

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕРВИЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ФОТОСИНТЕЗА

© 2003 г. А. Б. РУБИН и Т. Е. КРЕНДЕЛЕВА

*Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
Москва*

I. Введение. II. Электронтранспортная цепь фотосинтеза. III. Состояние хинонов и «быстрая» регуляция. IV. Ключевая роль ферредоксина. V. Математическое моделирование. VI. Механизмы транспорта электронов. VII. «Медленная» регуляция. VIII. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез – процесс создания органического вещества из неорганического определяет специфику зеленых растений. Он является начальным звеном сложной и разветвленной последовательности реакций метаболизма, обеспечивающей в конечном итоге рост и развитие растения в соответствии с генетической программой. Фотосинтез является процессом преобразования световой энергии солнца в химическую энергию тканей фотосинтезирующих организмов. Источником углерода для построения молекул органических соединений служит углекислота атмосферы. Суммарное уравнение фотосинтеза не дает никакого представления о химизме и промежуточных продуктах реакции. Весь процесс фотосинтеза может быть разделен на две стадии. В первичной (световой) энергия поглощенных квантов света используется для разрыва химических связей восстановителя,

Принятые сокращения: ГА – глутаровый альдегид; ГС – глутаминсинтетаза; ГОГАТ – глутамин-оксоглутарат-аминотрансфераза; ДМСО – диметилсульфоксид; МВ – метилвиологен; ПБК – пигментбелковый комплекс; П680 – реакционный центр ФС 2; П700 – реакционный центр ФС 1; ППФ – первичные процессы фотосинтеза; ФС – фотосистема; Рубиско – рибулозобисфосфат карбоксилаза; РЦ – реакционный центр; ССК – светособирающий комплекс; Фд – ферредоксин; ФНР – ферредоксин-NADP-редуктаза; ФХРР – ферредоксин-хинонредуктазная реакция; ЭТЦ – электронтранспортная цепь.

Адрес для корреспонденции: e-mail – rubin@biophys.msu.ru

Работа выполнена при поддержке РФФИ (гранты 01-04-48482, 01-04-48240, 02-04-49617).

в случае высших растений для фотолиза воды, а часть энергии, в конечном счете, запасается в новых химических связях. В последующей (темновой) стадии фотосинтеза запасенная энергия используется для восстановления углекислоты до сахаров в восстановительном пентозофосфатном цикле.

Первичные процессы фотосинтеза (ППФ) включают несколько этапов: поглощение света хлорофиллом, миграцию энергии поглощенных квантов к реакционным центрам (РЦ) фотосистем, фотохимическое разделение зарядов, процессы переноса электронов по фотосинтетической цепи, сопряженные с запасанием энергии в виде химических связей конечного восстановленного продукта – восстановленного NADP, а также АТФ. Весь комплекс ППФ полностью осуществляется во внутренних мембранах хроматофоров (у бактерий) или хлоропластов (у высших растений и водорослей), содержащих весь хлорофилл клетки. Для эффективного поглощения энергии квантов света молекулы хлорофилла сгруппированы по несколько сотен и связаны с молекулами мембранных белков, образуя специальные «антенные» комплексы. Взаимодействуя с белками, хлорофилл изменяет свои оптические свойства, таким образом в каждом «антенном» комплексе существуют разные формы хлорофилла, спектральные свойства которых существенно отличаются от хлорофилла в растворе. Существование разных форм, перекрывающих спектры поглощения друг друга, обеспечивают эффективную миграцию энергии поглощенных квантов света к РЦ. Передача энергии осуществляется согласно физическим законам от коротковолновых форм пигментов к более длинноволновым, поэтому антенный комплекс является как бы «воронкой», обеспечивающей эффективную передачу энергии, поглощенной любой молекулой пигмента, на специальные молекулы хлорофилла, являющиеся РЦ фотосистем, каждый из которых функционально тесно связан с донором и акцептором электронов. Возбужденный электрон РЦ передается акцептору электронов, образуя в РЦ дефицит электрона, который восполняется переносом электрона от донора. Таким образом, энергия возбужденного электрона не рассеивается в виде тепла или флуоресценции, а используется на образование восстановителя. У высших растений свет возбуждает две фотосистемы (ФС), локализованные в мембране так, что донорная сторона ФС находится у внутренней поверхности мембраны, а акцепторная – у наружной. Таким образом, энергия кванта, возбуждая электроны в молекулах хлорофилла, запускает электронный транспорт через цепь переносчиков фотосинтетической цепи. В конечном итоге поток электронов восстанавливает NADP⁺ до NADPH. Источником электронов в этих реакциях служит у высших

растений и водорослей окисление воды, сопровождающееся выделением молекулярного кислорода. Освобождающаяся при переносе электронов энергия используется для транслокации протонов через мембрану, возникающая в результате разность электрохимических потенциалов запускает синтез АТФ в реакциях фосфорилирования.

Существенные успехи, достигнутые мировой наукой за последние годы, связанные с изучением молекулярных механизмов первичных процессов, показали, что это сложная (особым образом организованная) динамическая система, которая должна иметь соответствующие механизмы регуляции на разных уровнях, чтобы подстроиться к метаболизму целого растения, постоянно испытывающему влияние изменяющейся внешней среды.

II. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭТЦ ФОТОСИНТЕЗА ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ И ВОДРОСЛЕЙ

Вся совокупность ППФ осуществляется за счет функционирования всего пяти типов белковых и пигмент-белковых комплексов (ПБК), встроенных в мембрану тилакоида. ЭТЦ фотосинтеза включает три ПБК (ФС 2, ФС 1 и цитохромный b_6/f -комплекс). Взаимодействие между ними осуществляется с помощью подвижных переносчиков (пластохиноны, пластоцианин и Фд). Светособирающий и сопрягающий макромолекулярные комплексы электронтранспортными функциями не обладают. Работы последних лет позволили установить структуру макромолекулярных комплексов, определить последовательность первичных доноров и акцепторов электронов, локализованных на их белковых субъединицах [32, 61, 33].

Главная особенность самых начальных стадий — высокая скорость переноса электронов, необходимая для обеспечения эффективного первичного разделения зарядов. Известно, что квантовый выход использования энергии электронного возбуждения в РЦ близок к 100%. Начальный акт разделения зарядов в реакционном центре завершается за несколько пикосекунд. Очевидно, что последующие процессы электронного транспорта много медленнее, отсюда ясно, что должны существовать некие молекулярные механизмы, которые позволяют обеспечить взаимодействие быстрых начальных стадий фотосинтеза с более медленными биохимическими реакциями, сохраняя при этом высокую эффективность и направленность процесса. Локализация нескольких последовательных переносчиков в пределах одного макромолекулярного комплекса (на расстоянии 5–10 Å) облегчает туннелирование электрона, которое является основным механизмом переноса электронов в ЭТЦ фотосинтеза.

Еще одна трудность в сопряжении разных реакций, составляющих единую ЭТЦ фотосинтеза связана с тем, что разделение зарядов в реакционном центре процесс одноэлектронный, в то время как значительная часть переносчиков ЭТЦ двухэлектронные. Донором электронов в ФС 2 является система разложения воды, выделяющая кислород в четырехэлектронном процессе. Это указывает на необходимость существования механизмов, осуществляющих сопряжение последовательных процессов электронного транспорта.

Организация ЭТЦ в мембране тилакоида представлена на рис. 1. Разделение зарядов в РЦ ФС 2 и ФС 1 индуцирует транспорт электронов по ЭТЦ. В ФС 2 система первичных акцепторов электрона (феофитин и связанные хиноны Q_A и Q_B) локализована на белковых субъединицах самого ПБК. Положительный заряд, образующийся после разделения зарядов в реакционном центре у внутренней поверхности мембраны, компенсируется электроном, поступающим из системы разложения воды. Функционально ПБК ФС 2 представляет собой H_2O -пластохинон-оксидоредуктазу. Количество свободного пластохинона, образующего пул, примерно на порядок превышает количество реакционных центров. Для полного восстановления молекулы кроме двух электронов, получаемых от Q_B , пластохинон расходует также два протона из наружной водной фазы. Являясь подвижным переносчиком, он выполняет функции ФС 2 – цитохром f -оксидоредуктазы и обеспечивает электронный транспорт между ФС 2 и цитохромным b_6/f -комплексом. На четырех белковых субъединицах этого комплекса связаны один гем цитохрома f и два гема цитохрома b_6 (с разным редокс-потенциалом), железо-серный белок Риске. Однако не все эти переносчики являются участниками линейной ЭТЦ, хотя весь комплекс выполняет пластохинон-пластоцианин-оксидоредуктазную функцию. Дважды восстановленный и протонированный пластохинон садится на специальный сайт на белке, локализованный вблизи внутренней поверхности мембраны, передает один из электронов железо-серному центру Риске, а второй на гем низкопотенциального цитохрома b_6 , при этом оба протона выделяются во внутри-тилакоидное водное пространство. Цитохром f восстанавливает пластоцианин, который, также являясь подвижным переносчиком внутри водной фазы тилакоида, подходит к цитохромному комплексу у его внутренней поверхности и включается в линейный поток электронов. Второй электрон, восстановивший низкопотенциальный гем b_6 , переносится на высокопотенциальный гем b_6 и используется внутри комплекса в цикле восстановления молекулы окисленного пластохинона, который садится на цитохромный комплекс в специальном месте посадки у наружной поверхности мембраны. При

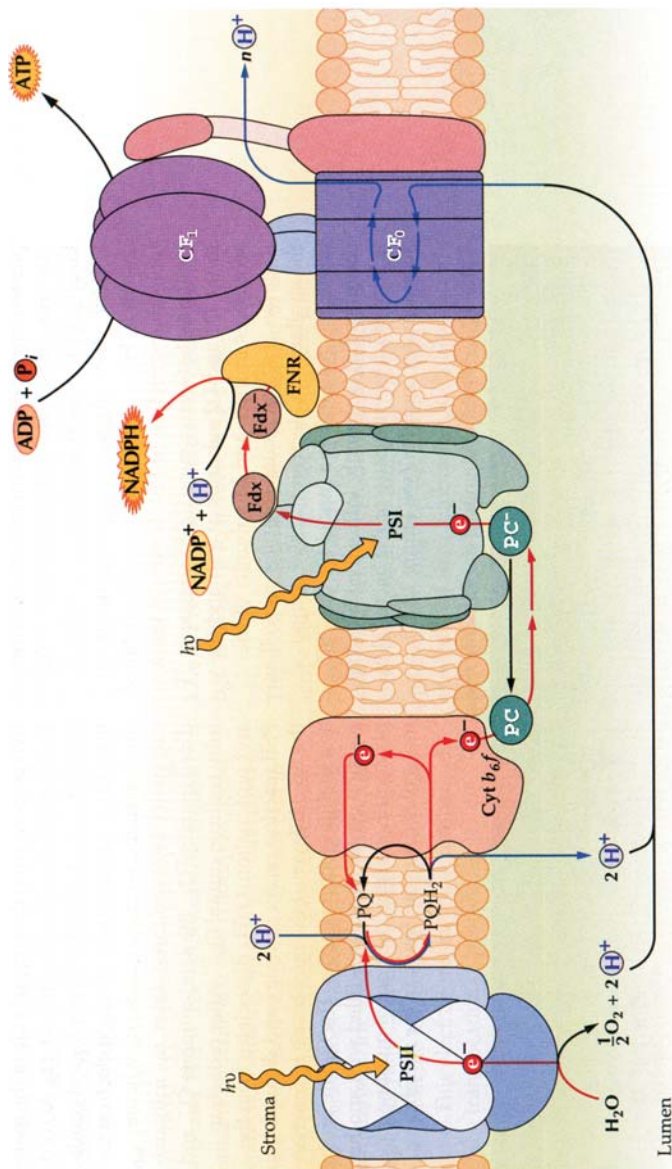


Рис. 1. Электронтранспортная цепь фотосинтеза в мембране тилакоида.

Внешняя (стромальная) сторона мембраны сверху, внутренняя (люменальная снизу). Показаны четыре макромолекулярных мембранных комплекса: ФС I (PS I), ФС 2 (PS II), цитохромный комплекс (*Cyt b₆/f*) и АТР-синтаза (CF $_0$ – мембранная часть, CF $_1$ – каталитическая часть), а также подвижные переносчики: пластохинон (PQ), пластоцианин (PC) и ферредоксин (Fd). Электроны переносятся по ЭТЦ от воды до NADP (показано стрелками). Трансмембранный перенос протонов в протонный канал АТРаза также показан сплошной стрелкой [61].

первом обороте цикла пластохинон восстанавливается до семихинона, при втором образуется полностью восстановленная молекула пластохинола, при этом расходуется также два протона из наружной водной фазы. Таким образом на этом участке ЭТЦ последовательное восстановление двух молекул пластоцианина в линейной цепи электронного транспорта сопровождается переносом четырех протонов из стромы хлоропластов в люмен.

Пластоцианин, осуществляющий функции цитохром *f*-ФС 1-оксидоредуктазы – небольшой гидрофобный медьсодержащий белок (10,5 кДа) – одноэлектронный переносчик, его электронтранспортные свойства связаны со способностью меди изменять валентность. Взаимодействие пластоцианина и П700 (см. ниже) осуществляется в комплексе, образуемом за счет электростатических сил. Однако связанный пластоцианин находится в равновесии со свободным пулом, т.к. на каждый реакционный центр ФС 1 в хлоропластах приходится 4–5 макромолекул пластоцианина. Размер глобулы оценен как $40 \times 32 \times 28 \text{ \AA}$. Методами иммунохимии и изучением «вывернутых тилакоидов» четко показано, что он расположен внутри тилакоида у внутренней поверхности мембраны. Предполагается, что белок может диффундировать в водном внутритилакоидном пространстве и даже пересекать расстояние между параллельными сторонами тилакоида. Однако *in vivo* диффузия должна происходить внутри уплощенного тилакоидного пузырька, где к тому же велико отношение поверхности к объему, что значительно увеличивает межмолекулярные взаимодействия на поверхности, уменьшает подвижность воды и увеличивает вязкость внутренней фазы. Поэтому движение относительно крупной молекулы, размеры которой сопоставимы с толщиной внутритилакоидного пространства, должно быть затруднено. Таким образом, в вопросе о механизмах взаимодействия пластоцианина не все ясно, однако известно, что пул пластоцианина почти всегда полностью окислен, значит скорость его диффузии не является фактором, ограничивающим линейный фотосинтетический поток электронов.

Первичным донором электронов в реакционном центре ФС 1 является особая форма хлорофилла *a* (П700), локализованная на димере белка главной субъединицы комплекса у внутренней поверхности мембраны. При окислительно-восстановительном титровании П700 проявляет свойства одноэлектронного переносчика со среднеточечным потенциалом около 460 мВ. Локализованный на том же димере первичный акцептор электронов в ФС 1 (A_0) представляет собой соединение хлориновой природы, следующий переносчик (A_1), является филлохиноном, последующие за A_1 акцепторы – железо-

серные белки. Идентифицировано по крайней мере три железо-серных белка, принимающих участие в переносе электронов с акцепторной стороны РЦ ФС 1. A_1 восстанавливает железо-серный центр F_x , локализованный у внутренней поверхности того же белка. Далее электрон переносится на железо-серные центры А и В, локализованные на одной из минорных субъединиц (PsaC) ПБК ФС 1. Расстояние между P700 и этими железо-серными центрами соответствует толщине мембраны (40 Å), так что перенос электрона здесь носит трансмембранный характер. Вопрос о способе включения их в ЭТЦ остается предметом дискуссий. В соответствии с величинами редокс-потенциалов (-550 и -590 мВ) центры А и В могут быть последовательными переносчиками электронов [61]. Однако существует и другая точка зрения, согласно которой в линейный поток электронов включается только железо-серный центр В, центр А включается в циклический поток электронов вокруг ФС 1 [19].

Следующим компонентом ЭТЦ за ФС 1 является одноэлектронный переносчик ферредоксин (Фд) (E_0 -400 мВ). Этот небольшой кислый, гидрофильный белок (около 10 кДа), содержит два или четыре атома трехвалентного железа и четыре атома серы в качестве лигандов на один каталитический центр. Очевидно, что железо-серный кластер, находящийся близко к поверхности, играет важнейшую роль не только в электронтранспортных процессах, но и в определении структуры белковой глобулы. Фд – подвижный переносчик, легко диффундирующий в водной фазе тилакоида. Две модели объясняют участие Фд в электронном транспорте. Согласно первой (модель челнока) он восстанавливается на акцепторной стороне ФС 1 у наружной поверхности мембраны тилакоида и затем диффундирует по водной фазе вдоль мембраны к месту посадки на ферредоксин-NADP-редуктазу (ФНР), где образует временно функционирующий комплекс. Другая модель предполагает, что ФНР образует прочный комплекс с локализованными у внешней поверхности тилакоида субъединицами ФС 1, эти белки расположены так близко друг к другу, что могут одновременно прочно связать небольшую по размеру молекулу Фд [43].

Ферредоксин-NADP-редуктаза – следующий компонент линейной ЭТЦ представляет собой белок с м.м. 35– 40 кДа, включающий FAD в качестве простетической группы. Он прочно связан с внешней поверхностью тилакоидной мембраны вне зоны стекинга. В молекуле фермента существует кластер основных аминокислотных остатков, который служит местом связывания Фд, представляющего собой кислый белок. За образование комплекса с Фд ответственны остатки лизина, аргинина и карбоксильная группа. Существует на белке

также два специфических места связывания NADP, одно из них с высоким сродством. Перенос электрона от Фд к NADP происходит в комплексе Фд, ФНР, NADP. Восстановление NADP – процесс двухэлектронный, а Фд является одноэлектронным переносчиком. Однократное срабатывание реакционного центра приводит к переносу одного электрона в активном центре ФНР с образованием полувосстановленной формы флавопротеина. Видимо, на акцепторном участке ФС 1 в цепи может иметь место кооперация между молекулами редуктазы, включенными в параллельные цепи. Две полувосстановленные молекулы флавопротеина дисмутируют, образуя один полностью восстановленный флавин: $2\text{ФП}^- \longleftrightarrow \text{ФП} + \text{ФП}^{2-}$. Этот двухэлектронный переносчик и восстанавливает растворенный в строме хлоропласта NADP, который кроме двух электронов от ФНР присоединяет еще протон из стромы. Таким образом, одноэлектронный перенос в РЦ ФС 1 сопрягается с двухэлектронным восстановлением конечного акцептора электронов в ЭТЦ фотосинтеза. Восстановленный NADP и синтезированный в сопряженном с фотосинтетическим электронным транспортом процессе фотофосфорилирования АТФ обеспечивают восстановление CO_2 через цикл Кальвина, ключевым ферментом которого является рибулозо-бисфосфат-карбоксилаза (Рубиско), локализованная в строме как и другие ферменты восстановительного цикла. Таким образом, ЭТЦ фотосинтеза обеспечивает образование конечного продукта и является частью единого механизма трансформации энергии. Очевидно, что ЭТЦ фотосинтеза не соответствует какой-либо единой стабильной структуре в мембране тилакоида. Ситуация усугубляется латеральной гетерогенностью мембраны: макромолекулярные комплексы, составляющие единый механизм трансформации энергии, неравномерно распределены в мембране тилакоида. Так ССК и ПБК ФС 2 локализованы главным образом в зоне стекинга гран, ПБК ФС 1 и сопрягающий комплекс находятся в ламеллах стромы, маргинальных и торцовых частях гран, а цитохромный комплекс равномерно распределен по всей мембране. Вся мембрана целиком представляет собой единый механизм, эффективность работы которого зависит от взаимодействия входящих в него макромолекулярных комплексов, белков-переносчиков электронов, молекулярного окружения их в мембране, что и должно лежать в основе механизмов регуляции фотосинтеза в изменяющихся условиях среды [32].

Под регуляцией можно понимать направленную перестройку сложной системы с сохранением ее интегральной целостности с целью обеспечения оптимального функционирования при изменении внешних и внутренних условий. Механизмы регуляции условно

можно разделить на «медленные» и «быстрые». В физиологии фотосинтеза «медленные» предполагают перестройку и изменение структуры хлоропласта и его компонентов. Их действие связано с включением генетического аппарата и синтезом новых белков, для чего требуется определенное время (минуты, часы). Эти процессы зависят от работы регуляторных белков, которые активируются под действием света (фитохром, криптохром), а также от функционирования системы биосинтеза хлорофилла. Механизмы «быстрой» регуляции ответственны за динамические изменения в функционировании отдельных участков фотосинтетической цепи и с синтезом белка не связаны. Они основаны на изменениях констант взаимодействия переносчиков, например, вследствие изменения их конформации.

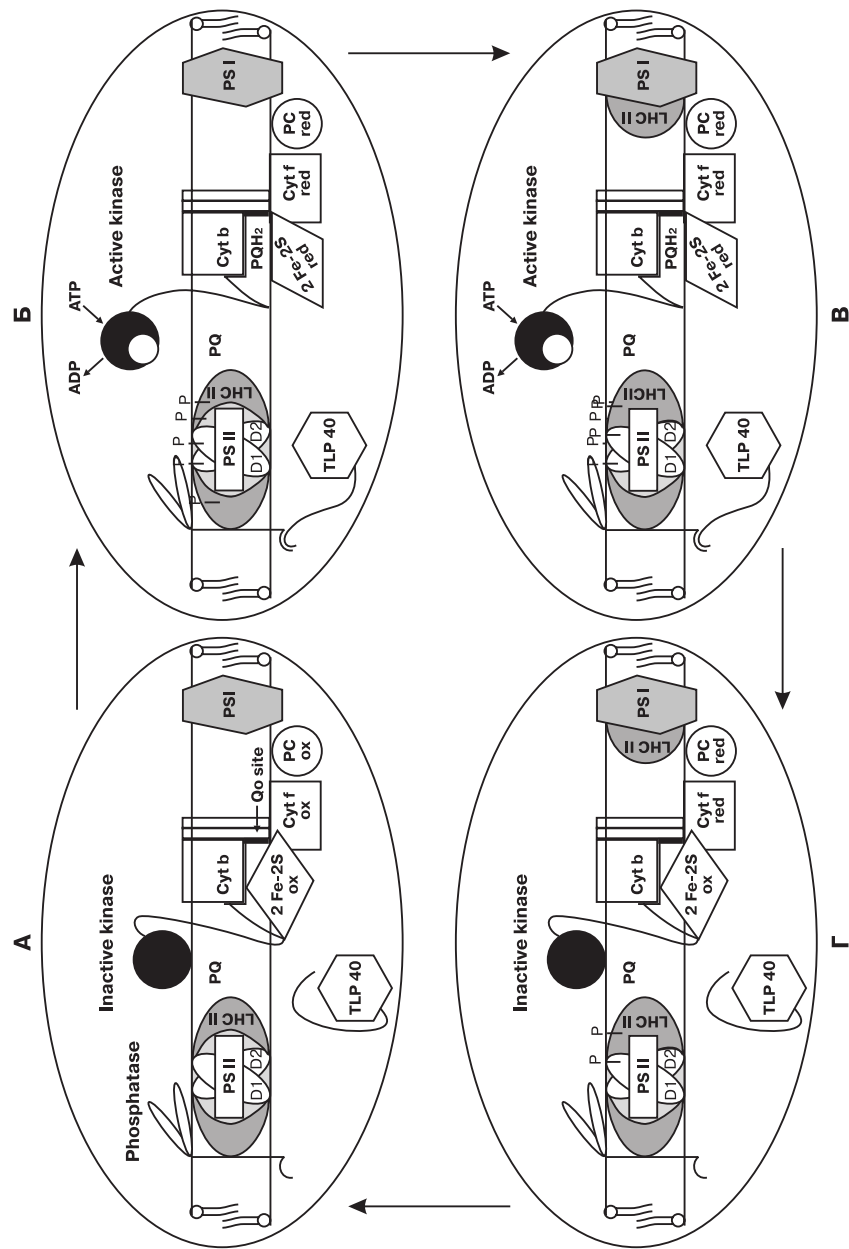
Важную роль в регуляции редокс-состояния переносчиков ЭТЦ играет пул хинонов. Здесь находится «узкое» место ЭТЦ — окисление пластохинола. Именно на этом этапе замедляется скорость потока электронов при образовании трансмембранной разности электрохимических потенциалов, т.е. осуществляется контроль скорости линейного транспорта электронов со стороны сопрягающего механизма [20]. От восстановленности хинонов, в свою очередь, зависит редокс-состояние переносчиков цепи между ФС. В настоящее время наиболее хорошо изучен механизм быстрой регуляции переноса электрона за счет перераспределения энергии возбуждения между двумя ФС, основанный на обратимом фосфорилировании белков светособирающего комплекса (ССК) (рис. 2) [42]. Дополнительный отрицательный заряд, получаемый основным полипептидом ССК при присоединении фосфатной группы специальной киназой, вызывает его латеральную миграцию из стыкованных областей мембраны тилакоида в нестыкованные, что переводит хлоропласт из состояния 1 в состояние 2, когда повышается перенос энергии к ФС 1 и увеличивается вклад циклического фосфорилирования. В активировании киназы огромную роль играет редокс-состояние переносчиков электронов. Каталитическая часть киназы локализована в строме хлоропласта, а ее мембранная часть связана с цитохромным комплексом. Киназа не активна, пока пул хинонов окислен. После посадки дважды восстановленного хинона на цитохромный комплекс, он восстанавливает железо-серный комплекс Риска и цитохром *f*, вызывая одновременно конформационные изменения в макромолекуле цитохромного комплекса вблизи внутренней поверхности мембраны, передающиеся на мембранную часть киназы. Изменения ее конформации активирует фермент, который фосфорилирует треониновые остатки на белках ССК и ФС 2 [74]. Изменение активности фосфатазы также зависит от конформационных перестроек на внутренней поверх-

ности цитохромного комплекса, т.к. в домене хлоропласта обнаружен циклофилин-подобный белок TLP 40, обладающий свойствами пептидил-пропил *cis-trans*-изомеразы и реагирующий на конформационные изменения цитохромного комплекса. На аминотерминальном конце белок имеет площадку, которая может быть местом связи с погруженным в домен концом фосфатазы [50]. Пока цитохромный комплекс восстановлен, фосфатаза «заблокирована», после его окисления фосфатаза активируется и дефосфорилирует фосфорилированные белки в том числе и ССК. Потеряв дополнительный заряд белок транспортируемого ССК диффундирует обратно и вновь ассоциируется с ФС 2, увеличивая ее светопоглощение (сечение поглощения). Таким образом происходит «подстройка» ЭТЦ, обеспечивающая оптимальное соотношение циклического и нециклического потока электронов и защиту ФС 2 от фотоокисления [43]. Появление отрицательного заряда при фосфорилировании полипептидов ФС 2 может иметь и другие последствия. Так оно может ослаблять связь Q_A с белком, приводя к потере Q_A и тем самым прерывать линейный электронный транспорт (Рубин, Чемерис, неопубликованные данные). Ниже мы обобщим значение процессов такого рода.

Важную роль в обеспечении эффективной работы ЭТЦ и поддержании оптимальных для каждой конкретной ситуации редокс-состояний участников электронтранспортных процессов играет также и Фд. Он является ключевым компонентом альтернативных метабо-

Рис. 2. Изменение распределения поглощенных квантов между ФС с помощью механизма обратимого фосфорилирования белков тилакоида [74].

Каталитическая часть фосфокиназы локализована в строме хлоропласта, а мембранная часть связана с цитохромным комплексом. Пока пул хинонов окислен, киназа не активна (А). Садясь на цитохромный комплекс, дважды восстановленный хинон (QH_2) восстанавливает железо-серный комплекс Риске ($2Fe-2S$) и цитохром *f*, вызывая конформационные изменения в макромолекуле цитохромного комплекса, передающиеся на мембранную часть киназы. Изменение ее конформации активирует фермент, который фосфорилирует белки ССК и ФС 2 (Б). Дополнительный отрицательный заряд, получаемый ССК при присоединении фосфатной группы, вызывает его латеральную миграцию от ФС 2 к ФС 1, повышая перенос энергии к ФС 1 (В). Конформационные изменения в цитохромном комплексе влияют также на активность фосфатазы через циклофилин-подобный белок TLP 40, обладающий свойствами пептидил-пропил *cis-trans*-изомеразы и имеющий на аминотерминальном конце площадку, которая может быть местом связи с погруженным в домен концом фосфатазы. Пока цитохромный комплекс восстановлен, фосфатаза «заблокирована» (Б и В), после его окисления фосфатаза активируется (Г) и дефосфорилирует фосфорилированные белки, в том числе и ССК. Потеряв дополнительный заряд, белок транспортируемого ССК диффундирует обратно и вновь ассоциируется с ФС 2, увеличивая сечение поглощения и поток электронов к ФС 2.



лических путей, связанных с восстановлением разных акцепторов ФС 1. Фд, восстановленный в результате работы ЭТЦ, помимо ФНР, служит донором электронов для сульфитредуктазы, ферментов пути ассимиляции азота в хлоропласте – нитритредуктазы, ГОГАТ, а также молекулярного кислорода и тиоредоксинредуктазы. Наличие большого числа терминальных акцепторов открывает дополнительные возможности для регуляции электронного потока и систем ассимиляции CO_2 и азота, что необходимо для обеспечения процессов синтеза белка в хлоропласте. Кроме того существование альтернативных путей сброса электронов препятствует «перевосстановлению» компонентов, поддерживая их в определенном редокс-состоянии [2].

Возникает вопрос о «цели» регуляции состояния ЭТЦ с помощью рассматриваемых механизмов, которые, на первый взгляд, направлены на повышение эффективности использования поглощенной энергии света в хлоропласте. Действительно, эффективность процессов разделения зарядов в РЦ фотосинтеза близка к 100%, однако в стабильных продуктах фотосинтеза энергии запасается значительно меньше. С другой стороны, известно, что активные формы кислорода вызывают перекисное окисление мембран и являются причиной окислительного стресса в клетках. В основе этого явления лежит целый ряд химических превращений с участием активных радикалов. Большая роль здесь принадлежит также активации кислорода за счет энергии электронного возбуждения с образованием синглетного кислорода [33, 34]. Из результатов исследований последних лет, в том числе и наших, стало ясно, что развитие окислительного стресса фотосинтетического аппарата, которое зависит от образования активных форм O_2 , определяется избытком электронов в цепи. Можно предполагать, что следствием наличия гибкой системы регуляции является защита от окислительных повреждений, а целью быстрой регуляции электронтранспортных процессов фотосинтеза – создание оптимального состояния ЭТЦ, когда нет избытка или недостатка электронов на определенных ее участках.

III. ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ ХИНОНОВ С ПОМОЩЬЮ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛА

Флуоресценция хлорофилла. Не использованная в фотосинтезе энергия поглощенных квантов света диссипирует в тепло или излучается в виде флуоресценции. Подавляющая часть флуоресценции, наблюдаемой при изучении листьев высших растений или водорослей, генерируется в ФС 2. Вследствие высокой эффективности дезактивации возбужденного состояния P680 и разделения зарядов в РЦ,

флуоресценция ФС 2 характеризуется низкими значениями квантового выхода (1–3%) и времени затухания (100–200 пс). Однако по изменению этих величин можно судить об эффективности основного фотосинтетического запасаения энергии электронного возбуждения П680 в различных условиях. В настоящее время параметры флуоресценции как показатель состояния и эффективности функционирования фотосинтетического аппарата широко используются в фундаментальных и прикладных исследованиях. Основная идея состоит в том, что уменьшение эффективности запасаения света в фотосинтезе приводит к увеличению интенсивности флуоресценции [33, 34, 35, 57].

Параметры кинетики флуоресценции хлорофилла *a* обладают большой информативностью для характеристики состояния ППФ. Это связано с тем, что изменения состояния фотосинтетического аппарата сопровождаются изменением вероятности тушения энергии электронного возбуждения молекул хлорофилла, что и проявляется в изменении квантового выхода флуоресценции при освещении (эффект Каутского). Таким образом, сложная кинетика нарастания переменной флуоресценции хлорофилла отражает последовательное заполнение различных пулов пластохинона на акцепторной стороне ФС 2, а кинетика затухания – гетерогенность окисления восстановленного пула. Исходный уровень флуоресценции (F_0) определяется флуоресценцией хлорофилла в условиях, когда все РЦ находятся в «открытом» рабочем состоянии и способны тушить флуоресценцию антенны, поскольку все молекулы первичного хинонного акцептора Q_A готовы принять электрон от П680. Если все молекулы Q_A восстановлены (на свету), РЦ «закрит», т.к. перенос электронов от П680 на феофитин невозможен в силу электростатического отталкивания. Поэтому энергия электронного возбуждения большей частью возвращается в антенну и уровень флуоресценции становится максимальным (F_m). Разница между F_m и F_0 называется переменной флуоресценцией ($F_v = F_m - F_0$). Она обусловлена той частью световой энергии, которая в первичных реакциях фотосинтеза утилизируется при открытых РЦ.

В адаптированных к темноте листьях все центры фотохимически активны и флуоресценция соответствует уровню F_0 . При освещении их насыщающей вспышкой флуоресценция становится максимальной (F_m) и быстро релаксирует в темноте до исходного уровня. Величина отношения F_v/F_m коррелирует с квантовым выходом фотосинтеза, что позволяет использовать этот параметр для характеристики процессов фотосинтеза даже на целых фотосинтезирующих объектах. При постоянном освещении центры частично или полностью переходят в «закрытое» состояние по мере восстановления Q_A , что сопро-

вождается увеличением уровня флуоресценции до величины F_t . Освещение образца на этом фоне насыщающей фотосинтез вспышкой увеличивает уровень флуоресценции до величины F_m' , меньшей чем F_m , т.к. имеет место нефотохимическое тушение флуоресценции, связанное с диссипацией части энергии возбуждения в РЦ и фотосинтетической антенне. Оно обусловлено по крайней мере тремя процессами: энергизационным ΔpH -зависимым тушением (Q_E), уменьшением сечения поглощения ФС 2 вследствие перехода части фосфорилированных ССК к ФС 1 (Q_T) и фотоингибированием ФС 2 (Q_I). Таким образом разница между максимальной флуоресценцией F_m и F_m' обусловлена той частью флуоресценции, которая тушится за счет нефотохимических процессов. Все эти процессы отражаются на кинетической кривой, которая имеет немонотонный характер. При длительной экспозиции листьев на сильном свете флуоресценция сначала возрастает до F_m , затем снижается до F_m' за счет нефотохимического тушения [57].

Восстановленный Q_A^- легко отдает электрон на Q_B , который затем передает его в пул свободных пластохинонов. После однократного возбуждения РЦ короткой интенсивной вспышкой, окисление Q_A^- сопровождается быстрой релаксацией переменной флуоресценции за счет переноса электронов с Q_A^- на Q_B . Небольшой долгоживущий компонент в кинетике окисления Q_A^- связан с наличием в популяции реакционных центров некоторого числа «неактивных», в которых перенос с Q_A к Q_B невозможен. Более сложная ситуация наблюдается, когда ФС 2 возбуждается многократно. Восстановленные молекулы Q_B передают электроны в пластохиноновый пул. Поэтому степень восстановленности Q_B , зависит от редокс-состояния пула. Его окисленность зависит, в свою очередь, от линейного электронного транспорта через ФС 1 и далее к конечным акцепторам таким, как CO_2 . После длительного периода темноты Рубиско неактивна, и фиксация CO_2 не происходит. По этой причине пул пластохинонов может быть восстановлен даже в первый момент освещения. В таком случае последующие электроны с Q_A^- смогут переноситься только обратно в донорную часть ФС 2, что скажется на кинетической кривой. Таким образом, очевидно, что кинетика темновой релаксации переменной флуоресценции связана с состоянием Q_B , и пластохинонового пула. Все изложенное выше указывает, что по характеру кинетической кривой и других параметров флуоресценции (величины F_0 , F_m , F_v , а также F_v/F_m и др.) можно судить об изменениях в цепи электронного транспорта.

Изучение фундаментальных механизмов флуоресценции и выяснение их взаимосвязи с работой ЭТЦ и сопряженными с ней процес-

сами являются основой для использования параметров флуоресценции в решении прикладных задач, требующих получения характеристики физиологического состояния растения. Применение техники с высоким временным разрешением позволило нам проанализировать кинетики нарастания и спада флуоресценции. Оказалось, что нарастание переменной флуоресценции от уровня F_0 до F_m имеет три фазы. Начальная, быстрая фаза подъема протекает за 1 мс. Более медленные фазы – за времена порядка 30 и 300 мс, соответственно. Амплитуда наиболее медленной фазы нарастания флуоресценции (в отличие от двух других) существенно снижалась при обработке листьев метилвиологеном (МВ), который акцептирует электроны от ФС 1 в условиях, когда ферменты цикла фиксации CO_2 не активны, и окисляет переносчики ЭТЦ между ФС. Есть основания считать, что медленная фаза связана с восстановлением Q_A в ФС 2_B -центрах, характеризующихся малым размером светособирающей антенны.

В кинетике темновой релаксации переменной флуоресценции контрольных листьев также обнаружено три кинетических компонента с временами полуспада 8 мс, 105 мс, и 850 мс. Изменение восстановленности межсистемного участка длительностью вспышки и добавлением МВ определяло характер спада. После освещения в течение 30 мс кинетика релаксации быстрая, на долю быстрого компонента приходится более 70%. По мере увеличения длительности освещения соотношение компонентов менялось в сторону возрастания вклада более медленных, тогда как при обработке МВ, темновой спад всегда был быстрым, независимо от длительности освещения. Полученные данные указывают на сложность путей реокисления Q_A и зависимость их от уровня восстановленности переносчиков электронов между ФС. Показано, что средний компонент связан с наличием узкого места на акцепторной стороне ФС 1 [11, 45].

Роль пластохинонов в регуляции активности ФС 2. Большая роль пластохинонового пула в метаболизме растительной клетки связана также с тем, что через этот пул осуществляется взаимодействие фотосинтетической ЭТЦ с дыхательной. Субстратом хлоропластного дыхания служит NADH, образующийся при гликолитическом расщеплении углеводов. NADH-дегидрогеназа восстанавливает пул пластохинонов, который может быть окислен хинон-редуктазой [44]. Нами было показано, при целом ряде неблагоприятных физиологических воздействий, сопровождающихся снижением роста культуры хлореллы (азотное голодание, тепловой шок и др.), наблюдается инактивация ФС 2, проявляющаяся, в частности, в снижении переменной флуоресценции. Наблюдаемое уменьшение величины F_v/F_m обусловлено главным образом повышением в этих условиях

уровня F_0 , что указывает на необратимое восстановление или потерю первичного акцептора электронов Q_A в ФС 2 [40]. Было показано также, что инактивация ФС 2 связана с накоплением в хлоропластах продуктов фотосинтеза, которые не могут использоваться для роста. Потеря реакционными центрами ФС 2 способности к фотохимическому тушению является проявлением регуляторного механизма, ингибирующего фотосинтез при избыточном накоплении в хлоропласте продуктов углеводного метаболизма, общих для гликолиза и цикла Кальвина. Факторы, препятствующие накоплению субстратов хлоропластного дыхания (отсутствие CO_2 , торможение метаболизма глюкозы ее неметаболизируемым аналогом 2-дезоксид- D -глюкозой, ингибирование синтеза белка), предотвращали инактивацию ФС 2 в клетках хлореллы. Ингибирование диуроном транспорта электронов между Q_A и Q_B не влияло на хлоропластное дыхание, но предотвращало инактивацию ФС 2. Механизм инактивации связан с потерей ФС 2 первичного хинонного акцептора после его двухэлектронного восстановления от пластохинона за счет потока электронов от субстратов хлоропластного дыхания. Полученные результаты указывают на существование единого механизма метаболической регуляции активности ФС 2 при различных по своей природе воздействиях. В результате взаимодействия восстановленного дыхательной цепью пластохинона с первичным акцептором электронов ФС 2 происходит снижение скорости фотосинтетического потока электронов до уровня, соответствующего потребностям клетки [39].

Важная роль пула хинонов в поддержании оптимального уровня первичных процессов фотосинтеза была продемонстрирована на микрокродоросли *Chlamydomonas reinhardtii*, которая способна к длительному (несколько дней) интенсивному образованию H_2 на свету после полутора-двух суток голодания (инкубация в среде с дефицитом серы). Было показано, что серное голодание в течение первых суток вызывает значительное снижение скорости фотосинтеза в результате инактивации 85–90% ФС 2 [75]. Когда скорость фотосинтетического образования O_2 становится ниже скорости дыхания, культура переходит в анаэробные условия, и через некоторое время начинается выделение H_2 . Для изучения механизмов изменения активности ФС 2 в процессе серного голодания при переходе культуры к анаэробным условиям и ее участия в образовании H_2 регистрировали изменения параметров флуоресценции на всех стадиях адаптации клеток *C. reinhardtii* к недостатку серы методом импульсной флуориметрии. Было показано, что постепенное уменьшение активности ФС 2 во время аэробной стадии, при наступлении анаэробных условий сменяется быстрой и полной ее инактивацией. Затем начинается

медленная реактивация части ФС 2 с одновременным образованием H_2 . При этом характер изменения активности ФС 2 качественно коррелирует со скоростью образования H_2 , что указывает на участие ФС 2 в передаче электронов через ФС 1 и Фд гидрогеназе. Механизм медленной инактивации ФС 2, видимо, аналогичен описанному ранее для эукариотических водорослей в условиях недостатка различных биогенных элементов [39]. Получены данные о том, что образующиеся при голодании состояния ФС 2 с низкой способностью к фотохимическому тушению возбуждения являются долгоживущими [5].

Механизм быстрой инактивации ФС 2 у голодающих по сере клеток *S. reinhardtii* при переходе к анаэробным условиям также может быть связан с восстановлением пула хинонов. Возникающий дефицит O_2 делает невозможным функционирование конечной оксидазы хлоропластного дыхания, что приводит к повышению восстановленности пула пластохинонов. Это, в свою очередь, вызывает подавление активности ФС 2 и, соответственно, уменьшение скорости фотосинтетического образования O_2 . Частичная реактивация ФС 2 в анаэробных условиях, по всей видимости, обусловлена активацией гидрогеназы, которая через Фд окисляет ЭТЦ фотосинтеза, в том числе, пул пластохинонов. В результате частичного окисления пула увеличивается отток электронов от ФС 2, что, в свою очередь, повышает эффективность работы цепи фотосинтеза. Процесс выделения водорода позволяет сохранить часть активных центров ФС 2 в анаэробных условиях при серном голодании, что предотвращает их полную деструкцию, и одновременно обеспечивает клетку некоторым количеством O_2 . Активация гидрогеназы является механизмом, защищающим ФС 2 от деструкции в условиях голодания. Таким образом редокс-состояние пластохинонового пула играет важную роль в физиологической регуляции активности ФС 2 на протяжении всех этапов серного голодания культуры. В свою очередь, степень восстановленности пула определяется соотношением скоростей реакций фотосинтеза, хлоропластного дыхания и образования водорода [5].

IV. КЛЮЧЕВАЯ РОЛЬ ФЕРРЕДОКСИНА

Поскольку основной смысл регуляции — обеспечение оптимальной работы системы в целом, то должны существовать регуляторные механизмы, обеспечивающие «подстройку» ППФ к потребностям темновой стадии фотосинтеза, а также процессам ассимиляции азота, без которых невозможен синтез белков, а следовательно и осуществление генетической программы роста и развития растения.

С этой точки зрения большой интерес вызывает Фд, поскольку он может быть восстановителем для целого ряда протекающих в хлоропласте ключевых биохимических процессов, которые не относятся к ППФ. Так, Фд может включать цикл процессов восстановления нитрита, единственного источника азота, попадающего в хлоропласт. Через цикл восстановления, катализируемый системой ГС–ГОГАТ образуются аминокислоты, используемые далее для синтеза белка в хлоропласте [2]. Фд восстанавливает также тиоредоксин, осуществляющий важную функцию в регуляции процессов синтеза белка, работы самой ЭТЦ и АТФ-синтазы. Электрон с Фд может использоваться в восстановлении сульфатов, а также кислорода (рис. 3). Видимо, включение тех или иных альтернативных путей циклического сброса электронов зависит от физиологического состояния хлоропласта. [56]. В нормальных условиях пул Фд, как правило, восстановлен. Это может объяснять отсутствие конкуренции между ассимиляцией углерода и азота при насыщающих интенсивностях света. Образующийся в цитозоле и поступающий в хлоропласт нитрит, будучи акцептором электронов, участвует в поддержании редокс-статуса компонентов ЭТЦ, стимулирует нециклический транспорт электронов [2]. Нами было показано специфическое влияние нитрита на сопряженные с электронным транспортом процессы трансформации энергии в хлоропластах. Так, добавление NO_2^- (5 мМ) к препаратам тилакоидов пшеницы ингибировало фотофосфорилирование, сопряженное с линейным потоком электронов через обе ФС, но стимулировало циклическое фосфорилирование с феназинметосульфатом (в присутствии диурана), а также поток электронов от искусственного донора через ФС 1 и МВ на кислород и активность индуцированной светом Mg^{2+} -зависимой H^+ -АТФазы хлоропластов. Присутствие NO_2^- во время световой энергизации хлоропластов увеличивало величину отношения F740/F695 в спектрах низкотемпературной флуоресценции, что указывает на перераспределение энергии поглощенных квантов в пользу ФС 1. Изменение величины медленной компоненты в индукционной кривой замедленной флуоресценции свидетельствует о влиянии нитрита на величину трансмембранной $\Delta p\text{H}$ [23].

Фд играет важную роль в регуляции распределения электронов между нециклическим и циклическим потоками. Пути и механизмы Фд-зависимого циклического транспорта электронов вокруг ФС 1 до сих пор остаются предметом дискуссий. Возможно, существует несколько циклических потоков, в том числе и в антимицин-нечувствительном пути восстановления пластохинона электронами, поступающими от акцепторной стороны ФС 1 [54, 70]. Ключевым вопросом регуляции электронного транспорта является механизм распределе-

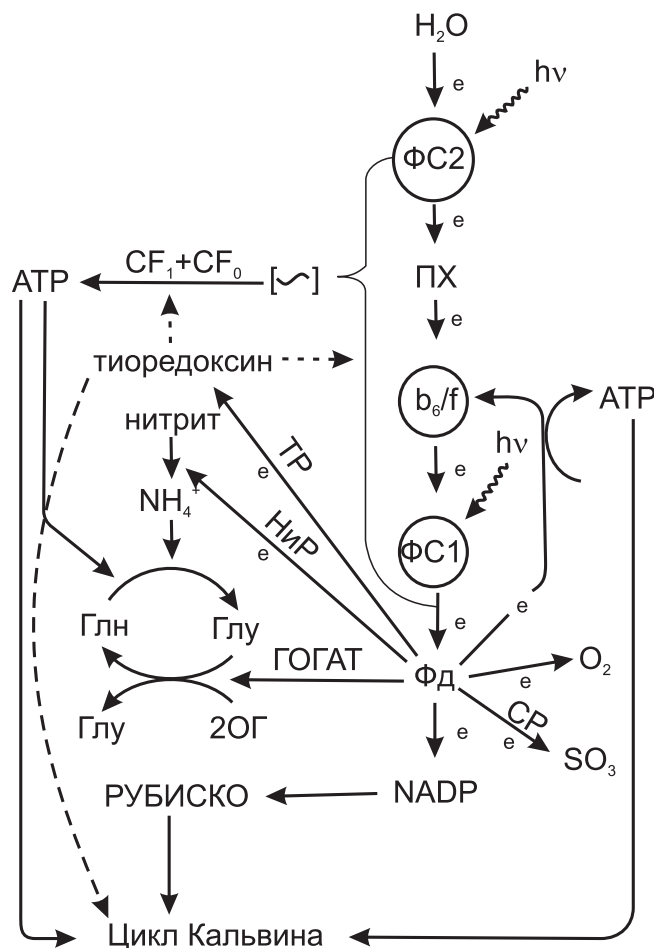


Рис. 3. Альтернативные пути окисления ферредоксина, восстановленного электронтранспортной цепью, в хлоропласте

Ферредоксин, восстановленный ФС 1, является донором электронов (кроме NADP) для реакций восстановления кислорода, тиоредоксина, сульфита, нитрита, а также глутамат-синтазного цикла ассимиляции азота в хлоропласте. В свою очередь восстановленный тиоредоксин может оказывать регуляторное влияние на эффективность процессов переноса электронов по ЭТЦ, фотофосфорилирование и цикл Кальвина.

Сплошные стрелки – пути транспорта электронов, пунктирные стрелки – регуляторные воздействия. СР – сульфитредуктаза, ГОГАТ – глутамин-оксоглутарат-аминотрансфераза, Нир – нитритредуктаза, Тр – тиоредоксинредуктаза, 2-ОГ – 2-оксоглутарат.

ния потока электронов от восстановленного Фд на NADP^+ по линейному пути или обратно в цепь по циклическому. Но он не может быть решен без определения участников цикла. Исследования редокс-превращений цитохромов и ингибиторный анализ указывают на включение в цикл пластохинона и цитохромного b_6/f -комплекса [43, 51, 63]. Однако, механизмы восстановления пластохинона с участием восстановленного Фд неизвестны. Именно ферредоксин-хинонредуктазная реакция (ФХРР) является не совпадающим с линейным потоком электронов участком Фд-зависимого цикла. До сих пор не удается связать ее с каким-либо выделенным и охарактеризованным белком, который бы был ответственным, в частности, за специфическую чувствительность цикла к антимицину А [46, 63]. В последнее время обсуждается возможность участия в этом процессе особой формы цитохрома b_{559} [51]. Неоднократно ставился вопрос об участии в цикле ФНР [46, 54], но имеющихся экспериментальных фактов недостаточно для его решения, и они не укладываются в рамки какой-либо единой схемы, это и определило наш интерес к указанной проблеме. Методом ЭПР-спектроскопии была изучена кинетика темнового восстановления фотоокисленного P700 после 1,5 с освещения изолированных тилакоидов гороха в анаэробных условиях в присутствии диурона. При добавлении Фд увеличивался вклад быстрого (200 мс) компонента восстановления, достигавший постоянной величины (близкой к 80%) при концентрациях белка 25–40 мкМ, что указывает на связь этого кинетического компонента с Фд-зависимым циклом вокруг ФС 1. Специфический ингибитор циклического транспорта антимицин А в 1,5 раза увеличивал длительность быстрого компонента и одновременно уменьшал его вклад в темновое восстановление P700 . Эти данные показывают, что в наших экспериментальных условиях быстрый компонент темнового восстановления P700^+ обусловлен антимицин-чувствительной частью ФХРР. Темновое восстановление P700^+ замедлялось дибромтимохиноном, HQNO , что подтверждает включение пластохинона и цитохромного b_6/f -комплекса в Фд-зависимый циклический транспорт электронов вокруг ФС 1. Ингибиторы ФНР (N-этилмалеимид, p-фенилендималеимид и гепарин) замедляли быстрый компонент и одновременно увеличивали вклад медленного компонента темнового восстановления P700^+ . Полученные результаты позволяют предположить, что циклический поток электронов из акцепторного пула ФС 1 на P700^+ осуществляется также с участием ФНР, однако механизм этого участия по-прежнему не ясен и требует продолжения исследований. Изучение влияния пиридиннуклеотидов на темновое восстановление P700^+ подтвердило участие ФНР в

циклическом потоке. Как NADP^+ , так и NADPH (в отличие от NADH) уменьшали вклад быстрого компонента в кинетику релаксации P700^+ и увеличивали вклад медленного в одном и том же интервале концентраций. Таким образом получены дополнительные доказательства участия ФНР в циклическом транспорте электронов [17]. Связывание пиридиннуклеотидов с ФНР аллостерически влияет на взаимодействие Фд с ФНР, что каким-то образом препятствует передаче электронов от Фд на последующие переносчики, участвующие в циклическом транспорте электронов. Вопрос об участии ее протестической группы в переносе электронов в циклическом потоке остается открытым. С другой стороны, для непосредственного восстановления погруженного в мембрану пластохинона находящегося в водной среде Фд необходимо, чтобы головка пластохинона и Fe-S-кластер Фд находились друг от друга на расстоянии, не превышающем $15\text{--}20 \text{ \AA}$ [43]. Поскольку ФНР способна специфически связывать Фд и является мембранным белком, она может способствовать такому сближению Фд с пластохиноном. Мест связывания хинона на ФНР пока не обнаружено. В одной из моделей циклического транспорта электронов в хлоропластах цианобактерий в качестве компонента ФХРР, обеспечивающего место посадки хинона, рассматривается минорная субъединица комплекса ФС 1 (PsaE), рядом с которой ФНР локализована в мембране [43, 70].

V. МАТЕМАТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ППФ

Как уже описано выше, регуляторные свойства биологических процессов определяются их иерархической организацией в пространстве и во времени. Временные масштабы процессов фотосинтеза простираются от 10^{-12} с (разделение зарядов в реакционных центрах ФС) до времен порядка секунд для метаболических процессов и до нескольких часов, необходимых для синтеза белков, и даже дней, характерных для стадий роста целого растения. Функционирование такой сложной системы в широком диапазоне изменяющихся условий среды обеспечивается наличием многочисленных регуляторных систем на разных уровнях структурно-функциональной организации. Регуляция фотосинтетических процессов является многоуровневой со многими положительными и отрицательными обратными связями и многочисленными оптимизирующими механизмами, позволяющими сохранить жизнеспособность системы в период стресса. В этом случае возврат к более благоприятному режиму освещения, минерального питания и т.п. позволяет в кратчайшие сроки возобновить эффективную работу всей системы запа-

сания энергии. Включая светом последовательность фотосинтетических процессов, можно «тестировать» систему и наблюдать кинетику переходных процессов состояний отдельных ее компонентов. Такая возможность прямых кинетических наблюдений за отдельными компонентами делает привлекательным построение математических моделей системы первичных процессов фотосинтеза, поскольку здесь можно более корректно ставить задачу идентификации параметров модели по данным кинетических экспериментов.

Математическое моделирование процессов в хлоропластах и их фрагментах имеет целью идентификацию констант скоростей отдельных стадий процесса фотосинтеза в разных условиях эксперимента и последующую идентификацию физических параметров электронно-колебательных и электронно-конформационных взаимодействий [7, 27]. Взаимодействие компонентов ПБК может быть описано с помощью систем дифференциальных уравнений, линейных относительно вероятностей состояний этих комплексов. В отличие от описания с помощью уравнений закона действующих масс [20, 52], впервые был поставлен вопрос о применимости «master equations» для описания переноса электрона в пределах комплекса реакционного центра [38, 62].

На кафедре биофизики была выполнена более подробная математическая разработка [36, 71] и дальнейшее развитие метода для описания процессов переноса электрона в РЦ фотосинтезирующих бактерий и высших растений [9, 60, 67]. Для таких моделей, представляющих собой системы линейных дифференциальных уравнений существуют математически обоснованные конструктивные подходы к однозначной идентификации параметров моделей. Уравнения можно полагать линейными для изолированных комплексов РЦ, для которых блокировано взаимодействие с окружающими донорами и акцепторами, например, с помощью замораживания, или в присутствии ингибиторов. Для таких редуцированных систем проведена оценка констант скоростей переноса электрона на отдельных участках цепи [7, 9, 27, 29, 67].

В общем виде математическое описание процессов переноса электрона в молекулярном комплексе сводится к следующему. Состояние комплекса

$$\rightarrow [C_1 C_2 \dots C_n] \rightarrow \quad (1)$$

описывается упорядоченной совокупностью состояний компонентов C_i входящих в комплекс. Каждый из переносчиков может находиться в окисленном, восстановленном, нейтральном, возбужденном, том или другом конформационном или ином состоянии. Переходы между состояниями описываются обыкновенными дифференциальными уравнениями, линейными относительно вероятностей состояний.

$$\frac{dp_i}{dt} = \sum_{j=1}^l (p_j k_{ij} - p_i k_{ji}),$$

$$p_i(0) = b, i = 1, \dots, l$$
(2)

Или в векторной форме:

$$\frac{dP}{dt} = K^T P, P(0) = B.$$
(3)

Вероятность найти переносчик в состоянии D представляет собой сумму вероятностей состояний комплекса p_i , в которых данный компонент представлен в состоянии D :

(4)

Вероятности переходов между состояниями k_{ij} могут не быть постоянными величинами, а зависеть как от состояния самого комплекса, так и от иных переменных или параметров системы: t° , $\Delta\mu\text{H}^+$, внешнего электрического поля и т.д. Таким образом, описание (1–4) предоставляет возможность для оценки кинетических параметров с помощью идентификации величине по экспериментальным данным. Уравнения типа «master-equation» для описания с разной степенью детализации процессов в отдельных молекулярных комплексах, входящих в состав системы первичных процессов фотосинтеза использовались для описания процессов в комплексах ФС I [7, 9, 27, 67]. Во всех этих случаях моделировали процессы переходов между состояниями комплекса, которые можно характеризовать вероятностями этих переходов.

Два типа регуляции в комплексах РЦ. Математические модели, построенные и идентифицированные по результатам исследований на фрагментах, позволили сделать заключение о существовании по крайней мере двух типов организации и регуляции фотосинтетической ЭТЦ в зависимости от характера взаимодействия составляющих ее элементов [27, 67, 68, 93]. Первый тип – световая регуляция в пределах мультиферментных ПБК – фотореакционных центров. Эти оптимизированные в процессе эволюции системы стабильны в своей функциональной и структурной организации в широком диапазоне внешних воздействий. Экранированные от внешних влияний белковым и липидным окружением, они сохраняют стабильность своих кинетических характеристик, в том числе способность к фотоконформационным переходам. Основным регуляторным фактором на этом уровне является сам свет, поскольку именно поглощение кванта света приводит к перераспределению заряда в первичной фотоак-

$$P(D) = \sum_{S_q \in D} p(S_q, t).$$

тивной паре и сопровождается конформационными изменениями белковых компонентов. Это препятствует обратному переносу электрона и потере энергии в виде флуоресценции.

Во всех изученных фотосинтезирующих объектах (фрагменты ФС 1 и 2, препараты РЦ, хроматофоры) при переходе от темновых условий к световым изменение параметров системы было направлено на увеличение эффективности выноса электрона за пределы первичной фотосинтетической пары. Очевидно, что «световая» регуляция может играть физиологическую роль, подобно аллостерической регуляции в ферментативном катализе, осуществляемой путем конформационных изменений белков-ферментов. Наличие таких конформационных переходов было обнаружено при изменении условий «темнота — свет — темнота». Так при регистрации фотоиндуцированных редокс-превращений бактериохлорофилла в препаратах РЦ оказалось, что при замораживании на свету скорость восстановления пигмента после выключения действующего света существенно ниже, чем у препаратов, замороженных в темноте. Был сделан вывод о фиксации низкой температурой световой или темновой конформации бактериальных РЦ. Результаты комплексных исследований конформационной подвижности ПБК с использованием спектральных методов, ЭПР и мессбауеровской спектроскопии, спиновых меток для препаратов в суспензиях, порошках и пленках при различной степени гидратации составили основу теоретических представлений о роли электронно-конформационных взаимодействий в первичных процессах фотосинтеза. Полученное при идентификации математических моделей различие эффективных значений констант скоростей переноса электронов между отдельными компонентами РЦ на свету и в темноте (масштаб различий 1–2 порядка) подтвердило наличие разных конформационных состояний. Эти состояния, по-видимому, отличаются взаимным расположением активных групп донорных и акцепторных компонентов и, как следствие, реакционной способностью и кинетическими характеристиками [28, 35].

Другой тип регуляции электронтранспортных процессов проявляется на стадиях взаимодействия молекулярных комплексов с подвижными переносчиками, т.е. на участках «входа» и «выхода». Идентификация параметров по экспериментальным данным, полученным при варьировании рН, редокс-условий, вязкости среды показывает, что диапазон изменения констант скоростей переноса электрона на этих участках при изменении внешних условий составляет несколько порядков. Эти участки являются местом приложения регулирующих воздействий внутриклеточных факторов (эндогенные ингибиторы, метаболиты и т.д.). С точки зрения кинетической модели константы

«входа» и «выхода» определяют стационарные значения «внутренних переменных» и влияют на их кинетические характеристики. Таким образом, сигналы, регистрируемые спектральными методами и отражающие характеристики компонентов, составляющих комплексы, в то же время несут информацию о процессах, «удаленных» от РЦ.

Лимитирующей стадией во взаимодействии комплексов является скорость диффузии подвижных переносчиков [53]. Скорость диффузии зависит от рН, вязкости, межгранных расстояний, которые, в свою очередь, определяются уровнем энергизации мембраны и зависят от интенсивности освещения и других параметров, влияющих на физиологическое состояние организма. В терминах кинетической модели можно сказать, что константы скоростей «входа» и «выхода» каждого из комплексов являются величинами, регулируемые со стороны фотосинтезирующей клетки. Таким образом, изменения физиологического состояния организма проявляются не только на уровне биосинтеза компонентов, но и в изменении величин констант скоростей взаимодействия ПБК с донорным и акцепторным окружением, что соответствует изменению констант «входа» и «выхода», определяющих стационарный уровень и кинетику отдельных состояний РЦ. Этот факт позволяет использовать характеристики процессов, происходящих на уровне РЦ, в качестве индикаторов состояния фотосинтезирующего организма.

Одним из наиболее легко регистрируемых параметров является кинетическая кривая флуоресценции, индуцированная светом, вызывающим фотосинтез. Кривая может иметь весьма сложный характер, причем отдельные кинетические особенности приписываются влиянию разных компонентов фотосинтетического аппарата [47]. В последнее десятилетие моделирование фотосинтетических процессов в большинстве случаев имело своей целью воспроизвести особенности индукционной кривой флуоресценции нарастающего участка и медленного перехода участков до выхода на стационарный режим, которые определяются процессами с характерными временами. Наиболее простые модели для описания процессов быстрой фазы флуоресценции рассматривали только электронтранспортные процессы в самом комплексе ФС 2, не рассматривая деталей переноса электронов в реакционный центр от водоразлагающего комплекса и при блокировании переноса между первичным и вторичным хиноном. Анализ простой математической модели показал, что переход от активного к неактивному фотосинтезу может быть связан с нарушениями сопряжения между процессами электронного транспорта и фиксации CO_2 в цикле Кальвина. При более детальном описании процессов в ФС 2, рассматривается взаимодействие РЦ с

пулом хинонов. В результате на такой модели получена информация о характерных особенностях быстрой стадии кинетической кривой индукции флуоресценции [7].

В наших работах применен новый подход к моделированию фотосинтетических процессов в хлоропластах высших растений с помощью *обобщенной модели*. Он основан на детальном кинетическом описании каталитических циклов основных ПБК, входящих в систему первичных процессов с учетом зависимости энергетического контроля электронного транспорта. Модель учитывает процессы, проходящие в трех компартментах хлоропласта: мембране, внутритилакоидном пространстве и строме хлоропласта. Первичные процессы транспорта электронов по цепи переносчиков сопровождаются трансмембранным движением ионов, которое взаимосвязано с образованием электрохимического потенциала, имеющего электрическую ($\Delta\phi$) и концентрационную ($\Delta\mu$) составляющую. Модель учитывает возможность перемещения ионов Cl^- , K^+ и H^+ между стромой и люменом, с учетом соотношения объемов компартментов. Рассмотрены также процессы разделения зарядов и инициированного электронного переноса в цитохромном комплексе и на участках, где электронный перенос осуществляют подвижные переносчики пластохинон и пластоцианин. Важной особенностью модели является учет зависимости скоростей трансмембранного переноса электрона от электрического потенциала. Такая модель не только описывает особенности кривой флуоресценции для разных значений интенсивности, но и дает возможность проследить за изменениями состояния отдельных компонентов фотосинтетического аппарата, как входящих в состав комплексов, так и обладающих самостоятельной подвижностью в мембране тилакоида. Кроме того, в рамках модели могут быть проанализированы сопряженные процессы генерации трансмембранного электрического потенциала, потоки ионов через мембрану тилакоида, работа АТФ-синтазы [69]. В рамках такой модели с иной точки зрения можно рассмотреть процессы нефотохимического тушения флуоресценции, вызванного непосредственно действием электрохимического потенциала. Модель позволяет увидеть не только корреляцию кинетических изменений флуоресценции и $\Delta\mu\text{H}^+$, но рассмотреть все «промежуточные элементы регуляции», связанные с изменением состояний отдельных переносчиков ЭТЦ и, в конечном счете, приводящие к изменению концентраций состояний комплекса ФС 2, ответственных за флуоресценцию [6, 21, 22, 31, 69]

Стадии медленной фазы кинетики флуоресценции связаны с включением механизмов генерации электрохимического потенциала, влияющим на распределение электронов в фотосинтетической цепи

и таким образом определяющим интенсивность свечения. На временах порядка секунды и более регулирующее влияние на систему начинают оказывать многочисленные процессы, связанные с потреблением электрохимического потенциала, в первую очередь, поступление неорганического фосфата, необходимого для работы АТФ-синтазы, и интермедиаты, регулирующие работу цикла Кальвина и его сопряжение с акцепторной частью ФС 1. Для примера можно остановиться лишь на одном аспекте проблемы – характере разнообразия типов индукции медленной фазы флуоресценции у индивидуальных клеток фотосинтезирующих водорослей и изменении этого характера в ходе роста культуры *Scenedesmus quadricauda*. В процессе роста культуры одноклеточной водоросли зарегистрировано несколько характерных типов кривых индукции флуоресценции (в минутном диапазоне) для отдельных клеток. Одни имеют один крутой максимум и дальнейшее экспоненциальное падение уровня флуоресценции. Учитывая, что флуоресценция отражает потерю энергии, которая не была утилизирована в электронном транспорте, такие клетки (с низкой флуоресценцией) характеризуются активным фотосинтезом. В клетках, имеющих индукционные кривые с одним или двумя максимумами и высоким стационарным уровнем флуоресценции, фотосинтез неактивен (рис. 4). Распределение типов кривых индукции флуоресценции одноклеточных водорослей в процессе роста культуры меняется. На начальных этапах роста культуры наблюдается большое разнообразие индукционных кривых. Присутствуют клетки как с низким стационарным уровнем и простой релаксационной кинетикой (активный фотосинтез), так и с высоким стационарным уровнем и сложной кинетикой (неактивный фотосинтез). На стадии нелимитированного линейного роста большинство клеток обладают активным фотосинтезом. На этапе стационарного роста разнообразие паттернов

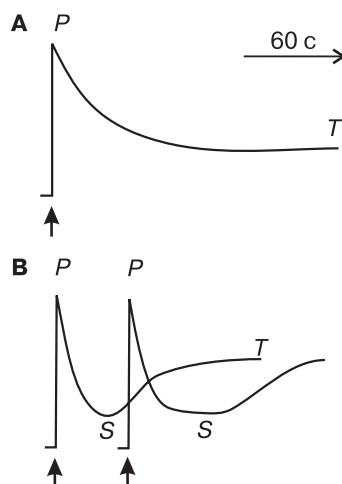


Рис. 4. Типы индукционных кривых индивидуальных клеток микроводорослей.

А – Клетки с активным фотосинтезом.

Б – Клетки с неактивным фотосинтезом.

Стрелки вверх – включение действующего света. P, S, T – общепринятые обозначения переходных фаз флуоресценции.

кинетики снова увеличивается. Появляется много клеток со сложной кинетикой индукции и высоким стационарным уровнем флуоресценции [66]. Анализ упрощенной математической модели, учитывающей связь процессов электронного транспорта с циклом Кальвина, показал, что активные клетки отличаются от неактивных большим коэффициентом сопряжения электронного транспорта с циклом фиксации углекислоты. Параметр сопряжения является управляющим и определяет тип индукционной кривой. Имеется область, в которой система является триггерной и обладает двумя устойчивыми стационарными состояниями, области влияния которых разделены сепаратрисой. В этом случае в зависимости от состояния системы (содержания АТФ) может осуществляться активный (малое начальное содержание АТФ) или неактивный тип фотосинтеза (большое начальное содержание АТФ). Результаты анализа обобщенной модели свидетельствуют о том, что основную роль в формировании типа индукционной кривой флуоресценции играют ионные потоки, определяющие степень сопряжения электронного транспорта и образования трансмембранного потенциала, служащего источником работы АТФ-синтазы, обеспечивающей цикл фиксации углерода необходимой энергией. Исследование детальной модели сопряжения первичных процессов с процессами фиксации CO_2 позволят подтвердить и уточнить это предположение. Очевидно, что конструктивным подходом к описанию фотосинтетических процессов является построение обобщенной модели процессов, а затем при описании конкретных особенностей отдельных составляющих процессов – детализация отдельного изучаемого процесса (при сохранении контуров основной «рамочной модели»). Это позволяет сохранить в поле зрения целостные свойства системы и уровни регуляции со стороны более полной системы.

Таким образом, экспериментальное исследование организации системы ППФ и идентификация соответствующих математических моделей позволили выявить в них несколько уровней организации и регуляции. На уровне разделения и первичной стабилизации зарядов процессы протекают в ПБК, молекулярная организация которых включает электронно-колебательные и электронно-конформационные взаимодействия и обеспечивает идеальные условия для переноса индивидуального электрона по «энергетической лестнице» и трансмембранного разделения зарядов. Мультиферментные ПБК сохраняют стабильность в широком диапазоне температуры, рН и других внешних условий и чувствительны лишь к «сильной» световой регуляции, вызывающей фотоиндуцируемые направленные конформационные переходы. На диффузионно-контролируемых стадиях

процессы чувствительны к рН, редокс условиям, другим внешним и внутриклеточным факторам, и контролируются физиологическим состоянием целого растения. Оптимальная работа фотосинтетического аппарата при хорошем сопряжении световых и темновых реакций приводит к релаксационным (бесколебательным) типам кривой индукции флуоресценции. Напротив, нарушение сопряжения сопровождается немонотонной кинетикой индукции флуоресценции с несколькими максимумами [28, 31, 66].

VI. МЕХАНИЗМЫ ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРОНОВ

В настоящем разделе мы рассмотрим более подробно физико-химические механизмы, лежащие в основе процессов переноса электрона в начальных стадиях фотосинтеза. В многокомпонентных макромолекулярных комплексах, содержащих РЦ, в основе высокоэффективного направленного транспорта электронов лежит туннелирование электрона, сопряженное с колебательными и конформационными изменениями в белковой матрице. РЦ фотосинтеза представляет собой фактически фотоактивный фермент, субстратом которого является свет. Поглощение кванта света реакционным центром запускает работу ЭТЦ фотосинтеза. Накопленный в последнее время экспериментальный материал показывает, что для РЦ остается корректным принцип сопряжения электронных переходов с конформационными перестройками в белке как в обычных ферментах. Увеличение прочности и числа водородных связей влияет на скорость релаксационных процессов в белках РЦ и сопряженного с ними переноса электронов из-за снижения внутримолекулярной подвижности белковой матрицы по выделенным колебательным степеням свободы и участия «неотрелаксированных» состояний переносчиков. Для изучения природы релаксационных процессов в высокоупорядоченном комплексе переносчиков используются воздействия, модифицирующие систему водородных связей (криопротекторы, изотопное замещение H_2O на D_2O , многоатомные спирты, апротонные растворители). Эти воздействия, делая водородные связи менее лабильными, замедляют релаксационные процессы, уменьшают подвижность и увеличивают жесткость макромолекул. Было показано, например, что в бактериальном РЦ эти воздействия замедляют восстановление бактериофеофитина. Изменение кинетики указывает, что перенос электрона на бактериофеофитин сопровождается молекулярной реакцией с участием внутрибелковых водородных связей. Появление в РЦ возбужденного пигмента изменяет зарядовое состояние в донорно-акцепторном комплексе по сравнению с исход-

ным. При этом изменяется баланс сил, определяющих равновесную конформацию системы, адаптированной к темноте. В ходе последующей релаксации с участием системы водородных связей и достигается новое равновесное состояние ион-радикальной пары, затем уже происходит перенос электрона на Q_A [33, 34].

Состояние водородных связей влияет на динамику фотоиндуцированных релаксационных процессов в системе. При модификации сетки водородных связей изотопным замещением D_2O на H_2O и добавлением многоатомных спиртов и апротонных растворителей, скорости разделения зарядов уменьшаются в 2–4 раза, при этом квантовая эффективность снижается на 10–12%. Таким образом, нарушение состояния водно-белкового окружения кофакторов, даже не затрагивающее взаимного расположения переносчиков электрона (расстояние, ориентация), приводят к существенному изменению скоростей и эффективности электронтранспортных реакций. Добавление глицерина и ДМСО увеличивает среднеточечный потенциал P/P^+ на 30 и 45 мВ из-за изменения физических свойств всего белкового комплекса РЦ вследствие изменений макроскопических диэлектрических параметров среды и нарушения микроскопической структуры ближайшего атомного окружения редокс-центров. Изменение ΔE может быть следствием изменения диэлектрической проницаемости (ϵ) растворителя, набухания белковой глобулы и изменения распределения зарядов вблизи РЦ [35]. Изотопное замещение $D_2O \rightarrow H_2O$, на величину потенциала не влияло, т.к. при таком воздействии ни ϵ среды, ни положение атомов в белковой матрице не изменяется. Однако дейтерирование, также как добавление ДМСО, уменьшали константу скоростей разделения зарядов и константу переноса электронов на хинон. Заряженные атомы или их группы в окружении электронных переносчиков активно реагируют на появление неравновесных состояний переносчиков электрона, участвуя в их сольватации. В нативных условиях процессы сольватации способствуют формированию оптимальных энергетических конфигураций для высокоэффективных прямых фотосинтетических реакций и препятствуют обратным. Нарушение энергетического соответствия между начальными и конечными состояниями приводит к нарушению прямых электронтранспортных реакций и снижению их эффективности. Полученные экспериментальные данные и теоретический анализ механизма отклика среды на возникновение неравновесных состояний переносчиков электронов позволили предложить энергетическую модель ППФ в РЦ *Rhodobacter sphaeroides* [26].

Динамика конформационных переходов способствует созданию выгодных конфигураций начальных и конечных состояний перенос-

чиков для прямого транспорта и препятствует обратному. Так, индуцированная при переносе электрона конформационная подвижность обеспечивает стабилизацию фотомобилизованного электрона на хинонных акцепторах Q_A и Q_B . Стабилизация электрона на вторичном хиноне Q_B также сопровождается конформационными изменениями, которые методом рентгеноструктурного анализа выявляются в «замороженных» до 77 К на свету кристаллах комплексов бактериальных РЦ [49, 64, 72]. Наиболее хорошо изучены РЦ пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, для которых известны кристаллическая структура, а также последовательность и скорость фотоиндуцированных реакций. После возбуждения РЦ за 3,5 пс происходит разделение зарядов и перенос электрона на молекулу бактериофеофитина, а затем за 200 пс к хинонному акцептору Q_A . В РЦ *R. sphaeroides* из трех гидрофобных белковых субъединиц (L, M, H) две (L и M), имеющие по пять α -спиралей, несут электронные переносчики. Субъединица H не несет переносчиков, имеет только одну α -спираль, наименее гидрофобна и прикрывает с цитоплазматической стороны область связывания хинонов Q_A и Q_B . Нами было показано, что удаление H-субъединицы влияет на динамические характеристики ПБК, изменяя параметры релаксационных процессов, сопровождающих фоторазделение зарядов в низкотемпературных экспериментах. Кинетика темнового восстановления фотоокисленного бактериохлорофилла в комплексах, замороженных до 100 К в темноте и на свету различается. В случае LM комплекса (без H-субъединицы) времена релаксации больше, чем для целого комплекса, а различия между образцами, замороженными на свету и в темноте, значительно более существенны. Особенности энергетического профиля указывают на существование локализованного состояния, отвечающего полной конформационной релаксации, которое отделено дополнительным барьером от множества состояний, по которым релаксирует система во временном диапазоне порядка 100 мс. Его заселение становится возможным при относительно высоких температурах в процессе адаптации образца к свету. Результаты показывают, что удаление из комплексов РЦ H-субъединицы, наиболее полярной и имеющей на межсубъединичной поверхности десятки молекул воды, оказывает влияние на скорость и глубину конформационного перехода в ПБК после фоторазделения зарядов. Ее удаление трансформирует окружение переносчиков, влияя и на структуру водородных связей РЦ, играющей важную роль в релаксационных процессах, обеспечивающих эффективное фоторазделение зарядов [65]. Вероятность участия поляризуемых боковых цепей белка и сети водородных связей РЦ в разделении и стабилизации зарядов обсуждается и

другими исследователями [55, 73]. В конечном итоге модификация структурно-динамического состояния РЦ приводит к изменениям температурных и световых эффектов в процессе рекомбинации зарядов между восстановленным первичным хинонным акцептором и фотоокисленным димером бактериохлорофилла [25].

Состояние воды в окружении мембран и белковых глобул может существенно изменять эффективность электронтранспортных реакций. Процесс гидратации биологических структур не сводится к последовательности заполнения тех или иных участков поверхности белков и мембран, а связан с глубокими изменениями их структурно-динамических и функциональных характеристик. Методами ^1H , ^{13}C и ^{31}P ЯМР-спектроскопии изучали динамику белкового компонента, полярных и неполярных участков фотосинтетических мембран пурпурных бактерий в условиях разной влажности. Особенно глубокие изменения структуры мембран (имеющих в ряде случаев нелинейную зависимость от влажности) происходят при внедрении воды в водородные связи внутри белков и между молекулами липидов, а также при появлении свободной воды с высокой диэлектрической постоянной. Показано, что появление свободной воды коррелирует с повышением эффективности электронного транспорта на участке цепи $Q_A \longrightarrow Q_B$ [1].

Экспериментальная модификация конформационного состояния макромолекул и мембранных комплексов была проведена нами также на хлоропластах высших растений. При ограничении конформационной подвижности мембранных структур мягкой фиксацией низкими концентрациями ГА (образующего меж- и внутримолекулярные сшивки при взаимодействии с аминокеттогруппами боковых цепей лизина и SH-группами белков), наблюдалось значительное подавление всех процессов, связанных с трансформацией энергии. Обращает на себя внимание тот факт, что фиксация низкими концентрациями ГА сказывается уже на начальных этапах ППФ, эффективности передачи поглощенной молекулами антенн световой энергии на РЦ, о чем можно судить по изменениям длительности компонентов флуоресценции, связанных с ФС 1 или ФС 2 [16]. При этом длительность флуоресценции ФС 1 при 10 мМ ГА возрастает сразу в два раза, дальнейшее увеличение жесткости мембраны уже не отражается на времени жизни флуоресценции. Время жизни флуоресценции ФС 2 при обработке нарастающими концентрациями ГА возрастает постепенно и достигает максимального значения при полной фиксации структуры тилакоида. Полученные результаты показывают, что эффективная передача энергии с ССК на РЦ связана с изменениями конформации (или подвижности) белковых матриц,

с которыми связаны молекулы пигментов. Подтверждением этого является температурная зависимость времени жизни флуоресценции. При понижении температуры до минус 60–70 °С, когда происходит резкое замедление или остановка конформационных движений макромолекулярных структур в водной фазе, время жизни флуоресценции хлорофилла возрастает в 2 раза и при дальнейшем понижении температуры оно практически не изменяется [16]. Обработка тилакоидов низкими концентрациями ГА не изменяет активности самих РЦ, упрятанных внутрь белковых глобул, и не влияет на перенос электронов от воды до железо-серных белков на донорной стороне ФС 1, скорость электронного транспорта при низких концентрациях даже увеличивается вследствие его разобщения. Наиболее чувствительными к самым низким концентрациям оказались процессы, связанные с функционированием сопрягающего комплекса (каталитическая часть которого локализована на внешней поверхности мембраны тилакоида) – фотофосфорилирование и Mg-зависимая H^+ -АТРаза. При этом еще сохраняется фотоиндуцированное поглощение протонов, медленный компонент замедленной флуоресценции и фотоиндуцированное тушение флуоресценции атебрина, которое рассматривают как показатель образования $\Delta\mu H^+$. Для их подавления необходимы большие концентрации ГА [16].

Поскольку сопрягающий комплекс в процессе функционирования изменяет конформацию под действием $\Delta\mu H^+$ можно было ожидать, что обработка тилакоидов в темноте и на свету (фиксация неэнергизованного и энергизованного состояния мембраны, соответственно) будет влиять различно. Действительно, оказалось, что при обработке хлоропластов на свету сильнее подавляются процессы, связанные с запасанием энергии. По сравнению с темновой фиксацией при фиксации на свету фотоиндуцированное тушение флуоресценции атебрина подавляется значительно меньше, а его релаксация после выключения света происходит гораздо быстрее. Скорость нарастания медленной фазы индукционной кривой и стационарный уровень замедленной флуоресценции у тилакоидов, фиксированных на свету, падает значительно больше, чем у фиксированных той же концентрацией ГА в темноте. Обработка хлоропластов на свету фиксирует световую конформацию сопрягающего комплекса с «открытым» состоянием протонного канала. Это увеличивает проводимость мембран для ионов, энергизованная мембрана не способна «удержать» $\Delta\mu H^+$ и разряжается нефункциональным путем [15].

Характерной особенностью организации сложных систем является существование двух или нескольких различных стационарных режимов функционирования составляющих ее подсистем, переходы

между которыми и составляют основу регуляции системы в целом. Наличие таких переходов было обнаружено при изменении условий «темнота – свет – темнота». При регистрации фотоиндуцированных редокс-превращений бактериохлорофилла в препаратах РЦ оказалось, что при замораживании на свету скорость восстановления пигмента после выключения действующего света существенно ниже, чем у замороженных в темноте. Был сделан вывод о фиксации низкой температурой световой или темновой конформации бактериальных РЦ. Результаты комплексных исследований конформационной подвижности ПБК с использованием спектральных методов, ЭПР и мессбауэровской спектроскопии, спиновых меток для препаратов в суспензиях, порошках и пленках при различной степени гидратации составили основу теоретических представлений о роли электронно-конформационных взаимодействий в первичных процессах фотосинтеза [12, 32]. Они нашли подтверждение в работах по математическому моделированию процессов в РЦ, в которых учитывали возможность двухэлектронного восстановления вторичного хинона, влияние зарядового состояния комплексов РЦ и конформационных перестроек ПБК на скорость обратного переноса электронов с хинонового акцептора на пигмент. Были проанализированы особенности механизма туннелирования и электронно-колебательных и электронно-конформационных взаимодействий на этом участке электронного транспорта. Установленное при идентификации математических моделей различие эффективных значений констант скоростей переноса электронов между отдельными компонентами РЦ на свету и в темноте (масштаб различий 1–2 порядка) подтвердило наличие разных конформационных состояний. Эти состояния, по-видимому, отличаются взаимным расположением активных групп донорных и акцепторных компонентов и, как следствие, реакционной способностью и кинетическими характеристиками [28, 69].

VII. «МЕДЛЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ»

Адаптация растений к длительно действующим факторам приводит к изменению определенных структур, эти адаптивные перестройки обусловлены работой генетического аппарата клетки. «Медленная» регуляция первичных процессов фотосинтеза к изменяющимся условиям среды связана с синтезом хлоропластных белков *de novo*. Адаптация целого растения направлена на поддержание эффективной работы ЭТЦ, оптимально сопряженной с фиксацией CO_2 и другими метаболическими процессами. Механизмы медленной «подстройки» связаны с изменением стехиометрии основных макромолекулярных

комплексов тилакоидов, обеспечивающих трансформацию энергии. С этой точки зрения большой интерес представляет изучение особенностей ЭТЦ у растений с разной активностью фиксации CO_2 , в том числе у жизнеспособных ядерных мутантов гороха с нарушениями в синтезе хлорофилла. Эти мутанты при 30–50%-ном содержании хлорофилла характеризуются 70%-ным уровнем фотосинтеза по сравнению с диким типом. Они отличаются от контроля распределением хлорофилла между основными ПБК. Так, у мутанта линии 42 (получен С.А.Гостимским), электрофорезом в ПААГ показано отсутствие полосы, содержащей ССК1. С комплексом ФС 2 у этого мутанта связано вдвое больше хлорофилла, чем у дикого типа, в то время как с ССК у мутанта связано не более 40%. «Стратегия» подстройки мембраны к высокой скорости фиксации CO_2 на единицу хлорофилла включает относительное увеличение в мембранах комплексов с РЦ фотосистем (в первую очередь ФС 2), переносчиков, обеспечивающих взаимосвязь ФС, а также количества сопрягающих комплексов [14, 58]. В проростках продуктивных растений, как правило, наблюдается перераспределение хлорофилла между ПБК в пользу увеличения числа комплексов с реакционными центрами, а потеря части антенны компенсируется тем, что подавляющая часть ФС 2 относится к ФС 2_{α} , локализованной в зоне стекинга мембран вместе с ССК, которая обеспечивает линейный электронный транспорт [41].

Известно, что формирование фотосинтетического аппарата зависит от интенсивности и спектрального состава света. Листья теневыносливых растений всегда имеют более высокое содержание хлорофилла и относительно больший размер светособирающей антенны. В регуляции синтеза ПБК, а также биогенеза самого хлоропласта участвуют регуляторные белки. Удобной моделью для изучения регуляторного действия света на свойства фотосинтетического аппарата является первый лист растений, питающийся в основном за счет запасов семени (миксотрофно), он может расти и развиваться при интенсивностях света ниже компенсационного пункта фотосинтеза. Так, используя первый лист ячменя, выращиваемого при светопотоках, меньших чем $1 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, удалось показать, что образование части пула ССК (ЛНСП) при очень низком потоке квантов специфически активируется фитохромом, который усиливает накопление хлорофилл *b*-связывающего белка. Снижение освещенности при выращивании растений от 12 до $0,3 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ приводило к уменьшению суммарного содержания хлорофилла в 10 раз на синем и только в 3 раза на красном свету. На синем свету, в отличие от красного, существенно сильнее падало поглощение CO_2 и квантовый выход фотосинтеза, а отношение хлорофиллов *a/b* повышалось до 4,4.

Световая эффективность нефотохимического и фотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (в расчете на поглощенный квант) при снижении потока смешанного или красного света не изменялась, тогда как и нефотохимическое тушение и накопление Q_A^- на поглощенный квант возрастало в листьях, выращиваемых на синем свете низкой интенсивности.

Поскольку рост растения обеспечивается синтезом белков, то во многом он определяется взаимодействием процессов фотосинтеза и азотного метаболизма. Азотный и углеродный метаболизм являются теми двумя основными конструктивными процессами, которые определяют продуктивность. Эти два локализованные в разных частях растения процесса взаимодействуют на уровне хлоропласта, поскольку для обеспечения работы как углеродного, так и азотного циклов требуются одни и те же восстановительные и энергетические эквиваленты, образующиеся в первичных процессах фотосинтеза [61]. Как правило фотосинтетическая активность положительно коррелирует с содержанием азота в листьях, главным образом потому, что без него нарушается синтез фотосинтетического аппарата. Одним из наиболее частых следствий отсутствия азота является изменение в количестве и активности ключевого фермента фотосинтеза – Рубиско, хотя это может быть не единственной причиной и не единственным механизмом контроля фотосинтетической активности со стороны азотного метаболизма. Изменение скорости и направленности темнового метаболизма обеспечивает структурные перестройки тилакоидных мембран. Так, например, у водорослей накопление углеводов служит сигналом к инактивации ФС 2. Один из механизмов метаболического контроля активности ФС 2 у водорослей связан с активацией хлоропластного дыхания [39, 40]. Отмечалась также светозависимая метаболическая репрессия синтеза белков фотосинтетического аппарата не востребуемыми ассимилятами [37].

В случае высших растений взаимосвязь углеводного и азотного метаболизма еще более сложная вследствие разной их организации не только во времени, но и в пространстве. Даже для хлоропластов, где весь фотосинтез и восстановление нитрита до азота органических соединений происходит в одном объеме с использованием одних и тех же энергетических и восстановительных эквивалентов, вопрос о механизмах регуляции остается открытым. Уже на ранних этапах голодания по азоту в листьях существенно снижается содержание восстановленных форм азота (в основном за счет небелкового азота), уменьшается сухая масса и площадь листьев. Содержание хлорофилла также снижено, но отсутствие изменений в отношении хлорофиллов *a* и *b* указывает на одинаковый с контролем характер распределения

хлорофилла между отдельными хлорофилл-содержащими комплексами. Однако отношение хлорофилл/белок изменяется во втором листе несущественно, так же как и скорость фиксации CO_2 на каждую единицу хлорофилла. Изучение функциональной организации тилакоидов этого листа показало, что нет различий по потенциальной активности линейной ЭТЦ. Однако оказалось, что одним из первых нарушений в организации тилакоида при недостатке азота является уменьшение числа сопрягающих комплексов, причем в большей степени за счет гранального компартмента. Полученные данные показали, что у растений пшеницы, по крайней мере на начальных этапах голодания по азоту, активируются процессы транспорта электронов на участке ФС 1 и циклическое фотофосфорилирование, что может частично компенсировать недостаток АТФ. Это является частью механизма адаптации, который позволяет хлоропластам *in situ* сохранять достаточно высокую скорость фиксации CO_2 на ранних этапах голодания [13, 18].

Для того чтобы определить, как потенциальные возможности хлоропластов реализуются в целом растении, необходимы исследования на неотделенных от растения листьях. Полученные результаты показывают, что самые первые нарушения при недостатке азота связаны с нарушениями процессов запасаания энергии. Различия в характеристиках флуоресценции в листьях контрольных и страдающих от недостатка азота растений наблюдаются только на начальных участках световых кривых и отсутствуют при интенсивностях света, насыщающих фотосинтез. Снижение фотосинтетической активности голодающих по азоту высших растений *in situ* является результатом уменьшения числа всех хлорофиллсодержащих комплексов на единицу поверхности и повышением сопротивления диффузии CO_2 к местам карбоксилирования (видимо, вследствие изменения структуры), а не изменением в механизмах первичных процессов фотосинтеза, как это наблюдается у микроводорослей.

Очень часто повреждение растений и водорослей в естественных условиях среды вызывается окислительным стрессом. Для фотосинтезирующих организмов в ряду первостепенных факторов, вызывающих такой стресс, особое место занимает видимый свет высокой интенсивности, который может вызывать фотоокислительный стресс, приводить к фотоингибированию и деструкции фотосинтетического аппарата. Для защиты от окислительных повреждений в антенном комплексе и самих РЦ имеется целый ряд механизмов. Кроме уже отмечавшегося ранее перехода части ССК от ФС 2 к ФС 1 (перераспределение энергии возбуждения между ФС) и фотоингибирования, может иметь место миграция энергии возбуждения от

ФС 2 к молекулам каротиноидов, которые способны диссипировать энергию возбужденного состояния в тепло. Последний процесс может усиливаться вследствие светоиндуцированного изменения состава каротиноидов, приводящего к накоплению дезэпоксицированных каротиноидов за счет эпоксицированных форм [59, 76]. Показано, что облучение диатомовых водорослей *Thalassiosira weissflogii* мощным видимым светом приводит к снижению фотохимической активности ФС 2 тем больше, чем больше длительность экспозиции на интенсивном свете. Способность к репарации также зависит от длительности облучения. Изменения активности ФС 2 после кратковременного облучения (до 15 мин.) обусловлены появлением избыточных значений градиента водородных ионов на мембранах тилакоидов, приводящих к тушению возбужденных состояний хлорофилла каротиноидами и перераспределению энергии возбуждения между ФС за счет фосфорилирования белков. После двух часов облучения восстановление активности было уже лишь частичным. Медленное восстановление, видимо, связано с ресинтезом поврежденных при фотоокислении белковых структур. Инкубирование клеток с дитиотреитолом, ингибитором дезэпоксидазы ксантофиллов, вызывало значительное уменьшение фотоиндуцированных изменений поглощения в максимумах поглощения дезэпоксицированных форм каротиноидов, частично обратимых после небольших доз облучения и необратимых после больших. Рост нефотохимического тушения и отсутствие восстановления показателей фотохимической активности после окончания облучения большими дозами указывает на значительный вклад ксантофиллового цикла в тушение избытка возбужденных состояний ФС 2 у диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii* [10].

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность первичных процессов фотосинтеза представляет собой целостную систему, характеризующуюся структурно-функциональной автономией и обладающую своими механизмами регуляции. В основе молекулярных механизмов ППФ лежат электронно-конформационные взаимодействия, обеспечивающие направленные изменения конфигурации переносчиков при приеме или отдаче электрона. Такого рода конформационные изменения регулируют эффективность превращения энергии в фотосинтезе. Резкие изменения условий среды или другие неблагоприятные воздействия могут привести к нарушениям сопряжения последовательных стадий переноса электрона, в результате чего может создаваться избыток электронов или энергии электронного возбуждения на отдельных

участках цепи. Это, в свою очередь, может привести к появлению активных форм кислорода (супероксид-радикал, синглетный кислород) и, как следствие, к окислительному повреждению мембраны. Различные изменения характера ППФ отражаются на спектральных свойствах (поглощение, флуоресценция пигментов) взаимодействующих переносчиков. Совокупность рассмотренных результатов показывает, что флуоресценция хлорофилла является обобщенным интегральным параметром, позволяющим судить об эффективности и динамике начальных стадий трансформации энергии.

Результаты фундаментальных исследований в этой области реально могут быть использованы в области прикладной биотехнологии и экологии, например, при разработке флуорометрических индикаторов физиологического состояния растений [24]. Так, предложенная биофизическая модель связи фотосинтеза фитопланктона с параметрами флуоресценции при разной подводной освещенности позволяет быстро оценить скорость фотосинтеза и рассчитать первичную продукцию фитопланктона в непрерывном режиме измерения. Этот метод оценки был успешно использован в разных районах морей и океанов, а также для внутренних пресных водоемов [3, 4, 48]. Проведенные нами исследования показали, что кора молодых побегов деревьев, содержащая достаточное количество хлоропластов, обладает оптическими свойствами, которые делают возможным измерение флуоресценции хлорофилла на ветках, при необходимости непосредственно на дереве. На этой основе был разработан метод определения физиологического состояния растений в наземных биоценозах по величине относительной флуоресценции (F_v/F_m) [8].

ЛИТЕРАТУРА

1. Аксенов С.И., Нокс П.П., Рубин А.Б. (1999) *Биофизика*, **44**, 442–447.
2. Алехина Н.Д., Кренделева Т.Е., Полесская О.Г. (1996) *Физиология растений*, **43**, 136–148.
3. Антал Т.К., Венедиктов П.С., Конев Ю.Н., Маторин Д.Н., Хаптер Р., Рубин А.Б. (1999) *Океанология*, **39**, 314–320.
4. Антал Т.К., Венедиктов П.С., Маторин Д.Н., Возняк Б., Рубин А.Б. (2001) *Океанология*, **41**, 860–869.
5. Антал Т.К., Кренделева Т.Е., Лауринавичене Т.В., Макарова В.В., Цыганков А.А., Сейберт М., Рубин А.Б. (2001) *Доклады Академии Наук*, **381**, 119–122.
6. Беляева Н.Е., Демин О.В., Лебедева Г.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. (2001) *Математика. Компьютер. Образование*, **8**, часть 2, М.–Ижевск: РХД, 564–572.
7. Бухов Н.Г., Дамиров Х.Г., Джибладзе Т.Г., Ризниченко Г.Ю., Карапетян Н.В., Рубин А.Б. (1988) *Научные доклады высшей школы. Биологические науки*, **4**, 28–37.
8. Венедиктов П.С., Волгин С.Л., Казимирко Ю.В., Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Макарова В.В., Лаврухина О.Г., Погосян С.И., Яковлева О.В., Рубин А.Б. (1999) *Биофизика*, **44**, 1037–1047.

9. Воробьева Т.Н., Кренделева Т.Е., Ризниченко Г.Ю., Шайтан К.В., Рубин А.Б. (1983) Молекулярная биология, **20**, 1203–1210.
10. Воронова Е.Н., Волкова Э.В., Казимирко Ю.В., Чивкунова О.Б., Мерзляк М.Н., Погосян С.И., Рубин А.Б. (2002) Физиология растений, **49**, 350–358.
11. Егорова Е.А., Бухов Н.Г., Кренделева Т.Е., Рубин А.Б. (2001) Доклады Академии Наук, **377**, 1–4.
12. Кононенко А.А., Нокс П.П., Чаморовский С.К., Рубин А.Б., Лихтенштейн Г.И., Крупянский Ю.Ф., Суздальев И.П., Гольданский В.И. (1986) Химическая физика, **5**, 795–803.
13. Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Макарова В.В., Лаврухина О.Г., Низовская Н.В. (2001) Физиология растений, **48**, 400–405.
14. Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Низовская Н.В. (1994) Физиология растений, **41**, 720–725.
15. Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Низовская Н.В., Тулбу Г.В. (1982) Биохимия, **47**, 904–910.
16. Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Низовская Н.В., Пащенко В.З., Тимофеев К.Н., Тулбу Г.В., Хитров Ю.А. (1977) Биохимия, **42**, 1965–1972.
17. Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Тимофеев К.Н., Иванов Б.Н., Рубин А.Б. (2001) Доклады Академии Наук, **379**, 694–697.
18. Кренделева Т.Е., Макарова В.В., Кукарских Г.П., Низовская Н.В., Лаврухина О.Г. (1996) Биохимия, **61**, 2158–2164.
19. Кренделева Т.Е., Плутахин Г.А., Кукарских Г.П. (1985) Биохимия, **50**, 941–948.
20. Кукушкин А.К., Тихонов А.Н. Лекции по биофизике фотосинтеза (1988) М.: МГУ, 320 с.
21. Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б., Демин О.В. (2000) Журнал физической химии, **74**, 1874–1883.
22. Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Демин О.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. (2002) Биофизика, **47**, 1044–1058.
23. Макарова В.В., Кукарских Г.П., Низовская Н.В., Лаврухина О.Г., Кренделева Т.Е. (1998) Биохимия, **63**, 1662–1667.
24. Маторин Д.Н., Венедиктов П.С., Конев Ю.Н., Казимирко Ю.В., Рубин А.Б. (1996) Доклады Академии Наук, **350**, 256–258.
25. Нокс П.П., Чурбанова И.Ю., Захарова Н.И., Красильников П.М., Лукашев Е.П., Рубин А.Б., Шайтан К.В. (2001) Биохимия, **66**, 114–118.
26. Пащенко В.З., Гришианова Н.П., Нокс П.П., Корватовский Б.Н., Рубин А.Б. (2002) Электрохимия, **38**, 103–112.
27. Ризниченко Г.Ю. (1991) Математические модели первичных процессов фотосинтеза. Итоги науки и техники, серия биофизика, **31**, М.: ВИНТИ, 160 с.
28. Ризниченко Г.Ю. Лекции по математическим моделям в биологии (2002) М.–Ижевск: Регулярная и хаотическая динамика, 232 с.
29. Ризниченко Г.Ю., Воробьева Т.Н., Храброва Е.Н., Рубин А.Б. (1986) Биофизика, **31**, 793–799.
30. Ризниченко Г.Ю., Воробьева Т.Н., Рубин А.Б. (1993) Молекулярная биология, **27**, 1230–1244.
31. Ризниченко Г.Ю., Лебедева Г.В., Демин О.В., Беляева Н.Е., Рубин А.Б. (2000) Биофизика, **45**, 452–460.
32. Рубин А.Б. Принципы организации и регуляции первичных процессов фотосинтеза Тимирязевские чтения LV (1995). Пушино ОНТИ ПНЦ РАН, 38 с.
33. Рубин А.Б. Биофизика, т. 1 (1999) М.: Книжный дом «Университет», 372–418.
34. Рубин А.Б. Биофизика, т. 2 (2000) М.: Книжный дом «Университет», 273–385.
35. Рубин А.Б. (2000) Соросовский журнал, **4**, 7–13.

35. Рубин А.Б., Кононенко А.А., Шайтан К.В., Пащенко В.З., Ризниченко Г.Ю. (1994) Биофизика, **39**, 213–235.
36. Рубин А.Б., Шинкарев В.П. Транспорт электронов биологических системах. (1984) М.: Наука, 319 с.
37. Семенов В.Е. (1982) Физиология фотосинтеза. М.: Наука, 164–187.
38. Сорокин Е.М. (1973) Физиология растений, **20**, 389–399.
39. Чемерис Ю.К., Венедиктов П.С., Рубин А.Б., (1996) Физиология растений, **43**, 833–841.
40. Чемерис Ю.К., Попова А.В., Арутюнян А.А., Венедиктов П.С. (1999) Физиология растений, **36**, 56–66.
41. Alauddin, M., Krendeleva, T.E., Nizovskaya, N.V., Rubin, A.B. (1985) Photosynthetica, **19**, 527–535.
42. Allen, J.F., Forsberg, J. (2001) TRENDS in Plant Sci., **6**, 317–326.
43. Bendall, D.S., Manasse, R.S. (1995) Biochim. Biophys. Acta, **1229**, 23–38.
44. Bennoun, P. (1999) FEBS Lett., **156**, 363–365.
45. Bukhov, N., Egorova, E., Krendeleva, T., Rubin, A., Weis, Ch., Heber, U. (2001) Photosynth. Res., **70**, 155–166.
46. Cleland, R.E., Bendall, D.S. (1992) Photosynth. Res., **34**, 409–418.
47. Dau, H. (1994) Photochem. Photobiol., **60**, 1–23.
48. Falkowski, P.G. (1992) Molecular Ecology of Phytoplankton Photosynthesis // Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea / Eds. Falkowski P.G., Woodhead A.D. / N.Y: Plenum Press, 47–67.
49. Fiorentini, C., Arancia, G., Caprioli, A., Falbo, V., Rugger, F.M., Donelli, G. (1988) Toxicon, **26**, 1047–1056.
50. Fulgosi, A., Vener, A.V., Alschmied, L., Herrmann, R.G., Andersson, B. (1998) EMBO J., **17**, 1577–1587.
51. Heimann, S., Schreiber, U. (1999) Plant Cell Physiol., **40**, 818–824.
52. Holzapfel, C., Bauer, R. (1975) Z. Naturforsch., **30**, 489–498.
53. Hope, A.B. (1993) Biochim. Biophys. Acta, **1143**, 1–22.
54. Hosler, J.P., Yocum, C.F. (1985) Biochim. Biophys. Acta, **808**, 21–31.
55. de-Huijbregts, C., Cappon, J.J., Boender, G.P., Raap, J., Gast, P., Hoff, A.J., Lugtenburg, J., de Groot, H.J.M. (1998) Photosynthesis: Mechanisms and Effect, **2**. /Ed. Garab, G./ Amsterdam: Kluwer Acad. Publ., 759–762.
56. Ivanov, B.N., Kobayashi, Y., Bukhov, N.G., Heber, U. (1998) Photosynth. Res., **57**, 61–70.
57. Krause, G.H., Weis, E. (1991) Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **42**, 313–349.
58. Krendeleva, T.E., Kukarskikh, G.P., Nizovskaya N.V., Rubin, A.B. (1996) Physiol. Plant., **96**, 439–445.
59. Lokstein, H., Hartel, H., Hoffmann, P., Woiitke, P., Renger, G. (1994) J. Photochem. Photobiol. (B): Biol., **26**, 175–184.
60. Malik, M., Riznichenko, G.Yu., Rubin, A.B. (1990) Biological electron transport processes. Their mathematical modeling and computer simulation. Praha–London: Akademia. 176 p.
61. Malkin, R., Niyogi, K., (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. / Eds. Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. / Rockville, Maryland: American Society of Plant Physiologists, 568–628.
62. Malkin, S. (1971) Biochim. Biophys. Acta, **234**, 425–427.
63. Moss, D.A., Bendall, D.S. (1984) Biochim. Biophys. Acta, **767**, 389–395.
64. Oswald, E.M., Sugai, A., Labigne, A., Wu, A.c., Fiorentini, C., Boquet, P., O'Brien, A.D. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 3814–3818.
65. Paschenko, V.Z., Gorokhov, V.V., Grishanova, N.P., Korvatovsky, B.N., Knox, P.P., Zakharova, N.I., Rubin, A.B. (1998) Biochim. Biophys. Acta, **1364**, 361–372.
66. Pogosyan, S.I., Sivchenko, M.A., Maximov, V.N., Ostrowska, M. (1997) Oceanologia, **39**, 163–175.

67. *Riznichenko, G.Yu., Chrabrova, E.N., Rubin, A.B.* (1988) *Studia biophysica*, **126**, 51–59.
68. *Riznichenko, G.Yu., Vorobjova, T.N., Chrabrova, E.N., Rubin, A.B.* (1990) *Photosynthetica*, **24**, 37–51.
69. *Riznichenko, G.Yu., Rubin, A.B.* (2003) *Comments on Theoretical Biol.*, in press.
70. *Scheller, H.V.* (1996) *Plant Physiol.*, **110**, 187–194.
71. *Shinkarev, V.P.* (1998) *Photochem. Photobiol.*, **61**, 32–42.
72. *Stowell, M.H.B., McPhillips, T.M., Rees, D.C., Soltis, S.M., Abresch, E., Feher, G.* (1997) *Science*, **276**, 812–816.
73. *Turzo, K., Laczko, G., Filus, Z., Maroti, P.* (1998) *Photosynthesis: Mechanisms and Effect*, **2** / Ed. Garab, G. / Amsterdam: Kluwer Acad. Publ., 837–840.
74. *Vener, A.V., Ohad, L., Andersson, B.* (1998) *Current Opinion in Plant Biol.*, **1**, 217–223.
75. *Wykoff, D.D., Davies, J.P., Melis, A., Grossman, A.* (1998) *Plant Physiol.*, **117**, 129–139.
76. *Young, A.J., Frank, H.A.* (1996) *J. Photochem. Photobiol. (B): Biol.*, **36**, 3–15.