеза пигментов [21, 177, 178]. В частности, в работе Гриффитса [21] с помощью дифференциальной спектроскопии было показано, что 10-минутная темновая инкубация предосвещенных (для фотопревращения активной формы протохлорофиллида Пхлд655/650) проламеллярных тел, выделенных из этиопластов ячменя, с НАДФН при комнатной температуре приводит к убыли Пхлд 633/628 и образованию более длинноволновых форм с максимумами поглощения около 640 и 650 нм. Исследование спектров действия образования хлорофилла также показало, что участие в этом процессе формы Пхлд633/628 осуществляется через стадию преобразования этой неактивной коротковолновой формы в более длинноволновую основную фотоактивную форму [179]. Предпола-

гали, что форма Пхлд633/628 соответствует протохлорофиллиду, не связанному специфическим образом с ферментом ПОР [23, 42, 132]. С другой стороны, не исключено, что соответствующий коротковолновой форме протохлорофиллид прикреплен к ПОР таким образом, что теряется его фотохимическая активность [49]. Подтверждением того, что мономерный коротковолновый протохлорофилл Пхлд 633/628 связан с белком, служат данные о времени затухания флуоресценции этой формы, которое по данным работы [180] значительно меньше (около 6 нс) по сравнению со временем затухания флуоресценции протохлорофиллида в растворе (около 10 нс).

Форма протохлорофиллида Пхлд643/637 обнаруживается по спектрам поглощения (основные максимумы при 637 и 444 нм), но практически не проявляется в спектрах флуоресценции, что связано с высокоэффективной миграцией энергии (близкой к 100 %) с этой формы на Пхлд655/650 [165, 181–183]. Полоса при 643 нм появляется в спектре этиолированных листьев после того, как они подвергаются каким-либо воздействиям (в том числе процедуре выделения активных пигмент-белковых комплексов), нарушающим в какой-то мере их нативное состояние, обеспечивающее эффективную миграцию энергии между молекулами пигмента. В большом количестве указанная форма накапливается при инкубации этиолированных листьев в растворе δ – аминолевулиновой кислоты (см. рис.6). Форма Пхлд643/637 является доминирующей в этиолированных листьях некоторых видов растений [184, 185]. В разностных спектрах флуоресценции «свет – минус – темнота» [169] отрицательный максимум при 643–644 нм наблюдался лишь в очень молодых (до 4 дней) этиолированных листьях. При дальнейшем выдерживании растений в темноте усиливалась миграция энергии с этой формы на основную, более длинноволновую форму протохлорофиллида Пхлд655/650. Форма Пхлд643/637 фотохимически активна и под действием света превращается в хлорофиллид при достаточно низких температурах также, как и протохлорофиллид Пхлд655/650. Однако, ее фотоактивность *in vivo* сильнее зависит от температуры, чем фотоактивность основной активной формы Пхлд655/650 [176].

Основная фотоактивная форма Пхлд655/650 обнаруживается лишь в целых этиолированных листьях. В коротковолновой области ее спектра поглощения наблюдается две полосы: при 448–450 нм и при 460–462 нм (см. рис.6). При нарушении нативного состояния листа форма Пхлд655/650 исчезает с одновременным усилением поглощения и флуоресценции более коротковолновых форм. Длинноволновое положение максимумов активных форм протохлорофиллида Пхлд643/637 и Пхлд655/650, по-видимому, обусловлено связью

хромофора с ферментом ПОР и донором водорода НАДФН, а также хромофор-хромофорным взаимодействием молекул пигмента, о котором свидетельствуют результаты исследования кругового дихроизма [186, 187], поляризации флуоресценции и миграции энергии [188]. Предполагается, что молекулы Пхлда образуют димеры [186] или тетрамеры [188]. Возможно, пигмент-пигментное взаимодействие обусловлено агрегацией белковых молекул (ПОР), несущих хромофоры.

Состояние кофактора НАДФН, по всей вероятности, также влияет на спектральные свойства активной формы Пхлда. Было показано, что добавление НАДФ⁺ к освещенным (для превращения в хлорофилл активной формы протохлорофиллида) препаратам этиопластов или этиопластных мембран приводит к накоплению в темноте неактивной пигментной формы с максимумом поглощения при 642 нм и максимумом флуоресценции при 649 нм, в то время как в результате добавления НАДФН в темноте формируется более длинноволновая фотоактивная форма протохлорофиллида с максимумом поглощения при 650 нм и с максимумом флуоресценции при 655–657 нм [189–191].

Кроме того, по-видимому, немаловажную роль в формировании длинноволновой формы Пхлд_{655/650} *in vivo* играют липиды внутренних мембран этиопластов, которые, скорее всего, способствуют образованию агрегатов пигмент-белкового комплекса (см. ниже).

Протохлорофиллид Пхлд_{655/650} под действием света превращается в хлорофиллид даже при очень низких температурах (до 190 К).

О двух пулах активной формы протохлорофиллида Пхлд_{655/650}

Предположение о существовании двух пулов основной фотоактивной формы протохлорофиллида Пхлд_{655/650} было высказано нами [192, 193] на основании наблюдения параллельного образования двух первичных форм хлорофиллида после кратковременного освещения этиолированных листьев при низкой температуре. Недавно были получены прямые доказательства существования двух пулов Пхлд_{655/650} [169, 194, 195]. С помощью метода разложения разностного спектра флуоресценции: свет минус темнота, на составляющие гауссовы компоненты было показано, что полоса флуоресценции фотоактивной формы Пхлд_{655/650} включает два компонента с максимумами при 652–653 нм и 657 нм [169]. Форма Пхлд₆₅₃ максимально накапливается в очень молодых двух-трехдневных этиолированных листьях, когда еще не сформировались проламеллярные тела. Накопление фотоактивного Пхлда с максимумом флуоресценции при 653 нм обнаружено также в листьях расте-

ний, выращиваемых в нормальных фотопериодических условиях (день–ночь) после темного периода [169] и в зеленеющих листьях ячменя после нескольких часов освещения, когда разрушаются проламеллярные тела и развиваются тилакоиды [174]. Исходя из этих фактов, авторы полагают, что протохлорофиллид Пхлд653 связан с протилакоидами или тилакоидами в отличие от Пхлд655, который связан с ПЛТ. В работе Игнатова и Литвина [194, 195] также было показано, что основная активная форма Пхлд655/650 существует в двух модификациях с максимумами флуоресценции при 653 и 655 нм и максимумами поглощения при 648 и 650 нм. Спектры поглощения этих двух форм существенно различаются в синей области спектра: коротковолновые полосы этих форм располагаются, соответственно, при 440 и 450 нм. Установлено, что более коротковолновая форма Пхлд653/648 образуется под действием красного света из минорной длинноволновой формы предшественника хлорофилла Пхлд686/676, накапливающейся в очень молодых проростках, и служит предшественником нефлуоресцирующего хлорофилла Р-680 реакционных центров ФС 2 [194, 195].

Обсуждаемые основные формы предшественника хлорофилла обнаруживаются не только в этиолированных листьях и на ранних стадиях зеленения [169,196], но и в полностью сформировавшихся зеленых листьях [197, 198] (см. рис.7), а также в выращенных в темноте проростках голосемянных [199].

Фотопревращения этих форм, наблюдаемые при последующем освещении, служат доказательством того, что постоянный синтез хлорофилла в зеленых листьях растений осуществляется через те же формы предшественника, что и в этиолированных листьях [197, 198] (см. рис. 7).

Флуоресцентные исследования форм предшественника хлорофилла в целых листьях при физиологических условиях

Успехи в исследовании фотохимических реакций биосинтеза хлорофилла в целых клетках стали возможными благодаря применению чувствительных флуоресцентных методов. Трудность состояла в том, что свет, возбуждавший флуоресценцию, одновременно вызывал и фотопревращение пигментов. Выход был найден в глубоком охлаждении объекта (см выше, стр 21). Однако, и этот метод имел ряд существенных ограничений, поскольку измерения флуоресценции не могли осуществляться на одном и том же объекте, а характеристики флуоресценции в реальном процессе, протекающем при физиологических температурах, оставались неизвестными.

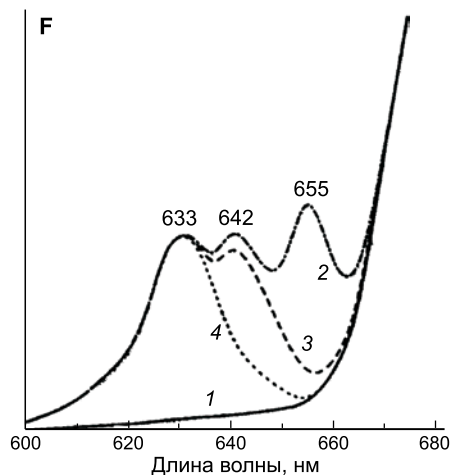


Рис. 7. Накопление и фотопревращение основных форм протохлорофиллида в зеленых листьях гибискуса [198].

1 и 2 – низкотемпературные (77 К) спектры флуоресценции зеленых листьев, измеренные до и после 16 часов темнового инкубирования образца, 3 – после дополнительного облучения белым светом 103 Вт/м², 4 – плюс еще 10 минут облучения белым светом 103 Вт/м².

Совсем недавно в нашей лаборатории (Дубровский, Литвин, неопубликованные результаты) была существенно повышена чувствительность метода, что позволило преодолеть это ограничение. Появилась возможность измерять флуоресценцию при столь низкой интенсивности света, что его фотохимическое действие практически не проявлялось (рис. 8, 9). Благодаря этому удалось провести исследования фотохимической стадии процесса в физиологических условиях непосредственно в ходе превращения пигментов на одном и том же объекте.

Была исследована флуоресценция активных форм предшественника хлорофилла, начиная с самых ранних стадий развития этиолированных проростков (растения с еще нераскрывшимися семядолями и неразвернувшимися листочками), когда преобладающей является коротковолновая форма протохлорофиллида с максимумом флуоресценции при 637–638 нм (форма Пхлд638). Из рис. 8А видно, что под действием света низкой интенсивности форма Пхлд638 превращается в продукт со спектром, характерным для хлорофилла(ида). При дополнительном интенсивном облучении флуоресценция продукта реакции сначала растет, но при дальнейшем и более интенсивном облучении изменения достигают некоторого предельного значения, что можно объяснить переносом энергии электронного возбуждения на фотопродукт (процесс, который конкурирует с фотореакцией). Обращает на себя внимание и тот факт, что спектр флуоресценции образующихся форм хлорофиллида не смещается в длинноволновую

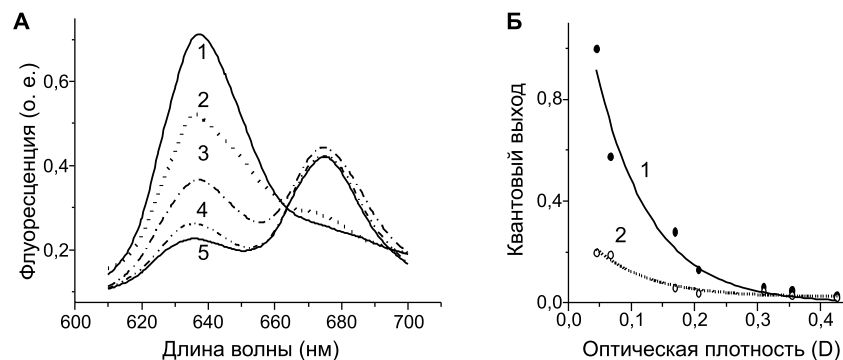


Рис. 8 Флуоресценция коротковолновой формы предшественника хлорофилла в листьях фасоли при физиологических условиях (25 °С)

А. Спектры флуоресценции (длина волны возбуждающего света 445 нм), измеренные на одном и том же листе.

1. Исходный спектр неразвернувшегося этиолированного листа.
2. То же, что 1, после освещения 2 мин светом 6,7 мВт/м².
3. То же, что 2, после дополнительного освещения 5 мин светом 200 мВт/м².
4. То же, что 3, плюс 2 с освещения светом 100 Вт/м².
5. То же, что 4, после инкубации в темноте 15 мин.

Б. Изменение квантового выхода флуоресценции при накоплении предшественника в этиолированных листьях.

По оси абсцисс – оптическая плотность (D) в красном максимуме. По оси ординат относительный квантовый выход флуоресценции при 638 нм (1) и при 655 нм (2).

область при очень интенсивном освещении (кривые 3 и 4), как это наблюдается для основной формы предшественника с максимумом флуоресценции 655 нм. Этот факт свидетельствует о том, что коротковолновая форма предшественника Пхлд638 участвует только в одной из двух последовательных фотореакций в цепи образования хлорофилла. На рис. 8Б представлены изменения квантового выхода флуоресценции коротковолновой (638 нм) и основной (655 нм) форм предшественника по мере накопления протохлорофиллида в этиолированных проростках. Относительный квантовый выход коротковолновой формы экспоненциально уменьшается при накоплении пигмента. Выход флуоресценции длинноволновой формы значительно меньше и мало изменяется в процессе ее накопления. Это согласуется с предположением о переносе энергии, при котором роль донора играет коротковолновая форма Пхлд638, а роль акцептора – его длинноволновая форма.

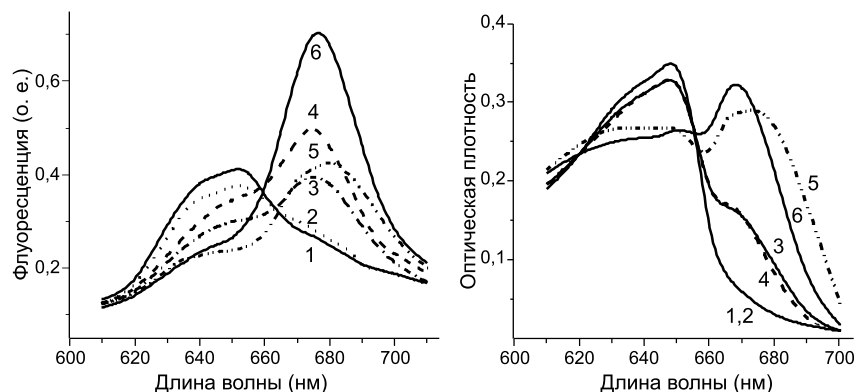


Рис. 9. Сопоставление спектров флуоресценции (А) и поглощения (Б) при фотопревращении основной формы предшественника хлорофилла (Пхлд655/650), измеренных в физиологических условиях (25 °С) на одном и тоже листе (6 дневные этиолированные проростки фасоли).

1. Исходный спектр этиолированного листа
2. То же, что 1, после освещения 2 мин светом 6,7 мВт/м²
3. То же, что 2, после дополнительного освещения 5 мин светом 200 мВт/м²
4. То же, что 3, после 15 мин инкубации в темноте.
5. То же, что 4, плюс 2 с освещения светом 100 Вт/м².
6. То же, что 5, после 15 мин инкубации в темноте.

Таким образом, на самых ранних стадиях зеленения этиолированных листьев активной является не наблюдавшаяся ранее коротковолновая форма протохлорофиллида с максимумом флуоресценции при 638 нм (Пхлд638).

На рис. 9 представлены изменения спектров флуоресценции (А) и поглощения (Б) этиолированных листьев на более поздней стадии этиоляции, когда преобладающей становится основная форма предшественника хлорофилла с максимумом флуоресценции при 655 нм. Из сопоставления спектров поглощения и флуоресценции видно, что квантовый выход образующихся форм хлорофиллида изменяется как в результате фотореакции, так и в ходе темновых процессов. Интенсивное освещение сопровождается смещением спектра фотопродуктов в длинноволновую сторону (ср. кривые 3 и 5 на рис. 9Б). Это свидетельствует об участии формы Пхлд655/650 (в отличие от формы Пхлд638, см. выше), в обеих последовательных фотореакциях заключительной стадии биосинтеза хлорофилла.

В целом, предварительные спектральные исследования флуоресценции этиолированных листьев в процессе нативных фотохимических превращений при комнатной температуре демонстрируют сложность

процессов, протекающих в листе (по сравнению с относительно простой картиной, полученной на модельных системах).

VII. РОЛЬ АГРЕГАЦИИ ПРОТОХЛОРОФИЛЛИДА И ПОР В ОБРАЗОВАНИИ ФОТОХИМИЧЕСКИ АКТИВНОГО КОМПЛЕКСА

Уже в ранних работах [157] высказывалось предположение, что активная форма протохлорофиллида Пхлд655/650 представляет собой агрегат пигментных молекул. Об агрегационной природе длинноволновых форм свидетельствуют характерные особенности их спектров. Это прежде всего длинноволновый сдвиг спектральных максимумов по сравнению со спектрами растворов пигмента. Сужение полос поглощения и флуоресценции активной формы Пхлд655/650 (в полтора-два раза по сравнению с формой Пхлд633/628) указывает на возникновение взаимодействия между электронными структурами хромофоров [200, 201]. Действие дезагрегирующих агентов (умеренное нагревание, добавки органических растворителей или детергентов) приводит к уменьшению или исчезновению длинноволновых спектральных полос и увеличению коротковолновых [12, 157, 202–205].

Исследования спектральных свойств протохлорофилла(ида) в модельных системах в сравнении с его спектральными свойствами *in vivo* также привели к результатам, подтверждающим предположение о том, что активная форма протохлорофиллида представляет собой агрегат пигмента. Многие исследователи отмечали близкое сходство (или идентичность) спектральных характеристик активной формы протохлорофиллида *in vivo* со спектральными характеристиками агрегатов протохлорофилловых пигментов в растворах [206–213], которые характеризуются батохромным сдвигом полос поглощения (включая полосу *Sore*). Совпадение основного максимума полосы *Sore* агрегатов протохлорофиллида *in vitro* и полосы, принадлежащей активной форме протохлорофиллида Пхлд650/655 *in vivo* (около 460 нм), является свидетельством агрегированного состояния Пхлд650/655. Спектры твердых пленок протохлорофилловых пигментов (обработанных парами аммиака) в красной области также весьма близки к спектрам предшественника хлорофилла *in vivo* [214–220].

Характерное для агрегатов энергетическое взаимодействие молекул протохлорофиллида в этиолированных листьях подтверждается результатами исследований поляризации флуоресценции, кругового дихроизма [187–189] и миграции энергии [87, 165, 181–183, 221–225].

Таким образом, целый ряд данных указывает на то, что фотоактивные формы протохлорофиллида *in vivo* находятся в агрегированном состоянии.

Поскольку одна молекула ПОР может восстанавливать только одну молекулу протохлорофиллида в каталитическом сайте [34, 49], строение активного пигмент-белкового комплекса представляется как объединение нескольких тройных активных комплексов. При этом расстояние между молекулами пигмента должно быть достаточно малым для осуществления передачи энергии по индуктивно-резонансному механизму. Следовательно фермент ПОР должен образовывать олигомеры. Предположения об агрегированном состоянии ПОР *in vivo* высказывались и ранее [227, 228, 229]. Следует заметить, что белки, принадлежащие к суперсемейству RED, характеризуются способностью образовывать агрегаты [37], и большинство ферментов, принадлежащих к этому семейству, функционирует в виде димеров или тетрамеров. При исследовании ПОР *in vitro* было установлено, что агрегация фермента благоприятна для его ферментативной активности [226]. При фракционировании ПЛТ пшеницы методом изоэлектрического фокусирования на разных стадиях зеленения выяснилось, что даже на заключительном этапе образования хлорофилла, во время сдвига Шибата, пигмент и ПОР ассоциированы в одной и той же фракции [230]. Авторы предположили, что коротковолновый спектральный сдвиг на этом этапе связан с разрушением агрегатов ПОР, что приводит к дезагрегации пигмента. С помощью метода перекрестного связывания были получены результаты, свидетельствующие о том, что ПОР в проламеллярных телах находится в агрегированном состоянии, преимущественно в виде димеров [230]. Методом гель-фильтрационной хроматографии очищенного суммарного белка МСБ-ПОР (мальтозу связывающий белок – ПОР), полученного путем оверэкспрессии ПОР гороха в *E. coli*, было напрямую показано, что нативный фермент существует преимущественно в димерном состоянии [226].

В работе [231] исследовались фотоактивные комплексы ПОР, выделенные из этиолированных листьев пшеницы и очищенные с помощью гель-хроматографии. Большая молекулярная масса комплексов (112 кДа), характеризующихся максимумом поглощения при 640 нм и максимумом флуоресценции при 643 нм, свидетельствует об агрегации субъединиц фермента. При уменьшении концентрации детергента при солюбилизации проламеллярных тел были получены более тяжелые частицы с мол. массой 1080 ± 250 кДа, спектральные свойства которых соответствовали основной активной

форме протохлорофиллида *in vivo* – Пхлд 655/650. В этих комплексах ПОР была доминирующим полипептидом. Гель-хроматография освещенных образцов показала, что после фотопревращения протохлорофиллида происходит быстрая дезагрегация комплекса.

Согласно данным ряда исследователей [228, 231, 232], форма протохлорофиллида Пхлд643/638 может быть димером, а Пхлд655/650 должна быть более крупным агрегатом. В пользу этого свидетельствует также сужение полос поглощения и флуоресценции Пхлд655/650 по сравнению с полосами Пхлд643/638.

Итак, с помощью различных экспериментальных подходов получены данные, указывающие на то, что активный тройной комплекс Пхлд-НАДФН-ПОР находится в агрегированном состоянии в виде димеров или более крупных олигомеров. Агрегации пигмент-белкового комплекса, по-видимому, способствуют липиды (см. ниже).

Природу нативных длинноволновых спектральных форм связывают с существованием крупных агрегатов протохлорофиллида. Об этом же свидетельствует наличие аналогичных полос в спектрах агрегированного протохлорофилла в модельных системах [207, 208, 210, 215, 233, 234] и в спектрах протохлорофилла в оболочках семян некоторых видов растений [235–238], где, согласно данным по спектрам кругового дихроизма [237] длинноволновая форма протохлорофилла находится в кристаллической форме. Образование агрегатов протохлорофиллида возможно благодаря агрегации фотофермента ПОР, облегчающей взаимодействие порфириновых колец молекул пигмента.

VIII. ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С АКТИВНЫМ ПИГМЕНТ-ФЕРМЕНТНЫМ КОМПЛЕКСОМ ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ

Кроме трех основных компонентов активного пигмент-ферментного комплекса этиопластов (протохлорофиллид, НАДФН и фотофермен ПОР), возможную роль в функционировании комплекса *in vivo* играют некоторые дополнительные компоненты.

Флавины как компонент активного комплекса биосинтеза хлорофилла

Данные, полученные с использованием как спектроскопических [239], так и препаративных методов [240], свидетельствовали о

том, что в фотоактивном комплексе присутствуют флавины, функция которых пока неясна. Уолкер и Гриффитс [240] высказали предположение о флавиновой природе коэнзима ПОР. Об этом свидетельствовал ряд фактов: 1) активность ПОР ингибировалась антагонистами флавопротеинов – кинакрином и трифлиоперазином, 2) препараты, содержащие ПОР, способны восстанавливать цитохром *c*, 3) в мембранах, обогащенных ПОР, ФАД выделялся вместе с ферментом. Найар и соавт. [241], исследуя фотоиндуцированные взаимодействия порфиринов и флавинов в модельных системах предположили, что *in vivo* флавины могут служить донором электрона в реакции фотовосстановления протохлорофиллида. Позднее Гриффитс пересмотрел свою точку зрения на участие флавинов в активном пигмент-белковом комплексе [242]. Выделенная им ПОР не содержала флавинов, но могла катализировать фотовосстановление протохлорофиллида. Поскольку искусственный комплекс Пхлд-НАДФН-ПОР оказался фотоактивным и без флавинов, Гриффитс заключил, что и *in vivo* флавины не входят в активный комплекс. Однако, по нашему мнению, сохранение активности очищенной ПОР *in vitro* еще не доказывает того, что и *in vivo* (в целых этиолированных листьях) флавины не участвуют в процессе биосинтеза хлорофилла.

Нами было исследовано индуцированное освещением при 77К изменение спектров флуоресценции целых этиолированных листьев кукурузы в широком диапазоне длин волн, включающем максимумы флуоресценции НАДФН (470 нм) и флавинов (525 нм) [239]. Оказалось, что под действием света одновременно с тушением флуоресценции активной формы Пхлда резко уменьшается полосу флуоресценции флавина, что, по всей вероятности, связано с его фотовосстановлением, так как флуоресценцией обладает только окисленная форма. После повышения температуры, одновременно с образованием первичных форм хлорофиллида, наблюдалось возрастание интенсивности флуоресценции флавинов (максимум при 525 нм) до величины, превышающей ее исходный уровень в неосвещенных образцах, что указывает на возрастание концентрации окисленных флавинов. Полученные данные свидетельствуют о возможности участия флавинов в первичных фотохимических реакциях фотовосстановления протохлорофиллида. Механизмы фотовосстановления предшественника хлорофилла *in vivo* и *in vitro* могут различаться. Нам кажется, что на данном этапе исследований нельзя полностью исключить роль флавинов в организации и функционировании активного пигмент-белкового комплекса протохлорофиллида *in vivo*.

*Роль липидов в образовании активного комплекса
протохлорофиллида*

Было исследовано [243] влияние галакто- и сульфоллипидов, выделенных из этиопластов ячменя, на спектральные свойства искусственно созданного *in vitro* активного комплекса, включающего Zn-протофеофорбид *a* (ZnПФа) и Zn-протофеофорбид *b* (ZnПФб); ферменты ПОР А и ПОР В ячменя и НАДФН. Основным максимумом спектра флуоресценции комплекса без добавления липидов находился при 630 нм. Добавление смеси галактолипидов и сульфоллипидов приводило к сдвигу максимума до 655 нм, характерного для активного комплекса *in vivo*. Липиды, по-видимому, способствуют агрегации пигмент-белкового комплекса. К такому выводу пришли и авторы работы [244], в которой исследовалось влияние глицерина и хлоропластных липидов на изменения спектров искусственных пигмент-ферментных комплексов. Поскольку известно, что структура проламеллярных тел включает двойной липидный слой, состоящий из моно-галактозил-диацилглицерола и ди-галактозил-диацилглицерола [245], авторы работы [244] использовали именно эти пластидные липиды для добавления к искусственным комплексам, включающим ПОР, НАДФН и Zn-протофеофорбид *a*. При этом наблюдался длинноволновый сдвиг максимума поглощения комплекса (с 628 до 646 нм). После освещения образцов отмечено образование феофорбида с максимумом поглощения при 678 нм, который затем смещался в темноте до 668 нм. Авторы полагают, что полученные данные являются доказательством участия двух липидов в образовании активной длинноволновой формы предшественника хлорофилла *in vitro*, а, возможно, и *in vivo*.

*Минорные полипептиды как компоненты нативного
комплекса предшественника хлорофилла*

В этиопластах обнаружены и другие связанные с протохлорофиллидом полипептиды помимо ПОР: 70, 41, 17, и 14 кДа [246]. Для выяснения путей биогенеза фотосинтетического аппарата особый интерес представляет обнаружение в этиопластах полипептидов, идентичных входящим в состав реакционных центров фотосистемы II [247, 248]. С помощью метода быстрой радиоактивной метки в неосвещенных этиопластах ячменя были обнаружены в небольших количествах практически все основные апобелки реакционных центров обеих фотосистем: P700, CP47, CP43, D2 и D1 [249–251]. Однако, накопление этих апобелков начиналось только после освещения.

На основании многочисленных исследований можно заключить, что основными компонентами активного комплекса заключительной стадии биосинтеза хлорофилла являются: активные формы протохлорофиллида: (Пхлд655/650 и Пхлд643/637); фотофермент ПОР, тирозиновая группа которого служит одним из доноров протона (для позиции C_{17}); НАДФН – донор второго протона (гидрид-иона) и, возможно, флавины, которые могут быть донорами или переносчиками электрона. Кроме того, немаловажную роль в образовании активного комплекса играют липиды.

Не исключено, что ряд минорных полипептидов, отличных от ПОР, в частности, белки, характерные для двух фотосистем фотосинтеза, также находятся в ассоциации с активными комплексами предшественника хлорофилла или, возможно, входят в состав неких минорных активных комплексов. На основании результатов хроматографического анализа (HPLC) выделенных из пшеницы фотоактивных Пхлд-ПОР комплексов было высказано предположение о возможной ассоциации зеаксантина и виолаксантина с фотоактивным комплексом протохлорофиллида [231].

IX. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние десятилетия были получены важные результаты в области изучения световой стадии биосинтеза хлорофилла. Удалось выяснить состав комплекса, в котором осуществляется реакция фотовосстановления темного предшественника хлорофилла. Комплекс включает три компонента – протохлорофиллид, донор водорода НАДФН и фотофермент протохлорофилл оксидоредуктазу (ПОР). Определены основные свойства фотофермента ПОР, воспроизведена реакция фотовосстановления протохлорофиллида в модельной системе – искусственном тройном комплексе.

Вместе с тем, развитие спектральных исследований процессов накопления и восстановления предшественника хлорофилла непосредственно в целых клетках и листьях растений показало, что процесс, протекающий в клетке, значительно более сложен, чем в модельных системах. Гетерогенность форм предшественника хлорофилла, различие путей их превращения в хлорофилл, многоступенчатый характер фотохимических и темновых реакций [178] свидетельствуют о том, что результатом процесса является образование нескольких функционально активных пигмент-белковых комплексов необходимых для построения фотосинтетического аппарата. Результаты исследований позволяют идентифицировать пути, ведущие к включению пигмента в состав двух различных фотохимических систем

фотосинтеза. Можно надеяться, что на следующем этапе исследований будет выяснена природа гетерогенности нативных форм предшественника хлорофилла, их структура и участие в закладке основных пигмент-белковых комплексов, функционирующих при фотосинтезе. В связи с проблемой природы активных комплексов предшественника хлорофилла особое значение приобретает их исследование в живых функционирующих клетках.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Fischer, H.* (1940) *Naturwissenschaften*, **28**, 401–405.
2. *Fischer, H., Oestreicher, A.* (1940) *Z. Physiol. Chem.*, **262**, 243.
3. *Fischer, H., Mittenzwei, H., Oestreicher, A.* (1939) *Z. Physiol. Chem.*, **257**, IV.
4. *Belyaeva, O.B.* (2003) *Photosynthesis Res.*, **76**, 405–411.
5. *Любименко В.Н.* (1923) *Известия Рос. АН.*, 6 сер., **17**, 129.
6. *Любименко В.Н., Гюббенет Е.К.* (1930) *Изв. Естеств. Научн. Инст. им. П.Ф. Лесгафта*, **16**, 165.
7. *Smith, J.H.C.* (1948) *Arch. Biochem.*, **19**, 449–454.
8. *Smith, J.H.C.* (1952) *Year Book Carneg. Inst.*, **51**, 151.
9. *Красновский А.А., Кособуцкая Л.М.* (1952) *Докл. АН СССР*, **85**, 177–180.
10. *Кособуцкая Л.М., Красновский А.А.* (1954) *Биохимия*, **19**, 37–44.
11. *Smith, J.H.C., Benitez, A.* (1953) *Carnegie Inst. Wash. Year Book*, **52**, 151–153.
12. *Smith, J.H.C., Benitez, A.* (1954) *Plant Physiol.*, **29**, 135–143.
13. *Smith, J.H.C., Kupke, D.W.* (1956) *Nature*, **178**, 751–752.
14. *Smith, J.H.C., Kupke, D.W., Giese, A.T.* (1956) *Carn. Inst. Wash. YB*, **55**, 243–245.
15. *Smith, J.H.C.* (1960) In: *Comparative biochemistry of photoreactive systems* (Eds. Allen M.B.) Academic Press. New York–London. 1960. P. 257–277.
16. *Smith, J.H.C.* (1961) In: *Biological structure and function. V.2.* (Eds. Goodwin T.W. and Linberg O.) Acad. Press. London–New York. 1961. P. 325–338.
17. *Boardman, N.K.* (1962) *Biochem. Biophys. Acta*, **62**, 63–79.
18. *Wolf, J.B., Price, L.* (1956) *Plant Physiol.* **31**, 31
19. *Годнев Т.Н., Шлык А.А., Ляхнович Я.П.* (1957) *Физиол. Раст.*, **4**, 393–400.
20. *Griffiths, W.T.* (1974) *FEBS Lett.*, **46**, 301–304.
21. *Griffiths, W.T.* (1975) *Biochem. J.*, **152**, 623–635.
22. *Griffiths, W.T., Mapleston, R.E.* (1978) In: *Chloroplast Development*. (Ed. by G. Akoyunoglou, J.H. Argyroudi-Akoyunoglou). Amsterdam. 1978. P. 99–104.
23. *Griffiths, W.T.* (1978) *Biochem. J.*, **174**, 681–692.
24. *Suzuki, J.Y., Bauer, C.E.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3749–3753.
25. *Fujita, Y.* (1996) *Plant. Cell. Physiol.*, **37**, 411–421.
26. *Armstrong, G.A.* (1998) *J. Photochem. Photobiol. B*, **43**, 87–100.
27. *Oliver, R.P., Griffiths, W.T.* (1980) *Biochem. J.*, **191**, 277–280.
28. *Apel, K., Sante, H.J., Redlinger, T.E., Falk, H.* (1980) *Eur. J. Biochem.*, **111**, 251–258.
29. *Oliver, R.P., Griffiths, W.T.* (1981) *Biochem. J.*, **195**, 93–101.
30. *Apel, K.* (1981) *Eur. J. Biochem.*, **120**, 89–93.

31. Teakle, R., Griffiths, W.T. (1993) *Biochem. J.*, **296**, 225–230.
32. Reinboth, S., Reinboth, C., Lebedev, N., Apel, K. (1996) *Plant Cell*, **8**, 763–769.
33. Baker, M.E. (1994) *Biochem. J.*, **300**, 605–607.
34. Wilks, H. M., Timko, M.P. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 724–728.
35. Birve, S., Selstam, E., Johansson, L. (1996) *Biochem. J.*, **317**, 549–555.
36. Labesse, G., Vidal-Cros, A., Chomilier, J., Gaudry, M., Morno, J.P. (1994) *Biochem. J.*, **304**, 95–99.
37. Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., Ghosh, D. (1995) *Biochemistry*, **34**, 6003–6013.
38. Tanaka, N., Nonaka, T., Tanabe, T., Yoshimoto, T., Tsuru, D., Mitsui, Y. (1996) *Biochemistry*, **35**, 7715–7730.
39. Tanaka, N., Nonaka, T., Nakanishi, M., Deyashiki, Y., Hara, A., Mitsui, Y. (1996) *Structure*, **4**, 33–45.
40. Townley, H.E., Sessions, R.B., Clarke, A.R., Dafforn, T.R., Griffiths, W.T. (2001) *Proteins*, **44**, 329–335.
41. Schultz, R., Steinmuller, K., Klaas, M., Forreiter, C., Rasmussen, S., Hiller, C. Apel, A. (1989) *Genet.*, **217**, 355–361.
42. Oliver, R.P., Griffiths, W.T. (1982) *Plant Physiol.*, **70**, 1019–1025.
43. Griffiths W.T. (1980) *Biochem. J.*, **186**, 267–278.
44. Dahlin, C., Aronsson, H., Wilks, H.M., Lebedev, N., Sundqvist, C., Timko, M. (1999) *Plant Mol. Biol.*, **39**, 309–323.
45. Wiktorsson, B., Engdahl, S., Zhong, L.B., Boddi, B., Ryberg, M., Sundqvist, C. (1993) *Photosynthetica*, **29**, 205–218.
46. Martin, G.E.M., Timko, M.P., Wilks, H.M. (1997) *Biochem. J.*, **325**, 139–145.
47. Griffiths, W.T., McHugh, T., Blankenship, R.E. (1996) *FEBS Lett.*, **398**, 235–238.
48. Lebedev, N., Timko, M. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **96**, 17954–17959.
49. Klement, H., Helfrich, M., Oster, U., Schoch, S., Rudiger, W. (1999) *Eur. J. Biochem.*, **265**, 862–874.
50. Heyes, D.J., Hunter, C.N. (2002) *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 601–604.
51. Lebedev, N., Karginova, O., McIvor, W., Timko M. (2001) *Biochemistry*, **40**, 12562–12574.
52. Schoefs, B., Franck, F. (2003) *Photochem. Photobiol.*, **78**, 543–557.
53. Horton, P., Leech, R.M. (1975) *Plant Physiol.*, **56**, 113–120.
54. Schoch, S., Helfrich, M., Wiktorsson, B., Sundqvist, C., Rudiger, W., Ryberg, M. (1995) *Eur. J. Biochem.*, **229**, 291–298.
55. Griffiths, W.T. (1991) In: *Chlorophyll* (Edited by H. Sheer), pp.433–450. CRC Press, Boca Raton, FL. 1991.
56. Kotzabasis K., Schuring M.P., Senger, H. (1989) *Physiol. Plant.*, **75**, 221–226.
57. Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф. (1995) *Биохимия*, **60**, 1429–1438.
58. Ignatov, N.V., Litvin, F.F. (1996) *Photosynthesis Res.*, **50**, 271–283.
59. Bjorn, L.O. (1963) *Physiol. Plant.*, **16**, 142–150.
60. Bjorn, L.O. (1969) *Physiol. Plant.*, **22**, 1–17.
61. Rebeiz, C.A., Yaghi, M., Abou-Haidar, M., Castelfranco, P.A. (1970) *Plant Physiol.*, **46**, 57–63.
62. Ланг Ф., Воробьева Л.М., Красновский А.А. (1971) *Молекулярная биология*, **5**, 366–374.
63. Cohen, C.E., Schiff, J.A. (1976) *Photochem. Photobiol.*, **24**, 555–566.
64. Belanger, F.C., Rebeiz, C.A. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 1266–1272.

65. *Belanger, F.C., Rebeiz, C.A.* (1980) *Biochemistry*, **19**, 4875–4883.
66. *Belanger, F.C., Rebeiz, C.A.* (1980) *Plant Sci. Lett.*, **18**, 343–350.
67. *Chereskin, B.M., Wong, Y.S., Castelfranco, P.A.* (1982) *Plant Physiol.*, **70**, 987–993.
68. *Belanger, F.C., Rebeiz, C.A.* (1985) *J. Biol. Chem.*, **255**, 1266–1272.
69. *Whyte, B.J., Griffiths, W.T.* (1993) *Biochem. J.*, **291**, 939–944.
70. *Adra, A.N., Rebeiz, C.A.* (1998) *Photochem. Photobiol.*, **68**, 852–856.
71. *Bombart, P., Dujardin, E.* (1984) In: *Protochlorophyllide reduction and greening* (Edited by C. Sironval and M. Brouers), pp. 175–179. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands 1984.
72. *Krasnovsky, A.A., Bistrova, M.I., Safronova, I.A.* (1984) In: *Protochlorophyllide reduction and greening* (Edited by C. Sironval and M. Brouers), pp. 331–339. Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands 1984.
73. *Helfrich, M., Schoch, S., Schafer, W., Ryberg, M., Rudiger, W.* (1996) *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2606–2611.
74. *Nakamura, A., Watanaabe, T.* (1998) *FEBS Lett.*, **426**, 201–204.
75. *Ikeuchi, M., Murakami, S.* (1982) *Plant Cell Physiol.*, **23**, 575–583.
76. *Ikeuchi, M., Murakami, S.* (1982) *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1089–1099.
77. *Ryberg, M., Sundqvist, C.* (1982) *Physiol. Plant.*, **56**, 125–132.
78. *Selstam, E.A., Widell, A., and Johansson, L.B.* (1987) *Physiol. Plant.*, **70**, 209–214.
79. *Benli, M., Schulz, R., and Apel, K.* (1991) *Plant Mol. Biol.*, **16**, 615–625.
80. *Dehesh, K., Klaas, M., Hauser, I., Apel, K.* (1986) *Planta*, **169**, 162–171.
81. *Armstrong, G., Runge, S., Frick, G., Sperling, U., and Apel, K.* (1995) *Plant Physiol.*, **108**, 1505–1517.
82. *Holtorf, H., Reinbothe, S., Reinbothe, C., Berez, B., and Apel, K.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3254–3258.
83. *Frick, G., Su, Q., Apel, K., and Armstrong, G.A.* (2003) *Plant J.*, **35**, 141–153.
84. *Sperling, U., van Cleve, B., Frick, G., Apel, K., and Armstrong, G.A.* (1997) *Plant J.*, **12**, 649–658.
85. *Sperling, U., Franck, F., van Cleve, B., Frick, G., Apel, K., and Armstrong, G.A.* (1998) *Plant Cell*, **10**, 283–296.
86. *Sperling, U., Frick, G., van Cleve, B., and Apel, K.* (1999) In: *The Chloroplast: From molecular biology to biotechnology* (Argyroudi-Akoyunoglou J.H., and Senger H., eds). Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 1999, pp. 97–102.
87. *Franck, F., Sperling, U., Frick, G., Pochert, B., Van Cleve, B., Apel, K., and Armstrong, G.A.* (2000) *Plant Physiol.*, **124**, 1678–1696.
88. *Santel, H.-J., and Apel, K.* (1981) *Eur. J. Biochem.*, **120**, 95–103.
89. *Reinbothe, C., Apel, K., Reinbothe, S.* (1995) *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 6206–6212.
90. *Reinbothe, S., Reinbothe, C., Apel, K., and Lebedev, N.* (1996) *Cell*, **86**, 703–705.
91. *Schunmann, P.H., and Ougham, H.J.* (1996) *Plant. Mol. Biol.*, **31**, 529–537.
92. *Skinner, J.S., and Timko, M.P.* (1998) *Plant Cell Physiol.*, **39**, 795–806.
93. *Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okamura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Ysaduda, M., and Tabata, S.* (1996) *DNA Res.*, **3**, 109–136.
94. *Heyes D.J., Martin G.E.M., Reid R.T., Hunter, C.N., and Wilks H.M.* (2000) *FEBS Lett.*, **483**, 47–51.

95. Li, J., and Timko, M.P. (1996) *Plant Mol. Biol.*, **30**, 15–37.
96. Kuroda, H., Masuda, T., Fusada, N., Ohta, H., and Takamiya, K. (2000) *Plant Cell Physiol.*, **41**, 226–229.
97. Spano, A.J., He, Z., Michel, H., Hunt, D.F., and Timko, M.P. (1992) *Plant Mol. Biol.*, **18**, 967–972.
98. Oosawa, N., Masuda, T., Awai, K., Fusada, N., Shimada, H., Ohta, H., and Takamiya, K. (2000) *FEBS Lett.*, **474**, 133–136.
99. Su, Q., Frick, G., Armstrong, G., and Apel, K. (2001) *Plant Molecular Biology*, **47**, 805–813
100. Kuroda, H., Masuda, T., Fusada, N., Ohta, H., and Takamiya, K. (1995) *Plant Cell Physiol.*, **41**, 226–229.
101. Takio, S., Nakao, N., Suzuki, T., Tanaka, K., Yamamoto, I., and Satoh, T. (1998) *Plant Cell Physiol.*, **39**, 665–669.
102. Masuda, T., Fusada, N., Oosawa, N., Takamatsu, K., Yamamoto, Y.Y., Ohta, M., Nakamura, K., Goto, K., Shibata, D., Shirano, Y., Hayashi, H., Kato, T., Tabata, S., Shimada, H., Ohta, H., and Takamiya, K. (2003) *Plant Cell Physiol.*, **44**, 963–974.
103. He, Z.H., Li, J., Sundqvist, C., and Timko, M.P. (1994) *Plant Physiol.*, **106**, 537–546.
104. Yoshida, K., Chen, R.M., Tanaka, A., Teramoto, H., Tanaka, R., Timko, M.P., and Tsuji, H. (1995) *Plant Physiol.*, **109**, 231–238.
105. Boardman, N.K., and Anderson, J.M. (1964) *Aust. J. Biol. Sci.*, **17**, 86–92.
106. Leyon, H. (1953) *Exp. Cell. Res.*, **5**, 520–529.
107. Von Wettstein, D. (1959) In: *Developmental Cytology* (Edited by D. Rudnick), The Ronald Press Company, New York, 1959, pp.123–160.
108. Ryberg, M., and Sundqvist, C. (1982) *Physiol. Plant.*, **56**, 125–132.
109. Ryberg, M., and Sundqvist, C. (1982) *Physiol. Plant.*, **56**, 133–138.
110. Lindsten, A., Ryberg, M., and Sundqvist, C. (1988) *Physiol. Plant.*, **72**, 167–176.
111. Shaw, P.J., Henwood, J.A., Oliver, R.P., Griffiths, W.T. (1985) *Eur. J. Cell Biol.*, **39**, 50–55.
112. Ryberg, M., Dehesh, (1986) *Physiol. Plant.*, **66**, 616–624.
113. Klein, S., Schiff, J.A. (1972) *Plant Physiol.*, **49**, 619–626.
114. Rowe, J.D., Griffiths, W.T. (1981) *Biochem. J.*, **311**, 417–424.
115. Schultz, R., Steinmuller, K., Klaas, M., Forreiter, C., Rasmussen, S., Hiller, C., Apel, K. (1989) *Mol. Gen. Genet.*, **217**, 355–361.
116. Darrach, P.M., Kay, S.A., Teakle, G.R., Griffiths, W.T. (1990) *Biochem. J.*, **265**, 789–798.
117. Joyard, J., Block, M., Pineau, B., Albrieux, C., Douce, R. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 21820–21827.
118. Pineau, B., Gerard-Hirne, C., Douce, R., Joyard, J. (1993) *Plant Physiol.*, **102**, 821–828.
119. Dahlin, C., Sundqvist, C., Timko, M.P. (1995) *Plant Mol Biol.*, **29**, 317–330.
120. Masuda, T., Takamiya, K. (2004) *Photosynth. Res.*, **81**, 1–29.
121. Савченко Г.Е., Абрамчик Л.М., Сердюченко Е.В., Чайка М.Т. (1989) *Докл. АН БССР*, **33**, 660–663.
122. Pineau, B., Dubertret, G., Joyard, J., Douce, R. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**, 9210–9215.
123. Aronsson, H., Sundqvist, C., Timko, M.P., Dahlin, C. (2001) *FEBS Lett.*, **502**, 11–15.
124. Aronsson, H., Sundqvist, C., Dahlin, C. (2003) *Plant Mol. Biol.*, **51**, 1–7.
125. Dahlin, C., Aronsson, H., Wilks, H.M., Lebedev, N., Sundqvist, C., Timko, M. (1999) *Plant Mol. Biol.*, **39**, 309–323.

126. Годнев Т.Н., Галактионов С.Г., Раскин В.И. (1968) Докл. АН СССР, **181**, 237–240.
127. Bjorn, L.O. (1963) *Physiol. Plant.*, **16**, 142–150.
128. Boardman, N.K. (1966) In: *The Chlorophylls* (Ed by L.P. Vernon and G.R. Seely) pp. 437–479. Academic Press, New York, 1966.
129. Ланг Ф., Воробьева Л.М., Красновский А.А. (1971) Молекулярная биология, **5**, 366–374.
130. Rebeiz, C.A., Castelfranco, P.A. (1973) *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **24**, 129–172.
131. Rebeiz, C.A., Smith, B.B., Mattheis, J.R., Cohen, C.E., McCarthy, S.A. (1978) In: *Chloroplast development* (Eds Akoyounoglou G. And Argroudi-Akoyounoglou J.H.) Amsterdam, 1978, pp. 59–76.
132. Boddi, B., Lindsten, A., Ryberg, M., Sundqvist, C. (1989) *Physiol. Plant.*, **76**, 135–143.
133. Ellsworth, R.K., Nowak, C. (1974) *Ann Biochem*, **57**, 534–546.
134. Liljenberg, C.L. (1974) *Physiol Plant*, **32**, 208–213.
135. Liljenberg, C.L. (1977) In: *Lipids and lipid polymers in higher plants* (Eds. Tevini M., Lichtentaler H.K.) Berlin, 1977, pp. 259–270.
136. Shioi, Y., Sasa, T. (1982) *Plant Cell Physiol.*, **23**, 1315–1321.
137. Shioi Y., Sasa, T. (1983) *Plant Cell Physiol.*, **24**, 835–840.
138. Aronoff, S., Ellsworth, R.K. (1968) *Photosynthetica*, **2**, 288–297.
139. Jones, O.T.G. (1979) In: *The porphyrins* (Ed. Dolphin D.) New York, 1979. V. 6. P. 179–232.
140. Belanger, F.C., Rebeiz, C.A. (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 365–372.
141. Belanger, F.C., Duggan, J.X., Rebeiz, C.A. (1982) *J. Biol. Chem.*, **257**, 4849–4858.
142. Wu, S.M., Mayasich, M., Rebeiz, C.A. (1989). *Analitical biochem.*, **178**, 294–300.
143. Carey, E.E., Rebeiz, C.A. (1985) *Plant Physiol.*, **79**, 1–6.
144. Carey, E.E., Tripathy, B.C., Rebeiz, C.A. (1985) *Plant Physiol.*, **79**, 1059–1063.
145. Granick, S., Gassman, M.L. (1970) *Plant Physiol.*, **45**, 201–205.
146. Rebeiz, C.A., Belanger, F.C., McCarthy, S.A., Fressinet, G., Duggan, J.X., Wu, S.M., and Mattheis, J.R. (1981) *Proc. 5th Int. Congr. Photosynth.* (G. Akoyounoglou, ed.) V. 5, P. 197–212. Int. Sci. Services, Jerusalem, Israel, 1981.
147. Duggan, J. X., Rebeiz, C.A. (1982) *Plant Sci Lett.*, **24**, 27–37.
148. Duggan, J. X., Rebeiz, C.A. (1982) *Plant Sci. Lett.*, **27**, 137–145.
149. Rebeiz, C.A., Lascelles, J. (1982) In: *Photosynthesis* (Ed Govinjee) New York–London. 1982, pp. 699–780.
150. Rebeiz, C.A., Wu, S.M., Kuhadja, M., Daniell, H., Perkins, E.J. (1983) *Mol. Cel. Biochem.*, **57**, 97–125.
151. Koski, V.M., Smith, J.H.C. (1948) *J. Amer. Chem. Soc.*, **70**, 3558–3562.
152. Красновский А.А., Войновская К.К. (1949) Докл. АН СССР, **66**, 663–666.
153. Monteverde, N.A., Lubimenko, W.N. (1911) *Biologisches Centralblatt*, **31**, 481–498.
154. Koski, V.M., French, C.S., Smith, J.H.C. (1951). *Arch. Biochem. Biophys.*, **31**, 1–17.
155. Shibata, K. (1956) *Carn. Inst. Wash. YB*, 1956, **55**, 248–250.
156. Shibata, K. (1957) *J. Biochem. (Tokyo)*, **44**, 147–173.
157. Литвин Ф.Ф., Красновский А.А. (1957) Докл. АН СССР, **117**, 106–109.
158. Литвин Ф.Ф., Красновский А.А. (1958) Докл. АН СССР, **120**, 764–767.

159. Литвин Ф.Ф., Красновский А.А. (1959) Изв. АН СССР. Сер. физич., **23**, 82–85.
160. Ланг Ф., Воробьева Л.М., Красновский А.А. (1968) Докл АН СССР, **183**, 711–714.
161. Ланг Ф., Воробьева Л.М., Красновский А.А. (1969) Биохимия, **34**, 257–265.
162. Ланг Ф., Воробьева Л.М., Красновский А.А. (1969) Биофизика, **14**, 245–255.
163. Ланг Ф., Воробьева Л.М., Красновский А.А. (1971) Молекулярная биология, **5**, 366–374.
164. Sironval, C., Brouers, M., Michel, J.M., Kuiper, Y. (1968) Photosynthetica, **2**, 268–287.
165. Kahn, A., Boardman, N.K., Thorne, S.W. (1970) J.Mol.Biol., **48**, 85–101.
166. Литвин Ф.Ф., Стадничук И.Н. (1980) Физиол. Раст., **27**, 1024–1032.
167. Boddi, B., Ryberg, M., Sundqvist, C. (1992) J. Photochem. Photobiol., **12**, 389–401.
168. Boddi, B., Franck F. (1997) J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **41**, 73–82.
169. Schoefs, B., Bertrand, M., Franck, F. (2000) Photochem. Photobiol., **72**, 85–93.
170. Stadnichuk, I.N., Amirjani, M.R., Sundqvist, C. (2005) Photochem. Photobiol. Sci., **4**, 230–238.
171. Bovey, F., Ogawa, T., Shibata, K. (1974) Plant Cell Physiol., **15**, 1133–1137.
172. Cohen, C.E., Rebeiz, C.A. (1981) Plant Physiol., **67**, 98–103.
173. Shioi, Y., Sasa, T. (1984) Plant Cell Physiol., **25**, 131–137.
174. Franck, F., Strazlka, K. (1992) FEBS Lett., **309**, 73–77.
175. Virgin, H.I. (1993) Physiol. Plant., **89**, 761–766.
176. Вальтер Г., Беляева О.Б., Игнатов Н.В., Красновский А.А., Литвин Ф.Ф. (1982) Биологические науки, **9**, 35–39.
177. Sundqvist, C., Dahlin, C. (1997) Physiol. Plant., **100**, 748–759.
178. Литвин Ф.Ф., Беляева О.Б., Игнатов Н.В. (2000) Успехи биологической химии, **40**, 3–42.
179. Акулович Н.К. (1983) Формирование и состояние фотоактивного протохлорофиллового пигмента. Наука и техника. Минск, 1983.
180. Mysliwa-Kurdziel, B., Amirjani, M.R., Strzalka, K., Sundqvist, C. (2003) Photochem. Photobiol., **78**, 205–212.
181. Литвин Ф.Ф., Ефимцев Е.И., Игнатов Н.В. (1976) Биофизика, **21**, 307–312.
182. Игнатов Н.В. (1977) Исследование фотохимической стадии биосинтеза хлорофилла. Автореф. дисс. Канд. Биол. Наук. М. 1977.
183. Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф. (1981) Биофизика, **26**, 664–668.
184. Акулович Н.К., Раскин В.И. (1971) В сб. Проблемы биосинтеза хлорофилла. Наука и техника. Минск. 1971, сс. 5–52.
185. El Hamouri, B., Sironval, C. (1979) FEBS Lett., **103**, 345–347.
186. Houssier, C., Sauer, K. (1970) J. Amer. Chem. Soc., **92**, 779–791.
187. Schultz, A., Sauer, K. (1972) Biochem. Biophys. Acta, **267**, 320–340.
188. Vaugan, G.D., Sauer, K. (1974) Biochem. Biophys. Acta, **347**, 383–394.
189. El Hamouri, B., Sironval, C. (1980) Photobiochem. Photobiophys., **1**, 219–223.
190. El Hamouri, B., Brouers, M., Sironval, C. (1981) Plant Science Lett., **21**, 375–379.
191. Franck, F., Bereza, B., Boddi, B. (1999) Photosynth. Res., **59**, 53–61.
192. Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф. (1980) Биофизика, **25**, 617–623.

193. *Belyaeva, O.B., Litvin, F.F.* (1981) *Photosynthetica*, **15**, 210–215.
194. *Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф.* (2002) *Биохимия*, **67**, 949–955.
195. *Ignatov, N.V., Litvin, F.F.* (2002) *Photosynth. Res.*, **71**, 195–207.
196. *Franck, F., Berthelemy, X., Strazlka, K.* (1993) *Photosynthetica*, **29**, 185–194.
197. *Литвин Ф.Ф., Рихирева Г.Т., Красновский А.А.* (1962) *Биофизика*, **7**, 578–591.
198. *Игнатов Н.В., Литвин Ф.Ф.* (2002) *Биохимия*, **67**, 1142–1150.
199. *Schoefs, B., Franck, F.* (1998) *Plant Physiol.*, **118**, 1159–1168.
200. *Kasha, M.* (1963) *Radiant. Res.*, **20**, 55–70.
201. *Литвин Ф.Ф., Синещеков В.А.* (1965) В сб. «Молекулярная биофизика». 1965, сс. 191–203.
202. *Красновский А.А., Быстрова М.И., Сорокина А.В.* (1961). Докл. АН СССР, **136**, 1227–1230.
203. *Воробьева Л.М., Красновский А.А.* (1966) *Биохимия*, **31**, 578–584.
204. *Butler, W.L., Briggs, W.R.* (1966) *Biochim Biophys Acta*, **112**, 45–53.
205. *Dujardin, E., Sironval, C.* (1970) *Photosynthetica*, **4**, 129–138.
206. *Seliskar, C., Ke, B.* (1968) *Biochem. Biophys. Acta*, **153**, 685–691.
207. *Brouers, M.* (1972) *Photosynthetica*, **6**, 415–423.
208. *Brouers, M.* (1979) *Photosynthetica*, **13**, 9–14.
209. *Лосев А.П., Гуринович Г.П.* (1969) *Биофизика*, **14**, 110–118.
210. *Зенькевич Э.И., Лосев А.П.* (1976) *Мол. Биол.*, **10**, 294–304.
211. *Зенькевич Э.И., Кочубеев Г.А., Лосев А.П., Гуринович Г.П.* (1978) *Мол. Биол.*, **12**, 1002–1011.
212. *Шлык А.А., Фрадкин Л.И., Калинина Л.М.* (1973) В сб.: Проблемы биофотоники. М. 1973, сс. 122–132.
213. *Kotzabasis, K., Senge, M., Seyfried B., Senger, H.* (1990) *Photochem. Photobiol.* 1990, **52**, 95–101.
214. *Быстрова М.И., Красновский А.А.* (1967) *Мол. биол.*, **1**, 362–372.
215. *Быстрова М.И., Ланг Ф., Красновский А.А.* (1972) *Молекулярная биология*, **6**, 77–86.
216. *Быстрова М.И., Сафронова И.А., Красновский А.А.* (1982) *Мол. Биол.*, **16**, 291–301.
217. *Быстрова М.И., Сафронова И.А., Красновский А.А.* (1985) *Мол. Биол.*, **19**, 915–925.
218. *Красновский А.А., Быстрова М.И.* (1974) В сб. Хлорофилл (ред. А.А. Шлык), Наука и техника, Минск 1974, сс. 139–153.
219. *Красновский А.А., Быстрова М.И., Ланг Ф.* (1971) Докл. АН СССР, **201**, 1485–1488.
220. *Sanaani, O.D., Sauer, K.* (1977) *Plant Physiol.*, **60**, 422–429.
221. *Sironval, C.* (1972) *Photosynthetica*, **6**, 375–380.
222. *Шлык А.А., Фрадкин Л.И., Калинина Л.М.* (1973) В сб.: Проблемы биофотоники М. 1973, сс. 122–132.
223. *Henningsen, K.W., Thorne, S.W., Bordman, N.K.* (1974) *Plant Physiol.*, **53**, 419–425.
224. *Brouers, M., Sironval, C.* (1974) *Plant Sci. Lett.*, **2**, 67–72.
225. *Brouers, M.* (1975) *Photosynthetica*, **9**, 304–310.
226. *Martin, G.E.M., Timko, M.P., Wilks, H.M.* (1997) *Biochem. J.*, **325**, 139–145.
227. *Беляева О.Б., Литвин Ф.Ф.* (1989) Монография «Фотобиосинтез хлорофилла». Изд. Московского университета 1989.
228. *Boddi, B., Lindsten, A., Ryberg, M., Sundqvist, C.* (1989) *Physiol. Plant.*, **76**, 135–143.
229. *Boddi, B., Lindsten, A., Ryberg, M., Sundqvist, C.* (1990) *Photochem. Photobiol.*, **52**, 83–87.

230. Wiktorsson, B., Ryberg, M., Gough, S., Sundqvist, C. (1992) *Physiol. Plant.*, **85**, 659–669.
231. Chahdi, M.A., Schoefs, B., Franck, F. (1998) *Planta*, **206**, 673–680.
232. Wiktorsson, B., Engdahl, S., Zhong, L.B., Boddi, B., Ryberg, M., Sundqvist, C. (1993) *Photosynthetica*, **29**, 205–218.
233. Boddi, B., Soos, J., Lang, F. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **593**, 158–165.
234. Boddi, B., Kovacs, K., Lang, F. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **722**, 320–326.
235. Inada, Y., Shibata, K. (1960) *Plant Cell Physiol.*, **1**, 311–316.
236. Sundqvist, C., Ryberg, H. (1979) *Physiol. Plant.*, **47**, 124–128.
237. Sundqvist, C., Ryberg, H., Boddi, B., Lang, F. (1980) *Physiol. Plant.*, **48**, 297–301.
238. Игнатов Н.В., Беляева О.Б., Тумофеев К.Н., Литвин Ф.Ф. (1988) *Биофизика*, **33**, 500–505.
239. Ignatov, N.V., Belyaeva, O.B., Litvin, F.F. (1993) *Photosynthetica*, **29**, 235–241.
240. Walker, C.J., Griffiths, W.T. (1988) *FEBS Lett.*, **239**, 259–262.
241. Nayar, P., Brun, A., Harriman, A., Begley, T.P. (1992) *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 395–397.
242. Townley, H.E., Griffiths, W.T., and Nugent, J.P. (1998) *FEBS Lett.*, **422**, 19–22.
243. Reinbothe, C., Lebedev, N., and Reinbothe, S. (1999) *Nature (London)*, **397**, 80–84.
244. Klement, H., Oster, U., and Rudiger, W. (2000) *FEBS Lett.*, **480**, 306–310.
245. Selstam, E., and Widell-Wigge, A. (1993) In: *Pigment-protein complexes in plastids: Synthesis and assembly* (Edited by C. Sundqvist and M. Ryberg), P. 241–277. Academic Press, San Diego, 1993.
246. Redlinger, T.E., Apel, K. (1980) *Arch. Biochem. Biophys.*, **200**, 253–260.
247. Mullet, J.E., Klein, P.G., Klein, R.R. (1990) *Proc. Natl. Sci. USA*, **87**, 4038–4042.
248. Klein, R.R., Camble, P.E., Mullet, J.E. (1988) *Plant Physiol.*, **88**, 1246–1256.
249. Eichacker, L.F., Paulsen, H., and Rudiger, W. (1992) *Eur. J. Biochem.*, **205**, 17–24.
250. Eichacker, L.F., Muller, B., and Helfrich, M. (1996) *FEBS Lett.*, **395**, 251–256.
251. Kim, J., Klein, P., and Mullet, J. (1994) *J. Biol. Chem.* 1994, **269**, 17918–17923.