

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт фундаментальных проблем биологии
Российской академии наук

В. Г. Ладыгин

**ПУТИ БИОСИНТЕЗА, ЛОКАЛИЗАЦИЯ,
МЕТАБОЛИЗМ И ФУНКЦИИ
КАРОТИНОИДОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ
РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ВОДОРОСЛЕЙ**

Пушино, 2014

УДК 575.24 : 577.124 : 581.174.1

ББК

Ладыгин В.Г. Пути биосинтеза, локализация, метаболизм и функции каротиноидов в хлоропластах различных видов водорослей / Вопросы современной альгологии. 2015. 87 с. www.algology.ru.

ISBN

Рассмотрены современные представления о биосинтезе каротиноидов эукариот, как общие для высших растений и зеленых водорослей, так и специфические характерные для различных систематических групп водорослей. Описаны все гены и ферменты, участвующие на каждом этапе процесса биосинтеза каротиноидов, а также локализация мультиферментных комплексов в мембранах хлоропластов. Детально обсуждаются метаболизм и основные функции наиболее важных ксантофиллов: 1 – светособирающая, 2 – структурная и 3 – фотозащитная. Особое внимание уделено описанию механизмов фотозащиты, в том числе с участием специфических каротиноидов: 1 – виолаксантинового, 2 – лютеин-5,6-эпоксидного и 3 – диадиноксантинового циклов. Первый из них является характерным для большинства эукариот, а второй и третий встречаются только у отдельных групп водорослей. Рассмотрено участие каротиноидов в фототаксисе одноклеточных зеленых водорослей. Показано, что их светочувствительная органелла – глазное пятно содержит каротины. Причем, с помощью мутантов хламидомонады впервые удалось доказать возможность изменения состава каротинов в глобулах глазного пятна путем мутагенеза.

Ways of biosynthesis, localization, metabolism and functions of carotenoids in chloroplasts of different types of algae

Ladygin V.G.

It has been considered current ideas on biosynthesis of eukaryotes' carotenoids both general for higher plants and green algae, and specifically distinctive for different systematic groups of algae. It has been described all genes and enzymes participating at every stage of carotenoids' biosynthesis, as well as localization of multi-enzyme complexes in chloroplasts' membranes. Metabolism and main functions of the most important xanthophylls are being discussed in detail: 1 – light-harvesting, 2 – structural, and 3 – photoprotective. A special attention is paid to description of the mechanisms of photoprotection, including that ones with participation of specific carotenoids: 1 – violaxanthin, 2 – lutein-5,6-epoxide and 3 – diadinoxanthin cycles. The first one from them is typical for the most eukaryotes, and the second and the third one are met only in separate groups of the algae. It has been considered participation of carotenoids in phototaxis of unicellular green algae. It has been shown that their light-sensitive organella, the eyespot, contains carotenes. Moreover, with the help of *Chlamydomonas reinhardtii* mutants we managed to prove first possible changes of carotenes' composition in the globules of the eyespot by mutagenesis.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ И ПУТИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ.....	4
ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О КАРОТИНОИДАХ.....	4
БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОВ.....	7
1. Два пути биосинтеза изопентенилдифосфата.....	7
2. Формирование моно-, сескви- и дитерпенов.....	10
3. Синтез фитоиона.....	12
4. Дегидрирование фитоиона до ликопина.....	12
5. Циклизация каротинов.....	17
БИОСИНТЕЗ КСАНТОФИЛЛОВ.....	19
ЛОКАЛИЗАЦИЯ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ.....	28
ГЛАВА II. МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КАРОТИНОИДОВ.....	30
ХАРАКТЕРИСТИКА КАРОТИНОИДОВ ЭУКАРИОТ.....	31
ЛОКАЛИЗАЦИЯ НАИБОЛЕЕ ВАЖНЫХ КСАНТОФИЛЛОВ.....	34
ФУНКЦИИ КАРОТИНОИДОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ.....	38
1. Светособирающая функция каротиноидов.....	38
2. Фотозащитная функция каротиноидов.....	39
3. Структурная функция каротиноидов и их локализация.....	45
КСАНТОФИЛЛОВЫЕ ЦИКЛЫ.....	48
1. Виолаксантиновый цикл.....	48
2. Лютеин-5,6-эпоксидный цикл.....	50
3. Диадиноксантиновый цикл.....	58
УЧАСТИЕ КАРОТИНОИДОВ В ФОТОТАКСИСЕ.....	60
1. Формирование ультраструктуры глазного пятна.....	62
2. Состав каротиноидов в глобулах глазного пятна.....	66
3. Изменение состава каротинов глазного пятна путем мутагенеза.....	67
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	71
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	73

ВВЕДЕНИЕ

Из всех классов природных пигментов каротиноиды наиболее широко распространены в природе и, несомненно, принадлежат к числу очень важных соединений. Они обнаружены у всех представителей растительного царства как в фотосинтезирующих, так и в нефотосинтезирующих тканях. Эти пигменты часто встречаются у бактерий, грибов и в клетках многих животных, обуславливая их окраску, особенно птиц, рыб, ракообразных и насекомых. Каротиноиды и их производные имеют большое значение как для растений, участвуя в организации и функционировании фотосинтетических мембран, так и для животных, являясь основой зрительных пигментов, ответственных за восприятие света и различение цветов. Они (особенно β -каротин) – ценный биотехнологический продукт, используемый в медицине, сельском хозяйстве, а также в пищевой, косметической и парфюмерной промышленности в качестве физиологически активных соединений, природных красителей и источника витаминов.

Сейчас известно огромное разнообразие каротиноидов. Так, β -каротин содержится у бактерий, грибов и всех фотосинтезирующих организмов (Карнаухов, 1988, 2000), в то время как α -каротин и производные от него ксантофиллы синтезируются только в хлоропластах водорослей и высших растений, имеющих две фотосистемы (Young, Britton, 1989; Emenhiser et al., 1996). Поэтому возникает большой интерес как к процессу биосинтеза этих соединений и генетическому контролю отдельных его этапов, так и к специфике их локализации и возможной функциональной роли в фотосинтетических мембранах. До сих пор таких сведений очень мало (Young, Britton, 1989; Britton, 1998). В этой работе мы рассмотрим пути биосинтеза различных каротиноидов хлоропластов и участие в этом процессе ферментов, контролируемых различными генами.

Благодаря использованию в качестве объектов мутантов бактерий, грибов, водорослей и высших растений: ячменя, табака, томатов и перца, некоторые этапы биосинтеза каротиноидов уже достаточно хорошо изучены (Davies, 1975; Bishop, 1992; Sandmann, 1993). Однако из-за огромного разнообразия и специфического состава каротиноидов у различных организмов (Bilger et al., 1995; Hartel et al., 1996; Ладыгин, Ширикова, 1993, 1999) остается еще множество вопросов по выяснению промежуточных продуктов, составу и функциональной роли каротинов и ксантофиллов (Young, 1993; Goodwin, 1993; Маслова и др., 1996). Цель работы состояла в том, чтобы на основании обобщения собственных и литературных данных последних лет представить общую схему и специфические особенности биосинтеза каротиноидов в пластидах эукариот, уделив особое внимание наименее изученным ранним и заключительным этапам цепи биосинтеза каротинов и ксантофиллов с характеристикой ферментов и генов, установленных для хлоропластов водорослей и высших растений.

Мы надеемся, что понимание процессов биосинтеза каротиноидов и пространственной локализации ферментов будет способствовать дальнейшему выяснению их роли в организации и функционировании фотосинтетических мембран хлоропластов и решению важнейших задач биотехнологии.

I. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ И ПУТИ БИОСИНТЕЗА КАРОТИНОИДОВ

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О КАРОТИНОИДАХ

Каротиноиды – широко распространенный класс структурно и функционально различающихся природных пигментов, обычно имеющих желтую, оранжевую и красную окраску. Они синтезируются у дрожжей, грибов и во всех фотосинтезирующих организмах, начиная от бактерий и микроводорослей до высших растений (Annstrong, 1994; Liaaen-Jensen, 1998). В отличие от прокариот у эукариот с оксигенным фотосинтезом они накапливаются в пластидах водорослей и различных тканей высших растений: корнях,

стеблях, листьях, плодах, лепестках и пыльце цветков. И хотя в специфических органах накапливаются различные каротиноиды, основные этапы их биосинтеза осуществляются по предложенным здесь схемам до характерных для их пластид конечных продуктов (Britton, 1995b). Сейчас уже известно более 600 структурно различающихся каротиноидов (Straub, 1987; Kull, Pfander, 1995). В совокупности все прокариотные и эукариотные организмы синтезируют ежегодно более 110 млн. т этих пигментов (Klaui, 1982; Olson, Krinsky, 1995). Они являются биотехнологически ценным продуктом и имеют физиологически важное значение для структуры и функции клеток (Pfander, Bilger, 1994; Маслова и др., 1996; Карнаухов, 2000). В последние годы исследования каротиноидов активизировались в связи с новыми данными об антиоксидантной активности каротинов и ксантофиллов (Miller et al., 1996; Niyogi et al., 1997), участии ксантофиллов виолаксантинового цикла в формировании и функционировании светособирающего пигмент-белкового комплекса фотосистемы II (Demmig-Adams et al., 1996; Montane et al., 1998; Saccardy et al., 1998), а также о возможной локализации виолаксантинового цикла вблизи фотосистемы I (Корнюшенко и др., 1977; Ладыгин, Ширикова, 1987; Hager, Holocher, 1994).

Почти все каротиноиды имеют терпеноидное строение. Углеродный скелет их построен из восьми C_5 -изопреновых единиц изопентенилдифосфата, поэтому C_{40} -фитоин и производные от него каротиноиды называют C_{40} -изопреноидами, или тетратерпеноидами (Сапожников, 1967; Weedon, Moss, 1995).

По химическому строению все известные каротиноиды можно разделить на соединения с открытой цепью – *ациклические*, и соединения, содержащие на одном или обоих концах молекулы циклогексановые (иононовые) или циклопентановые кольца, – *циклические*. К соединениям с открытой цепью относятся: ζ -каротин, нейроспорин, ликопин (рис. 1, *a*) и многие ациклические ксантофиллы бактерий и грибов (Armstrong, 1994; Liaaen-Jensen, 1998). К моноциклическим каротиноидам относятся 7',8',11',12'-тетрагидро- γ -каротин, α - и β -зеакаротины, δ - и γ -каротины и их производные (Czygan, 1982; Armstrong, Hearst, 1996). В то же время α -, β - и ϵ -каротины содержат в своей молекуле два иононовых кольца и дают начало производным от них ксантофиллам с двумя циклами, в частности всем ксантофиллам водорослей и высших растений (Sandman, 1994; Liaaen-Jensen, 1998).

Как ациклические, так и циклические каротиноиды, молекулы которых имеют чисто углеводородное строение (например, $C_{40}H_{56}$ – ликопин, α -, ϵ - и β -каротин), называются каротинами (Siefertmann-Harms, 1987; Yamamoto, Bassi, 1996). Все кислородсодержащие каротиноиды (например, $C_{40}H_{56}O_2$ – зеаксантин, лютеин, лактукаксантин) называются ксантофиллами. Атомы кислорода могут входить в состав молекул ксантофиллов в виде гидроксильной, карбонильной, кето-(оксо-), эпоксидной и других групп и выполнять в них различную функцию (Сапожников, 1967; Miller et al., 1996; Yamamoto, Bassi, 1996; Saccardy et al., 1998). В структуре молекулы каротиноида можно легко различить центральное звено и концевые группы (рис. 1, *a*). Центральное звено – цепь конъюгированных двойных связей – называется хромофором. Концевые группы бывают ациклические, как у ликопина, и циклические, как у α -каротина (с β - и ϵ -циклогексановыми кольцами) или капсорубина (с двумя циклопентановыми кольцами). Хромофор молекул каротиноидов обычно состоит из $18 + 4 = 22$ углеродных атомов, а концевые группы в подавляющем большинстве содержат по $6 + 3 = 9$ атомов углерода (Goodwin, 1993).

Нумерация атомов углерода начинается от концевых групп к центру молекулы (рис. 1, *a*) (Britton, 1995b, 1998). Сейчас известно более 50 видов концевых групп, в том числе 7 типов C_9 -концевых групп (рис. 1, *b*) для пластид водорослей и высших растений – ациклическая ψ , характерная для ликопина, и 6 типов циклических: β , ϵ , γ , κ , ϕ , χ (Britton, 1995b, 1998). Следует также отметить специфические концевые группы (рис. 1, *в*): *алленовую*, характерную для неоксантина и фукоксантина, имеющую две ненасыщенные двойные связи у 7-го атома углерода (рис. 1, *в*, 3), и *ацетиленовую* – с тройной связью между 7-м и 8-м атомами углерода (рис. 1, *в*, 4), установленную для аллоксантина и диатоксантина водорослей (Britton, 1998; Liaaen-Jensen, 1998). Алленовые и ацетиленовые концевые

группы, так же, как и циклопентановые кольца (рис. 1, в, 2), образуются из циклогексановых колец эпоксикаротиноидов (рис. 1, в, 1) антраксантина и виолаксантина (Britton, 1998; Cunningham, Gantt, 1998, 2001). У растений каротиноиды образуются как с несимметричными (α -каротин, капсантин), так и с симметричными (β - и ϵ -каротины, капсорубин) концевыми группами (Britton, 1995b, Albrecht et al., 1996; Ronen et al., 1999).

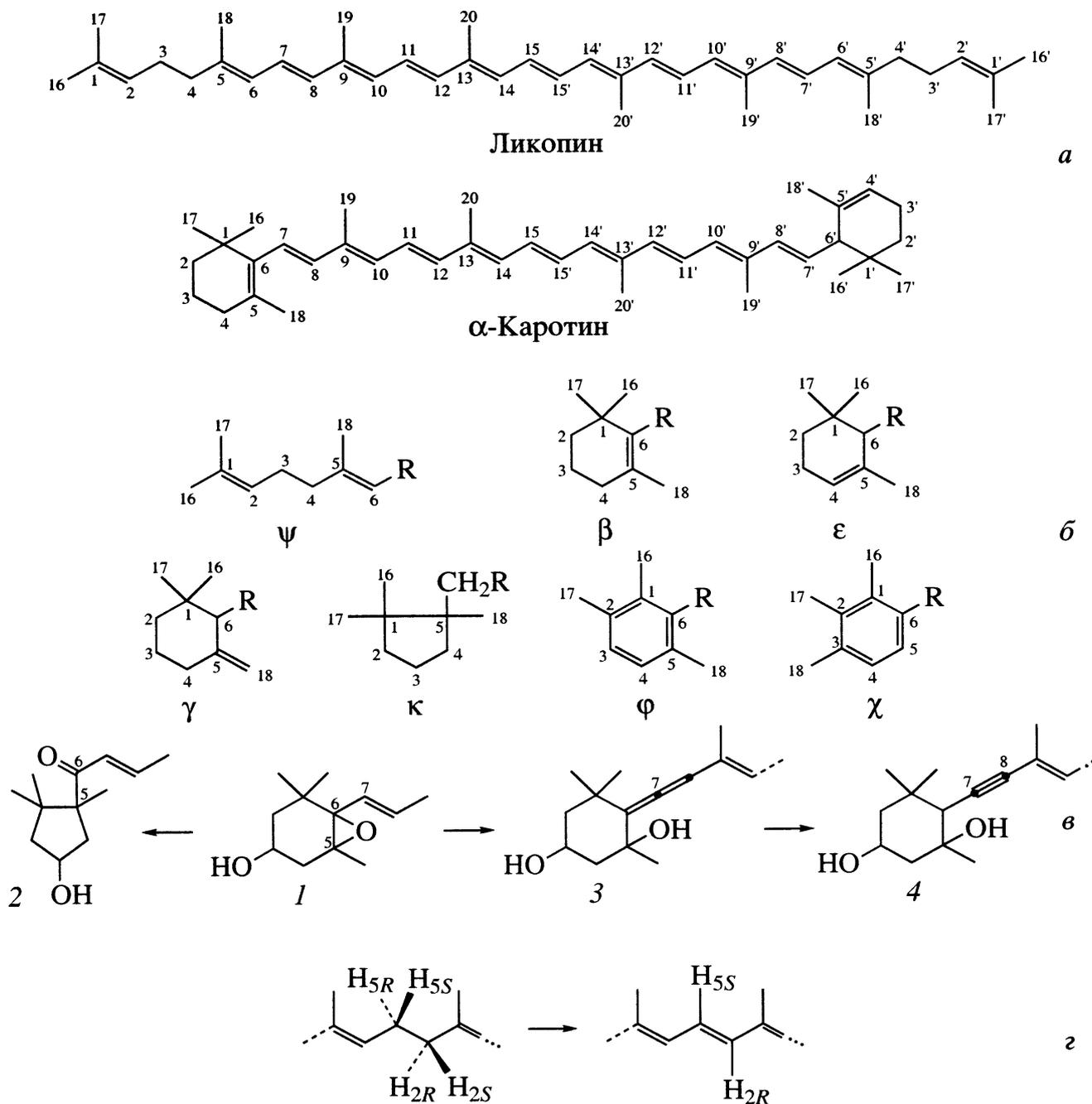


Рис. 1. а – нумерация атомов углерода в молекулах ациклических (ликопин) и циклических (α -каротин) каротиноидов; б – основные концевые группы: ациклическая ψ , характерная для ликопина, и циклические: β , ϵ , γ , κ , ϕ и χ ; в – трансформация циклогексанового кольца эпоксикаротиноидов (1) в циклопентановое кольцо (2) и специфические концевые группы: алленовую (3) и ацетиленовую (4); г – механизм образования конъюгированной двойной связи хромофора каротиноидов путем *trans*-элиминации 2-*pro-S*-5-*pro-R* атомов водорода. Сплошной линией показаны *pro-S*, а пунктирной линией *pro-R* – водородные связи.

Наличие сопряженных двойных связей в цепи полиенового хромофора определяет спектры поглощения каждого из каротиноидов (Mimuro et al., 1992). Те из них, которые имеют $7 + 4 = 11$ и более ненасыщенных двойных связей, начиная от ζ -каротина, нейроспорина и ликопина, а также все циклические каротины и ксантофиллы, имеют максимумы поглощения в видимой области спектра при 350–550 нм (Britton, 1995a). Более ранние предшественники до фитоина ($3 + 6 = 9$) и фитофлуина ($5 + 5 = 10$) бесцветны и поглощают свет в ближней ультрафиолетовой части спектра при 250–380 нм (Mimuro et al., 1992; Britton, 1995a).

Существенную роль в биохимии каротиноидов играет их изомеризация. В природе, как правило, каротиноиды находятся в *транс*-форме. Но при определенных условиях (яркий свет, высокая температура, pH и др.) они могут формироваться в виде как *цис*-, так и *транс*-изомеров. Фитоин и фитофлуин являются естественными предшественниками всех каротиноидов.

У бактерий и грибов они присутствуют только в *транс*-, а у водорослей и высших растений – в *цис*-конфигурации. Факт *цис*-, *транс*-изомерии имеет огромное значение как в биосинтезе, так и в функционировании каротиноидов (Сапожников, 1967; Britton, 1998). В растворах соотношение изомеров может существенно изменяться. Так, при кипячении в бензоле или гексане в растворе быстро образуется смесь изомеров. Этот эффект усиливается при освещении, причем наибольшая *цис-транс*-изомеризация наблюдается при освещении светом с длиной волны, совпадающей с полосой основного максимума поглощения пигмента. Добавление 1% йода на свету усиливает этот процесс, так как он является фотосенсибилизатором. Как правило, *транс*-изомер более стабилен, имеет более высокие точку плавления и оптическую плотность, максимум поглощения его сдвинут в длинноволновую сторону по сравнению с максимумом поглощения *цис*-изомера (Сапожников, 1967; Mimuro et al., 1992; Britton, 1995a).

БИОСИНТЕЗ КАРОТИНОВ

Синтез каротиноидов является сложным биологическим процессом. Он осуществляется в клетках бактерий, грибов, водорослей и высших растений и протекает с участием различных энзиматических систем, контролируемых многими генами (Boudreau et al., 1994; Scolnik, Giuliano, 1996; Ronen et al., 1999; Cunningham, Gantt, 1998, 2001). Весь процесс биосинтеза условно можно разделить на несколько наиболее важных этапов (рис. 2): 1 – ранние этапы биосинтеза C_5 -изопреновых единиц изопентенилдифосфата; 2 – формирование моно- (C_{10}), сескви- (C_{15}) и дитерпенов (C_{20}); 3 – синтез тетратерпена – фитоина (C_{40}); 4 – дегидрирование (десатурация) фитоина до фитофлуина, ζ -каротина, нейроспорина и ликопина; 5 – циклизация и образование α -, β - и ϵ -каротинов; 6 – гидроксилирование, оксигенирование и эпоксилирование каротинов и формирование циклических ксантофиллов пластид водорослей и высших растений.

Традиционно в научной литературе и в этой статье мы использовали тривиальные названия каротиноидов, данные им в процессе первой идентификации, и описания, как правило, с учетом объекта, из которого они впервые выделены. Они удобнее и менее громоздки, хотя и не отражают их химическую структуру. Химическую номенклатуру IUPAC (Klaui, 1982; Weddon, Moss, 1995) мы использовали там, где было необходимо показать различия в химической структуре и формировании концевых групп.

1. Два пути биосинтеза изопентенилдифосфата

Долгое время считали, что ацетат и мевалоновая кислота являются единственными предшественниками в биосинтезе всех изопреноидов, в том числе и каротиноидов (Goodwin, 1993; Пасешниченко, 1998). Однако недавно получены принципиально новые данные, предполагающие возможность существования двух альтернативных путей биосинтеза

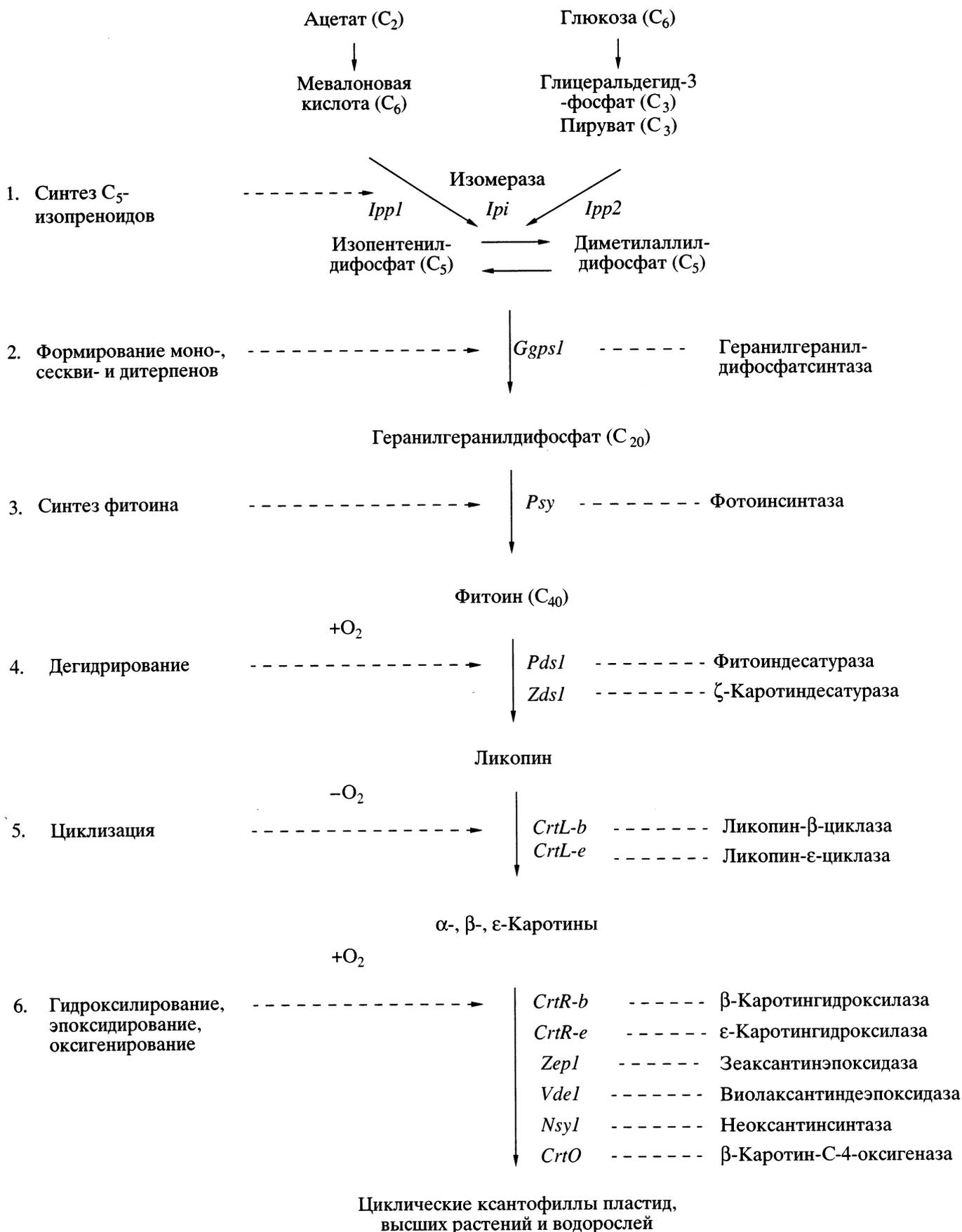


Рис. 2. Общая схема цепи биосинтеза каротиноидов в хлоропластах эукариот.

ключевых C₅-изопреноидов (Rohmer et al., 1993; Lichtenthaler et al., 1997; Rohmer, 1999). Такими ключевыми C₅-соединениями в биосинтезе всех терпеноидов, в том числе и каротиноидов, являются изопентенилдифосфат и диметилаллилдифосфат (рис. 3).

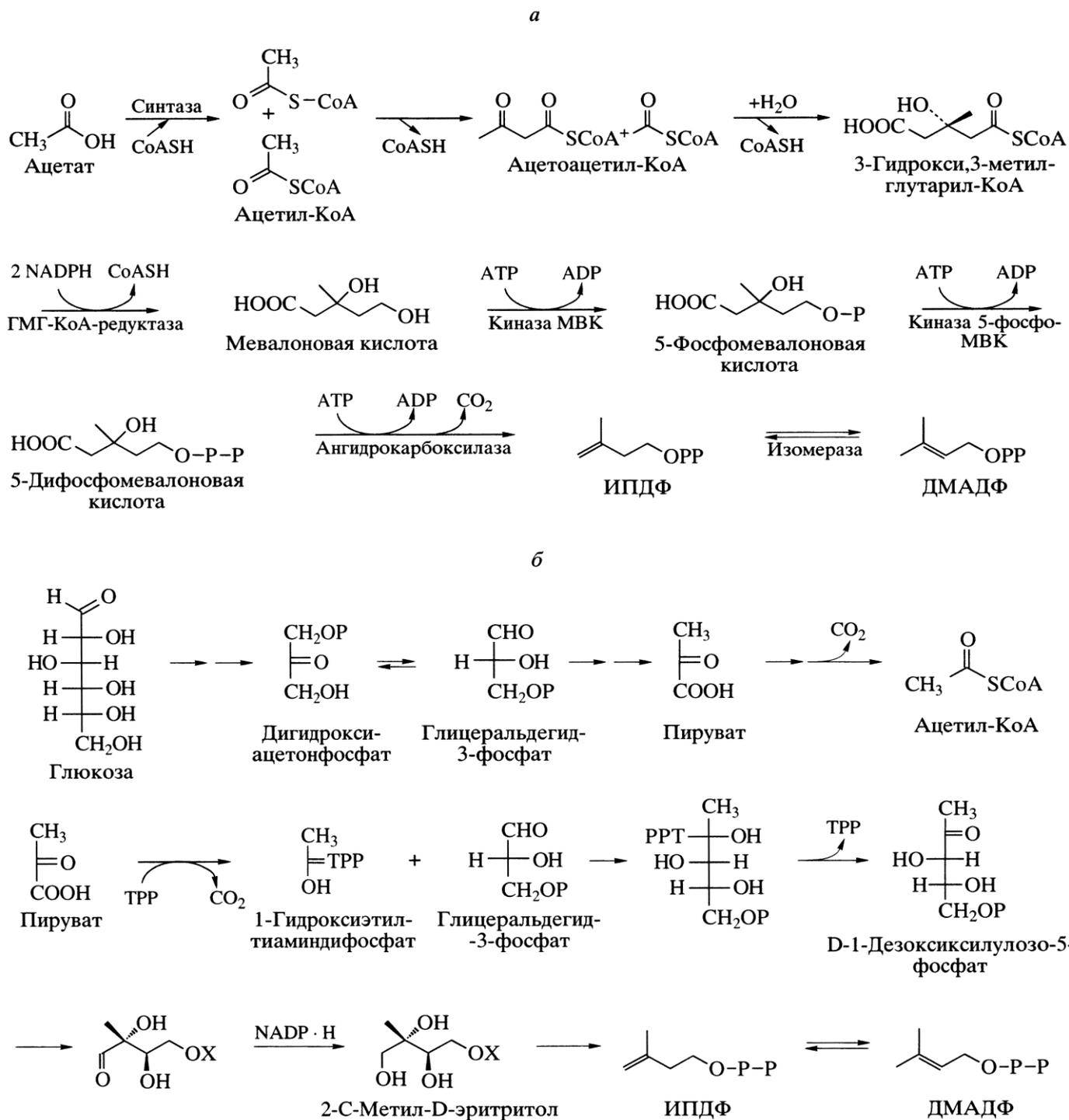


Рис. 3. Два пути биосинтеза C₅-изопреноидов: *a* – ацетатно-мевалонатный путь биосинтеза изопентенилдифосфата (ИПДФ) и диметилаллилдифосфата (ДМАДФ) из ацетата через стадию формирования мевалоновой кислоты (Porter, 1969; Britton, 1998); *б* – глицеральдегидфосфат-пируватный путь биосинтеза ИПДФ и ДМАДФ из глюкозы путем ее гликолиза и конденсации продукта декарбоксилирования пирувата – 1-гидроксиэтилтиаминдифосфата (C₂) и глицеральдегид-3-фосфата (C₃) (Rohmer, 1999).

Предполагается, что эти вещества в клетках высших растений могут синтезироваться как в цитоплазме из ацетата (ацетатно-мевалонатный путь) (рис. 3, а) и использоваться при формировании стеролов (Сапожников, 1967; Porter, 1969; Britton, 1998), так и в хлоропластах из глюкозы (глицеральдегид-3-фосфат-пируватный путь) (рис. 3, б), являясь предшественниками каротиноидов (Rohmer et al., 1993; Lichtenthaler et al., 1997; Пасешниченко, 1998).

При исследовании культуры клеток высших растений было установлено, что мевалонатный (ацетатный, цитозольный) и немевалонатный (глюкозный, пластидный) пути биосинтеза изопентенилдифосфата, по-видимому, не связаны друг с другом (Lichtenthaler et al., 1997). Наличие такой возможности подтверждает получение мутантов табака, дефицитных по тиамину. У них был блокирован биосинтез каротиноидов и хлорофилла, но не стеролов и жирных кислот (Пасешниченко, 1998). Объясняется это тем, что тиамин является кофактором реакции декарбоксилирования пирувата (рис. 3, б) и не затрагивает ацетатно-мевалонатный путь синтеза изопентенилдифосфата и стеринов в цитоплазме растений (Britton, 1998; Rohmer, 1999).

Следует особо отметить, что для *Scenedesmus*, выращенной в гетеротрофной культуре на среде с глюкозой, было показано образование триозофосфата и пирувата в процессе расщепления глюкозы как по гликолитическому пути в цитоплазме, так и по окислительному пентозофосфатному пути (Пасешниченко, 1998), что облегчает их использование при биосинтезе каротиноидов внутри хлоропластов. Эти данные хорошо согласуются с тем, что у высших растений биосинтез изопентенилдифосфата из глюкозы (т.е. из фотосинтетически усвоенной CO_2) может осуществляться только в хлоропластах (рис. 3, б) (Lichtenthaler et al., 1997; Rohmer, 1999).

Однако есть данные, указывающие на то, что изопентенилдифосфат может легко транспортироваться из цитоплазмы в хлоропласт (цит. по: Пасешниченко, 1998). На основании этих данных нельзя полностью исключить того, что, например, у мутантов биосинтез каротиноидов пластид может осуществляться и в отсутствие фотосинтеза и глюкозы за счет изопентенилдифосфата ацетатно-мевалонатного пути, как это имеет место при биосинтезе каротиноидов в клетках бактерий и грибов (Britton, 1998). Для проверки такой возможности биосинтеза в хлоропластах особый интерес представляли бы исследования нефотосинтезирующих мутантов водорослей, использующих в качестве единственного источника углерода либо ацетат, как, например, *Chlamydomonas reinhardtii* (Ладыгин, 1970), либо глюкозу, как *Chlorella* или *Scenedesmus obliquus* (Пасешниченко, 1998; Rohmer, 1999).

2. Формирование моно-, сескви- и дитерпенов

Начиная от изопентенилдифосфата и до образования моно- (C_{10}), сескви- (C_{15}) и дитерпенов (C_{20}) цепь биосинтеза всех изопреноидов осуществляется по единой схеме, независимо от того, где это соединение синтезируется: в цитоплазме или в хлоропластах (рис. 4). Для образования монотерпена геранилдифосфата (C_{10}) необходимы изомеризация изопентенилдифосфата с помощью фермента изопентенилдифосфатизомеразы (гены *Ipi*, *Ipp 1*, *Ipp 2*) в диметилаллилдифосфат и конденсация этих двух молекул (рис. 4, а). Впервые фермент изопентенилдифосфатизомеразы был выделен в 1959 г. из дрожжей (Сапожников, 1967). Этот фермент оказался единственным в биосинтезе терпеноидов, чувствительным к моноiodоксусной кислоте, которая ингибирует включение мевалоновой кислоты в каротиноиды, что косвенно указывало на его участие в процессе изомеризации. Дальнейшие исследования реакции превращения изопентенилдифосфата в диметилаллилдифосфат показали, что эти вещества находятся в процентном соотношении 13 : 87 и являются стереоспецифичными по этому ферменту. Стереоспецифичность была установлена двумя способами: а) с использованием меченой по третию $^3\text{H}_2\text{O}$ и б) утилизации стереоспецифически меченой по третию мевалоновой кислоты.

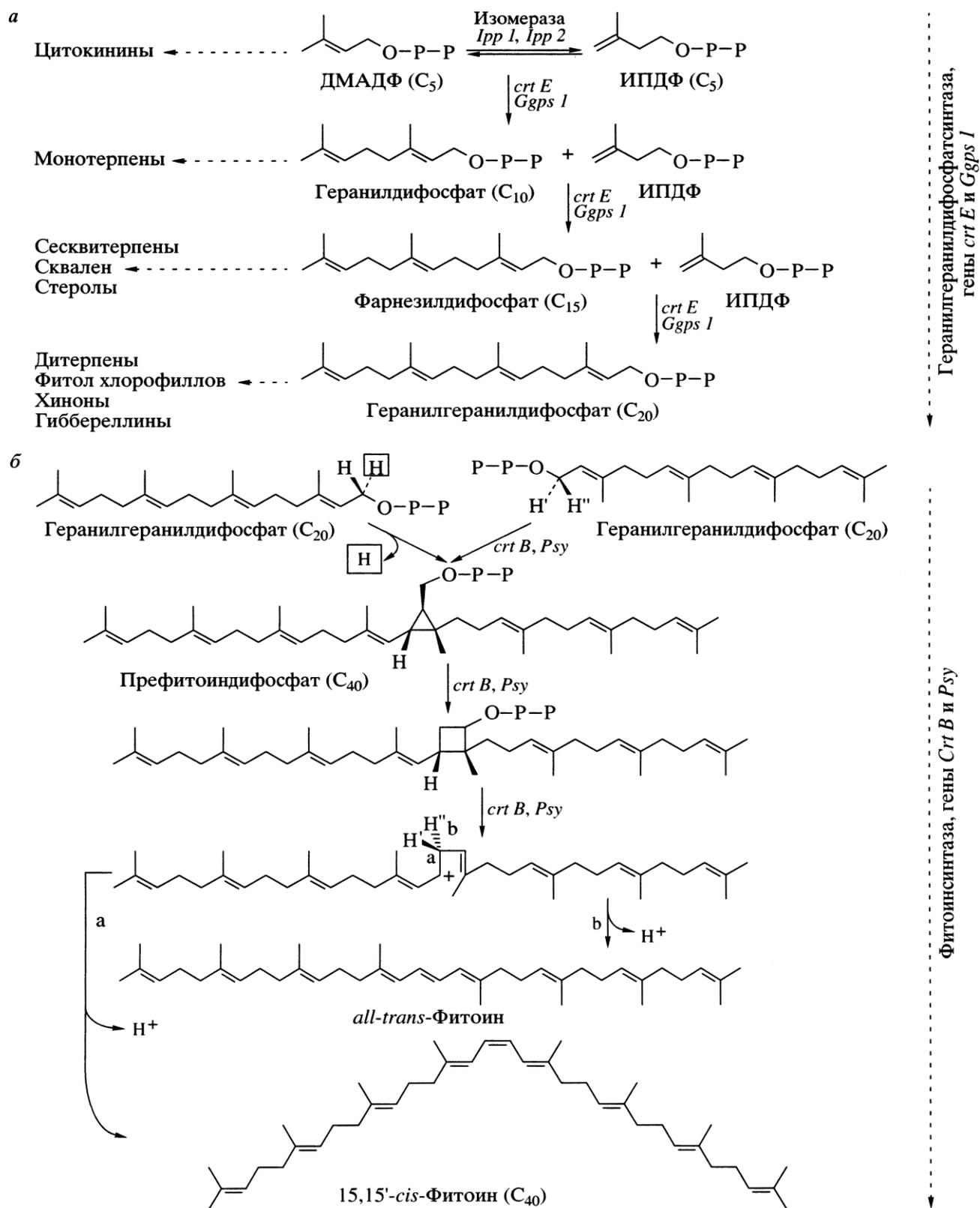


Рис. 4. *а* – биосинтез моно- (геранилдифосфат), сескви- (фарнезилдифосфат) и дитерпенов (геранилгеранилдифосфат); *б* – синтез *all-trans*- или *15,15'-cis*-фитоина из двух молекул геранилгеранилдифосфата через стадию формирования префитоиндифосфата (Britton, 1998).

Гены *Ipp 1* и *Ipp 2* – изопентенилдифосфатизомеразы, гены *crtE* и *Ggps* – геранилгеранилдифосфатсинтазы, гены *crtB* и *Psy* – фитоинсинтазы.

Механизм изомеризации подробно описан в работах Портера (Porter, 1969) и Гудвина (Goodwin, 1971, 1993). В результате конденсации изопентенилдифосфата (C_5) и диметилаллилдифосфата (C_5) образуется монотерпен геранилдифосфат (C_{10}). Эта реакция катализируется ферментом геранилгеранилдифосфатсинтазой (Armstrong, 1994; Armstrong, Hearst, 1996; Zhu et al., 1997).

Он же катализирует дальнейшее последовательное присоединение еще двух молекул изопентенилдифосфата с образованием вначале фарнезилдифосфата (C_{15}), а затем дитерпена геранилгеранилдифосфата (C_{20}) (рис. 4, а), причем цепь биосинтеза каротиноидов от изопентенилдифосфата (C_5) до фарнезилдифосфата (C_{15}) совпадает с цепью биосинтеза стеролов (Сапожников, 1967; Armstrong, Hearst, 1996), основным предшественником которых является сквален (Пасешниченко, 1998; Britton, 1998). Геранилгеранилдифосфат служит общим предшественником цепей биосинтеза хинонов, гиббереллинов, фитола хлорофиллов и каротиноидов (Goodwin, 1994; Armstrong, Hearst, 1996; Britton, 1998).

3. Синтез фитоина

Последним звеном в цепи биосинтеза углеродного скелета каротиноидов, состоящего из 40 углеродных атомов, оказывается тетратерпен фитоин (рис. 4, б). Фитоин (C_{40}) образуется путем конденсации двух молекул дитерпена геранилгеранилдифосфата ($C_{20} + C_{20}$) по типу “хвост к хвосту” (Сапожников, 1967). Сейчас установлено, что продуктом этой реакции служит C_{40} -фитоин, который имеет ненасыщенную двойную связь между центральными атомами углерода (C-15 и C-15'), а не C_{40} -ликоперсен (Britton, 1998). Последний образует одинарную центральную связь, аналогично C_{30} -сквалену, предшественнику тритерпенов и стеролов, который формируется из двух молекул C_{15} -фарнезилдифосфата. На ряде растительных систем было показано прямое включение геранилгеранилдифосфата в фитоин (Schutte, 1983), причем было доказано, что этот процесс протекает в два этапа: вначале синтезируется префитоиндифосфат, а затем происходит десатурация (C-15,15') и образуется фитоин (Britton, 1998). При этом у различных организмов может синтезироваться либо *all-trans*-изомер (обычно у бактерий и грибов), либо 15,15'-*cis*-фитоин (у водорослей и высших растений) (рис. 4, б). Весь процесс синтеза катализируется ферментом фитоинсинтазой, имеющей мол. массу 40 кДа, которая кодируется одним геном *crt B* у бактерий и *Psy* у водорослей и высших растений (Hirschberg, 1998). Считается, что именно фитоин является ключевым C_{40} -предшественником всех каротинов и ксантофиллов. Гудвин (Goodwin, 1993, 1994) систематизировал и представил все факты, которые говорят в пользу этого мнения. Во-первых, изолированные хромопласты красных плодов томатов осуществляют прямое превращение геранилгеранилдифосфата в фитоин. Во-вторых, ингибирование дифениламином биосинтеза каротиноидов у микроорганизмов приводит к накоплению фитоина. В-третьих, многие бесцветные, бескаротиноидные мутанты бактерий, водорослей и высших растений накапливают фитоин. В-четвертых, известно, что дегидрирование (десатурация) является кислородзависимым процессом, поэтому в анаэробных условиях и в отсутствие подходящего акцептора электронов наблюдается ингибирование биосинтеза каротинов, при этом также накапливается фитоин (Goodwin, 1993, 1994).

4. Дегидрирование фитоина до ликопина

Исходя из структурной формулы фитоина, имеющего $3 + 6 = 9$ ненасыщенных двойных связей, можно видеть (рис. 5), что для его превращения в ликопин с $11 + 2 = 13$ двойными связями необходимо последовательное дегидрирование (десатурация) восьми углеродных атомов. Этот процесс должен идти по крайней мере через четыре промежуточных этапа, каждый из которых будет приводить к образованию одной двойной

связи. Такая последовательная десатурация фитоина до ликопина приводит к образованию хромофорной системы каротиноидов (Goodwin, 1993; Britton, 1998).

В настоящее время установлено, что в результате первой реакции дегидрирования образуется фитофлуин. Это первое промежуточное вещество в биосинтезе ликопина и последнее в цепи всех предшественников каротиноидов, имеющее $5 + 5 = 10$ ненасыщенных двойных связей, которое, как и фитоин, является бесцветным и имеет максимумы поглощения в ультрафиолетовой области спектра 250–380 нм (Britton, 1995a). Дальнейшее дегидрирование приводит к образованию ζ -каротина и хромофорной системы каротиноидов, включающей $7 + 4 = 11$ и более ненасыщенных двойных связей, обуславливающих поглощение в видимой части спектра при 350–550 нм (Mimuro et al., 1992; Britton, 1995a).

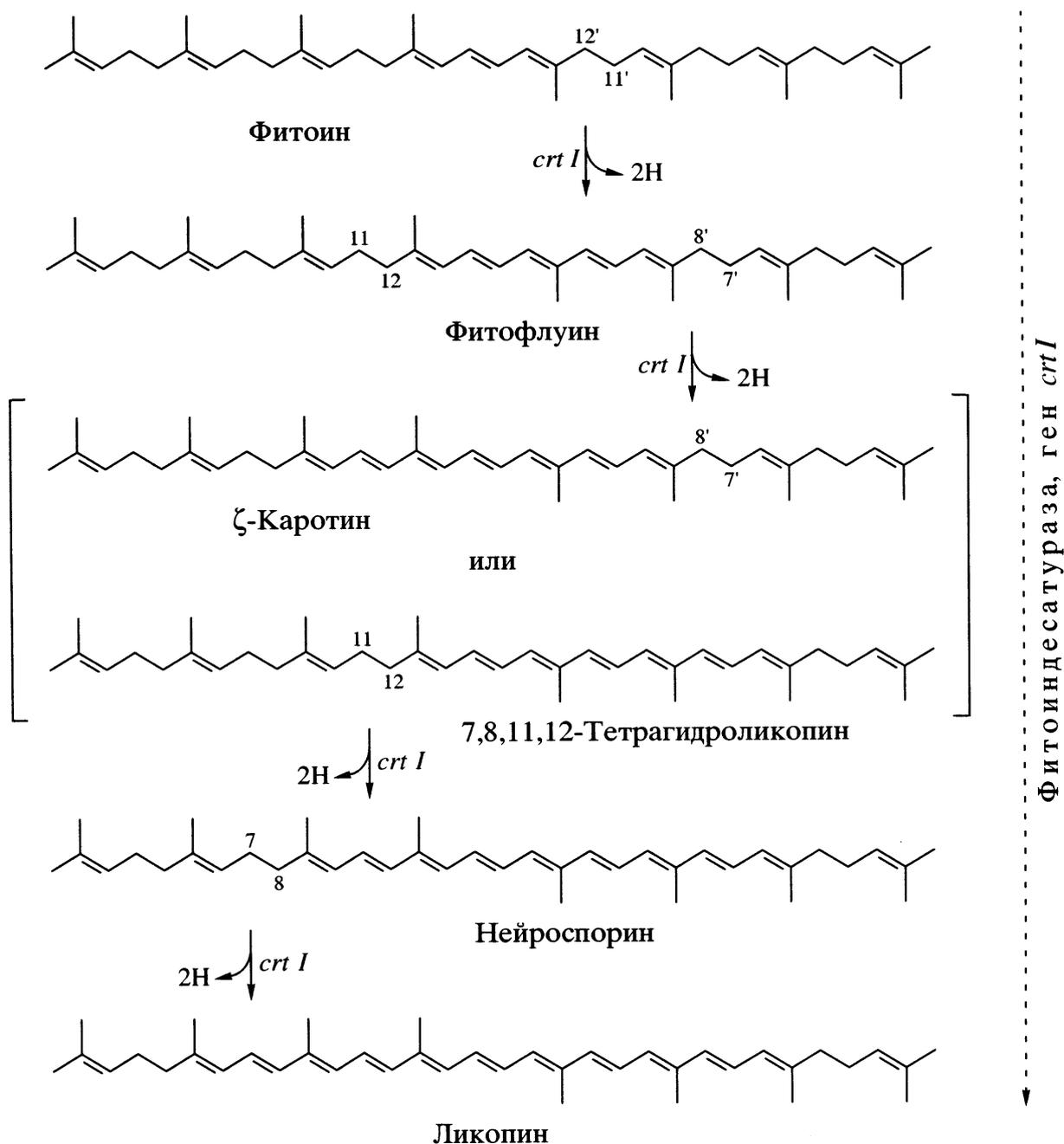


Рис. 5. Схема десатурации *all-trans*-фитоина до ликопина у бактерий и грибов, показывающая возможность формирования у них 7,8,11,12-тетрагидроликопина (несимметричного изомера ζ -каротина) из фитофлуина вместо ζ -каротина. Весь процесс катализируется одним ферментом – фитоиндесатуразой (ген *crt I*).

Первым в ряду каротиноидов, имеющим желтую окраску и максимумы поглощения в ближней ультрафиолетовой и видимой областях спектра при 350–450 нм является ζ -каротин, обнаруженный у водорослей и высших растений (Ладыгин, Ширикова, 1993; Britton, 1998). В то же время у бактерий и грибов, например у *Phycomyces blakesleanus* (рис. 5), в результате дегидрирования фитофлуина вначале образуется 7,8,11,12-тетрагидроликопин (несимметричный изомер ζ -каротина) (Davies, Ress, 1973; Britton, 1998). Затем он либо переходит путем циклизации в 7',8',11',12'-тетрагидро- γ -каротин, либо, так же, как и ζ -каротин, путем дегидрирования очередных двух атомов углерода превращается в нейроспорин (Kushwaha et al., 1970; Qureshi et al., 1974). Практически у всех организмов 4-я реакция дегидрирования приводит к образованию из нейроспорина $9 + 3 = 12$ ликопина $11 + 2 = 13$ (Davies, 1981).

Весь процесс дегидрирования от фитоина до ликопина у бактерий и грибов катализируется одним ферментом – фитоиндесатуразой (ген *crt I*) (рис. 5), а у водорослей и высших растений – двумя ферментами: фитоиндесатуразой (ген *Pds I*) и ζ -каротиндесатуразой (ген *Zds I*) (рис. 6) (Qureshi et al., 1974; Hirschberg, 1998; Cunningham, Gantt, 1998). Процесс образования все большего числа ненасыщенных двойных связей в ходе последовательного дегидрирования формирует хромофор каротиноидов, что обуславливает сдвиг максимумов поглощения в длинноволновую часть спектра (Goodwin, Williams, 1965; Schwieter et al., 1969; Mimuro et al., 1992; Britton, 1995a).

Экспериментальные доказательства в пользу последовательного дегидрирования были получены разными способами. Во-первых, при действии ингибитора синтеза каротиноидов – дифениламина в клетках наблюдалось накопление фитоина, а после его удаления синтез каротиноидов восстанавливался. Исследование кинетики превращений подтвердило, что синтез идет через промежуточные продукты: фитофлуин, ζ -каротин, нейроспорин и ликопин. Во-вторых, введение меченной ^{14}C мевалоновой кислоты показало, что распределение удельной активности соединений наблюдалось в соответствии с указанной выше последовательностью. В-третьих, на клеточных экстрактах бактерий было обнаружено превращение фитофлуина в ζ -каротин. В-четвертых, было установлено, что пластиды плодов томатов и других растений и водорослей способны превращать фитоин в фитофлуин (Сапожников, 1967; Corona et al., 1996).

У бактерий и грибов реакции дегидрирования идут последовательно: вначале две справа от центра молекулы, а потом две слева (рис. 5). В пластидах растений десатурация фитоина протекает альтернативно, поочередно слева и справа от центральных C-15 и C-15' атомов углерода хромофора (рис. 6). При формировании фитофлуина, ζ -каротина, нейроспорина и ликопина каждая новая двойная связь в процессе дегидрирования образуется, как показано на рис. 1, 2, путем *trans*-элиминации *2-pro-S-5-pro-R* атомов водорода (Goodwin, 1994; Britton, 1995b, 1998). Обычно в хлоропластах растений только ζ -каротин, нейроспорин и ликопин встречаются в *all-trans*-конфигурации, а у бактерий в такой конфигурации могут формироваться все предшественники, начиная от фитоина (Qureshi et al., 1974; Armstrong, 1996; Britton, 1998). Считается, что в хлоропластах высших растений и водорослей, в отличие от бактерий и грибов (Qureshi et al., 1974; Davies, Taylor, 1976), фитоин и фитофлуин имеют первоначально 15,15'-*cis*-конфигурацию (рис. 6).

Этот постулат предполагает, что 15-*cis*-фитоин дегидрируется до 15-*cis*-фитофлуина, который затем изомеризуется до *all-trans*-конфигурации. Дальнейшее дегидрирование идет до ζ -каротина, нейроспорина и ликопина, как правило, имеющих *all-trans*-геометрию. Однако известен мутант *C-6D Scenedesmus obliquus*, у которого имеет место обратимая изомеризация ζ -каротина (Powls, Britton, 1977; Sandmann, 1993), причем *cis*- ζ -каротин на свету превращается в *trans*- ζ -каротин, а в темноте – в поли-*cis*-изомеры: пронейроспорин и проликопин (Goodwin, 1993; Sandmann, 1993, 1994). Сейчас известно (рис. 7) строение поли-*cis*-проликопина – 7,9,7',9'-*tetra-cis*-ликопина (Sandmann, 1994; Britton, 1998).

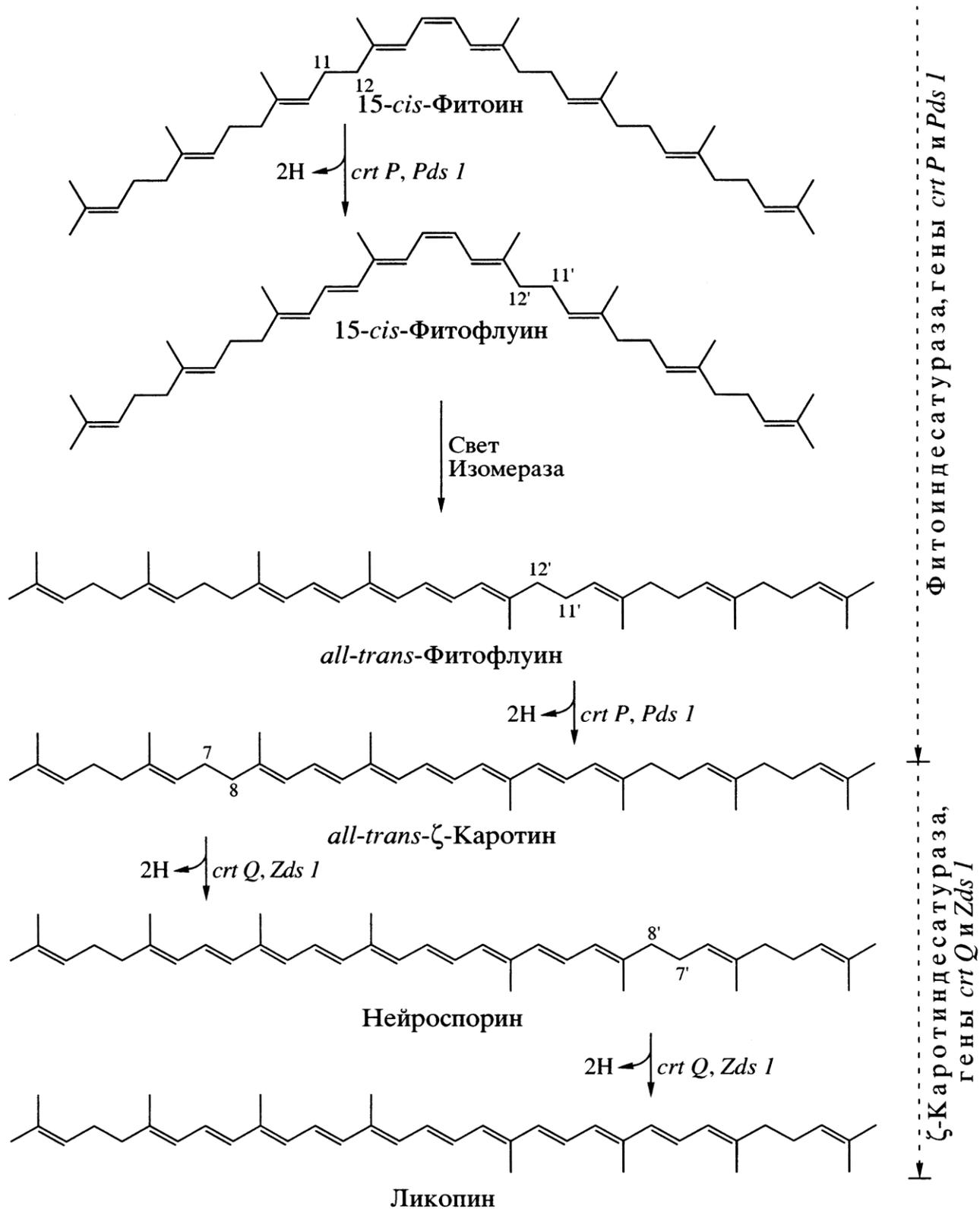


Рис. 6. Схема десатурации 15-*cis*-фитоина до *all-trans*-ликопина в хлоропластах высших растений и водорослей. Реакции катализируются двумя ферментами: фитоиндесатуразой (ген *Pds 1*) и ζ-каротиндесатуразой (ген *Zds 1*).

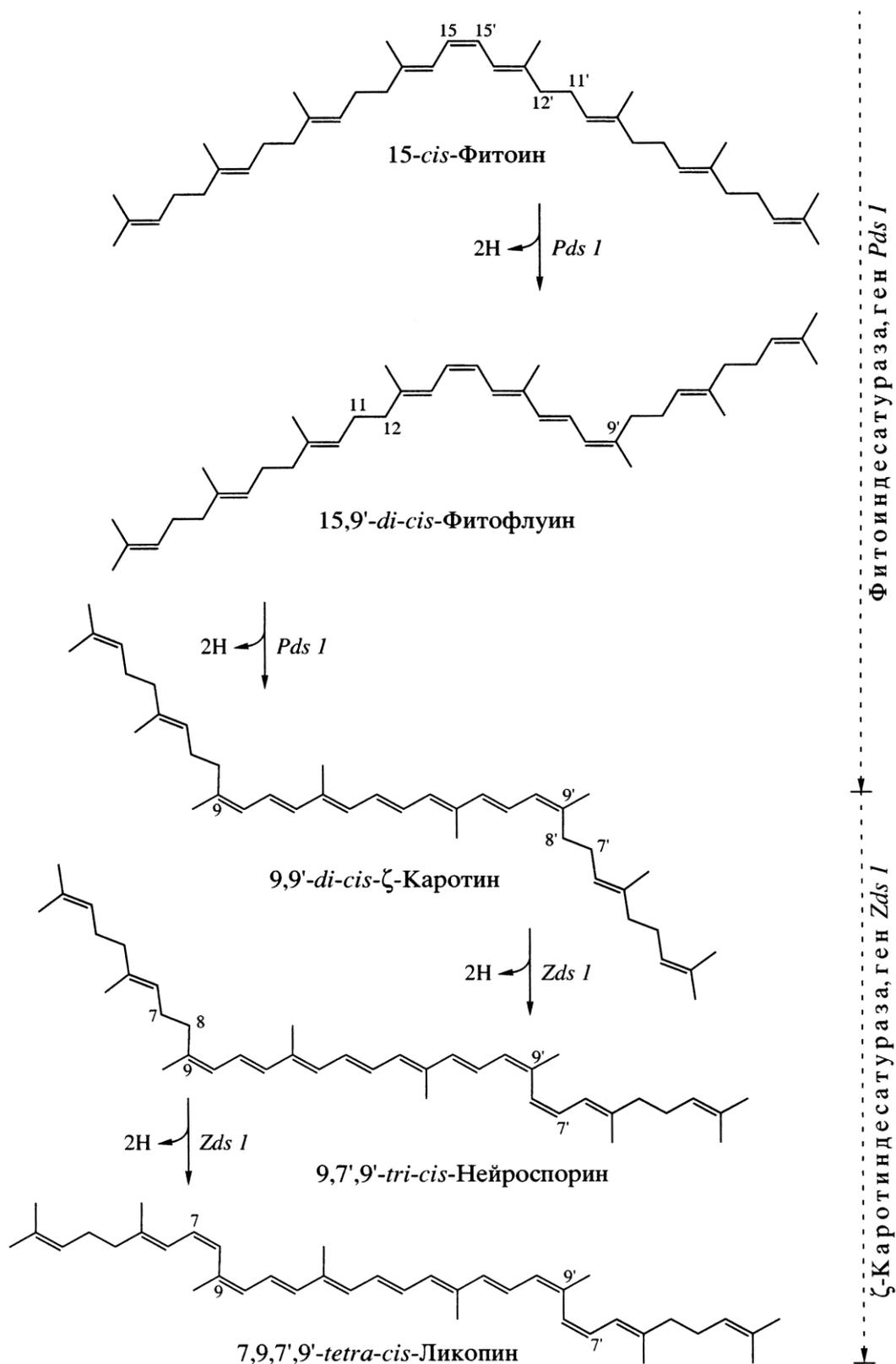


Рис. 7. Схема десатурации 15-*cis*-фитоина до поли-*cis*-проликопина (7,9,7',9'-*tetra-cis*-ликопина) в пластидах мутанта *C-6D Scenedesmus obliquus*, оранжевых плодов томатов (*Lycopersicon esculentum*) и желтых цветков нарцисса (*Narcissus pseudonarcissus*). Реакции катализируются двумя ферментами: фитоиндесатуразой (ген *Pds 1*) и ζ-каротиндесатуразой (ген *Zds 1*). После формирования 7,9,7',9'-*tetra-cis*-ликопина биосинтез останавливается (Britton, 1998).

Его предшественниками у мутанта *C-6D Scenedesmus* и в хромопластах оранжевых плодов томатов (*Lycopersicon esculentum*) являются: 15-*cis*-фитоин, 15,9'-*di-cis*-фитофлуин, 9,9'-*di-cis*- ζ -каротин и 9,7',9'-*tri-cis*-нейроспорин (Powls, Britton, 1977; Sandmann, 1994; Ronen et al., 1999). Аналогичным образом идет десатурация в хромопластах цветков желтого нарцисса (*Narcissus pseudonarcissus*) *in vitro* (Britton, 1998). В аэробных условиях из 15-*cis*-фитоина образуются: 15,9'-*di-cis*-фитофлуин, 9,9'-*di-cis*-каротин, 9,7',9'-*tri-cis*-нейроспорин и 7,9,7',9'-*tetra-cis*-лекопин (рис. 7). Биосинтез каротинов на этой стадии останавливается (Veyer et al., 1989).

Как показано на мутанте *C-6D Scenedesmus* и хромопластах желтых плодов томатов и цветков нарцисса, этот процесс превращения поли-*cis*-проликопина в последующие циклические каротины не может продолжаться в темноте даже при добавлении фермента ликопинциклазы (Goodwin, 1993; Sandmann, 1994). Но у уникального мутанта *Scenedesmus obliquus cis*- ζ -каротин и другие поли-*cis*-предшественники ликопина на свету изомеризуются в *trans*-изомеры и затем могут превращаться в β -каротин (Sandmann, 1993; Britton, 1998).

Дальнейшее превращение каротиноидов может осуществляться двумя путями: а) путем их окисления с образованием ксантофиллов с открытой цепью (характерно для бактерий) или б) вначале путем циклизации формируются каротины, а затем они могут окисляться и присоединять две гидроксигруппы, как у зеаксантина, лактукаксантина и лютеина, две эпоксигруппы, как у виолаксантина и лютеоксантина, две оксогруппы, как у капсорубина и кантаксантина, а также большего или меньшего числа этих групп у других циклических ксантофиллов, характерных для хлоропластов водорослей и высших растений (Kushwaha et al., 1970; Olson, Krinsky, 1995; Liaaen-Jensen, 1998).

5. Циклизация каротинов

Процесс циклизации каротинов, как правило, может осуществляться только в том случае, если одна или обе концевые группы имеют одну одинарную связь между С-3 и С-4 или С-3' и С-4' атомами углерода. Он не может происходить ни при наличии двух и более одинарных связей, ни при их отсутствии, как у 3,4,3',4'-тетрадегидроликопина (Britton, 1998; Cunningham, Gantt, 1998, 2001).

Формирование циклических каротинов хлоропластов начинается с образования двух типов концевых групп: β - и ϵ -иононовых колец у β - и α -зеакаротинов соответственно (рис. 8). Механизм циклизации достаточно подробно исследован (Britton et al., 1977; Schutte, 1983; Sandmann, 1994). У всех организмов, от бактерий до высших растений, он практически одинаков. Существенное отличие состоит лишь в том, что у бактерий и грибов начало циклизации может происходить раньше. Первое моноциклическое соединение 7',8',11',12'-тетрагидро- γ -каротин у них образуется еще из несимметричного изомера ζ -каротина (7,8,11,12-тетрагидроликопина) (Davies, Rees, 1973; Armstrong, 1994). С помощью мутантов зеленых водорослей *Chlorella 5/520* (Claes, 1957), *Scenedesmus C-6D* и *PG-1* (Britton et al., 1977; Schutte, 1983; Sandmann, 1994) и *Chlamydomonas reinhardtii C-41* и др. (Krinsky, Levine, 1964; Sirevog, Levine, 1973; Francis et al., 1973, 1975; Eichenberger et al., 1986; Ладыгин, Ширикова, 1993) было установлено, что первым продуктом циклизации каротинов является β -зеакаротин (рис. 8), который у водорослей образуется из нейроспорина (Czygan, 1982; Sandmann, 1994; Armstrong, Hearst, 1996). Из нейроспорина формируется и первое ϵ -иононовое кольцо в процессе синтеза α -зеакаротина (Armstrong, 1994; Britton, 1998). В дальнейшем у водорослей в результате дегидрирования из α -зеакаротина образуется δ -каротин (ϵ,ψ -каротин), а из β -зеакаротина – γ -каротин (ϵ,ψ -каротин). С помощью радиоактивной метки было установлено, что у *Scenedesmus* (Britton, 1995b) возможно формирование вначале ликопина (ψ,ψ -каротина), а затем его циклизация до δ - и γ -каротинов (Armstrong, 1994; Britton, 1998), так же, как это происходит в хромопластах красных плодов томатов (Sandmann, 1994) и хлоропластах *Arabidopsis thaliana* (Cunningham, Gantt, 1998, 2001).

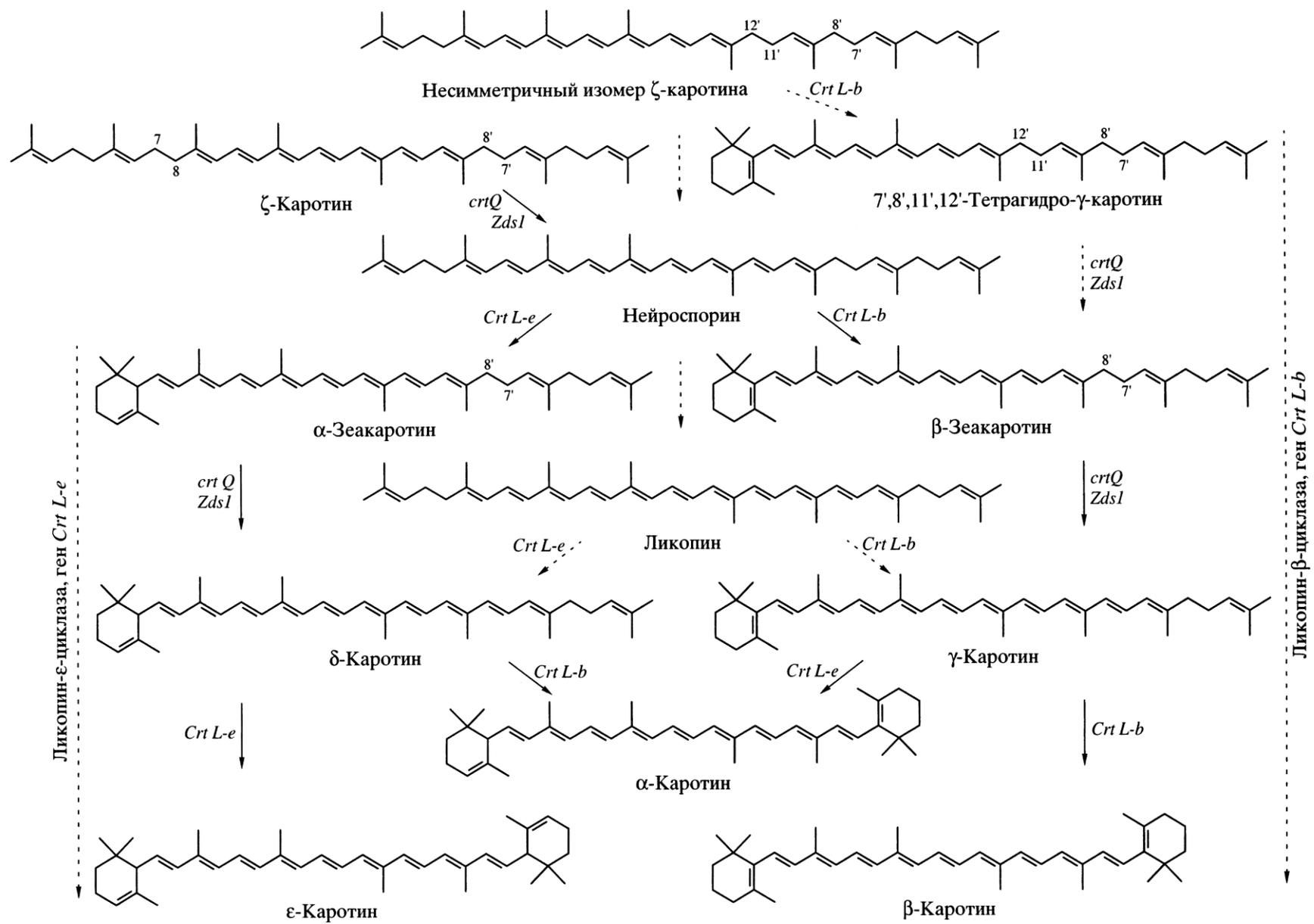


Рис. 8. Схема циклизации каротинов, показывающая образование β -иононового кольца (β -зеакаротин) с участием ликопин- β -циклазы (ген *Crt L-b*), и ϵ -иононового кольца (α -зеакаротин) с участием ликопин- ϵ -циклазы (ген *Crt L-e*) (Hirschberg, 1998; Cunningham, Gantt, 1998, 2001).

В результате циклизации второй концевой группы и образования ϵ -кольца или β -кольца из δ - и γ -каротинов синтезируются три типа каротинов: ϵ -каротин (ϵ,ϵ -каротин), α -каротин (β,ϵ -каротин) и β -каротин (β,β -каротин). В скобках дано название соединений по химической номенклатуре IUPAC (Klaui, 1982; Weedon, Moss, 1995).

Как видно из названия каротинов, все они различаются между собой только по концевым группам. В пластидах зеленых водорослей и высших растений в основном встречаются три типа концевых групп: одна, характерная для ликопина, ациклическая (ψ -концевая группа) и две циклические (β -иононовое кольцо и ϵ -иононовое кольцо). Два кольца различаются между собой положением двойной связи, расположенной в β -кольце между 5-м и 6-м, а в ϵ -кольце – между 4-м и 5-м атомами углерода. Все этапы циклизации каротинов протекают с участием ферментов. Используя ингибиторы в умеренных дозах, например ингибиторы ζ -каротиндесатуразы, можно замедлить образование ликопина и обнаружить синтез β -зеакаротина (Sandmann, 1994). Формирование β -кольца и ϵ -кольца контролируют разные гены. Так, для хромопластов красных плодов томатов и хлоропластов *Arabidopsis* установлено, что ген *Crt L-b* контролирует синтез ликопин- β -циклазы, катализирующей образование β -иононового кольца. В то же время ген *Crt L-e* контролирует синтез ликопин- ϵ -циклазы, которая катализирует образование ϵ -иононового кольца в процессе синтеза ϵ - и α -каротинов (Siefermann-Harms et al., 1981; Sandmann, 1994; Liaaen-Jensen, 1998; Cunningham, Gantt, 1998, 2001).

У бактерий и водорослей циклизация ликопина осуществляется с помощью ликопин- β -циклазы, синтез которой контролирует один *crt L* (*crt Y*)-ген (Sandmann, 1994; Armsrong, Hearst, 1996). В аэробных условиях *in vitro* для этой реакции требуется добавление НАДФН (Sandmann, 1994). У высших растений продукт *lcy*-гена – ликопин- β -циклаза обеспечивает циклизацию молекул *all-trans* ликопина на всех этапах превращения промежуточных продуктов до β -каротина (Nitshe, 1974; Cunningham et al., 1993; Linden et al., 1994). Ген *lcy* высших растений был впервые клонирован, выделен и детально охарактеризован (Linden et al., 1994). Аналогичный ген *crt L*-ликопин- β -циклазы описан у бактерий. Оба гена кодируют один и тот же 43 кДа полипептид ликопинциклазы (Sandmann, 1994). Все этапы циклизации каротинов протекают в анаэробных условиях в отличие от десатурации, для которой требуется кислород.

БИОСИНТЕЗ КСАНТОФИЛЛОВ

Все кислородсодержащие производные каротинов называются ксантофиллами. В пластидах эукариотических растений они образуются путем ферментативного окисления ϵ -, α - и β -каротинов. Реакции протекают в аэробных условиях. Обычно большинство кислородсодержащих групп, обнаруженных в ксантофиллах хлоропластов, находятся в форме либо гидроксигрупп ($-\text{OH}$) и связаны с 3-м углеродным атомом (C-3 или C-3'), либо оксогрупп ($=\text{O}$) и связаны с 4-м углеродным атомом (C-4 или C-4'), либо эпоксигрупп ($-\text{O}-$) в положении между 5-м и 6-м углеродными атомами (C-5,6 или C-5',6') иононовых колец. Известно, что все три типа кислородсодержащих групп образуются за счет реакций окисления с использованием молекулярного кислорода атмосферы (Маслова и др., 1996; Britton, 1998).

В результате первых реакций гидроксилирования α - и β -каротинов образуются зеиноксантин и α -криптоксантин (моногидрокси- α -каротин) (рис.9), а также β -криптоксантин (моногидрокси- β -каротин) (рис. 10). Эта ступень превращения каротиноидов является типичной монооксигеназной реакцией (Sandmann, 1994).

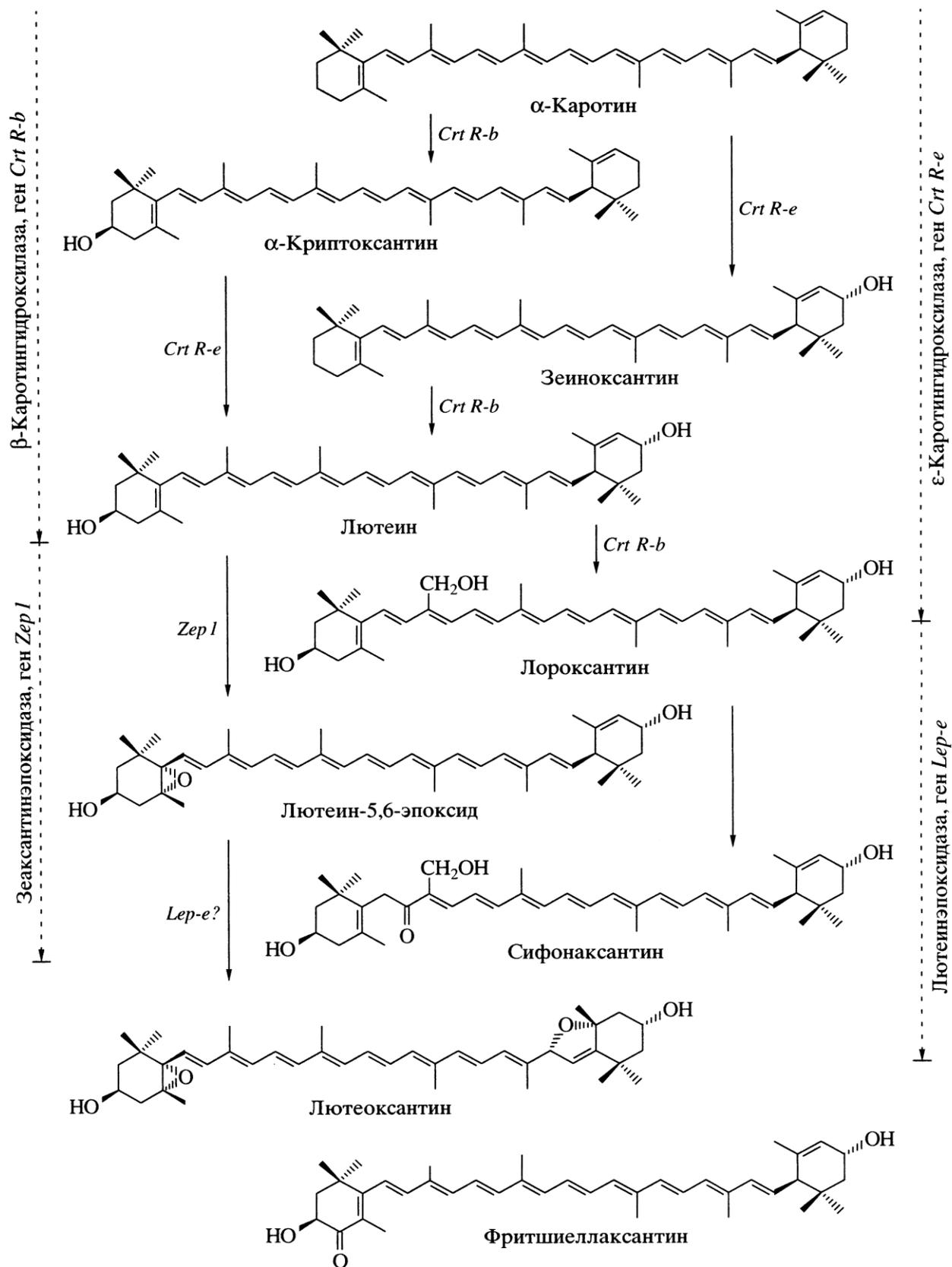


Рис. 9. Биосинтез ксантофиллов хлоропластов, производных α -каротина, с участием β -каротингидроксилазы (ген *Crt R-b*), ε -каротингидроксилазы (ген *Crt R-e*), зеаксантинэпоксидазы (ген *Zep 1*), а также, предположительно, ε -лютеинэпоксидазы (ген *Lep-e?*).

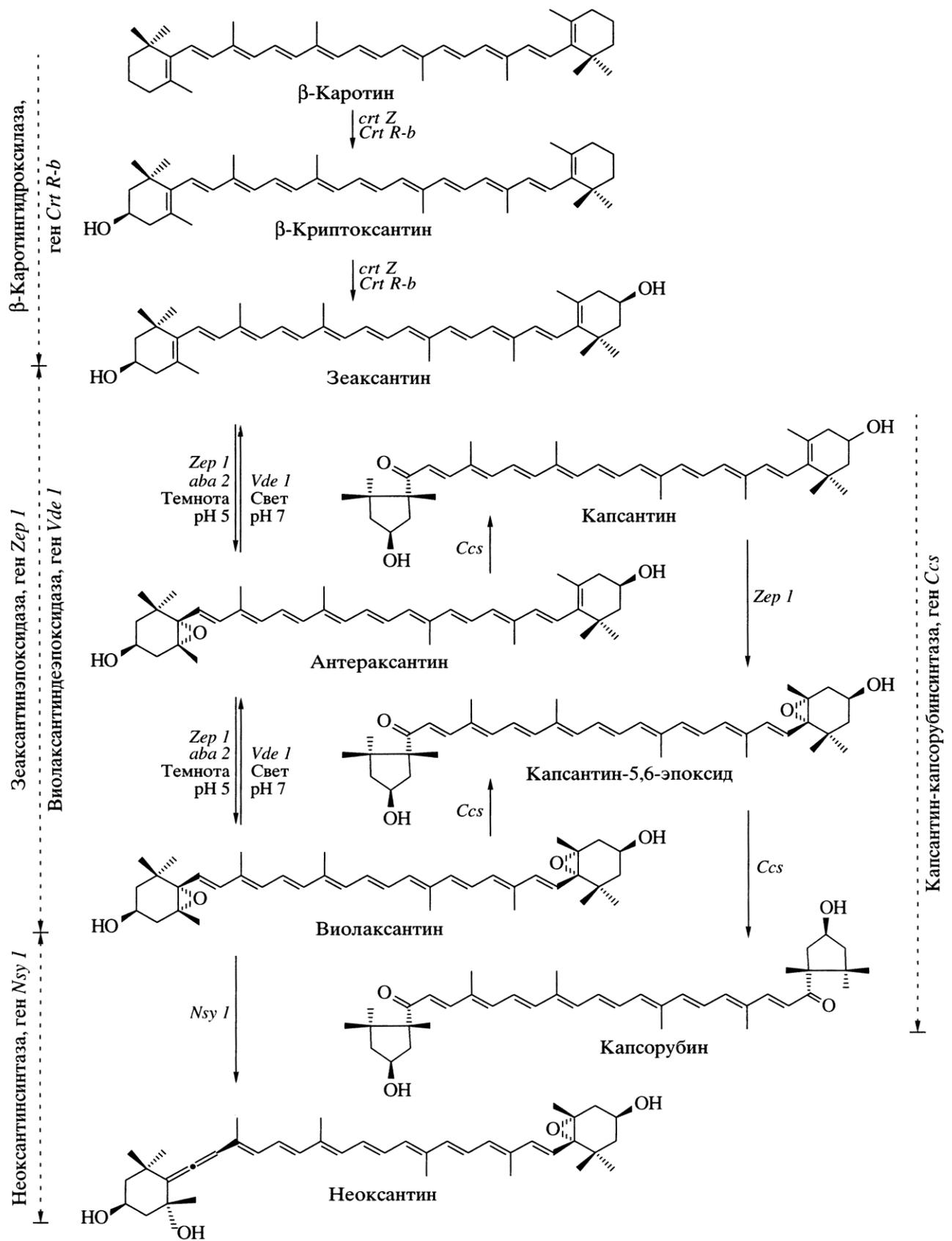


Рис. 10. Биосинтез ксантофиллов растений, производных β -каротина, с участием β -каротингидроксилазы (гены *crt Z* и *Crt R-b*), зеаксантинэпоксидазы (гены *Zep 1* и *aba 2*), виолаксантиндеэпоксидазы (ген *Vde 1*), неоксантинсинтазы (ген *Nsy 1*) и капсантин-капсорубинсинтазы (ген *Ccs*).

В настоящее время для водорослей и высших растений установлен ген *Crt R-b*, контролирующей синтез фермента, катализирующего окисление циклических каротинов (Hirschberg, 1998). Аналогичный ген, названный *crt H* (Bilger et al., 1995) и обозначенный в другой публикации как *crt Z* (Misawa, 1990), обнаружен у бактерий. Все эти гены кодируют синтез β -каротингидроксилазы (Armsrong, 1994; Armstrong, Hearst, 1996; Hirschberg, 1998). Считается, что β -криптоксантин является промежуточным звеном в двухступенчатом биосинтезе зеаксантина из β -каротина (рис. 10). Поэтому гены *Crt R-b*, *crt H* и *crt Z* контролируют, а их продукт β -каротингидроксилаза катализирует обе реакции превращения β -каротина как до β -криптоксантина (3-гидрокси- β -каротина), так и до зеаксантина (3,3'-дигидрокси- β -каротина) (Armsrong, 1994; Bartley et al., 1994; Sandmann, 1994).

Иначе происходит синтез лютеина из α -каротина. Вначале образуются промежуточные продукты α -криптоксантин (3-гидрокси- α -каротин) и зеиноксантин (3'-гидрокси- α -каротин), а затем лютеин (3,3'-дигидрокси- α -каротин) (рис. 9). Отличие состоит в том, что в синтезе лютеина участвуют два фермента, β -каротингидроксилаза и ϵ -каротингидроксилаза, контролируемые генами *Crt R-b* (при гидроксилировании β -кольца) и *Crt R-e* (при гидроксилировании ϵ -кольца) (Hirschberg, 1998; Cunningham, Gantt, 1998, 2001).

Поскольку α -каротин с его ϵ -иононовым кольцом синтезируется только в пластидах водорослей и высших растений, то и его производные зеиноксантин, α -криптоксантин, лютеин, лороксантин, сифонаксантин и фритшиеллаксантин (рис. 9) накапливаются только у этих организмов (Sandmann, 1994; Thompson, 1996; Liaaen-Jensen, 1998). Напротив, β -криптоксантин и зеаксантин синтезируются как у бактерий и грибов, так и у всех эукариотических растений и водорослей.

Недавно охарактеризована β -каротингидроксилаза как белок с мол массой 22 кДа (Hundle et al., 1993). И хотя он является мембранно-связанным белком, энзиматическая активность его была обнаружена только в присутствии компонентов цитоплазматической фракции (Sandmann, 1994; Cunningham, Gantt, 1998, 2001).

Что касается ксантофиллов – производных α -каротина, содержащих одно β -иононовое и одно ϵ -иононовое кольца, то о них, кроме широко распространенного лютеина, очень мало известно. Возможно, это объясняется тем, что α -каротин синтезируется только у водорослей и высших растений, а большая часть исследований проводилась на бактериях, грибах и цианобактериях.

У зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* обнаружены также лютеин-5,6-эпоксид, лютеоксантин и лороксантин (рис. 9) (Francis et al., 1973; Nitshe, 1974; Eichenberger et al., 1986; Niyogi et al., 1997). Лороксантин помимо *Chlamydomonas* был найден у *Euglena* (Nitshe, 1974), *Chlorella* (Claes, 1957; Nitshe, 1974), *Scenedesmus* (Nitshe, 1974; Britton et al., 1977) и у харовых водорослей (Grumbach, 1983). И хотя, кроме лютеина и лороксантина (Pogson et al., 1996), содержание других производных α -каротина незначительно, нельзя исключить очень важную функциональную роль этих каротиноидов в хлоропластах растений и водорослей. Так, например, лютеин участвует в образовании светособирающего комплекса фотосистемы II (Kühlbrandt et al., 1994). Функциональной роли других каротиноидов посвящены специальные обзоры (Сапожников, 1967; Britton, 1995b; Карнаухов, 1988, 2000).

В последние годы появилось большое число публикаций, посвященных исследованию виолаксантинового цикла (Hager, Holocher, 1994; Bilger et al., 1995; Hartel et al., 1996; Demming-Adams et al., 1996; Montane et al., 1998; Saccardy et al., 1998). Хорошо установлено, что из зеаксантина образуется вначале антраксантин с одной эпокси-, а затем виолаксантин с двумя эпоксигруппами (рис. 10). Две эпоксигруппы последовательно формируются в С-5,6- и С-5',6'-положениях атомов углерода β -иононовых колец. Реакция эпоксидации была изучена *in vitro* на изолированных хромопластах красных плодов *Capsicum annuum* (Sandmann, 1994; Armsrong, Hearst, 1996). Недавно у *Arabidopsis thaliana* были изолированы мутанты с различными нарушениями синтеза абсцизовой кислоты (*aba* – abscisic-acid-deficient), обусловленными мутациями в *aba*-гене (Rock, Zecvaart, 1991). В результате всех мутаций в локусе *aba*-гена в хлоропластах мутантов наблюдалось сильное уменьшение

содержания всех эпоксикаротиноидов, что указывает на нарушение гена *Zep 1* – зеаксантинэпоксидазы (Sandmann, 1994).

Темновая эпоксидация зеаксантина до виолаксантина в хлоропластах является обратимым циклическим процессом. На сильном свете (при световом стрессе) реакция деэпоксидации виолаксантина через антраксантин до зеаксантина выполняет защитную функцию в хлоропластах (Demming-Adams et al., 1996; Montane et al., 1998; Saccardy et al., 1998). Эта свето-темновая регуляция процесса обратимой эпоксидации–деэпоксидации описана во многих обзорных статьях (Сапожников, 1967; Hager, Holocher, 1994; Demming-Adams et al., 1996; Маслова и др., 1996; Карнаухов, 2000). Место локализации и функциональное значение этого процесса еще до конца не выяснены, но уже имеется много сведений, указывающих на участие процесса эпоксидации–деэпоксидации в агрегации и функционировании светособирающего комплекса II, а также в механизме защиты реакционного центра фотосистемы II от фотодеструкции (Gilmore, 1997; Montane et al., 1998). Есть также данные о том, что виолаксантиновый цикл может участвовать в организации светособирающего комплекса I и, возможно, связан с функционированием реакционного центра фотосистемы I (Корнюшенко и др., 1977; Ладыгин, Ширикова, 1987; Hager, Holocher, 1994; Маслова и др., 1996). Ранее было показано, что реакция эпоксидации и превращение зеаксантина в виолаксантин может осуществляться в препаратах, содержащих выделенные оболочки хлоропластов (Grumbach, 1983). Не исключено, что важное значение для этого процесса имеет состояние липидного бислоя фотосинтетических мембран хлоропластов (Navaux, Gruszecki, 1993; Клячко-Гурвич и др., 2000).

Среди основных каротиноидов хлоропластов зеленых водорослей и высших растений всегда присутствует неоксантин. Это эпоксикаротиноид, у которого помимо одной эпокси группы имеются три гидроксигруппы и одна специфическая для него алленовая концевая связь (рис. 10), т.е. две сопряженные двойные связи у 7-го атома углерода (рис. 1, в, 3). Считается, что неоксантин образуется из виолаксантина путем перестройки одной эпокси группы в 5-гидроксигруппу (Britton, 1998). Возможность осуществления этой реакции была продемонстрирована на бесклеточной системе в гомогенатах *Ampullinium carteri* (Sandmann, 1994). Недавно установлен ген *Nsy 1*, выделен и охарактеризован фермент неоксантинсинтаза (Al-Babili et al., 2000; Bouvier et al., 2000), осуществляющий эту реакцию.

Другими производными β-каротина являются оксокаротиноиды: капсантин и капсорбин (Czygan, 1982; Sandmann, 1994), которые образуются в хромопластах красных плодов перца (*Capsicum annuum*) и являются их основными ксантофиллами (рис. 10). Капсантин образуется из антраксантина путем трансформации эпокси группы в оксогруппу и превращения β-иононового кольца в циклопентановое кольцо (Cunningham, Gantt, 1998; Hirschberg, 1998). Аналогичным образом формируется капсорубин из виолаксантина. Только в этом случае две эпокси группы трансформируются в две оксогруппы и оба β-иононовых кольца превращаются в два циклопентановых кольца. Такая последовательность превращения описанных каротиноидов была подтверждена на выделенных хромопластах из красных плодов *Capsicum annuum* (Sandmann, 1994). Синтез капсантина и капсорубина катализируется капсантин-капсорубинсинтазой (ген *Ccs*). Она же осуществляет перестройку β-иононового кольца в циклопентановое кольцо (Hirschberg, 1998; Cunningham, Gantt, 1998, 2001).

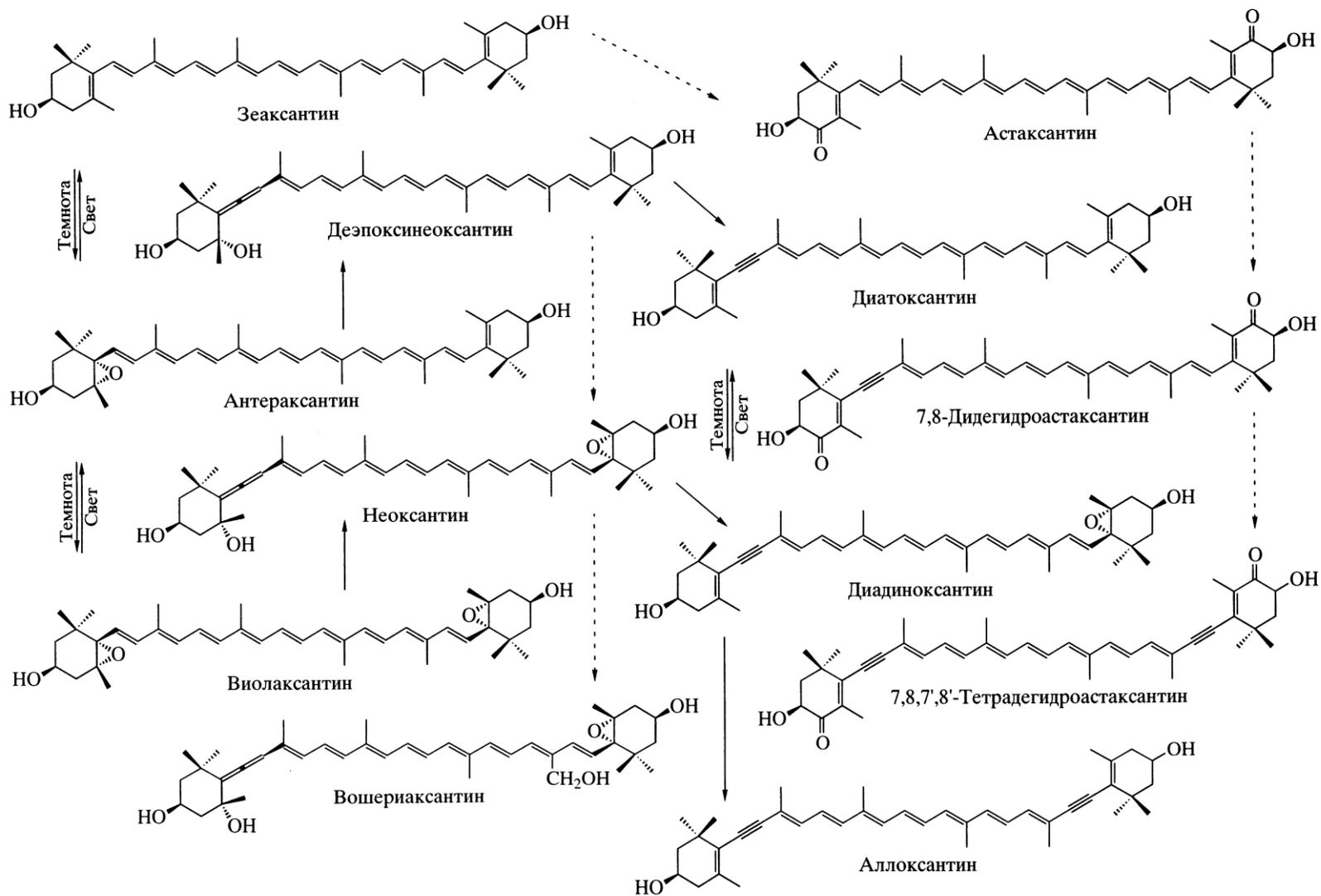


Рис. 11. Схема формирования алленовых (производных неоксантина) и ацетиленовых (производных диатоксантина) каротиноидов водорослей. Двумя стрелками показана обратимая эпексидация–деэпексидация диатоксантина и диациноксантина, подобная виолаксантинному циклу у высших растений.

Из наиболее широко распространенных ксантофиллов хлоропластов высших растений: зеаксантина, антераксантина и виолаксантина – образуются алленовые и ацетиленовые каротиноиды, которые встречаются почти у всех эукариот (Liaaen-Jensen, 1998). Из антераксантина и виолаксантина образуются соответственно дезпоксинеоксантин и неоксантин (рис. 11), а также другие алленовые ксантофиллы водорослей (Britton, 1995b, 1998). Свое название они получили благодаря наличию у них характерной алленовой концевой группы, т.е. двух ненасыщенных двойных связей у 7-го атома углерода (рис. 1, в, 3). В свою очередь из дезпоксинеоксантина и неоксантина синтезируются ацетиленовые ксантофиллы водорослей: диатоксантин и диадиноксантин (рис. 11), имеющие тройную ацетиленовую связь между 7-м и 8-м атомами углерода (рис. 1, в, 4). Эти каротиноиды в хлоропластах водорослей могут осуществлять реакции эпоксидации в темноте и дезэпоксидации на свету, подобно ксантофиллам виолаксантинового цикла высших растений (Britton, 1998). Кроме того, из диадиноксантина образуется аллоксантин (7,8,7',8'-тетрадегидро-3,3'-дигидрокси- β -каротин), один из характерных ксантофилов водорослей, содержащих две тройные ацетиленовые связи между 7-м и 8-м, а также 7'-м и 8'-м атомами углерода. Аналогичным образом формируются ацетиленовые концевые группы у каротиноидов, производных астаксантина: 7,8-дидегидро- и 7,8,7',8'-тетрадегидроастаксантина (рис. 11).

Астаксантин (3,3'-дигидрокси-4,4'-диоксо- β -каротин) – достаточно широко распространенный каротиноид водорослей, который, как и все перечисленные алленовые и ацетиленовые каротиноиды, является производным β -каротина. Другими оксокаротиноидами, производными β -каротина, являются эхиненон (4-оксо- β -каротин) и кантаксантин (4,4'-диоксо- β -каротин), характерные для цианобактерий и гетеротрофных бактерий. Они могут быть также обнаружены как вторичные каротиноиды у водорослей (рис. 12), растущих в различных условиях стресса, в частности при дефиците азота (Czygan, 1982). У зеленых водорослей они, так же как фритшиеллаксантин, астаксантин, семиастацен и астацен, могут накапливаться в клеточной стенке зооспор (Thompson, 1996).

Сейчас мало известно о реакциях, ответственных за формирование оксогрупп, связанных с 4-м углеродным атомом (C-4 или C-4') β -каротина (рис. 12). С помощью выделенных мембран цианобактерий *Synechocystis* было установлено *in vitro* превращение β -каротина в 4-оксопроизводное – эхиненон (Sandmann, 1994). Этот процесс является НАДФ·Н-зависимым и ингибируется KCN. Недавно получено доказательство того, что образование C-4 оксогруппы эхиненона протекает в два этапа: путем гидроксилирования и гидрирования (Sandmann, 1994; Britton, 1998). Синтез кантаксантина, 4,4'-диоксопроизводного β -каротина, приходит через соответствующие четыре этапа этих реакций.

Из β -каротина у водорослей образуется несколько кетокаротиноидов: эхиненон, кантаксантин, адониксантин, адонирубин, астаксантин (рис. 12). Недавно установлено, что присоединение оксогруппы (=O) катализируется β -каротин-C-4-оксигеназой, которую иногда называют β -каротинкетотазой (Hirschberg, 1998). У бактерий ее синтез контролирует ген *crt W* (Navaux, Gruszecki, 1993; Pfunder, Bilder, 1994), а у водорослей аналогичные гены обозначают как *Crt O* или *Brt* (Lotan, Hirschberg, 1995; Sandmann et al., 1999). Под действием этих генов у водоросли *Haematococcus pluvialis* в условиях стресса в плазмалеме клетки накапливаются эхиненон, кантаксантин и астаксантин (Lotan, Hirschberg, 1995; Sandmann et al., 1999). Показано, что β -каротин-C-4-оксигеназа катализирует включение двух оксогрупп в β -иононовые кольца, т.е. превращение β -каротина в кантаксантин через монокетон – эхиненон (Lotan, Hirschberg, 1995; Cunningham, Gantt, 1998).

При синтезе астаксантина у водорослей (гены *Crt O* или *Brt*) и у бактерий (ген *crt W*) β -каротин-C-4-оксигеназа может функционировать в сочетании с β -каротингидроксилазой (гены *crt Z* и *Crt R-b*).

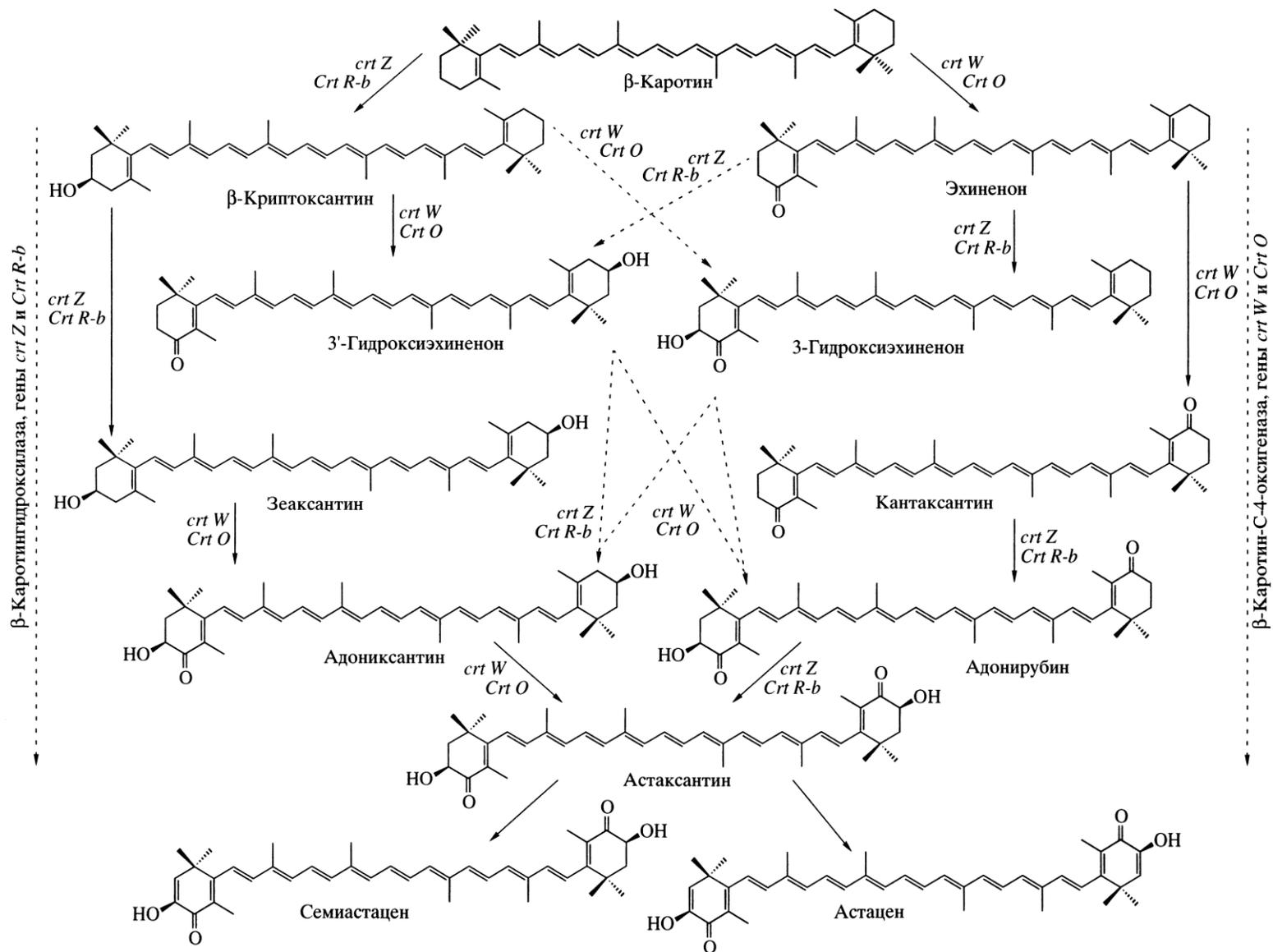


Рис. 12. Схема биосинтеза оксокаротиноидов водорослей и высших растений с участием β -каротин-C-4-оксигеназы (ген *crt W*, *Crt O*) и β -каротингидроксилазы (гены *crt Z*, *Crt R-b*) (Thompson, 1996; Hirschberg, 1998).

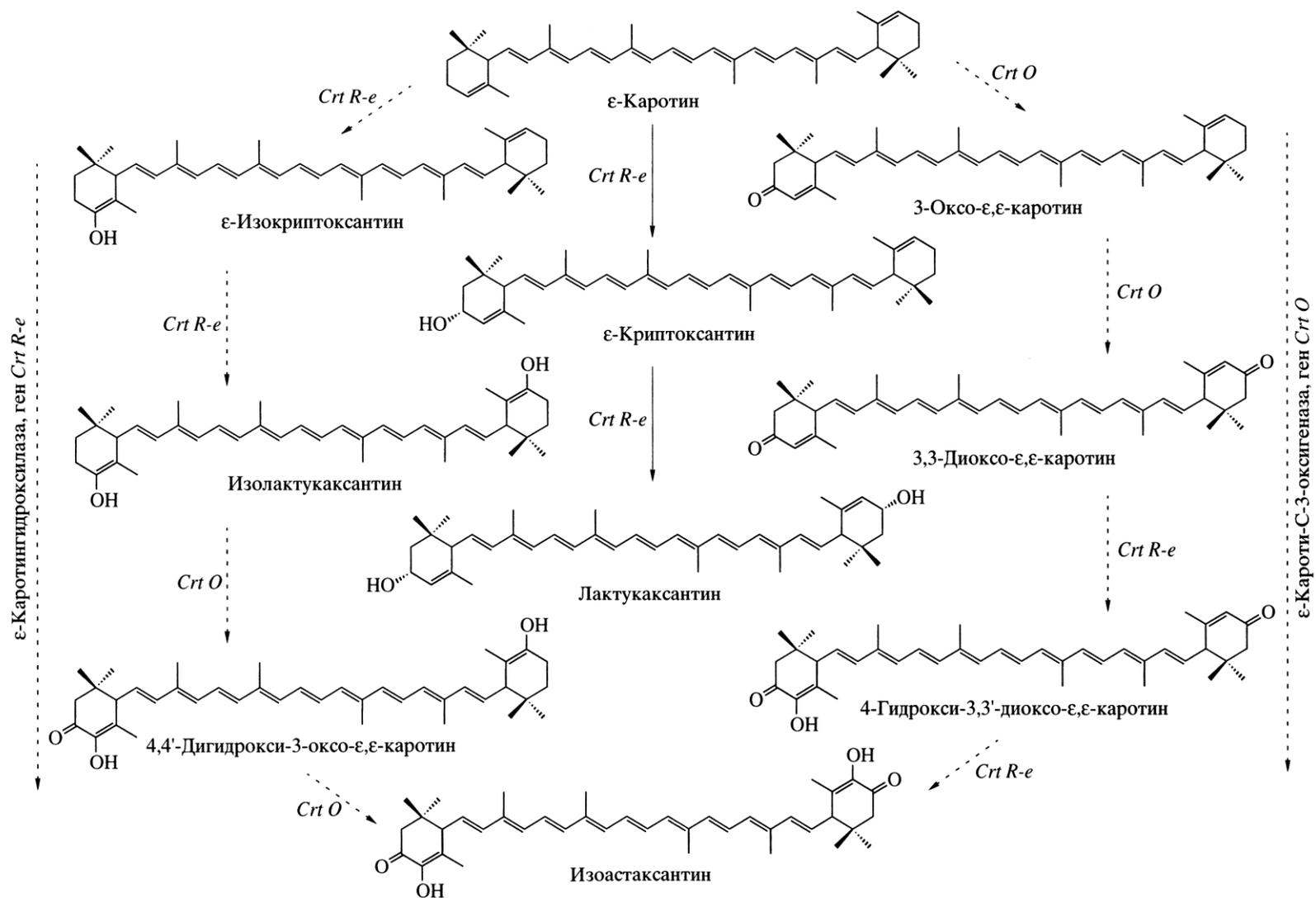


Рис. 13. Биосинтез ксантофиллов растений, производных ϵ -каротина: лактукаксантина в хлоропластах салата *Lactuca sativa* L. (Siefertmann-Harms et al., 1981) и возможные пути синтеза изоастантина предположительно с участием ферментов ϵ -каротингидроксилазы (ген $Crt R-e$) и ϵ -каротин-С-3-оксигеназы (ген $Crt O$).

Поскольку синтез гидрокси- и оксогрупп в концевых β-иононовых кольцах может осуществляться при совместном действии этих двух ферментов в любой последовательности, то они, вероятнее всего, функционируют независимо друг от друга и субстраты их синтеза различны (Hirschberg, 1998).

Известно, что среди высших растений и водорослей есть виды, у которых помимо α- и β-каротина присутствует ε-каротин (ε,ε-каротин) (Linaaen-Jensen, 1998). До сих пор очень мало известно ксантофиллов, производных ε-каротина. Так, из хлоропластов растений салата (*Lactuca sativa*) был изолирован и детально охарактеризован лактукаксантин (3,3'-дигидрокси-ε,ε-каротин) (рис. 13) (Siefermann-Harms et al., 1981). Это изомер лютеина (от α-каротина) и зеаксантина (от β-каротина). Промежуточным продуктом первой реакции гидроксирования ε-каротина является ε-криптоксантин (3-гидрокси-ε,ε-каротин). Обе реакции гидроксирования при синтезе лактукаксантина, по-видимому, катализируются ε-каротингидроксилазой, контролируемой геном *Crt R-e* (Cunningham, Gantt, 1998, 2001). Аналогичный дигидроксикаротиноид – тунаксантин (3,3'-дигидрокси-ε,ε-каротин) был обнаружен и описан у рыб *Oxyjulis californicus* (Siefermann-Harms et al., 1981; Schiedt, 1988).

Несмотря на то что ε-каротин был идентифицирован у нескольких видов водорослей (Linaaen-Jensen, 1998), каких-либо характеристик других производных от него ксантофиллов до сих пор почти нет. В то же время высокоокисленные производные ε-каротина достаточно хорошо описаны для клеток животных организмов (Schiedt, 1998). В наибольшей степени это относится к ксантофиллам, содержащим гидроксигруппы в положении С-4 и С-4' и оксогруппы в положении С-3 и С-3' углеродных атомов ε-иононовых колец (Schiedt, 1998). Они являются промежуточными продуктами и в синтезе изоастаксантина (4,4'-дигидрокси-3,3'-диоксо-ε,ε-каротина) (рис. 13).

Можно предположить, что реакции гидроксирования и оксигенирования осуществляются с помощью двух ферментов: ε-каротингидроксилазы (ген *Crt R-e*) и ε-каротин-С-3-оксигеназы (предположительно, ген *Crt O*), контролируемых разными генами. Последовательность реакций может быть такой, как представлено на рис. 13.

Однако она, по-видимому, не является жесткой, поскольку после реакции гидроксирования и образования ε-изокриптоксантина может присоединиться либо вторая гидрокси-, либо оксогруппа. Подтверждением такой точки зрения может служить факт обнаружения у рыб, ракообразных и птиц соединений типа 4-гидрокси-3'-оксо-ε,ε-каротина, 4'-гидрокси-3'-оксо-ε,ε-каротина, 4'-гидрокси-3,3'-диоксо-ε,ε-каротина, 4,4'-дигидрокси-3-оксо-ε,ε-каротина и других (Schiedt, 1998). Эти данные дают основания полагать, что синтез изоастаксантина у водорослей может осуществляться по предложенной нами схеме (рис. 13).

ЛОКАЛИЗАЦИЯ МУЛЬТИФЕРМЕНТНЫХ КОМПЛЕКСОВ

В настоящее время механизм функционирования ферментов, участвующих в биосинтезе каротиноидов, в клетках растений изучен очень слабо. Все больше накапливается сведений о том, что биосинтез каротиноидов осуществляется с помощью двух типов мультиферментных агрегатов или комплексов: а) гидрофильных, локализованных в строме хлоропластов и б) гидрофобных, ассоциированных с мембранами тилакоидов (Kleinig, Britton, 1982; Cunningham, Gantt, 1998). Первая группа ферментов исследована значительно лучше. Так, известно, что три водорастворимых фермента (рис. 14): изопентенилдифосфатизомераза, геранилгеранилдифосфатсинтаза и фитоинсинтаза (гены *Ipp 2*, *Ggps 1* и *Psy 1*), которые катализируют путь биосинтеза предшественников каротиноидов от С₅-изопреноидов до фитоина, – были изолированы вместе в составе мультиферментных комплексов (Camara, 1993). Предполагается, что гидрофобные ферменты: фитоиндесатураза (*PDS*), ζ-каротиндесатураза (*ZDS*) и ликопин-(β-и ε-)-циклазы (*LCYB* и *LSYE*) (гены *Pds 1*, *Zds 1*, *Crt L-b* и *Crt L-e*) – связаны с мембранами тилакоидов и также, вероятно, образуют мультиферментные комплексы (Cunningham, Gantt, 1998, 2001).

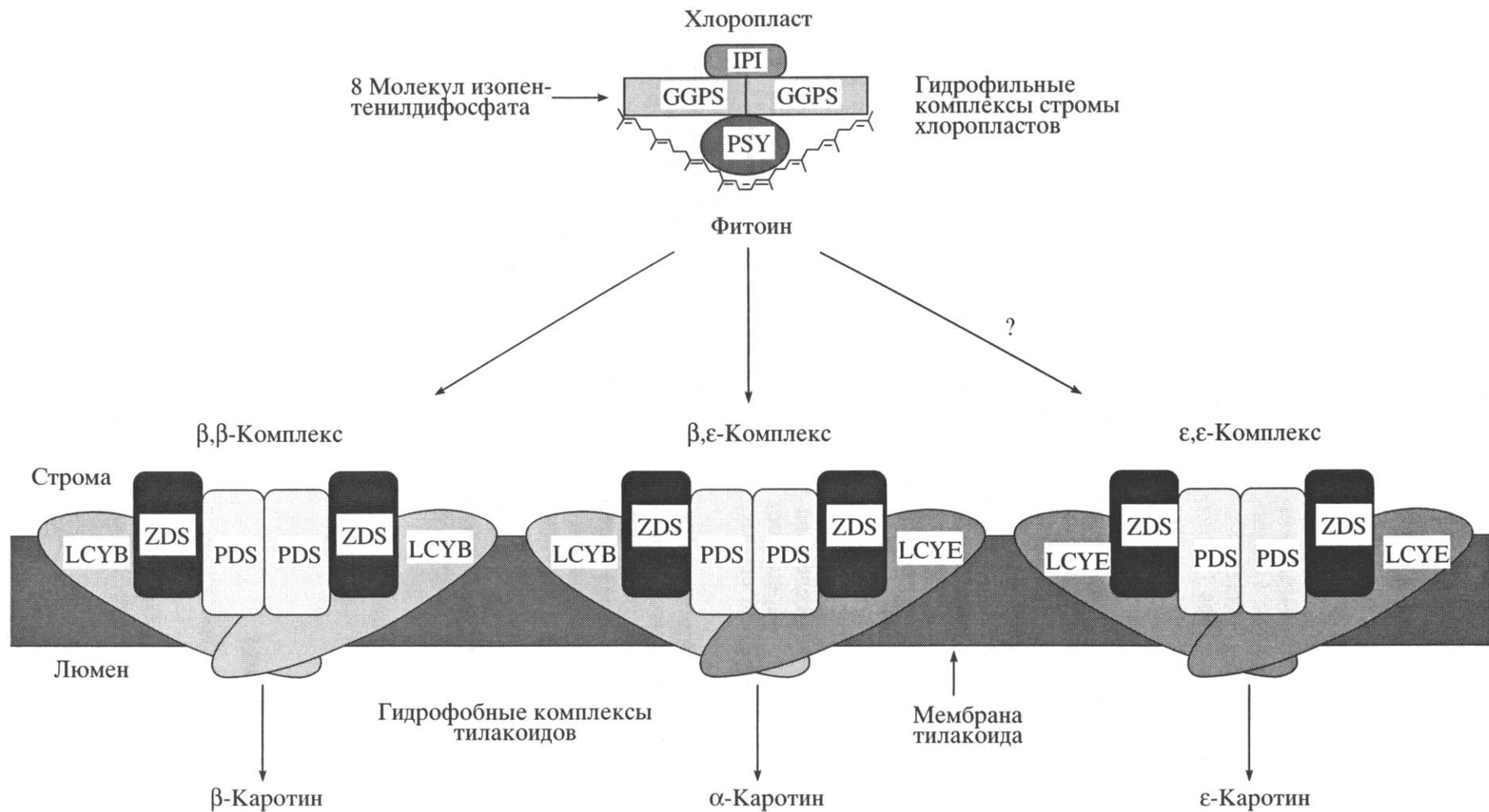


Рис. 14. Схема структурной модели предполагаемых стромальных и тилакоидных мультиферментных комплексов в хлоропластах растений (по Cunningham, Gantt, 1998). IPI – изопентенилдифосфатизомераза, GGPS – геранилгеранилдифосфатсинтаза, PSY – фитоинсинтаза, PSD – фитоиндесатураза, ZDS – ζ-каротиндесатураза, LCYB – ликопин-β-циклаза. LCYE – ликопин-ε-циклаза. Знак (?) означает возможность существования ε,ε-комплекса для синтеза ε-каротина.

Гипотетическая модель таких комплексов была предложена в 1998 г. (Cunningham, Gantt, 1998) и модифицирована нами (рис. 14).

Ранее были получены доказательства того, что гидрофильный фитоинсинтазный комплекс содержит одну копию изопентенилдифосфатизомеразы (*IPI*), две копии геранилгеранилдифосфатсинтазы (*GGPS*) в форме гомодимера (Dobgo, Camara, 1987) и одну копию фитоинсинтазы (*PSY*). Конечным продуктом реакций этого комплекса является синтез изомера 15-*cis*-фитоина. В желтых цветках нарцисса была обнаружена мембранно-связанная фитоинсинтаза, что не исключает возможности контакта такого комплекса с мембранами пластид (Schledz et al., 1996).

Что касается гидрофобных ферментов, то пока нет никаких прямых доказательств того, что мембранно-связанные десатуразы, циклазы и гидроксилазы образуют подобные мультиферментные комплексы (Candau et al., 1991). Однако в 1998 г. была выдвинута гипотеза (Cunningham, Gantt, 1998) о том, что десатуразно-циклазные ферменты тоже должны формировать агрегаты или комплексы, содержащие по две копии фитоиндесатуразы (*PDS*), ζ -каротиндесатуразы (*ZDS*) и ликопин- β -циклазы (*LCYB*) или ликопин- ϵ -циклазы (*LCYE*) (рис. 14). Учитывая, что в хлоропластах большинства водорослей и высших растений синтезируются только α -каротин (β, ϵ -каротин) и β -каротин (β, β -каротин), можно думать, что и в их пластидах, по-видимому, необходимо наличие только соответствующих двух типов десатуразно-циклазных ферментных комплексов (Cunningham, Gantt, 1998, 2001).

С помощью этой гипотезы, вероятно, можно в какой-то степени объяснить отсутствие у большинства растений ксантофиллов, производных ϵ -каротина (ϵ, ϵ -каротина), если предположить, что ферментные комплексы с двумя ликопин- ϵ -циклазами (*LCYB* и *LCYE*) у них не формируются. И лишь в очень редких случаях у растений ϵ, ϵ -комплекс может существовать, как, например, у салата *Lactuca sativa* L. Он может обеспечивать синтез как ϵ -каротина, ϵ -криптоксантина, так и лактукаксантина (3,3'-дигидрокси- ϵ, ϵ -каротина) (рис. 13) (Siefermann-Harms et al., 1981). Возможно, что ϵ, ϵ -комплекс образуется либо в дополнение к двум известным, либо взамен β, ϵ -комплекса. Однако такое предположение нельзя считать окончательно доказанным, так как генно-инженерные исследования 1999–2001 гг. показали, что методом направленного мутагенеза с помощью замены отдельных аминокислот можно добиться того, что ликопин- ϵ -циклаза обычных растений *Arabidopsis thaliana* становится способной синтезировать ϵ -каротин (до 92–98%) вместо α -каротина (Cunningham, Gantt, 2001). Мы надеемся, что дальнейшие исследования позволят ответить на вопрос, что определяет активность ферментов: число копий или его молекулярная структура.

Таким образом, с учетом важнейших современных достижений нами подробно рассмотрена цепь биосинтеза основных групп каротиноидов, производных α -, β - и ϵ -каротинов, наиболее часто встречающихся в хлоропластах высших растений и водорослей. Однако в процессе нашего обсуждения возникло много новых вопросов, представляющих большой интерес для биохимии, биофизики, генетики и физиологии растений. Для получения ответов на эти вопросы в будущем потребуются еще значительные усилия.

II. МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КАРОТИНОИДОВ

В настоящее время ведутся активные исследования по изучению функциональной роли каротиноидов и их локализации в мембранах хлоропластов. За предыдущие 10–15 лет были достигнуты значительные успехи в изучении процесса биосинтеза каротиноидов и его генетического контроля (Britton, 1998; Hirschberg, 1998; Ладыгин, 2002). Однако в вопросах локализации каротиноидов и их функционирования остается еще очень много неясного. Разноплановость полученных результатов и значительные успехи по отдельным вопросам обусловили необходимость обобщения этих результатов с целью освещения современного состояния функциональной значимости каротиноидов и участия их в фотохимических реакциях процесса фотосинтеза.

Каротиноиды являются широко распространенным классом пигментов, обнаруженных в природе. Они встречаются у бактерий, грибов, водорослей, растений и животных. В настоящее время известно более 800 видов каротиноидов (Карнаухов, 2000). Это большая группа желтых, оранжевых или красных пигментов, которые представляют собой полиеновые соединения преимущественно с 40 атомами углерода, построенные из изопреновых (C₅) единиц (обычно из восьми). Различают две группы каротиноидов: каротины и ксантофиллы. *Каротины* – это углеводороды, которые содержат в своем составе только атомы углерода и водорода. *Ксантофиллы* – это кислород-содержащие производные каротинов, которые, помимо атомов углерода и водорода, имеют атомы кислорода в виде гидрокси- (–OH), эпокси- (–O–) и оксо- (=O) групп (Britton, 1998; Ладыгин, 2000, 2002). Считается, что каротины принимают участие в организации и функционировании основных (core) комплексов реакционных центров фотосистем (Nashimoto, Koyama, 1990), в то время как ксантофиллы участвуют в организации вспомогательных светособирающих (антенных) комплексов фотосистем (Ruban et al., 2001).

К основным функциям каротиноидов можно отнести светособирающую, структурную и фотозащитную. Важная фотозащитная роль каротиноидов связана с механизмом нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла и участием их в обратимых реакциях ксантофилловых циклов. Анализу последних достижений по этим вопросам посвящена данная работа.

ХАРАКТЕРИСТИКА КАРОТИНОИДОВ ЭУКАРИОТ

В основе структуры каротиноидов лежит полиеновая цепь с большим числом ненасыщенных сопряженных двойных связей. Сопряженными называются двойные или тройные связи, разделенные одной простой связью. Если они разделены двумя или более простыми связями или две двойные связи примыкают к одному и тому же атому углерода, то они не являются сопряженными.

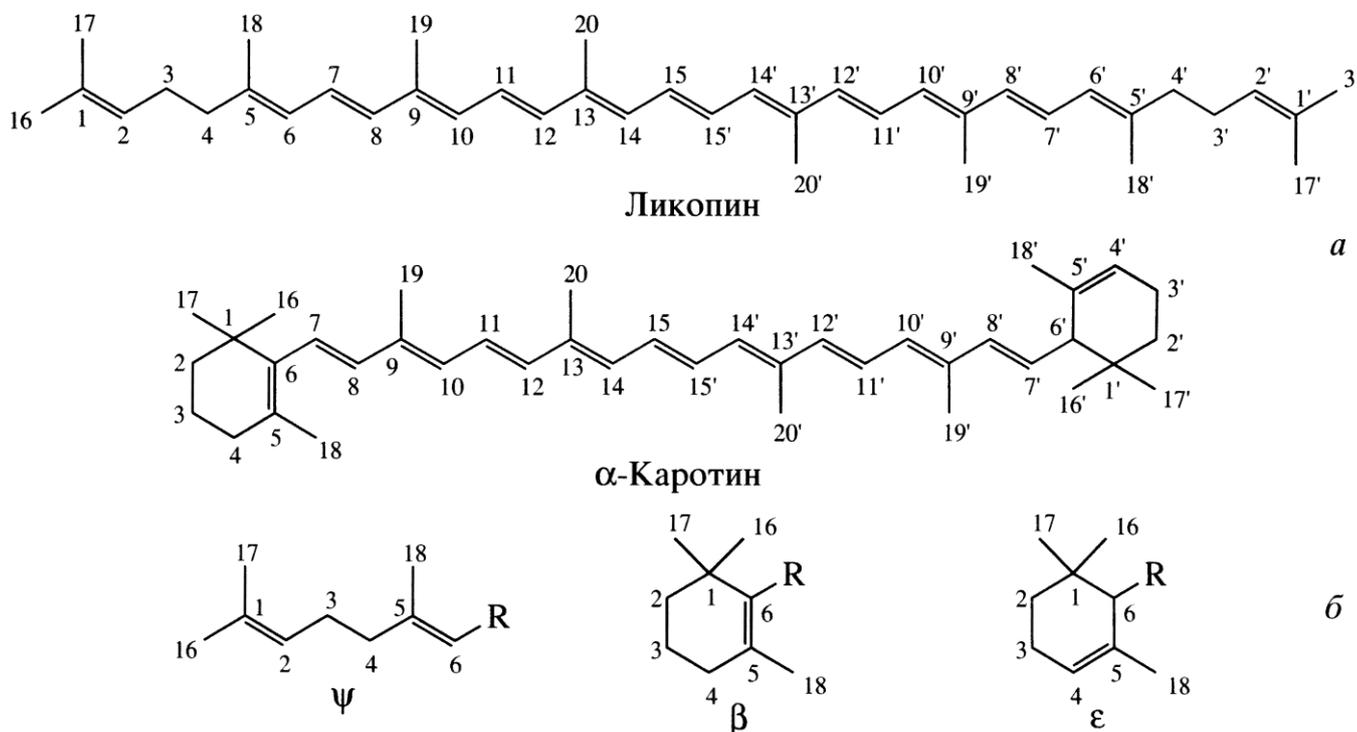


Рис. 15. Нумерация атомов углерода, структура хромофорной части (а) и наиболее характерных концевых групп (б) молекул каротиноидов в хлоропластах водорослей и высших растений (Britton, 1998; Ладыгин, 2002).

Каротиноиды хлоропластов состоят из центральной хромофорной части – линейной цепи ненасыщенных сопряженных двойных связей, и двух концевых групп – иононовых колец (рис. 15). Хромофорная группа с определенным числом сопряженных двойных связей в молекуле каротиноида обуславливает его спектр поглощения и окраску. Эти пигменты поглощают свет в области 280–550 нм.

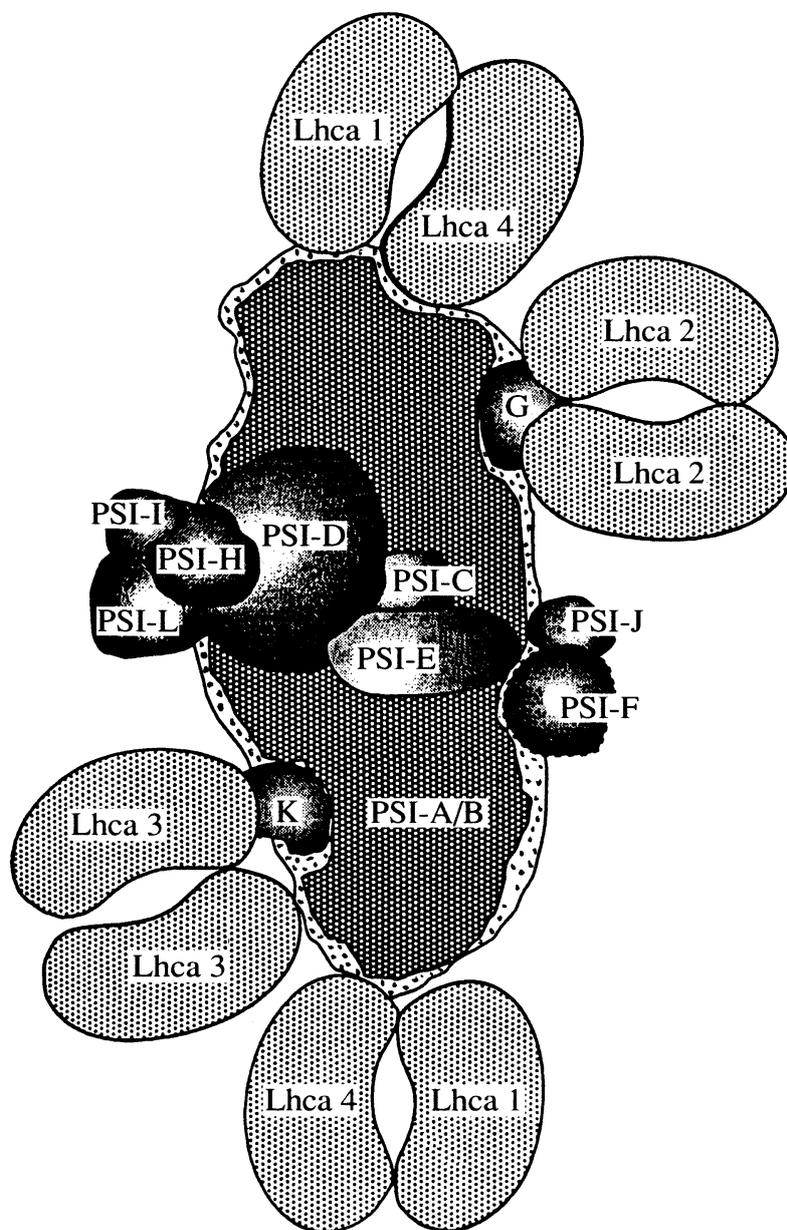


Рис. 16. Структурная организация ФС-I. Lhca 1–Lhca 4 – светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы внешней антенны ФС-I; PSI-C – PSI L, PSI-G (G), PSI-K (K) – светособирающие комплексы внутренней антенны ФС-I; PSI-A/B – ядровой хлорофилл-*a*-белковый комплекс ФС-I (Wollman et al., 1999; Fromme et al., 2003).

Поглощением света в синей области объясняется желто-оранжевая и красная окраска каротиноидов. С увеличением числа сопряженных двойных связей в молекулах каротиноидов они поглощают свет с большей длиной волны в видимой области спектра и становятся более интенсивно окрашенными. Так, в петролейном эфире фитоин, имеющий 3 сопряженные двойные связи (3 с.д.с.) и максимумы поглощения в ультрафиолетовой области $\lambda_{\max} = 275, 285$ и 296 нм, и фитофлуин (5 с.д.с.) с $\lambda_{\max} = 331, 348$ и 367 нм бесцветны. Дзета-каротин (7 с.д.с.) имеет поглощение в синем коротковолновом участке видимого спектра

($\lambda_{\max} = 378, 400, 425$ нм) и потому выглядит желтым, нейроспорин (9 с.д.с.) с $\lambda_{\max} = 414, 439, 467$ – желто-оранжевым, а ликопин (11 с.д.с.) поглощает в видимом сине-зеленом диапазоне спектра с $\lambda_{\max} = 444, 470, 502$ нм обладает характерной оранжево-красной окраской.

Сопряженные двойные связи полиеновой цепи обуславливают антиоксидантную активность и химическую реакционную способность каротиноидов по отношению к окисляющим агентам и свободным радикалам (Бриттон, 1986; Britton, 1995). Каротиноиды выполняют важные биологические функции не только как антиоксиданты, но и как предшественники витамина А (Карнаухов, 2000).

Высшие растения показывают стабильную однородность каротиноидного состава. Они содержат α -каротин, β -каротин, лютеин, зеаксантин, антраксантин, виолаксантин и неоксантин. Эти каротиноиды присутствуют в хлоропластах всех высших растений.

Редко встречаемые другие каротиноиды присущи лишь некоторым таксономическим группам, например лактукаксантин (3,3-дигидрокси- ϵ, ϵ -каротин) обнаружен только в листьях растений салата *Lactuca sativa* (Siefertmann- Harms et al., 1981).

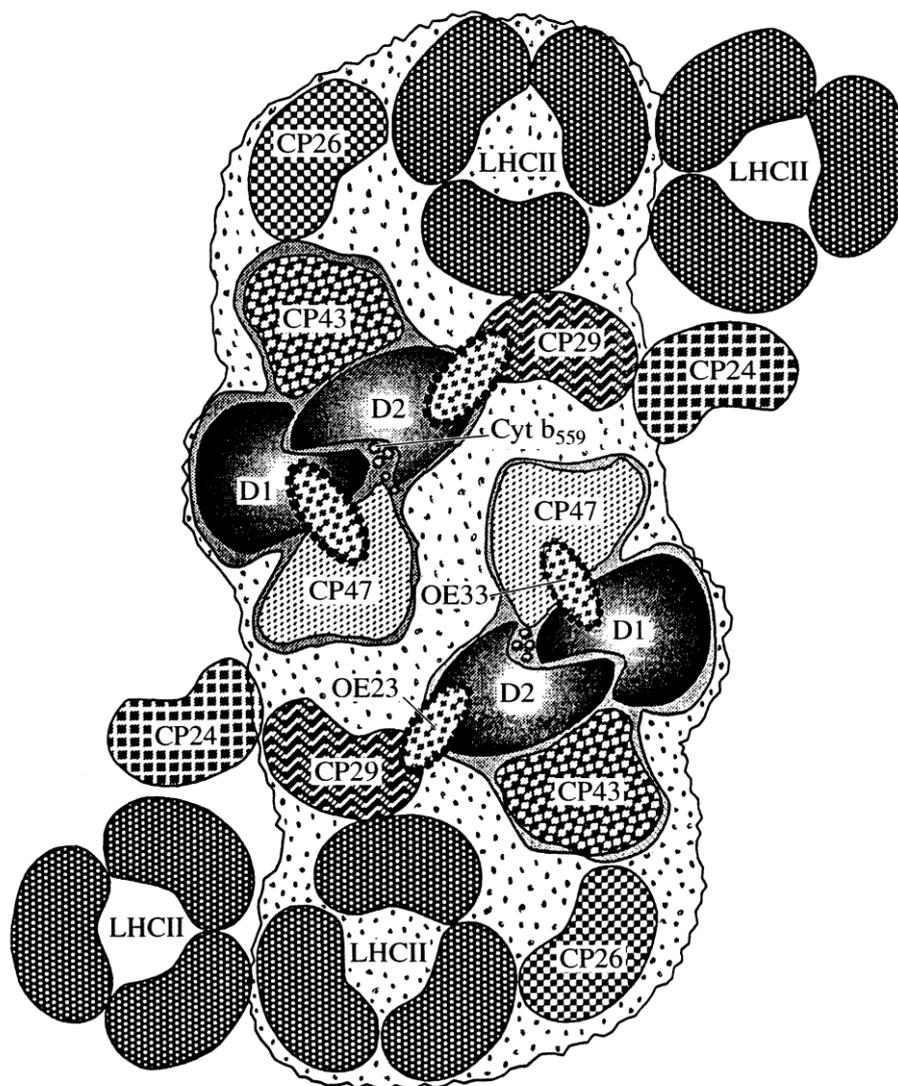


Рис. 17. Структурная организация димера ФС-II. Тримеры LHC-II – светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы внешней, периферической антенны ФС-II; CP24, CP26, CP29 – светособирающие хлорофилл-*a/b*-белковые комплексы внутренней антенны ФС-II; D1, D2, Cyt b_{559} , CP43, CP47 – ядровые хлорофилл-*a*-белковые комплексы ФС-II; OE23, OE33 – белки водоокисляющего комплекса с мол. массой 23 и 33 кД (Wollman et al., 1999; Amerongen, Dekker, 2003).

В хлоропластах зеленых водорослей (*Chlorophyta*) состав каротиноидов практически такой же, как и у высших растений, но иногда дополнительно встречается лороксантин (Ладыгин, 2000, 2002). В то же время красные (*Rhodophyta*), эвгленовые (*Euglenophyta*), а также бурые, золотистые, диатомовые и другие морские водоросли (относящиеся к *Chromophyta*) отличаются большим разнообразием каротиноидов. ϵ -Каротин (ϵ,ϵ -каротин) в малых количествах накапливается у водорослей (*Cryptophyceae*, *Diatomophyceae*, *Prasinophyceae* и *Chlorophyceae*) (Liaaen-Jensen, 1998). Все каротиноиды локализируются в пластоглобулах или тилакоидных мембранах, где распределяются гетерогенно. Часть из них связывается со специфическими хлорофилл-белковыми комплексами фотосистемы I (ФС-I) и фотосистемы II (ФС-II) (Wollman et al., 1999). Распределение каротиноидов между ядровыми комплексами реакционных центров ФС-I и ФС-II, а также между светособирающими пигмент-белковыми комплексами I и II (ЛНС-I и ЛНС-II) внутренней и внешней антенны фотосистем очень неравномерно (рис. 16, 17).

Показано, что каротины (в основном это β -каротин) принимают участие в организации и функционировании реакционных центров ФС-I и ФС-II (Nanba, Satoh, 1987; Hashimoto, Koyama, 1990), а ксантофиллы – в структуре и функции светособирающих хлорофилл-*a/b*-белковых комплексов ЛНС-I и ЛНС-II (Demmig-Adams et al., 1996; Gal et al., 1997; Peterman et al., 1997; Amerongen, Dekker, 2003; Fromme et al., 2003; Green et al., 2003). Установлено также, что α -каротин, как и β -каротин, может связываться в основном с реакционными центрами ФС-I и ФС-II и только в малых количествах – с их светособирающими комплексами (Young, Britton, 1989).

В исследованиях последних лет была обнаружена важная функциональная роль каротиноидов, участвующих в обратимых реакциях ксантофилловых циклов. Было показано, что в хлоропластах эукариот ключевая роль принадлежит ксантофиллам виолаксантинового цикла (виолаксантин, антераксантин и зеаксантин), которые связываются главным образом со светособирающими хлорофилл-*a/b*-белковыми комплексами ЛНС-I и ЛНС-II (Siefertmann-Harms, 1985; Thayer, Bjorkman, 1992; Lee, Thornber, 1995; Yamamoto, Bassi, 1996). Эти ксантофиллы распределены неравномерно среди различных комплексов ЛНС-I и ЛНС-II. Считается, что обогащение каротиноидами ксантофиллового цикла в большей степени присуще минорным компонентам светособирающих хлорофилл-*a/b*-белковых комплексов (CP29, CP26 и CP24), образующих внутреннюю антенну ФС-II (рис. 17), чем главному светособирающему комплексу ФС-II (тримеры ЛНС-II), формирующему внешнюю периферическую антенну (Bassi et al., 1993; Ruban et al., 1994; Lee, Thornber, 1995; Demmig-Adams et al., 1996; Goss et al., 1997; Verhoeven et al., 1999; Wollman et al., 1999).

В минорных комплексах локализуется до 80% пигментов ксантофиллового цикла, в то время как в состав главного периферического комплекса ЛНС-II входит лишь 20% этих пигментов (Gilmore et al., 1998). Важно отметить, что ксантофиллы находятся в этих комплексах в непосредственной близости к хлорофиллу. Помимо фотосинтетических мембран каротиноиды есть и в оболочках хлоропластов, в том числе около 1% виолаксантина (Siefertmann et al., 1978; Douce, Joyard, 1979; Joyard et al., 1998). Установлено, что деэпоксидация виолаксантина до зеаксантина происходит как в тилакоидах гран, так и в тилакоидах стромы (Siefertmann, Yamamoto, 1976).

ЛОКАЛИЗАЦИЯ НАИБОЛЕЕ ВАЖНЫХ КСАНТОФИЛЛОВ

Большой прогресс в вопросах биосинтеза каротиноидов был достигнут недавно с помощью новых молекулярных манипуляций, которые позволили на генетическом уровне частично разобраться в биосинтетическом пути ксантофиллов у высших растений и водорослей (Britton, 1998; Cunningham, Gantt, 2001; Ладыгин, 2002). В течение последнего десятилетия были клонированы гены ферментов, участвующих в синтезе α -каротина (β,ϵ -каротин) и β -каротина (β,β -каротин) (Sandmann, 1994; Cunningham, Gantt, 1998, 2001). Главными ксантофиллами, которые могут встречаться в фотосинтезирующих органах

растений, являются лютеин (3,3'-дигидрокси- α -каротин), зеаксантин (3,3'-дигидрокси- β -каротин), антераксантин (3,3'-дигидрокси-5,6-эпокси- β -каротин), виолаксантин (3,3'-дигидрокси-5,6,5',6'-диэпокси- β -каротин) и 9'-*cis*-неоксантин (3,3'-дигидрокси-5',6'-эпокси- β -каротин). Лютеин синтезируется из α -каротина, в то время как другие четыре ксантофилла являются производными β -каротина (рис. 18). Недавно были клонированы гены из *Arabidopsis thaliana* (Sun et al., 1996) и из плодов перца *Capsicum annuum* (Bouvier et al., 1998) и установлены аминокислотные последовательности β -каротиновой гидроксилазы, которая связывает гидроксигруппу с третьим атомом углерода С3 β -иононового кольца.

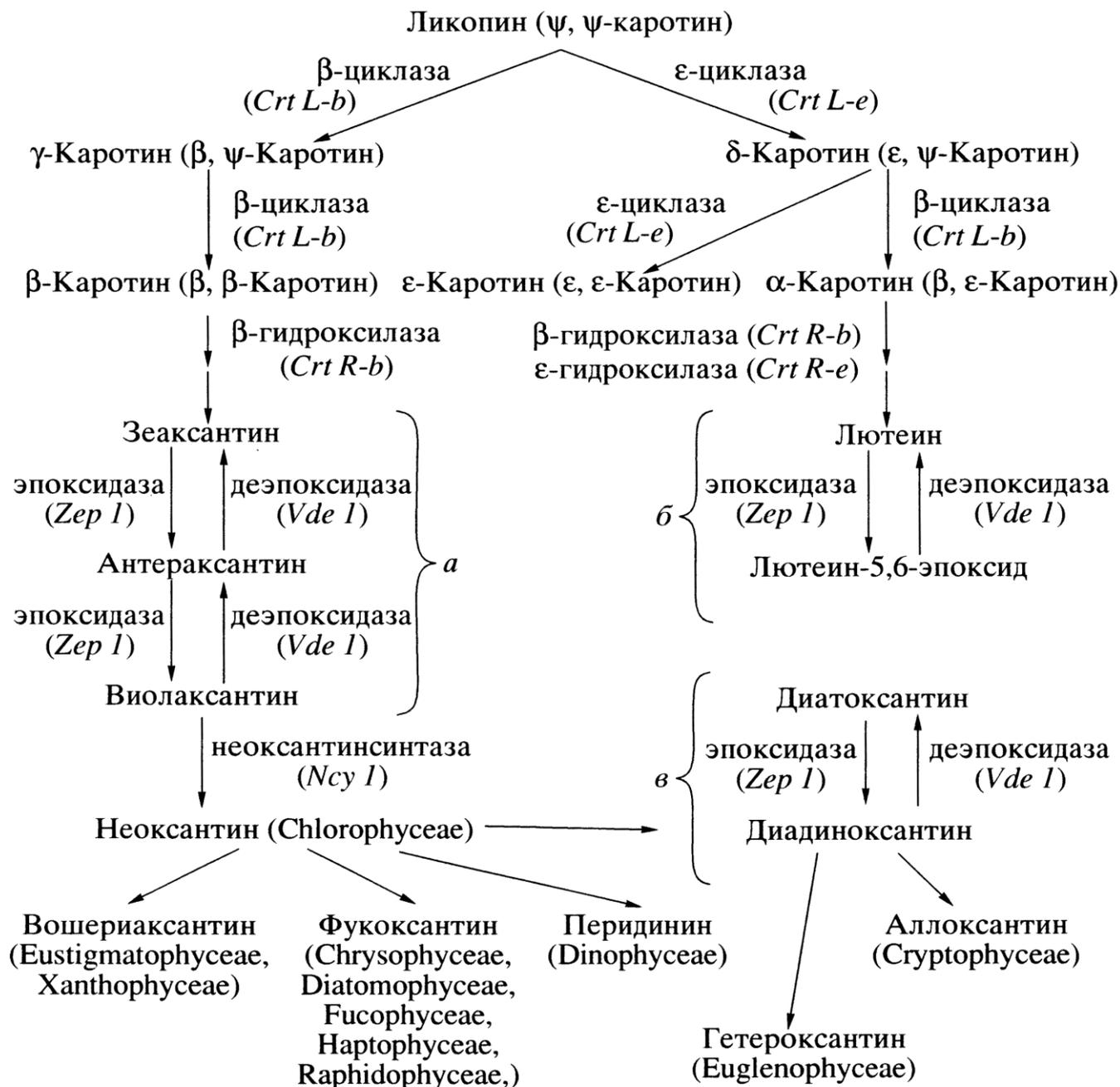


Рис. 18. Пути биосинтеза основных каротиноидов в хлоропластах эукариот. Показано три типа ксантофилловых циклов: виолаксантинового (*a*), лютеин-5,6-эпоксидного (*b*) и диадиноксантинового (*c*). В нижней части схемы перечислены основные ксантофиллы, выполняющие светособирающую функцию у разных таксонов водорослей (Ладыгин, 2002; Macpherson, Hiller, 2003; Scheer, 2003).

С помощью фермента β -гидроксилазы показано превращение эндогенного β -каротина до зеаксантина через промежуточное соединение β -криптоксантин (3-гидрокси- β -каротин) у *Arabidopsis thaliana*.

У высших растений и зеленых водорослей (*Chlorophyta*) зеаксантин вначале эпоксируется до 5,6-моноэпоксида антраксантина, а затем до 5,6,5',6'-диэпоксида виолаксантина с помощью фермента зеаксантиновой эпоксидазы (рис. 19), локализованной на внешней стороне мембраны тилакоида (Hager, Holocher, 1994). Генетические исследования на мутантах *Arabidopsis thaliana* (Rock, Zeevaart, 1991), *Nicotiana plumbaginifolia* (Marin et al., 1996) и зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* (Niyogi et al., 1997) показали, что эти организмы содержат только один ген *Zep 1*, который ответственен за эпоксидазную реакцию как в биосинтезе антраксантина и виолаксантина, так и лютеин-5,6-эпоксида и диадиноксантина в других ксантофилловых циклах (рис. 18, а-в) (Demmig-Adams et al., 1996; Bungard et al., 1999; Lavaud et al., 2002).

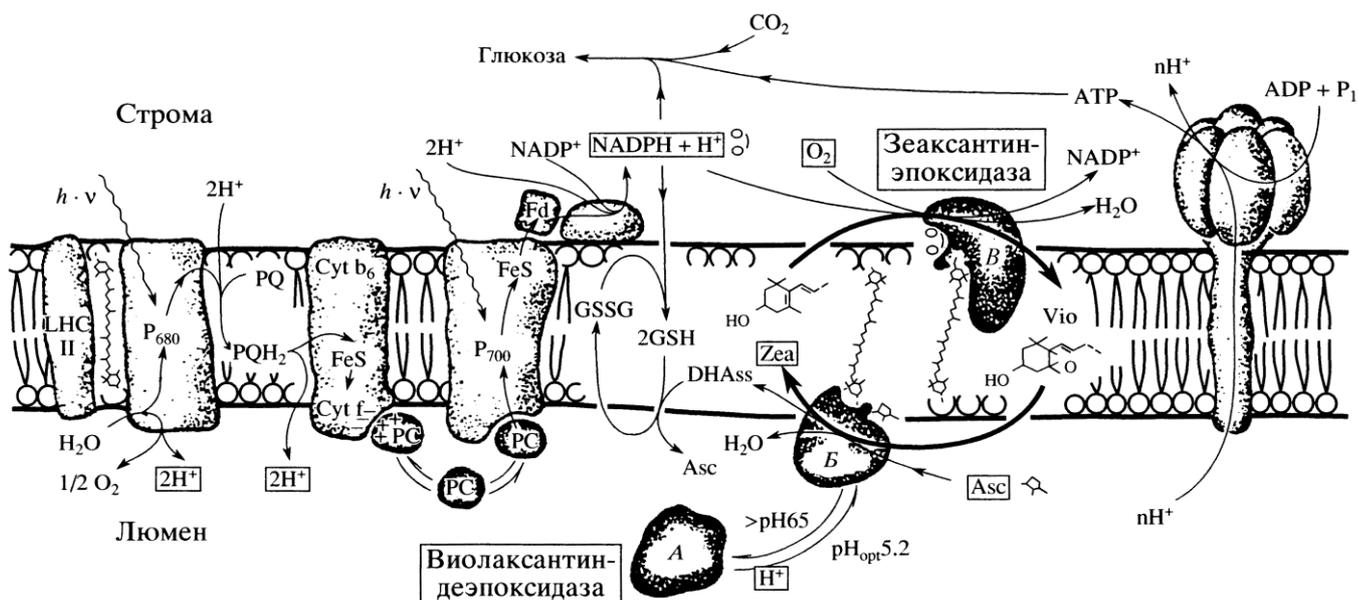


Рис. 19. Локализация ферментов в мембранах тилакоидов: виолаксантиновой дезэпоксидазы в неактивном (А) и активном (Б) состояниях и прочно связанной зеаксантиновой эпоксидазы (В) (Hager, Holocher, 1994).

В виолаксантиновом цикле (рис. 18, а), локализованном в тилакоидных мембранах хлоропластов, в условиях избыточного освещения виолаксантин быстро дезэпоксируется до антраксантина и зеаксантина (Goss et al., 1998) с помощью кодируемого геном *Vde 1* фермента виолаксантиновой дезэпоксидазы (рис. 19), которая локализуется в люмене на внутренней стороне мембраны тилакоида. Ее максимальная активность наблюдается при рН 5.2, а при рН 6.5 и выше она становится неактивной. В темноте и при слабой интенсивности света зеаксантин превращается обратно в виолаксантин с помощью зеаксантиновой эпоксидазы (Hager, 1980; Hager, Holocher, 1994). Ген *Zep 1*, кодирующий зеаксантиновую эпоксидазу, был выделен и идентифицирован в листьях *Nicotiana plumbaginifolia*, *Arabidopsis thaliana* (Marin et al., 1996) и в плодах перца *Capsicum annuum* (Bouvier et al., 1996). Получено доказательство, что зеаксантиновая эпоксидаза, прикрепленная к внешней стромальной стороне тилакоидной мембраны, становится максимально функционально активной при рН 7.5 (Siefermann, Yamamoto, 1975a; Hager, Holocher, 1994). Полученная с помощью генной инженерии очищенная зеаксантиновая эпоксидаза из плодов перца участвует в реакциях только с ксантофиллами, имеющими гидроксильную группу у третьего атома углерода С3 или С3' иононовых колец, полученных из β -каротина, т.е. с β -криптоксантином, зеаксантином или антраксантином, но не использует как субстрат сам β -каротин (Bouvier et

al., 1996). Мутанты с нарушениями в гене *Zep 1* зеаксантиновой эпоксидазы накапливали большое количество зеаксантина, но не могли синтезировать антраксантин и виолаксантин и были дефицитны как по этим пигментам, так и по неоксантину (Rock, Zeevaart, 1991; Marin et al., 1996; Niyogi et al., 1997). Эти результаты подтвердили более раннее предположение о том, что виолаксантин является прямым предшественником неоксантина. Однако фермент неоксантиновая синтаза (ген *Ncy*), катализирующий образование *trans*- или *9'-cis*-неоксантина из виолаксантина, был идентифицирован лишь недавно (Al-Babili et al., 2000; Bouvier et al., 2000).

В отличие от хлорофилл-*a/b*-содержащих зеленых водорослей из отдела *Chlorophyta* (Liaaen-Jensen, 1998) среди морских и океанических хлорофилл-*a/c*-содержащих водорослей, относящихся к отделу *Chromophyta* (Christensen, 1989; Liaaen-Jensen, 1998), можно обнаружить значительно более разнообразный набор каротиноидов, в основном производных β -каротина (Björnland, Liaaen-Jensen, 1989). Из них следует особо отметить ксантофиллы, содержащие алленовую или ацетиленовую группу. Это связано с тем, что наличие алленовой группы часто характерно для светособирающих ксантофиллов (рис. 18), таких как фукоксантин у диатомовых (*Diatomophyceae*), бурых (*Fucophyceae*, или *Phaeophyceae*) и гаптофитовых (*Haptophyceae*, или *Prymnesiophyceae*) водорослей, перидинин у динофлагеллят (*Dinophyceae*) или вошериаксантин у ксантофитов (*Xanthophyceae*) (Anderson, Barrett, 1986; Wilhelm, 1990; Björnland, Liaaen-Jensen, 1989). Ацетиленовая группа обнаружена у таких каротиноидов, как диатоксантин, его 5,6-моноэпоксид диадиноксантин, гетероксантин у эвгленовых (*Euglenophyceae*) и аллоксантин у криптофитовых (*Cryptophyceae*) (рис. 18). У морских и океанических хлорофилл-*a/c*-содержащих водорослей, таких, как диатомовые, бурые, динофлагелляты, гаптофиты и ксантофиты, реакции взаимопревращений диадиноксантина и диатоксантина осуществляются при функционировании диадиноксантинового цикла (рис. 18, в), который является альтернативой виолаксантиновому циклу (Hager, 1980; Björnland, Liaaen-Jensen, 1989; Liaaen-Jensen, 1998; Al-Babili et al., 2000; Bouvier et al., 2000). В дальнейшем было установлено, что у морских водорослей в определенных условиях оба эти цикла могут функционировать одновременно (Lohr, Wilhelm, 1999, 2001).

У водорослей был клонирован только один ген *CrtL-b* (ликопин- β -циклазы), контролирующей образование β -каротина как у хлорофилл-*a/b*- (*Chlorophyta*), так и у хлорофилл-*a/c*-содержащих (*Chromophyta*) эукариот. В обоих случаях реакции, ведущие к синтезу β -каротина, катализирует фермент ликопин- β -циклаза (Scheer, 2003). В течение длительного времени наш взгляд на ксантофилловый синтез у этих водорослей основывался большей частью на хемисистематических соображениях, которые предполагали, что виолаксантин является общим предшественником всех каротиноидов, содержащих алленовые или ацетиленовые группы (Milborrow, 1982; Björnland, Liaaen-Jensen, 1989; Ладыгин, 2000, 2002). Недавно удалось подтвердить эту гипотезу, показав, что у диатомовых, бурых и других водорослей, обладающих диадиноксантиновым циклом, при оптимальных условиях освещения также содержатся в очень малых количествах пигменты виолаксантинового цикла. Однако, когда быстрорастущие адаптированные к слабому свету водоросли подвергали резкой смене интенсивности освещения в течение нескольких часов, они накапливали значительные количества ксантофиллов виолаксантинового цикла (Lohr, Wilhelm, 1999, 2001). Детальные исследования на диатомовой водоросли *Phaeodactylum tricorutum* показали, что виолаксантин является промежуточным соединением в биосинтезе диадиноксантина (Lohr, Wilhelm, 1999). Другие авторы (Goericke, Welschmeyer, 1992), исходя из экспериментов на диатомовой водоросли *Thalassiosira weissflogii*, предположили, что диадиноксантин в свою очередь может служить предшественником фукоксантина (Lohr, Wilhelm, 1998, 1999). Широкое распространение виолаксантина у зеленых (*Chlorophyta*) и цветных (*Chromophyta*) водорослей наводит на мысль о том, что биосинтетический путь от β -каротина до виолаксантина у них одинаков.

Исследования биосинтетического пути ксантофиллов у диатомовой водоросли *P. triornutum*, начиная от β -каротина до виолаксантина, позволили: 1) идентифицировать число потенциальных промежуточных соединений на пути до виолаксантина, 2) изучить последовательность превращения пигментов от виолаксантина до фукоксантина, предложить математическую модель путей каротиноидных взаимопревращений у диатомовых водорослей, предполагая, что биосинтез виолаксантина у них идет по тому же пути, как у зеленых водорослей и высших растений (Lohr, Wilhelm, 1999, 2001).

Кроме того, интересно отметить, что в процессе биосинтеза виолаксантина из β -каротина были идентифицированы два возможных промежуточных соединения, а именно, β -криптоксантин и β -криптоксантин-5,6-эпоксид. На сильном свете накапливается β -криптоксантин, а на слабом преобладает β -криптоксантин-5,6-эпоксид. Возможно, так происходит в результате повышенной активности на сильном свете фермента виолаксантиновой дезэпоксидазы. Предположение, что зеаксантин является обязательным промежуточным соединением в синтезе виолаксантина, приводит к большим расхождениям между измеренными и рассчитанными скоростями его эпоксидации на слабом свете. В условиях слабого света вместо зеаксантина в биосинтез виолаксантина у диатомовых водорослей может быть вовлечен β -криптоксантин-5,6-эпоксид, который может превращаться сразу в антераксантин, минуя стадию синтеза зеаксантина.

Для *P. triornutum* и *Cyclotella meneghiniana* были определены кинетики нескольких этапов превращения ксантофиллов (Lohr, Wilhelm, 2001). Экспериментально определенные скорости превращения ксантофиллов были использованы для оценки гипотетического пути их синтеза у диатомовых водорослей. Для этой цели была разработана математическая модель, которая позволила рассчитать теоретические скорости превращения пигментов для микроводорослей при стабильных условиях освещения и роста. Сравнение измеренных и рассчитанных скоростей превращения пигментов хорошо согласуется с предполагаемым синтезом фукоксантина через виолаксантин.

ФУНКЦИИ КАРОТИНОИДОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ

1. Светособирающая функция каротиноидов

Поглощение фотонов света антенными пигментами имеет ключевое значение для фотосинтетической цепи переноса электронов и функционирования хлоропластов. В процессе фотосинтеза в качестве вспомогательных пигментов каротиноиды поглощают свет в области 350–550 нм и передают дополнительную энергию на хлорофиллы.

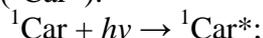
Коротковолновые формы хлорофиллов светособирающей антенны поглощают фотоны красного света с большей энергией (длина волны 650–680 нм), чем длинноволновые формы реакционных центров ФС-I и ФС-II (длина волны 680–710 нм). В фотосистемах энергия квантов света как бы “стекает вниз” в сторону более длинноволновых форм хлорофиллов, т.е. величина энергии квантов света все время уменьшается при переходе от пигментов антенны к пигментам реакционных центров P_{680} ФС-II и P_{700} ФС-I (Гудвин, Мерсер, 1986; Horton et al., 1996, 1999).

Каротиноиды в отличие от хлорофиллов поглощают свет в сине-зеленой области. Это особенно важно для водных морских и океанических видов водорослей, которые в их естественной среде хорошо обеспечены сине-зеленым, но не красным светом вследствие его сильного поглощения водной средой. В сине-зеленой области спектра каротиноиды более эффективны в собирании света, чем хлорофиллы, что определяется их высокой концентрацией и эффективной миграцией энергии на хлорофилл (Siefertmann-Harms, 1987). Будучи вспомогательными пигментами, каротиноиды передают поглощенную энергию на молекулы хлорофилла *a*, находящиеся на энергетически низком уровне синглетно-возбужденного состояния S_1 . У растений энергия квантов света с молекул ксантофиллов светособирающего комплекса ФС-II передается на молекулы хлорофилла *a* с

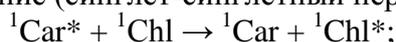
эффективностью соответственно: от виолаксантина – 54%, лютеина – 62%, неоксантина – 85%, а от хлорофилла *b* – 97% (Siefertmann-Harms, 1985; Gruszecki et al., 1999).

Последовательность реакций, начинающихся с перехода молекул каротиноидов в возбужденное состояние до осуществления фотосинтетической активности, состоит из нескольких этапов (Siefertmann-Harms, 1987):

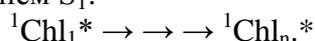
1) поглощение фотона света ($h\nu$) и переход молекулы каротиноида (Car) в возбужденное синглетное состояние ($^1\text{Car}^*$):



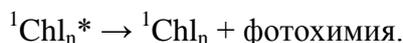
2) от каротиноида в возбужденном синглетном состоянии S_1 ($^1\text{Car}^*$) энергия возбуждения передается на основное состояние хлорофилла (^1Chl), который переходит в синглетно-возбужденное состояние (синглет-синглетный перенос):



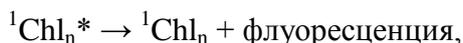
3) от единичных молекул хлорофилла (Chl_1) в синглетно-возбужденном состоянии энергия возбуждения передается на другие длинноволновые молекулы хлорофиллов (Chl_n) с более низким энергетическим уровнем S_1 :



Молекулы хлорофиллов в синглетно-возбужденном состоянии ($^1\text{Chl}_n^*$) передают часть своей энергии возбуждения в реакционные центры ФС-I и ФС-II, где индуцируются фотохимические реакции:



Эта фотохимическая реакция в хлоропластах растений приводит в движение все фотосинтетические процессы с участием ФС-I и ФС-II до выделения O_2 и фиксации CO_2 . Неиспользованная часть энергии возбуждения либо высвечивается с молекул хлорофилла в виде флуоресценции,



либо превращается в тепло, как правило, с участием каротиноидов. Аналогичные процессы осуществляются, когда фотохимическая реакция блокирована или отсутствует, как, например, в выделенных светособирающих пигмент-белковых комплексах ЛНС-I и ЛНС-II или у мутантов с нарушением фотосистем (Siefertmann-Harms, 1987; Demmig-Adams et al., 1996; Ладыгин, 1998).

2. Фотозащитная функция каротиноидов

В защите хлоропластов от повреждающего действия света наиболее существенную роль играют каротиноиды. Они действуют непосредственно или опосредованно с помощью ряда защитных механизмов в тех случаях, когда система становится сверхвозбужденной. В изменяющихся световых условиях эти защитные механизмы являются важными для фотосинтетического аппарата, уменьшают риск его повреждения и действуют как “аварийные клапаны” (Niyogi, 1999; Falkowski, Chen, 2003).

Большинство защитных механизмов с участием каротиноидов основано на их очень быстрой внутренней конверсии, которая осуществляется благодаря высокой плотности колебательных состояний лабильных молекул в сочетании с сильным запретом перехода $S_0 \rightarrow S_1$ возбуждения. Вторым важным фактором является очень низкий энергетический уровень триплетов каротиноидов, который у многих из них ниже, чем у триплетов хлорофилла, и также ниже, чем у синглетного кислорода (1274 нм, 7849 см^{-1} или 93.9 кДж/моль).

Сейчас известно четыре основных фотозащитных механизма с участием каротиноидов.

1. Каротиноиды действуют как фильтры, которые уменьшают количество синего и ближнего ультрафиолетового света, достигающего фотосинтетического аппарата. Такую же функцию они выполняют в нефотосинтезирующих организмах или тканях, например астаксантин у водоросли *Hematococcus pluvialis* (Kobayashi et al., 1991) и 9-*cis* и all-*trans*- β,β' -

каротины у *Dunaliella bardawil* (Ben-Amotz et al., 1989), где большинство каротиноидов локализуется в органеллах типа “олеосом”. Эти водоросли продуцируют каротиноиды в таких количествах, что они используются как коммерческий источник для естественного астаксантина и β,β' -каротина соответственно (Ben-Amotz et al., 1989; Kobayashi et al., 1991).

2. Каротиноиды могут действовать как тушители возбужденных синглетных состояний хлорофилла, так как нижний уровень энергии их синглетного возбужденного состояния находится ниже уровня энергии синглетного возбужденного состояния хлорофилла:



Уровень энергии возбужденных состояний каротиноидов может изменяться при увеличении или уменьшении числа конъюгированных двойных связей (рис. 20, 21), что приводит к изменению функций каротиноидов: доноров энергии (пигменты антенны), передающих поглощенную энергию на реакционные центры, и акцепторов энергии (тушители), абсорбирующих и рассеивающих избыточный свет.

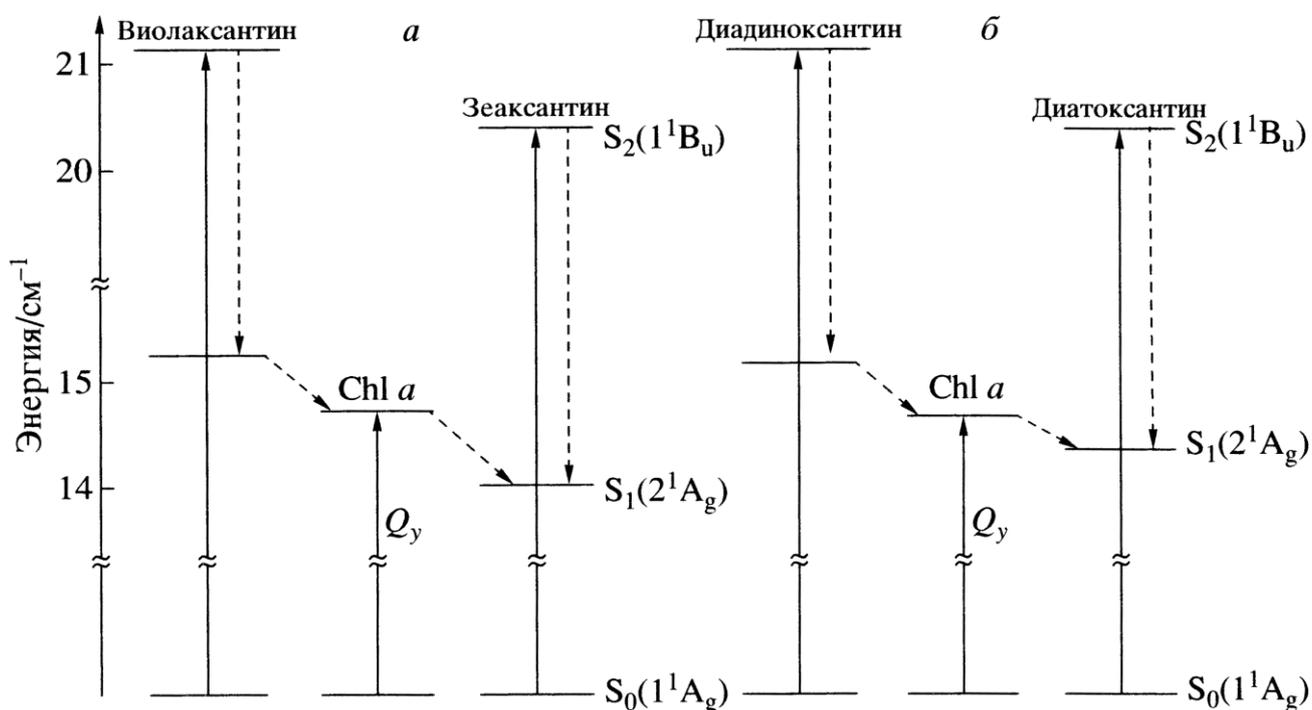


Рис. 20. Энергетические уровни каротиноидов виолаксантинового (а) и диадиноксантинового (б) циклов в S₁- и S₂-состояниях относительно хлорофилла а (Frank et al., 1994, 1996; Horton et al., 1999).

Такое изменение функций каротиноидов между сбориением света и рассеиванием энергии было подробно изучено в виолаксантиновом цикле растений, в котором виолаксантин превращается в зеаксантин. Светособирающий пигмент виолаксантин, содержащий девять конъюгированных двойных связей, дважды обратимо дезоксидируется до зеаксантина, содержащего одиннадцать сопряженных двойных связей (рис. 21), путем прибавления двух двойных связей Δ5 и Δ5' (Scheer, 2003).

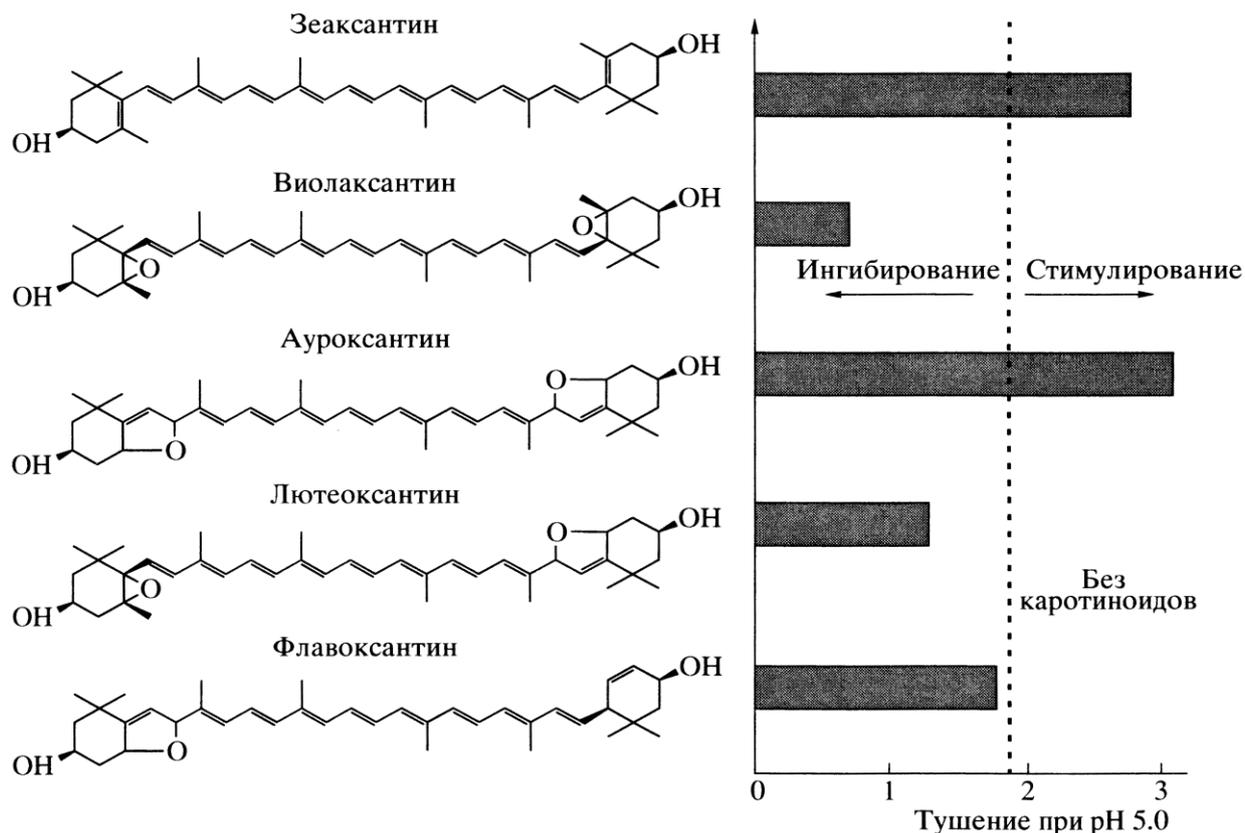
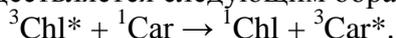


Рис. 21. Влияние различных каротиноидов, содержащих C5,6 или C5,8 эпоксидные группы, на эффективность тушения флуоресценции хлорофилла светособирающего комплекса ФС-II при pH 5.0 (Ruban et al., 1998b; Horton et al., 1999).

Похожие циклы эпоксидации–деэпоксидации, участвующие в защите клеток от светоиндуцированного повреждения, были обнаружены в морских и океанических водорослях с участием диатиноксантина и диатоксантина (Lohr, Wilhelm, 1998, 1999; Lavaud et al., 2002, 2003). Деэпоксирированные зеаксантин и диатоксантин приобретают свойства тушителя и участвуют в нефотохимическом тушении флуоресценции хлорофилла. Механизм нефотохимического тушения пока до конца не ясен. Предполагается прямой способ его реализации, суть которого состоит в том, что состояние S_1 виолаксантина лежит выше S_1 расположенных рядом молекул Chl *a*, в то время как состояние S_1 зеаксантина ниже, чем состояние s_1 как виолаксантина, так и Chl *a* (Frank et al., 2000). Поэтому виолаксантин может быть донором синглетной энергии, а зеаксантин – акцептором (тушителем). Поскольку возбужденные состояния каротиноидов являются короткоживущими, то передача энергии от них и к ним эффективна только при очень малом расстоянии между донором и акцептором. Поэтому даже небольшие структурные изменения могут привести к большим различиям в эффективности передачи энергии, в частности для механизма Декстера (Owens et al., 1992).

Каротиноиды могут быть тушителями триплетных состояний хлорофилла. Несмотря на то что синглетные состояния каротиноидов находятся выше синглетных состояний хлорофилла, их триплетные состояния гораздо ниже триплетных состояний хлорофилла. Молекула хлорофилла, находящаяся в возбужденном триплетном состоянии ($^3\text{Chl}^*$), реагирует с молекулой каротиноида, находящейся в основном синглетном состоянии (^1Car). В результате молекула хлорофилла переходит в основное синглетное состояние (^1Chl), а молекула каротиноида – в первое возбужденное триплетное состояние ($^3\text{Car}^*$). Эта спинразрешающая реакция осуществляется следующим образом:



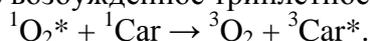
Для этого процесса требуется тесный контакт между пигментами, потому что эта передача энергии, вероятно, происходит посредством механизма обмена электронов. Хотя образование хлорофилловых триплетов является обычно медленным процессом (μs), но в фотосинтезирующих организмах он может быть на несколько порядков быстрее (Scheer, 2003).

Далее происходят интеркомбинационная конверсия и колебательная релаксация в молекуле каротиноида, и она переходит в основное синглетное состояние, растратив избыток энергии в виде тепла:



В этом механизме тушения каротиноид принимает на себя энергию возбужденного хлорофилла и препятствует его взаимодействию с молекулярным кислородом, тем самым предотвращая фотоокислительное разрушение хлорофилла.

4. Не менее важно то, что каротиноиды являются тушителями активных форм кислорода (${}^1\text{O}_2$, OH^\cdot) (Владимиров, 1998). Молекула каротиноида в синглетном состоянии ${}^1\text{Car}$ взаимодействует с молекулой кислорода в возбужденном синглетном состоянии ${}^1\text{O}_2^*$. В результате молекула кислорода переходит в основное триплетное состояние (${}^3\text{O}_2$), а молекула каротиноида – в первое возбужденное триплетное состояние (${}^3\text{Car}^*$)



Далее происходят интеркомбинационная конверсия и колебательная релаксация ${}^3\text{Car}^*$ в ${}^1\text{Car}$ и тепло, как в пункте 3.

Реакция тушения активных форм кислорода является спин-разрешенной, поэтому триплетные состояния каротиноидов с низким энергетическим уровнем могут быстро тушить синглетный кислород. Триплеты каротиноидов имеют такую низкую энергию, что повреждающими эффектами можно, вероятно, пренебречь. Они расположены локально и являются сравнительно короткоживущими. В процессе фотофизического тушения происходит восстановление каротиноида через ISC-релаксацию: ${}^3\text{Car}$ до ${}^1\text{Car}_0$ (Edge, Truscott, 1999; Scheer, 2003).

Нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла. Последние годы активно обсуждается коррелятивная зависимость между содержанием зеаксантина и типом тушения флуоресценции хлорофилла при фотоингибирующем стрессе (Demmig-Adams et al., 1996; Gilmore, 1997). Исследователи предполагают, что зеаксантин вовлечен в процесс безызлучательной диссипации энергии, который имеет место в светособирающем хлорофилл-*a/b*-белковом комплексе ФС-II и позволяет переводить возбужденный хлорофилл в его основное состояние посредством тепловой эмиссии (Demmig et al., 1987; Demmig-Adams, 1990; Gilmore, Govindjee, 1999; Müller et al., 2001). В светособирающем хлорофилл-*a/b*-белковом комплексе ЛНС-II триплетные состояния хлорофилла тушатся ксантофиллами при комнатной температуре, сокращая таким образом время жизни хлорофилловых триплетов на несколько порядков (Peterman et al., 1997). Следовательно, решающая роль в тушении возбужденных состояний хлорофилла принадлежит каротиноидам (Gilmore, Yamamoto, 1993; Gilmore et al., 1995). Максимальное тушение флуоресценции, несмотря на схожие спектральные свойства нескольких ксантофиллов, обычно наблюдали, когда в комплексе ЛНС-II присутствовал зеаксантин (Ruban et al., 1998b; Polivka et al., 2002).

Важное значение для функциональной активности молекул каротиноидов имеет длина полиеновой цепи. Удлинение цепи сопряженных двойных связей от 9 в виолаксантине до 11 в зеаксантине обуславливает изменение физико-химических свойств этих молекул (Britton, 1995).

Известно, что непротонированная система ЛНС-II, связывающая виолаксантин, находится в состоянии, которое обеспечивает максимальную эффективность в собирании света. Протонирование и связывание зеаксантина приводят к состоянию, в котором энергия рассеивается в виде тепла. Эти состояния конформационно различны и, по-видимому, объясняют тесную связь между энергизованным рН-зависимым нефотохимическим тушением (qE) и изменением полосы поглощения при 535 нм (ΔA_{535}) (Horton et al., 1999).

В настоящее время для объяснения процесса нефотохимического тушения предложено два механизма. Согласно первой гипотезе синглет-синглетная передача энергии от хлорофилла на каротиноид приводит к тушению флуоресценции хлорофилла и рассеиванию энергии возбуждения (прямое тушение). По второй гипотезе каротиноиды виолаксантинового цикла контролируют структурную организацию светособирающего комплекса ФС-II. Зеаксантин этого цикла участвует в конформационных изменениях мембран, которые обуславливают безызлучательное рассеивание энергии (непрямое тушение флуоресценции) (Horton et al., 1999).

а) Прямое тушение. Многие ученые поддерживают идею о прямом тушении флуоресценции хлорофилла зеаксантином (Horton et al., 1999; Müller et al., 2001). Считается, что перенос электронов между молекулами хлорофиллов и каротиноидов осуществляется, вероятно, через механизм Декстера, который требует близкого расположения этих пигментов с перекрыванием их спектров поглощения (Owens et al., 1992). Энергетически это может быть свойственно каротиноидам в первом синглетном состоянии S_1 с A_g -симметрией (2^1A_g), которое соответствует более низкому энергетическому уровню (рис. 20). Спектры поглощения пигментов в видимой области отражают переход электрона из основного состояния S_0 (1^1A_g) в состояние S_2 , которое имеет B_u -симметрию (1^1B_u). Энергия и время жизни состояния S_2 зависят от степени конъюгации π -электрона каротиноида. Увеличение числа сопряженных двойных связей приводит к уменьшению энергии в S_2 -состоянии (Horton et al., 1999).

Состояние S_1 обладает симметрией A_g (2^1A_g) в идеализированной точечной группе C_{2h} . Основное состояние S_0 также имеет A_g -симметрию (1^1A_g) и, как результат, переход $S_0 \rightarrow S_1$ запрещен. Величины энергий S_1 -состояний были определены путем измерения слабых (вследствие перехода $S_1 \rightarrow S_0$) спектров флуоресценции каротиноидов, имеющих менее девяти конъюгированных двойных связей (Andersson et al., 1992). Для более длинных хромофоров доминирует электронный переход $S_2 \rightarrow S_0$, и уровень энергии S_1 трудно установить (Frank et al., 1997). Поэтому уровень S_1 энергий для каротиноидов ксантофиллового цикла был рассчитан путем экстраполяции данных, полученных с использованием времен жизни S_1 состояний в соответствии с законом энергетического промежутка (the energy gap law) для безызлучательных переходов (Engelman, Jortner, 1970; Frank et al., 1994, 1996; Chynwat, Frank, 1995).

Различия в длине цепи сопряженных двойных связей (с.д.с.) каротиноидов ксантофиллового цикла (виолаксантин $n = 9$, антраксантин $n = 10$ и зеаксантин $n = 11$ с.д.с.) отражаются на величине их S_1 энергии (Frank et al., 1994). Времена жизни состояния S_1 для виолаксантина $\tau = 23.9$ ps, для антраксантина $\tau = 14.4$ ps и для зеаксантина $\tau = 9.0$ ps были использованы для того, чтобы рассчитать уровни энергий в S_1 -состоянии. Установлено (рис. 20), что энергии для каротиноидов ксантофиллового цикла составляли: для виолаксантина 15.290 см^{-1} , для антраксантина 14.720 см^{-1} и для зеаксантина 14.170 см^{-1} (Young et al., 1997).

С помощью абсорбционной спектроскопии (Frank et al., 1994) было обнаружено, что S_1 состояние виолаксантина (9 с.д.с.) энергетически выше, а зеаксантина (11 с.д.с.) ниже энергетического уровня S_1 хлорофилла (рис. 20). Энергетический уровень антраксантина (10 с.д.с.), как и лютеина (10 с.д.с.), в S_1 -состоянии находится примерно на том же уровне, что и у хлорофилла (Owens et al., 1992; Horton et al., 1999).

Зеаксантин может непосредственно принимать на себя избыточную энергию возбуждения посредством синглет-синглетной передачи энергии, тем самым дезактивируя возбужденный хлорофилл антенны. Увеличению зеаксантинового тушения способствует спектральное перекрытие синглетного хлорофилла и зеаксантина, обусловленное низким значением трансмембранного ΔpH (Owens et al., 1992). Виолаксантин же может действовать только на передачу своей энергии на хлорофилл, выполняя светособирающую функцию.

У морских водорослей аналогичную фотозащитную функцию хлорофилла выполняют каротиноиды диадиноксантинового цикла (рис. 20, б). Учитывая их энергетические уровни,

авторы пришли к выводу, что диадинаксантин в 1.7 раза более эффективно передает энергию S_1 -состояния на хлорофилл, чем диатоксантин (Frank et al., 1996).

б) *Непрямое тушение*. Существует мнение о том, что зеаксантин помимо тушения флуоресценции хлорофилла участвует в конформационных изменениях мембран, в частности в агрегации светособирающего комплекса ФС-II. Такое структурное изменение способствует безызлучательному рассеиванию энергии (Horton et al., 1991; Horton, Ruban, 1994; Ruban et al., 1997 a, b).

Природа взаимодействия между каротиноидами ксантофиллового цикла и основного светособирающего комплекса ФС-II (ЛНС-II) была исследована путем анализа эффектов при добавлении экзогенных каротиноидов. Снижение эффективности тушения можно наблюдать с рядом каротиноидов, в которых длина цепи сопряженных двойных связей была меньше девяти. Напротив, увеличение тушения наблюдали при добавлении каротиноидов, имеющих более 11 сопряженных двойных связей (Phillip et al., 1996).

Для каротиноидов, участвующих в рассеивании энергии *in vivo*, определяющее значение имеют такие факторы, как перекрывание спектров поглощения, положение и природа их энергетических состояний, ориентация переходных диполей и динамика их возбужденных состояний (Frank et al., 1997). Важное значение для рассеивания энергии помимо длины цепи конъюгированных двойных связей имеет и ориентация концевых групп каротиноидов.

В отличие от виолаксантина фураноидный диэпоксикаротиноид ауроксантин имеет семь конъюгированных двойных связей (Horton et al., 1999). Его эпоксидные группы находятся в конфигурации C5,8 и C5',8' (рис. 21), а не C5,6 и C5',6', как у виолаксантина. Предполагается, что энергетический уровень S_1 ауроксантина намного больше, чем виолаксантина. Вероятно, концевые группы этой молекулы находятся в плоскости цепи углеродных двойных связей, приблизительно так же, как у зеаксантина. Несмотря на более короткую систему ненасыщенных двойных связей, ауроксантин является стимулятором тушения флуоресценции хлорофилла (рис. 21). На основании этого можно предположить, что стимулирующее действие зеаксантина обусловлено не уровнем S_1 -энергии, а ориентацией концевых групп (Ruban et al., 1998 a, b). Другой каротиноид, лютеоксантин, имеет 8 конъюгированных двойных связей и 2 разные эпокси-группы: первая в положении C5,6, как у виолаксантина, а вторая – C5',8', как у ауроксантина. Как предполагают, первая концевая группа находится вне плоскости, а вторая – в плоскости цепи углеродных двойных связей. Молекула лютеоксантина является слабым тушителем. Моноэпоксид флавоксантин, имеющий C5,8-эпокси-группу в плоскости цепи углеродных двойных связей и вторую концевую группу, как у зеаксантина, – вне плоскости, обладает нейтральными свойствами. Следовательно, ориентация концевых групп может влиять на стимулирующий или ингибирующий эффекты каротиноидов в процессе тушения флуоресценции.

Защита мембранных липидов от фотодеструкции. Липиды – это обширная группа природных органических соединений, включающая жиры и жироподобные вещества. Они входят в состав всех биологических мембран живых клеток, в том числе хлоропластов, и играют важную роль в жизненных процессах (Thompson, 1996; Клячко-Гурвич и др., 2000). Будучи одним из основных компонентов фотосинтетических мембран хлоропластов, липиды играют роль гидрофобного матрикса, определяя такие свойства мембран, как текучесть, проницаемость, активность встроенных в них хлорофилл-белковых комплексов, ферментов и полипептидов (Клячко-Гурвич и др., 1991, 2000).

В состав мембран хлоропластов входят четыре основных типа липидов: моногалактозилдиацилглицерин (MGDG), дигалактозилдиацилглицерин (DGDG), фосфатидилглицерин (PG) и сульфохиновозилдиацилглицерин (SG) (Simidjiev et al., 1998). Хлоропластные мембраны характеризуются высоким содержанием галактолипидов. Наличие значительного количества ненасыщенных жирных кислот (C18 : 3) с тремя двойными связями обуславливает высокую чувствительность мембран к фотодеструкции активными формами кислорода (Клячко-Гурвич и др., 2000).

В выделенном светособирающем комплексе ЛНС-II были обнаружены все основные липиды тилакоидов. Половину полярных липидов выделенных макроагрегатов ЛНС-II составляет моно-галактозилдиацилглицерин. Он может способствовать оптимальной упаковке больших внутримембранных белков в бислойной структуре. Вторую половину липидов составляют три других липидных компонента мембран. Дигалактозилдиацилглицерин необходим для формирования кристаллов 3D и 2D (Simidjiev et al., 1998; Horton et al., 1999). Фосфатидилглицерин тесно связан с полипептидами ЛНС-II и может непосредственно участвовать в образовании тримеров и во взаимодействии субъединиц между собой. Роль сульфохинозилдиацилглицерина пока не ясна (Simidjiev et al., 1998). Мембраны тилакоидов гетерогенны, поэтому липиды в них должны локализоваться дисперсно, чтобы предотвратить концентрирование и образование гомогенных (небислойных) структур (Sharkey, 2000).

Важную функцию в защите липидов мембран фотосинтетических организмов от перекисного окисления выполняют ксантофиллы виолаксантинового цикла (Pfundel, Bilger, 1994; Eskling et al., 1997; Navaux, Niyogi, 1999). Они способны тушить триплетный хлорофилл ^3Chl и синглетный кислород $^1\text{O}_2$. Эти функции каротиноидов хорошо изучены *in vitro* в светособирающих комплексах ФС-II (Telfer et al., 1994; Navaux, Niyogi, 1999).

Существуют экспериментальные доказательства определенной ориентации зеаксантина в липидном бислое, где длинная ось каротиноида расположена почти перпендикулярно к поверхности мембраны с двумя полярными группами на обеих ее сторонах. Результатом такой ориентации является заметное уменьшение текучести липидов, кристаллизация мембран и уменьшение мембранной проницаемости для малых молекул (Sarry et al., 1994).

Следовательно, ксантофиллы виолаксантинового цикла в присутствии кислорода защищают хлорофиллы и липиды от разрушения и обеспечивают устойчивость тилакоидных мембран при высокой интенсивности света (Tardy, Navaux, 1997; Клячко-Гурвич и др., 2000).

3. Структурная функция каротиноидов и их локализация

Каротиноиды являются обязательными структурными компонентами фотосинтетических мембран. Они входят в состав хлорофилл-белковых комплексов. В состав комплексов реакционных центров ФС-I и ФС-II входят 1–2 молекулы β -каротина (Gounaris et al., 1990; Hashimoto, Koyama, 1990; Eijkelhoff, Dekker, 1995; Mimuro et al., 1995; Konermann et al., 1997; Tracowell, 2001).

В стабилизации светособирающих хлорофилл-*a/b*-белковых комплексов важную роль играют ксантофиллы: лютеин, виолаксантин, неоксантин и зеаксантин. В экспериментах по реконструированию светособирающих комплексов было установлено, что в отсутствие ксантофиллов образуются нестабильные комплексы (Plumley, Schmidt, 1987). В исследованиях кристаллической структуры показано, что светособирающий хлорофилл-*a/b*-белковый комплекс ФС-II содержит две молекулы лютеина (рис. 22, *a*). Концы обеих молекул образуют прочные водородные связи с полипептидными петлями белков на противоположных сторонах фотосинтетической мембраны. Полиеновые цепи молекул лютеина образуют X-образное перекрещивание (рис. 22, *в*), которое обеспечивает структурную стабильность (Gust, 1994; Kühlbrandt et al., 1994; Peterman et al., 1997). Другие ксантофиллы (виолаксантин и зеаксантин) также пронизывают мембранный бислой как жесткие стержнеподобные молекулы между молекулами липидов мембран (Subczynsky et al., 1992).

Конфигурация зеаксантина и виолаксантина в тилакоидных мембранах отличается от таковой свободных пигментов. Было обнаружено, что оба ксантофилла (особенно зеаксантин) связаны с антенными белками *in vivo*. Известны доводы против возможности их свободной диффузии в мембране и описаны биохимические доказательства их связи с интактными олигомерными светособирающими комплексами (Ruban et al., 1999, 2001).

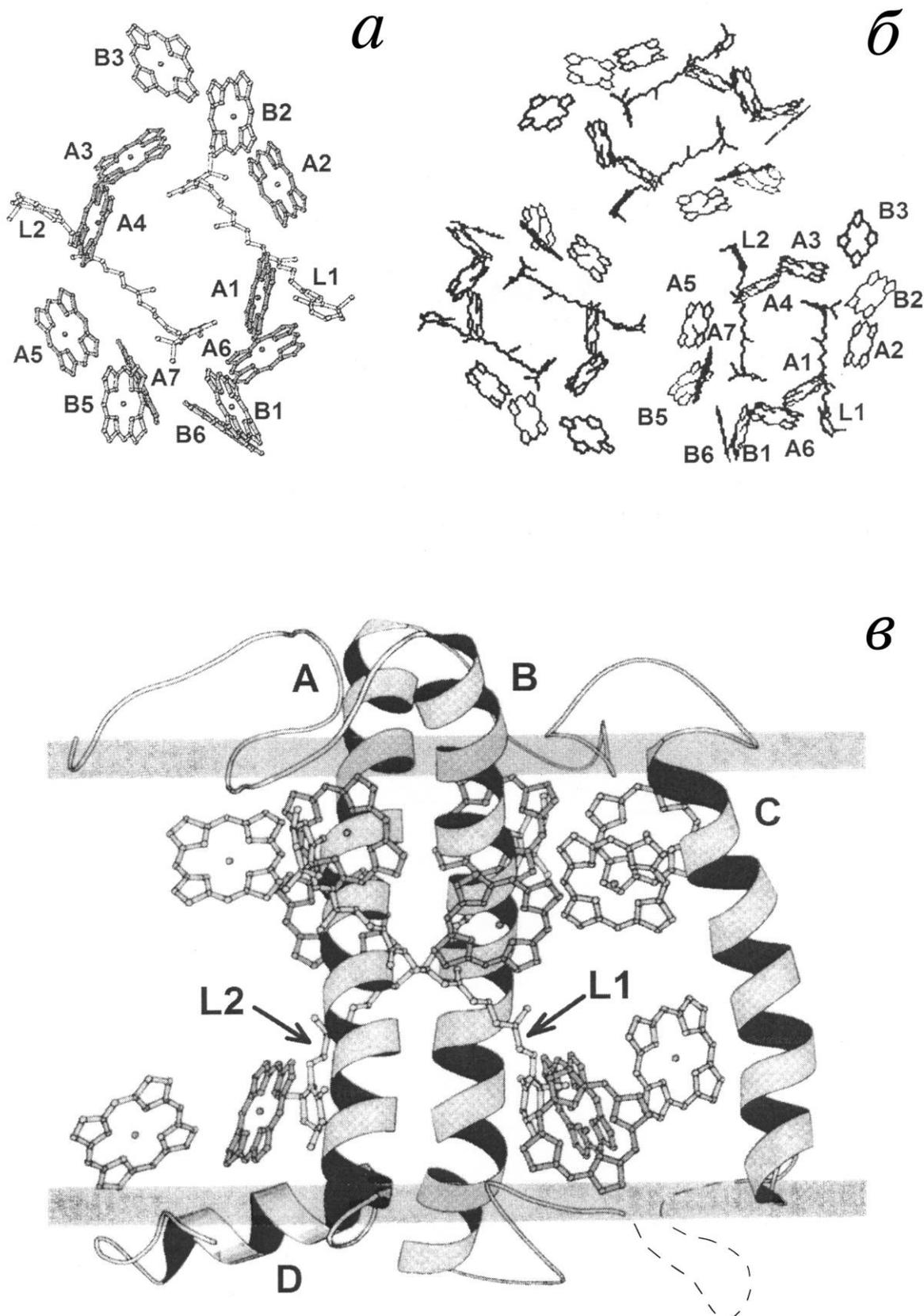


Рис. 22. Расположение молекул лютеина в локусах *L1* и *L2* светособирающего хлорофилл-*a/b*-белковый комплекс ФС-II (ЛНС-II) в мономерном (*a*) и тримерном (*б*) состояниях. Вид сверху мономера (*a*) и гетеротримера (*б*): A1–A7 – молекулы хлорофилла *a*, B1–B6 – молекулы хлорофилла *b*. Вид мономера сбоку (*в*) показывает положение спиралей белка (A, B, C, D), хромофоров хлорофилла и крестообразное расположение двух молекул лютеина (*L1* и *L2*) (Kühlbrandt et al., 1994; Amerongen, Dekker, 2003).

Полипептиды светособирающих комплексов ЛНС-I и ЛНС-II являются ядернокодируемыми белками. Эти белки связывают в определенных местах три типа ксантофиллов: лютеин, виолаксантин и неоксантин. В ЛНС-II были обнаружены два каротиноидсвязывающих локуса лютеина, которые были названы *L1* и *L2* (рис. 22, *a*). Локус *L1* полностью занят только лютеином, а локус *L2* заполняется на 80% лютеином и на 20% виолаксантином (Croce et al., 1999a; Nobe et al., 2000). Третий каротиноидсвязывающий локус высокоспецифичен для неоксантина и обозначается как *N1* (Croce et al., 1999a; Snyder et al., 2004). Ксантофиллы в локусах *L1*, *L2* и *N1* тесно связаны с комплексом ЛНС-II и не отделяются от него даже в очень жестких условиях очистки. Виолаксантин связан с ЛНС-II непрочной и может быть выделен уже при обработке мягким детергентом (Ruban et al., 1999; Verhoeven et al., 1999). Локусы *L1* и *L2* имеют самое большое сродство с лютеином, но также могут связывать виолаксантин и зеаксантин, но с меньшим сродством. Неоксантин связывается только с локусом *N1*. Следует отметить, что ксантофиллы в *L1* и *L2* взаимодействуют главным образом с хлорофиллом *a*, в то время как неоксантин *N1* взаимодействует строго с хлорофиллом *b* (Croce et al., 1999b). Неоксантин индуцирует гиперхромный эффект полосы поглощения при 652 нм и, по-видимому, проявляет свое действие главным образом путем нейтрализации синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$), тогда как ксантофиллы в локусах *L1* и *L2* участвуют в фотозащите ЛНС-II путем тушения триплетного хлорофилла ($^3\text{Chl}^*$) (Croce et al., 1999a,b). Результаты, полученные с помощью фемтосекундной абсорбционной спектроскопии, позволили объяснить возможность передачи энергии от каротиноидов через хлорофилл *b* на хлорофилл *a* (Croce et al., 1999a).

Установлено, что индивидуальные ксантофиллы локализируются в отдельных локусах различных белков светособирающих комплексов. Например, неоксантин помимо локуса *N1* в комплексе ЛНС-II может располагаться также в локусе *L2* комплексов CP29 и, вероятно, CP26. Другие белки светособирающих комплексов, такие, как Lhca1-4 ФС-I (рис. 16) и Lhcb4 ФС-II (рис. 17), вообще не связывают неоксантин (Croce et al., 1999a).

В ЛНС-II был обнаружен еще один локус, названный *V1*, при связывании с которым ксантофиллы не способны передавать поглощенную световую энергию на хлорофилл *a*. Напротив, при связывании с локусами *L1*, *L2* и *N1* каротиноиды легко передают энергию на этот хлорофилл (Caffari et al., 2001). При нормальных условиях освещения растений с локусом *V1* связан виолаксантин. Однако на сильном свете, когда виолаксантин превращается в антраксантин и зеаксантин в результате дезоксидации, этот локус занимает антраксантин или зеаксантин. По-видимому, ксантофиллсвязывающее место *V1* является резервуаром легко доступного виолаксантина в случае работы ксантофиллового цикла в условиях избыточного освещения (Caffari et al., 2001).

Известны данные о присутствии в светособирающем комплексе ФС-II (ЛНС-II) в небольших количествах зеаксантина (Ruban et al., 1994; Lee, Thornber, 1995; Verhoeven et al., 1999). При воздействии света высокой интенсивности на фотосинтетические ткани листьев зеаксантин образуется в ЛНС-II при дезоксидации из виолаксантина в процессе обратимого превращения ксантофиллов (Yamamoto, 1979, 1985; Ладыгин, 2000, 2002). Такое превращение ксантофиллов в ЛНС-II обычно бывает временным. На слабом свете или в темноте зеаксантин вновь превращается путем эпоксидации в виолаксантин (Yamamoto, 1985). Так как зеаксантин обнаруживается в хлоропластах только на сильном свете, т.е. в условиях светового стресса, и даже в таком случае в относительно малых количествах, его специфическое связывание с белками ЛНС-II было трудно установить. Тем не менее из недавних исследований *in vitro* (Croce et al., 1999a; Nobe et al., 2000), а также при анализе мутантов *Arabidopsis thaliana* и зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus* (Heinze et al., 1997; Bishop et al., 1998), накапливающих значительное количество зеаксантина (Pogson et al., 1996, 1998; Tardy, Navaux, 1996), было сделано заключение, что зеаксантин в ЛНС-II фотосинтетического аппарата может замещать виолаксантин и лютеин (Polle et al., 2001).

КСАНТОФИЛЛОВЫЕ ЦИКЛЫ

В настоящее время известно, что некоторые ксантофиллы могут участвовать в обратимых светозависимых реакциях. Эти взаимопревращения каротиноидов осуществляются в реакциях ксантофилловых циклов, две из которых считают главными: эпоксидации и деэпоксидации.

В хлоропластах различных эукариот сейчас известно три типа ксантофилловых циклов: виолаксантиновый, лютеин-5,6-эпоксидный и диадиноксантиновый (рис. 15).

В растительном царстве ключевым и наиболее широко распространенным является виолаксантиновый цикл, в котором осуществляются обратимые превращения виолаксантина в зеаксантин. Этот цикл обнаружен практически у всех эукариотических водорослей и высших растений (Demmig-Adams et al., 1996; Ладыгин, 2002).

Второй тип ксантофиллового цикла, лютеин-5,6-эпоксидный, был недавно описан для паразитического растения *Cuscuta reflexa* (Bungard et al., 1999), в листьях красного дуба *Quercus rubra* (García-Plazaola et al., 2002) и в семействах *Loranthaceae* и *Viscaceae* (Matsubara et al., 2003). В этом цикле лютеин может превращаться в лютеин-5,6-эпоксид. Затем имеют место обратные реакции.

Третий тип ксантофиллового цикла, диадиноксантиновый, был обнаружен у морских и океанических планктонных водорослей. В этом цикле происходит взаимопревращение диадиноксантина и диатоксантина (Lohr, Wilhelm, 1999; Ладыгин, 2000, 2002). У некоторых морских водорослей при определенных условиях роста могут работать одновременно диадиноксантиновый и виолаксантиновый циклы (Lohr, Wilhelm, 1999).

1. Виолаксантиновый цикл

Наземные растения и эукариотические водоросли на сильном свете поглощают больше солнечной энергии, чем они могут использовать в процессе фотосинтеза, поэтому избыток энергии может приводить к фотоокислительным разрушениям мембран хлоропластов (Владимиров, 1998; Красновский-мл., 1998). Одним из основных путей защиты растений от фотодеструкции при избытке света является виолаксантиновый цикл (рис. 23). Первые упоминания о реакциях светозависимого превращения виолаксантина, антраксантина и зеаксантина появились более 50 лет назад (Hager, 1955, 1957; Сапожников, 1967). Эти циклические взаимопревращения каротиноидов получили название виолаксантинового цикла (Yamamoto et al., 1962; Hager, 1967), который включает в себя две рН-зависимые реакции: прямую – деэпоксидации и обратную – эпоксидации, катализируемые двумя разными ферментами: виолаксантиновой деэпоксидазой и зеаксантиновой эпоксидазой (Hager, Holocher, 1994; Ладыгин, 2000, 2002).

Прямая реакция. Деэпоксидация виолаксантина до зеаксантина идет на сильном свете с выделением кислорода при участии фермента виолаксантиновой деэпоксидазы, который контролируется хлоропластным геном *Vde1* (Cunningham, Gantt, 1998, 2001; Ладыгин, 2002). Деэпоксидаза виолаксантина – это водорастворимый фермент с молекулярной массой от 40 до 54 кДа у разных растений, который локализуется на внутренней (люменальной) стороне мембраны тилакоида (рис. 19). Он проявляет максимальную активность при рН 5.2 и использует аскорбат в качестве косубстрата (Hager, 1966, 1969; Hager, Holocher, 1994; Eskling et al., 1997; Bugos et al., 1998; Cunningham, Gantt, 1998, 2001; Grotz et al., 1999; Hieber et al., 2000; Smirnoff, 2000; Smirnoff, Wheeler, 2000).

Обратная реакция. Эпоксидация зеаксантина до виолаксантина протекает на слабом свете или в темноте с использованием кислорода атмосферы, а не H_2O (Yamamoto et al., 1962; Yamamoto, 1979). Эта реакция осуществляется при оптимуме рН 7.5 с участием фермента НАДФ-Н-зависимой зеаксантиновой эпоксидазы, который контролируется хлоропластным геном *Zep1* и имеет молекулярную массу 72 кДа (Cunningham, Gantt, 1998, 2001; Ладыгин, 2002). Этот фермент является мембранно-связанным белком (рис. 19) и

локализуется на внешней (стромальной) стороне мембраны тилакоида (Hager, 1975; Siefermann, Yamamoto, 1975 a, b; Hager, Holocher, 1994; Jahns, 1995; Bugos et al., 1998).

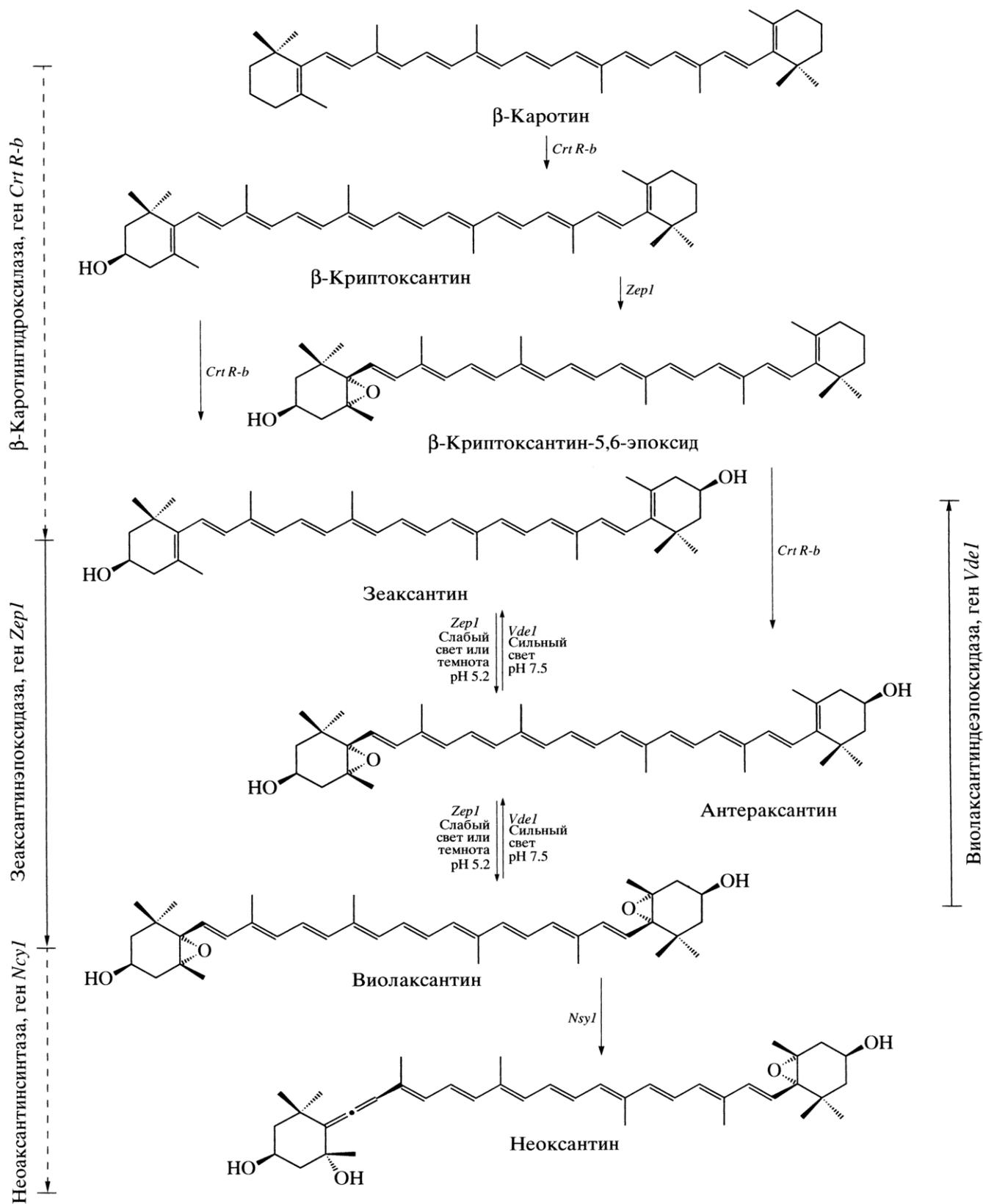


Рис. 23. Схема биосинтеза ксантофиллов виолаксантинового цикла из β-каротина и направленность протекания реакций в хлоропластах высших растений и пресноводных водорослей с участием зеаксантиновой эпоксидазы (ген *Zep1*) и виолаксантиновой дезэпоксидазы (ген *Vde1*) при различных условиях освещения.

Виолаксантиновая дезоксидаза в отличие от постоянно мембранно-связанной зеаксантиновой эпоксидазы подвижна внутри тилакоидного люмена и при близком к нейтральному значению pH 6.8–7.2, которое встречается *in vivo* в темноте, может отделяться от мембраны (рис. 19). Однако при сильном освещении, когда внутри тилакоида внутрилюменальный pH падает ниже 6.5 вследствие образования протонного градиента, свойства дезоксидазы изменяются, фермент вновь прикрепляется к мембране тилакоида, получая доступ к субстрату виолаксантину и достигая максимальной активности при pH 5.2 (Hager, Holocher, 1994).

Измерения времени протекания реакций виолаксантинового цикла показали, что в процессе дезоксидации виолаксантин превращается в зеаксантин в течение нескольких минут при избыточном освещении. Эта реакция замедляется при оптимальной интенсивности света и останавливается на лимитирующем свете (Hager, 1966, 1967; Hager, Holocher, 1994; Sarry et al., 1994; Latowski et al., 2000). В темноте протекает обратная реакция эпоксидации виолаксантинового цикла – превращение зеаксантина через промежуточный ксантофилл антраксантин в виолаксантин – и является очень медленной по сравнению с реакцией дезоксидации (Яцко и др., 2011; Маслова, Марковская, 2012). Для полной эпоксидации зеаксантина до виолаксантина требуется от одного до нескольких часов (Siefertmann, Yamamoto, 1975a; Hieber et al., 2000; Krause, Jahns, 2003).

Вопрос о местах локализации каротиноидов виолаксантинового цикла в хлоропластах все еще остается спорным. В ряде наиболее ранних работ высказано мнение о локализации этого цикла вблизи ФС-II (Сапожников, 1967; Sapozhnikov, 1973; Маслова и др., 1996). Но в литературе существуют и точки зрения о связи виолаксантинового цикла с функционированием ФС-I (Hager, 1980; Maroti, Pataky, 1983; Ладыгин, Ширикова, 1987; Hager, Holocher, 1994; Клячко-Гурвич и др., 2000). Следовательно, можно считать вполне вероятным, что реакции взаимопревращения ксантофиллов этого цикла могут осуществляться при функционировании как ФС-II, так и ФС-I (Havaux, Niyogi, 1999; Horton et al., 1999).

Большое влияние на скорость реакции дезоксидации оказывает состав газовой среды (Сапожников и др., 1959). Было высказано предположение о различных механизмах протекания этой реакции в присутствии и отсутствии кислорода в среде. Так, в присутствии кислорода дезоксидация происходит с участием ФС-II и осуществляется путем фотоокисления эпоксидных групп виолаксантина, что приводит к выделению фотосинтетического O₂. С другой стороны, вероятно, в анаэробных условиях дезоксидация проходит с участием ФС-I через восстановление эпоксидных групп и ведет к образованию H₂O (Маслова и др., 1996). Дезоксидация виолаксантина в зеаксантин осуществляется в липидном матриксе, а не на белках (Macko et al., 2002; Wehner et al., 2004). В то же время сейчас уже установлено, что отдельные молекулы каротиноидов не просто “растворены” в липидном бислое мембран тилакоидов, а имеют строго определенные места локализации в хлорофилл-белковых комплексах и выполняют различные функции в мембранах хлоропластов (Caffari et al., 2001).

2. Лютеин-5,6-эпоксидный цикл

Впервые на возможность существования второго типа ксантофиллового цикла было указано в 1975 г. в исследованиях каротиноидов зеленых плодов томатов в начале созревания (Rabinowitch et al., 1975), но подробное описание нового цикла, названного лютеин-5,6-эпоксидным, было представлено лишь несколько лет назад при исследовании паразитического растения *Cuscuta reflexa* (Bungard et al., 1999). В этом растении на сильном свете лютеин-5,6-эпоксид дезоксидируется до лютеина без нарушения структурной целостности светособирающих комплексов фотосистем.

Известно, что светособирающие комплексы высших растений содержат в основном такие ксантофиллы, как лютеин, виолаксантин и неоксантин. Лютеин присутствует в самой

большой концентрации, обычно варьируя между 30 и 60% от всех ксантофиллов (Bungard et al., 1999; Ладыгин, 2008). Содержание виолаксантина колеблется в пределах 17–30%. Каждая мономерная субъединица ЛНС-II содержит 2 молекулы лютеина, которые, перекрещиваясь в центре этого комплекса, выполняют структурную функцию (Kühlbrandt et al., 1991, 1994). Содержание неоксантина от общего пула ксантофиллов гораздо меньше и составляет от 9 до 14% (Bungard et al., 1999). Подобно лютеину, неоксантин является также внутренним структурным компонентом светособирающих комплексов. Паразитическое растение *Cuscuta reflexa* – это пока единственное фотосинтетически активное высшее растение из изученных на сегодняшний день, которое не содержит неоксантина (Bungard et al., 1999; Snyder et al., 2004).

Кроме некоторых паразитических растений, лютеин-5,6-эпоксидный цикл найден также в листьях красного дуба *Quercus rubra* (García-Plazaola et al., 2002). Очевидно, что этот цикл не очень широко распространен среди высших растений. Факторы и механизмы, которые определяют наличие или отсутствие лютеин-5,6-эпоксидного цикла, а также его физиологическое значение, пока мало изучены.

К сожалению, на наличие и динамику изменения содержания лютеин-5,6-эпоксида в фотосинтетических исследованиях почти не обращали внимания. Только недавно показано присутствие и фотопревращение лютеин-5,6-эпоксида в хлоропластах (Bungard et al., 1999; Matsubara et al., 2001; García-Plazaola et al., 2003). Уровень этого ксантофилла особенно высок в листьях *Quercus rubra* (García-Plazaola et al., 2002), теневые листья которого содержат намного больше лютеин-5,6-эпоксида, чем листья омелы белой (Matsubara et al., 2001), для которой характерно присутствие лютеин-5,6-эпоксидного цикла. Интересно отметить, что теневые листья этих растений накапливают гораздо больше лютеин-5,6-эпоксида, чем листья растений на ярком свете (Matsubara et al., 2001; García-Plazaola et al., 2002), что предполагает другой механизм функционирования нового цикла, отличный от механизма виолаксантинового цикла.

Общая характеристика. В листьях повилики *Cuscuta reflexa* (Bungard et al., 1999) обнаружен новый ксантофилловый цикл, названный лютеин-5,6-эпоксидным циклом (рис. 24). В условиях сильной освещенности лютеин-5,6-эпоксид дезэпоксируется до лютеина без нарушения структурной целостности светособирающих комплексов ЛНС-II (light-harvesting complex II) фотосистемы II.

Известно, что при освещении фотосинтезирующих растений избыточным для фотосинтеза светом в хлоропластах, где функционирует виолаксантиновый цикл, уменьшается количество виолаксантина, но количество продуктов его дезэпоксидации – антраксантина и зеаксантина, увеличивается по сравнению с растениями, выращенными в темноте (Demmig-Adams et al., 1996; Hager, Holocher, 1994). Сходная закономерность обнаружена для лютеин-5,6-эпоксидного цикла в клетках *Cuscuta reflexa*. После пребывания в течение 10 мин в условиях сильной освещенности терялось свыше 60% лютеин-5,6-эпоксида (Bungard et al., 1999). Уменьшение концентрации лютеин-5,6-эпоксида сопровождалось увеличением концентрации лютеина, точно так же, как потеря виолаксантина сопровождалась появлением продуктов его дезэпоксидации – антраксантина и зеаксантина. По всей видимости, у *Cuscuta reflexa* лютеин, образованный из лютеин-5,6-эпоксида, как и виолаксантин, является продуктом дезэпоксидации при избыточном освещении. Следовательно, лютеин-5,6-эпоксидный цикл – это второй ксантофилловый цикл, который включает в себя быструю обратимую светозависимую дезэпоксидацию кольца лютеин-5,6-эпоксида до лютеина (рис. 24).

Учитывая, что в обоих циклах дезэпоксидация происходит только в β -кольце, было высказано предположение, что в них участвуют одни и те же ферменты, т.е. виолаксантиновая дезэпоксидаза и зеаксантиновая эпоксидаза в обоих случаях осуществляют дезэпоксидацию эпокси групп β -иононового кольца в С-5,6-положении (Ладыгин, 2002, 2008).

Исследования последних лет показали, что лютеин-5,6-эпоксидный цикл характерен не только для паразитических растений. Известны корневые паразиты *Arceuthobium* и

Phoradendron, которые лишены этого цикла. Кроме того, обнаружение лютеин-5,6-эпоксида в созревающих зеленых плодах томатов *Lycopersicon esculentum* и наличие α -ксантофиллового цикла у *Quercus rubra* (García-Plazaola et al., 2002) указывают на отсутствие прямой связи этого цикла с паразитизмом. Таким образом, очень важный вопрос о физиологическом значении лютеин-5,6-эпоксидного цикла пока остается без ответа.

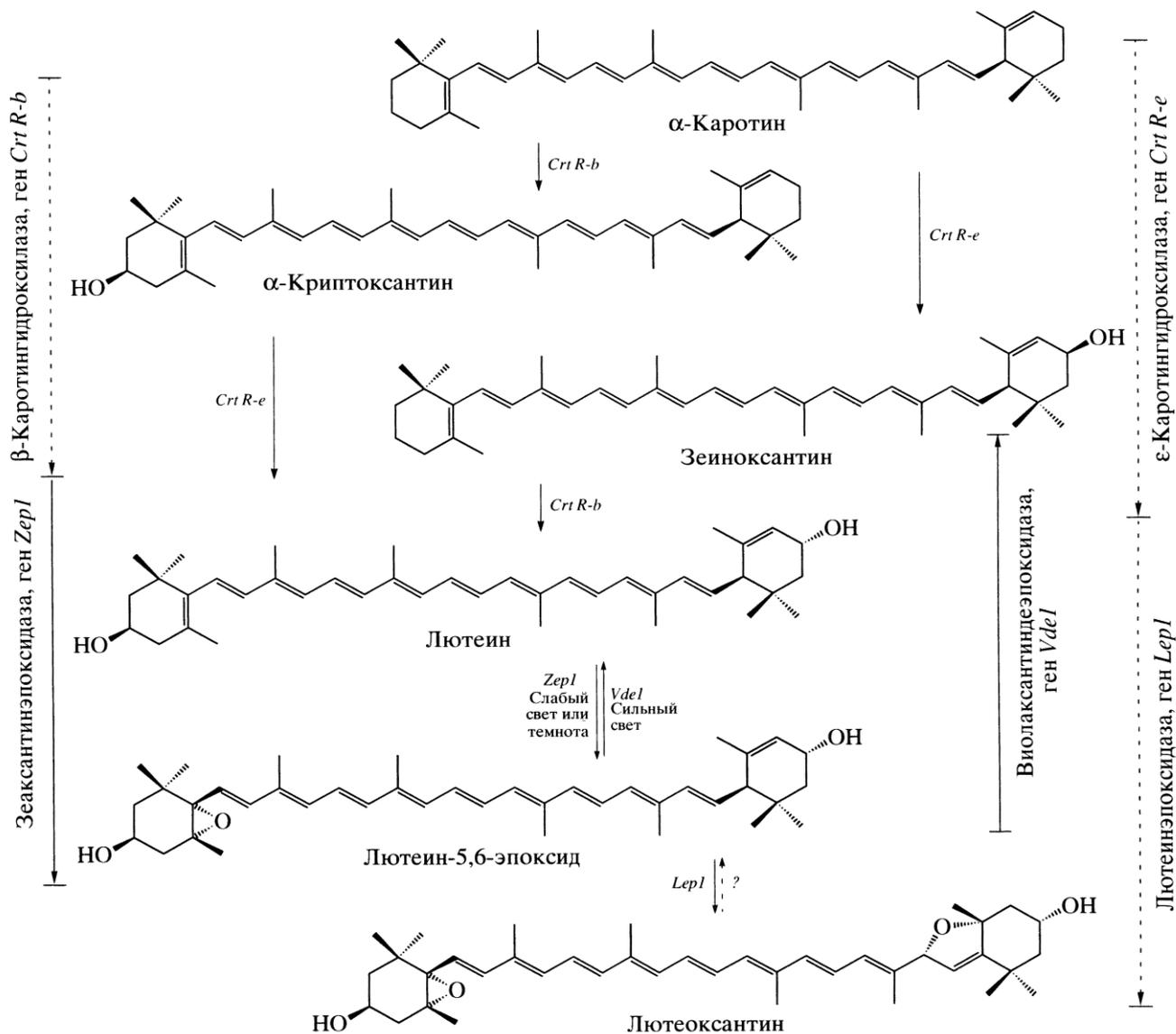


Рис. 24. Схема биосинтеза ксантофиллов лютеин-5,6-эпоксидного цикла из α -каротина и направленность протекания реакций в хлоропластах высших растений с участием зеаксантиновой эпоксидазы (ген *Zep1*) и виолаксантиновой деэпоксидазы (ген *Vdel*) при различных условиях освещения.

На основании сказанного можно заключить, что лютеин-5,6-эпоксидный цикл, скорее всего, дополняет основной распространенный виолаксантиновый цикл и включает те же самые реакции эпоксидации и деэпоксидации только β -кольца, характерные для виолаксантинового цикла, не затрагивая ϵ -кольца лютеина. Некоторые исследователи предполагают, что мутация в зеаксантиновой эпоксидазе могла привести к изменению регуляции или субстратной специфичности этого фермента, что обусловило параллельное функционирование двух ксантофилловых циклов. Однако истинные причины появления, функционирования и физиологической значимости лютеин-5,6-эпоксидного цикла еще предстоит выяснить.

Локализация. Известно, что светособирающие комплексы высших растений содержат в основном такие ксантофиллы, как лютеин, виолаксантин и неоксантин. Больше всего накапливается лютеина – обычно 30–60% от общего количества каротиноидов (Bungard et al., 1999; Horton et al., 1999). Содержание виолаксантина колеблется от 17 до 30%. Каждая мономерная субъединица ЛНС-II содержит две молекулы лютеина, которые, образуя перекрещивание в центре этого комплекса, выполняют структурную функцию (Kühlbrandt, Wang, 1991; Kühlbrandt et al., 1994). Содержание неоксантина гораздо меньше и составляет от 9 до 14% общего пула ксантофиллов (Bungard et al., 1999). Неоксантин, внутренний компонент светособирающих комплексов ЛНС-II, выполняет, главным образом, светособирающую функцию (Demmig-Adams et al., Wentworth et al., 2004; 1996; Bungard et al., 1999; Ладыгин, Ширикова, 2006). Единственное известное на сегодняшний день фотосинтезирующее высшее растение, которое не содержит неоксантина, – это повилика *Cuscuta reflexa* (Bungard et al., 1999; Snyder et al., 2004).

Локализация α -ксантофиллового цикла пока не установлена, но известно, что две молекулы лютеина L1 и L2, которые располагаются внутри основного светособирающего комплекса ЛНС-II и выполняют структурную функцию, недоступны для эпоксидации. Вероятно, в лютеин-5,6-эпоксидном цикле *Cuscuta reflexa* участвует лютеин, связанный с периферической частью светособирающего комплекса ЛНС-II в том месте (рис. 25), где в хлоропластах большинства высших растений обычно располагается неоксантин (Bungard et al., 1999).

Экспериментально показано, что у повилики *Cuscuta reflexa* соотношения хлорофиллов *a/b*, концентрации лютеина и пигментов виолаксантинового цикла, а также спектры поглощения тилакоидов остаются такими же, как и в тилакоидах других высших растений. Эти результаты подтверждают мнение, что лютеин-5,6-эпоксид эффективно замещает неоксантин в светособирающих комплексах *Cuscuta reflexa* без заметного влияния на состав пигментов и тилакоидную структуру (Bungard et al., 1999). Экспериментально подтверждено сходство между лютеин-5,6-эпоксид-содержащим ЛНС-II из повилики и неоксантин-содержащим ЛНС-II из листьев высших растений, например, салата. Показано, что оба ксантофилла – и лютеин, и неоксантин, прочно связаны с пигмент-белковыми комплексами ЛНС-II (Bungard et al. 1999; Wentworth et al., 2004; Ruban et al., 2014). Биосинтетический путь лютеин-5,6-эпоксида детально не изучен. Однако поскольку лютеин является производным α -каротина, можно предположить, что и лютеин-5,6-эпоксид находится в этой же ветви биосинтетического пути (Ладыгин, 2002). Важно определить, какие условия необходимы для работы лютеин-5,6-эпоксидного цикла у высших растений.

Условия функционирования. Основное условие функционирования циклов состоит в изменении освещенности и перехода свет–темнота. Известно, что для достижения полной эпоксидации пигментов виолаксантинового цикла достаточно 12 ч темноты (Xu et al., 1999). Однако только у 60% высших растений после выдерживания в темноте в течение 12 ч обнаруживались небольшие количества лютеин-5,6-эпоксида.

Большие пулы лютеин-5,6-эпоксида (более 5 ммоль/моль хлорофилла) найдены в листьях австралийских видов дуба рода *Quercus*, независимо от их экологических характеристик. Содержание лютеин-5,6-эпоксида в листьях дуба было приблизительно в 2 раза меньше, чем в листьях омелы белой – *Amyema miquelii*, росших на ярком свете (Matsubara et al., 2001). Содержание лютеин-5,6-эпоксида уменьшается при избыточной интенсивности света: в теневых листьях лютеин-5,6-эпоксида всегда больше, чем в ярко освещенных листьях. Так, ночью лютеин-5,6-эпоксида в 2 раза больше, чем в полдень. У вечнозеленых видов содержание лютеин-5,6-эпоксида в летних листьях выше по сравнению с зимними (García-Plazaola et al., 2002, 2003). Интересно, что α -каротин – биосинтетический предшественник лютеина и лютеин-5,6-эпоксида, также сильнее накапливается в теневых листьях (Siefermann-Harms, 1994; Demmig-Adams, Adams, 1996; García-Plazaola et al., 1999b).

Более высокое содержание лютеин-5,6-эпоксида в теневых листьях в течение лета показывает, что лютеин-5,6-эпоксид является ксантофиллом, который накапливается в

листьях, не подвергнутых световым стрессам. Интересно, что лютеин-5,6-эпоксидный цикл, обнаруженный у повилики *Cuscuta retlexsa* (Bungard et al., 1999), встречается и у других видов высших растений, таких как дуб красный *Quercus rubra* (García-Plazaola et al., 2002, 2003), у которого при сильном освещении лютеин-5,6-эпоксид превращается в лютеин путем дезэпоксидации. Распространенность и видовая принадлежность лютеин-5,6-эпоксидного цикла остаются неизвестными.

Изучение пигментного состава листьев тропического бобового дерева *Inga* sp., взятых рано утром из теневых и освещенных участков кроны, показало, что лютеин-5,6-эпоксида гораздо больше в теневых листьях, где его концентрация превышала концентрацию виолаксантина в 3.5 раза, чем в листьях на солнечном свете.

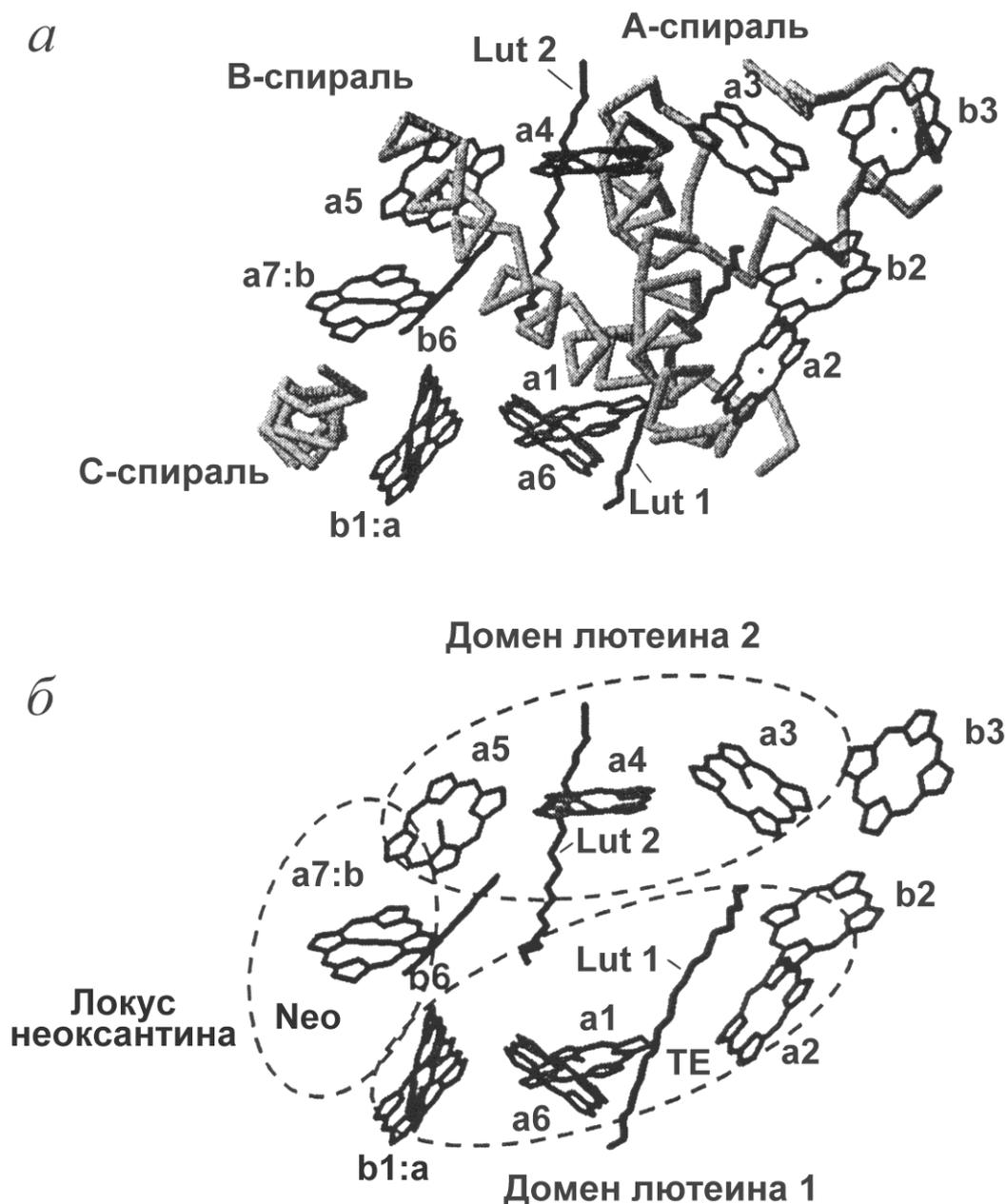


Рис. 25. Молекулярная модель мономера светособирающего комплекса LHC-II (Kühlbrandt, Wang, 1991; Kühlbrandt et al., 1994), показывающая локализацию молекул лютеина 1 (Lut1), лютеина 2 (Lut2) и неоксантина (Neo) (Wentworth et al., 2004, Ruban et al., 2014), а также распределения молекул хлорофиллов и α -спиралей белка (Kühlbrandt et al., 1994).

Теневые листья всегда содержали больше α -каротина (Thayer, Björkman, 1990) и в них же преобладал синтез α -ксантофиллов, когда лютеин превращается в лютеин-5,6-эпоксид. Сходные данные получены также *in situ* на листьях *Inga* sp. (Matsubara et al., 2002, 2005). Суммарное количество лютеин-5,6-эпоксида и лютеина было почти одинаковым в теневых и световых листьях одного и того же растения, как и в случае с β -ксантофиллами виолаксантинового цикла (Demmig-Adams et al., 1996; Lichtenthaler, 1998). Предполагается, что в листьях *Inga* sp. лютеин-5,6-эпоксид превращается в лютеин с помощью виолаксантиновой дезэпоксидазы в процессе приспособления к изменяющимся условиям тень–солнце (Matsubara et al., 2003, 2005). Неопределенное таксономическое распределение лютеин-5,6-эпоксида цикла наводит на мысль о том, что этот цикл мог сформироваться независимо у разных растений в процессе эволюции. Одна из возможных причин его появления – мутация в гене *Zep1*, приводящая к увеличению сродства зеаксантиновой эпоксидазы с лютеином (García-Plazaola et al., 2004).

Активность ключевых ферментов. Появление лютеин-5,6-эпоксида цикла, наряду с виолаксантиновым циклом, некоторые авторы объясняют мутацией зеаксантиновой эпоксидазы, которая в паразитических растениях приобретает способность катализировать эпоксидацию лютеина до лютеин-5,6-эпоксида (Matsubara et al., 2003). Возможно, что мутация изменила субстратную специфичность этого фермента так, что структура второго ϵ -иононового кольца (ϵ -кольца) не препятствует взаимодействию фермента зеаксантиновой эпоксидазы с β -кольцом лютеина. В этом случае зеаксантиновая эпоксидаза, помимо обычного для нее превращения зеаксантина в виолаксантин, становится способной синтезировать из лютеина лютеин-5,6-эпоксид (Matsubara et al., 2002, 2005).

Таким образом, одновременное функционирование двух ксантофилловых циклов может быть объяснено либо участием в них одних и тех же ферментов – виолаксантиновой дезэпоксидазы и обычной зеаксантиновой эпоксидазы, либо виолаксантиновой дезэпоксидазы и различных зеаксантиновых эпоксидаз (как обычной, так и модифицированной для α -цикла в результате мутации в области ϵ -кольца лютеина). Но все эти предположения слабо аргументированы и требуют дополнительных экспериментальных подтверждений.

Большинство авторов считает, что виолаксантиновая дезэпоксидаза может параллельно катализировать все реакции дезэпоксидации в двух ксантофилловых циклах: виолаксантиновом и лютеин-5,6-эпоксида. Подтверждением такой точки зрения могут служить данные, полученные на листьях красного дуба *Quercus rubra*, имеющего наряду с виолаксантиновым циклом и лютеин-5,6-эпоксида. В обоих циклах скорость дезэпоксидации как лютеин-5,6-эпоксида, так и виолаксантина почти одинакова (García-Plazaola et al., 2002, 2003).

Сравнительное исследование представителей семейств *Loranthaceae* и *Viscaceae* с отсутствием и наличием лютеин-5,6-эпоксида цикла выявило сходные диапазоны изменений концентрации лютеина и соотношений синтеза других каротиноидов, производных α - и β -каротинов. Это сходство означает, что содержание лютеина не может быть фактором, лимитирующим возникновение лютеин-5,6-эпоксида цикла. Установлено, что синтез лютеина может быть ограничен активностью ϵ -циклазы (Pogson et al., 1996). Так, изучен пигментный состав трансгенного *Arabidopsis thaliana lutOE*, сверхэкспрессирующего ϵ -циклазу (Polle et al., 2001), чтобы выяснить, может ли лютеин-5,6-эпоксида цикл индуцироваться изменениями биосинтеза лютеина. Сверхэкспрессия ϵ -циклазы в мутанте *lutOE* ведет к увеличению на 30% количества лютеина с одновременным уменьшением количества виолаксантина по сравнению с растениями дикого типа. Несмотря на увеличение содержания лютеина, количество обнаруженного лютеин-5,6-эпоксида в мутанте *lutOE* не изменялось, т.е. как и прежде оставалось на следовом уровне. Поскольку лютеин в мутанте *lutOE* синтезировался за счет подавления синтеза виолаксантина, можно предположить, что некоторые из дополнительных молекул лютеина заменяли виолаксантин в виолаксантин-связывающих локусах *VI* белков светособирающей антенны LHC-II. Это означает, что дополнительные молекулы лютеина, включенные в локусы *VI*, могли быть

доступны для ферментов ксантофиллового цикла (Ruban et al., 1999; Caffarri et al., 2001). Поэтому апопротеиновое стерическое препятствие для взаимодействия между зеаксантиновой эпоксидазой и лютеином может быть в значительной степени исключено из-за недостаточного накопления лютеин-5,6-эпоксида (Caffarri et al., 2001).

Изучение локализации пигментов в тилакоидах хлоропластов омелы белой *Viscaceae album* привело к выводу об отсутствии специальных локусов, связывающих лютеин-5,6-эпоксид. Показано, что лютеин-5,6-эпоксид мог иметь те же места связывания, что и виолаксантин (Morosinotto et al., 2003). А если молекулы лютеин-5,6-эпоксида связываются с теми же самыми локусами, что и молекулы виолаксантина, то в них синтез лютеин-5,6-эпоксида не индуцируется. В то же время у мутанта *lutOE Arabidopsis thaliana* (без лютеин-5,6-эпоксидного цикла) наблюдается эпоксидация лютеина (Wehner et al., 2004). Все это позволяет предположить, что эпоксидация лютеина до лютеин-5,6-эпоксида является лимитирующей реакцией для возникновения лютеин-5,6-эпоксидного цикла. Напротив, обратная реакция дезэпоксидации лютеин-5,6-эпоксида всегда становится возможной, когда начинается продукция лютеин-5,6-эпоксида (Ладыгин, 2008).

Эту гипотезу подтверждают результаты опытов *in vitro*, в которых рекомбинантная виолаксантиновая дезэпоксидаза *Arabidopsis thaliana*, экспрессированная в *E. coli*, катализировала одновременное превращение лютеин-5,6-эпоксида в лютеин и виолаксантина в антераксантин и зеаксантин (Wehner et al., 2004). Эти результаты хорошо согласуются с сообщениями о субстратной специфичности виолаксантиновой дезэпоксидазы из листьев салата и шпината (Grotz et al., 1999). Виолаксантиновая дезэпоксидаза из листьев салата способна превращать лютеин-5,6-эпоксид в лютеин. Активность виолаксантиновой дезэпоксидазы из листьев шпината в отношении лютеин-5,6-эпоксида не проверена, но фермент способен катализировать дезэпоксидацию моноэпоксида капсантин-5,6-эпоксида с эпокси группой в β -кольце, как у лютеин-5,6-эпоксида (Ладыгин, 2002). Они отличались только структурой второго кольца (Grotz et al., 1999). Как лютеин-5,6-эпоксид, так и капсантин-5,6-эпоксид удовлетворяли предполагаемым структурным требованиям, необходимым для проявления активности виолаксантиновой дезэпоксидазы – содержали полностью-транс-полиеновую цепь, по крайней мере, с одним β -иононовым кольцом с 3-ОН- и 5,6-эпокси группами (Britton, 1998; Ладыгин, 2002). Скорости дезэпоксидации виолаксантина и лютеин 5,6-эпоксида, определенные *in vitro*, сходны со скоростями, наблюдаемыми *in vivo* и *in situ* (Matsubara et al., 2001). Полагают, что виолаксантиновая дезэпоксидаза может катализировать реакции дезэпоксидации одновременно в обоих ксантофилловых циклах. Кроме того, близкие величины скоростей дезэпоксидации виолаксантина и лютеин-5,6-эпоксида в листьях дуба *Q. rubra*, имеющего лютеин-5,6-эпоксидный цикл (García-Plazaola et al., 2003), подтверждают мнение о том, что этот фермент одинаково хорошо работает в обоих циклах.

В отличие от виолаксантиновой дезэпоксидазы, зеаксантиновую эпоксидазу изучали, главным образом, в связи с биосинтезом абсцизовой кислоты (Marin et al., 1996). Этот растительный гормон имеет тот же самый путь биосинтеза, что и ветвь β -каротина. Абсцизовая кислота играет важную роль в развитии семян и в реакции растений на стресс. Тот факт, что у *Nicotiana plumbaginifolia* (Marin et al., 1996), *Chlamydomonas reinhardtii* (Niyogi et al., 1997), *Arabidopsis thaliana* (Niyogi et al., 1999) и *Licopersicon esculentum* (Thompson, 1996) найдена только одна копия гена зеаксантиновой эпоксидазы, указывает на двойную роль зеаксантиновой эпоксидазы как в синтезе пигментов и абсцизовой кислоты, так и в функционировании виолаксантинового цикла.

Субстратную специфичность зеаксантиновой эпоксидазы изучали с помощью фермента, выделенного из плодов перца *Capsicum annuum* (Bouvier et al., 1996). В отличие от виолаксантина с обеими концевыми группами в виде β -кольца, пигменты, у которых, подобно лютеину, одно β - и одно ϵ -кольцо, зеаксантиновой эпоксидазой из плодов перца не эпоксируются. Поэтому кажется интересным, что структура второго кольца, которое, возможно, некритично для виолаксантиновой дезэпоксидазы, препятствует каталитической

активности зеаксантиновой эпоксидазы из плодов перца даже при том, что оба фермента входят в семейство липокалинов (Bugos et al., 1998). Результаты изучения зеаксантиновой эпоксидазы из плодов перца наводят на мысль о том, что этот фермент, по-видимому, не катализирует эпоксидацию лютеина до лютеин-5,6-эпоксида и является основным фактором, лимитирующим возникновение и функционирование лютеин-5,6-эпоксидного цикла.

Возникает вопрос, как же тогда формируется лютеин-5,6-эпоксидный цикл у некоторых видов растений. Во-первых, это можно объяснить мутацией зеаксантиновой эпоксидазы. Такое предположение согласуется с современным пониманием молекулярной эволюции биосинтеза каротиноидов. Уже выделено несколько семейств каротиногенных ферментов с различными каталитическими функциями, которые возникли, возможно, путем дупликации генов (Hirschberg, 1998). Считается, что β - и ϵ -циклазы, участвующие в синтезе концевых групп неоксантина, капсантина и капсорубина (ферменты обнаружены в плодах перца *Capsicum annuum*), произошли из β -циклазы путем мутации. Предполагается, что мутация могла изменить субстратную специфичность зеаксантиновой эпоксидазы так, что структура второго иононового кольца (ϵ -кольца у лютеин-5,6-эпоксида и κ -кольца у капсантина-5,6-эпоксида) уже не препятствует взаимодействию пигмент-фермент (Matsubara et al., 2003).

Следовательно, мутантная зеаксантиновая эпоксидаза может синтезировать лютеин-5,6-эпоксид из лютеина и, по-видимому, больше соответствует названию лютеин- β,ϵ -эпоксидаза, подобно тому, как β -циклаза стала ϵ -циклазой (Pogson et al., 1996).

Можно представить, что вновь синтезируемые молекулы лютеин-5,6-эпоксида связываются с белками светособирающей антенны ЛНС-II и ЛНС-I (Green et al., 2003). В случае каротиноидов эта связь обеспечивается β -кольцом с 3-ОН-группой (Phillip et al., 1996). Если это так, то виолаксантин должен более прочно связываться с белком, чем лютеин. Однако экспериментально это еще не подтверждено.

Таким образом, у высших растений параллельное функционирование двух ксантофилловых циклов может осуществляться путем вовлечения виолаксантиновой дезэпоксидазы, а также зеаксантиновой эпоксидазы или мутантной зеаксантиновой эпоксидазы (Matsubara et al., 2003). Различные кинетики эпоксидации виолаксантинового и лютеин-5,6-эпоксидного циклов, наблюдаемые в дневное время в тенистых и освещенных солнцем листьях деревьев (Matsubara et al., 2001), а также при смене времен года (Xu et al., 1999), подразумевают возможность участия разных эпоксидаз в этих двух циклах.

Таблица 1. Максимумы поглощения ксантофиллов виолаксантинового и лютеин-5,6-эпоксидного циклов в 96% этаноле (Bungard et al., 1999; Hager, Meyer-Bertenrath, 1967)

Каротиноид	λ_{\max} , нм		
	417	441	471
Виолаксантин	417	441	471
Антраксантин	422	446	474
Зеаксантин	424	451	479
Лютеин-5,6-эпоксид	415	440	468
Лютеин	422	446	475

Учитывая тот факт, что разница между главными максимумами поглощения лютеин-5,6-эпоксида и лютеина составляет 5 нм (таблица 1) (Hager, Meyer-Bertenrath, 1967) (аналогично паре виолаксантин-антраксантин (Goss, 2003), а для виолаксантина и зеаксантина – 10 нм, можно предположить, что лютеин обладает меньшей активностью в реакциях фотозащиты, чем зеаксантин. Фотозащитная функция была исследована на мутантах *lor1 Chlamydomonas reinhardtii* (Niyogi et al., 1997) и *lut2 Arabidopsis thaliana*

(Pogson et al., 1998; Niyogi, 1999; Niyogi et al., 2001). Установлено, что для развития безызлучательного рассеяния требуется лютеин (Pogson et al., 1998; Horton et al., 1999; Müller et al., 2001). Предполагается, что любой ксантофилл с дезэпоксилированной структурой β -кольца может вызвать конформационное изменение в хлорофилл-связывающих белках комплексов фотосистем и привести к развитию безызлучательного рассеяния (Ладыгин, Ширикова, 2006). Это могут быть ксантофиллы – зеаксантин, антераксантин и лютеин, у высших растений (Demmig-Adams et al., 1996; Wentworth et al., 2004; Bungard et al., 1999; Hager, Holocher, 1994) и диатоксантин у морских водорослей (Müller et al., 2001).

На основании вышесказанного можно заключить, что лютеин-5,6-эпоксидный цикл является вспомогательным ксантофилловым циклом, обнаруженным только у некоторых видов высших растений. Он встречается параллельно с обычным для всех растений виолаксантиновым циклом и включает в себя те же самые реакции эпоксидации и дезэпоксидации, что и виолаксантиновый цикл. Исследователи предполагают, что мутация в зеаксантиновой эпоксидазе могла привести к изменению регуляции и/или субстратной специфичности этого фермента, что обусловило параллельную работу двух ксантофилловых циклов (Ладыгин, 2008). Однако истинные причины появления и функциональная значимость лютеин-5,6-эпоксидного цикла пока еще не выяснены.

3. Диациноксантиновый цикл

У морских планктонных водорослей обнаружен третий тип циклических взаимопревращений ксантофиллов, названный диациноксантиновым циклом. Эти фотосинтезирующие организмы обитают в нестабильных световых условиях, поскольку в глубине океана водоросли испытывают недостаток освещения для нормального процесса фотосинтеза. Поэтому им необходимо максимально эффективно собирать фотоны света. На поверхности моря эти водоросли получают сильный световой стресс, т.е. перенасыщение световой энергией, во много раз превосходящее тот уровень, который необходим для максимального фотосинтеза. В обеих ситуациях важную роль играют каротиноиды: как в собирании света, так и в защите от его избытка (Siefertmann-Harms, 1987; Frank, Cogdell, 1996; Yamamoto, Bassi, 1996).

В нескольких группах планктонных морских водорослей, таких; как диатомовые (*Diatomophyceae*), динофитовые (*Dinophyceae*), гаптофитовые (*Haptophyceae*) и ксантофитовые (*Xanthophyceae*), наряду с широко распространенным у фотосинтезирующих организмов виолаксантиновым циклом функционирует другой ксантофилловый цикл, включающий взаимопревращения ацетиленовых (имеющих одну тройную связь) ксантофиллов: диациноксантин и диатоксантина (Stransky, Hager, 1970; Macpherson, Hiller 2003). В этом ксантофилловом цикле, названном диациноксантиновым (рис. 26), при избыточном освещении моноэпоксидное соединение диациноксантин в процессе реакции дезэпоксидации превращается в безэпоксидный диатоксантин.

Фукоксантин, диациноксантин и диатоксантин морских водорослей обладают характерными структурными элементами – алленовой и ацетиленовой связями. Экспериментально установлена важная роль виолаксантина в качестве ключевого промежуточного соединения в биосинтезе всех каротиноидов с алленовой и ацетиленовой конформацией (рис. 26), что предполагали ранее (Björnland, Liaaen-Jensen, 1989; Liaaen-Jensen, 1998; Ладыгин, 2000, 2002; Macpherson, Hiller, 2003).

О функционировании виолаксантинового цикла у морских водорослей долгое время ничего не было известно. Относительно недавно (Lohr, Wilhelm, 1999) появилось первое сообщение о содержании значительных количеств виолаксантина, антераксантина и зеаксантина у планктонных морских водорослей. Ранее полагали, что эти пигменты не накапливаются у планктонных водорослей, которые содержат диациноксантиновый цикл.

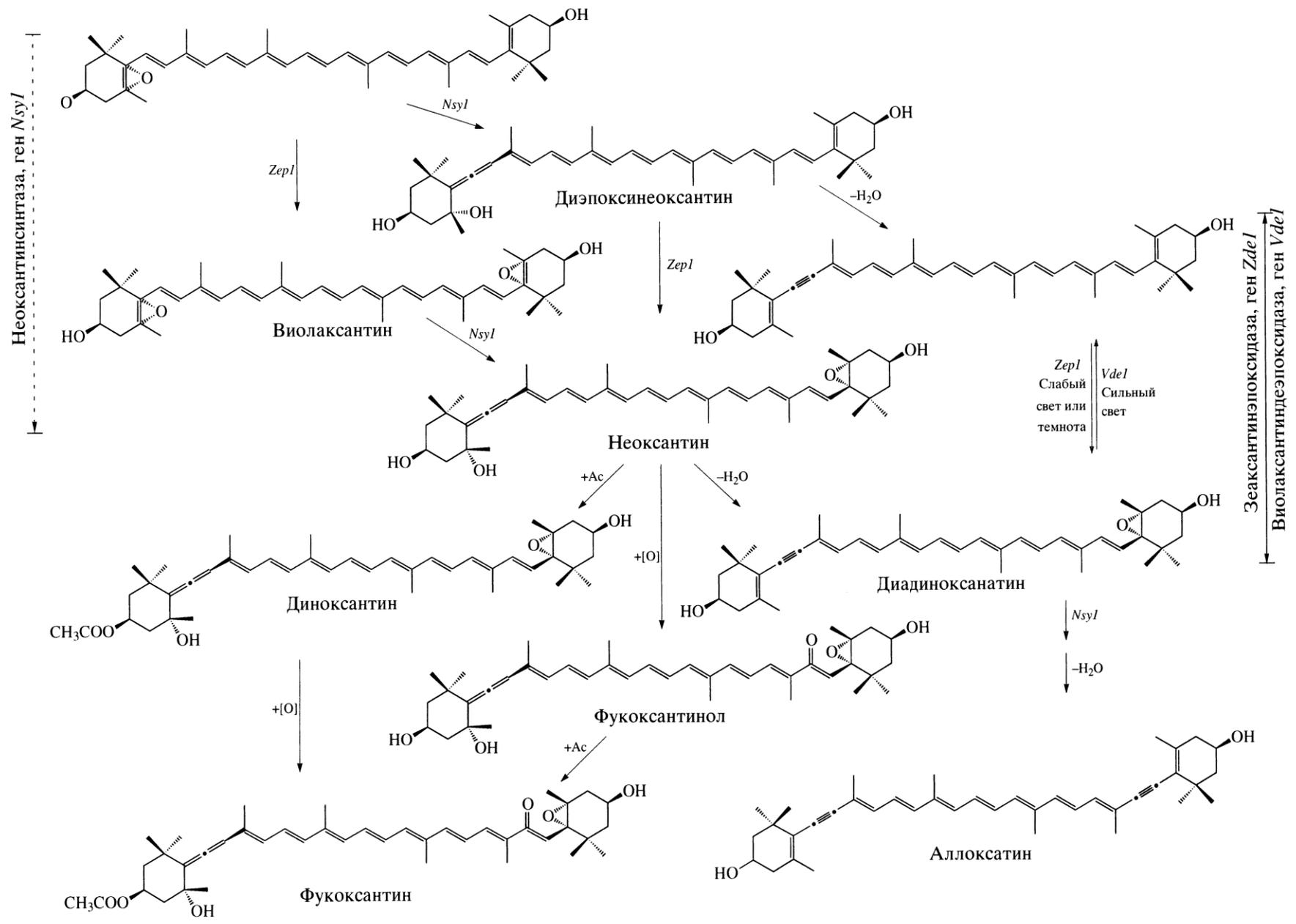


Рис. 26. Схема биосинтеза ксантофиллов диадиноксантинового цикла и направленность протекания реакций в хлоропластах морских водорослей с участием зеаксантиновой эпоксидазы (ген *Zep1*) и виолаксантиновой дезэпоксидазы (ген *Vde1*) при различных условиях освещения. Возможные пути биосинтеза каротиноидов, выполняющих светособирающую функцию (неоксантин, фукоксантин, аллоксантин).

Результаты, полученные по диадиноксантиновому циклу, показали, что этот цикл оказывает значительное влияние на тепловое рассеивание световой энергии, защищающее водоросли от фоторазрушения (Olaizola, Yamamoto, 1994; Arsalane et al., 1994). В экспериментах на диатомовых водорослях показано, что диатоксантин тушит энергию возбуждения менее эффективно, чем зеаксантин. Однако более низкая эффективность может быть компенсирована большими размерами пула диадиноксантинового цикла у морских водорослей, чем виолаксантинового цикла у высших растений (Lohr, Wilhelm, 1999, 2001), и более быстрыми кинетиками дезэпоксидации и эпоксидации в одноэтапном диадиноксантиновом цикле в сравнении с двухэтапным виолаксантиновым циклом (рис. 23 и 26).

Ферментом, катализирующим дезэпоксидацию как виолаксантина, так и диадиноксантина, является виолаксантиновая дезэпоксидаза. Экспериментально установлено, что с помощью этого фермента диадиноксантин дезэпоксицируется в 2 раза быстрее, чем виолаксантин (Lavaud et al., 2002). Этот факт наводит на мысль о том, что диадиноксантин вообще является более предпочтительным субстратом для дезэпоксидазы, чем виолаксантин. Поэтому для более быстрой регуляции нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла диадиноксантин более эффективен.

У морских водорослей эпоксидация с помощью фермента зеаксантиновой эпоксидазы достигается быстрее из-за одноступенчатой реакции превращения диатоксантина в диадиноксантин. Она имеет преимущество над двухступенчатой последовательностью превращений зеаксантина через антраксантин до виолаксантина при условии почти равной скорости кинетических констант для всех субстратов (рис. 23 и 26).

У планктонных морских водорослей хлорофилл *a*, хлорофилл *c* и фукоксантин вносят основной вклад в собирание и запасание энергии света и передачу ее на реакционные центры фотосистем (Wilhelm, 1990; Lavaud et al., 2003). Поэтому колебания в содержании диадиноксантина путем участия его в циклических превращениях позволяют клеткам регулировать свою способность к рассеиванию энергии при избыточных и лимитирующих условиях освещения.

УЧАСТИЕ КАРОТИНОИДОВ В ФОТОТАКСИСЕ ЗЕЛЕННЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

Типичным представителем зеленых микроводорослей является *Chlamydomonas reinhardtii*. Жгутиковые одноклеточные зеленые водоросли обладают фототаксическими способностями и образуют специфическую органеллу хлоропластов – глазное пятно (eyespot), часто называемое глазком или стигмой. Структурно оно содержит один или несколько (обычно 2–3) слоев гексагональных плотно упакованных богатых каротиноидами липидных глобул, локализованных внутри хлоропласта. У *Chlamydomonas reinhardtii*, как правило, оно располагается непосредственно под оболочкой хлоропласта, которая плотно прилегает к плазмомембране, но не сливается с ней (Семенова, Ладыгин, 1975; Семенова, 1978; Inwood et al., 2008). В световой микроскоп глазное пятно (eyespot) или стигму можно видеть как желтую, оранжевую или светло-красную точку или пятно (Kreimer et al., 1992; Inwood et al., 2008). Вначале полагали, что глазное пятно состоит только из 2–3-х слоев липидно-каротиноидных глобул. Однако в ходе дальнейших исследований было установлено, что липидные глобулы снаружи окружены белковыми мембранами (Семенова, 1978), которые формируются в процессе развития глазного пятна внутри хлоропласта. Образование тилакоидов и глазного пятна обычно протекает почти одновременно (рис. 27).

Каждый из 2–3 слоев липидно-каротиноидных глобул глазного пятна располагается на одном из тилакоидов (Семенова, Ладыгин, 1975; Foster, Smyth, 1980; Melkonian, Robenek, 1984; Nultsch, Hader, 1988).

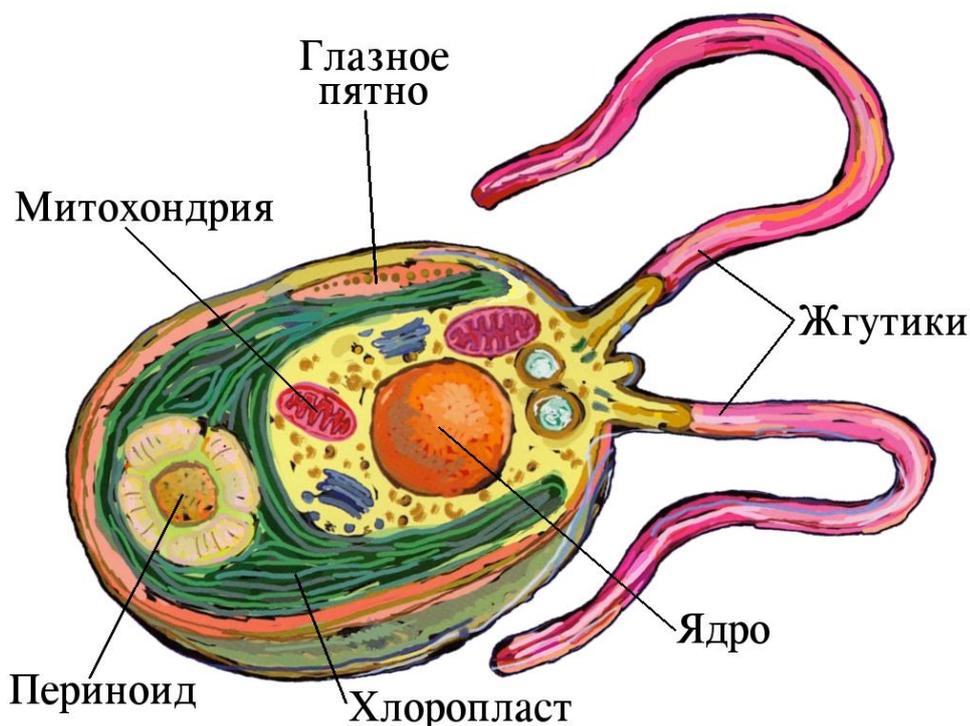


Рис. 27. Структурная организация клетки *Chlamydomonas reinhardtii* на продольном срезе.

Ранее полученные нами пигментные мутанты *Chlamydomonas reinhardtii* представляют огромную ценность, как для идентификации фоторецепторных пигментов, так и для анализа структуры и функции глазного пятна (Ладыгин, 1970, 1991).

В одной из статей мы обратили внимание на очень интересный факт, что область максимальной спектральной чувствительности фототаксиса для глазного пятна мутанта СС1101 ey, mt(-) была смещена в коротковолновую часть длин волн в сравнении со штаммом дикого типа (Синешечков и др., 1989). Эти данные позволили нам предположить, что смещение максимума фототаксиса может быть обусловлено изменениями состава каротиноидов как в мембранах хлоропластов, так и в глобулах глазного пятна. Нас заинтересовал вопрос: может ли изменяться у мутантов состав каротиноидов глазного пятна, так же как и в мембранах хлоропластов? С целью проверки этого предположения, мы провели исследования состава пигментов глазного пятна на серии мутантов *Ch. reinhardtii*, с измененным составом каротиноидов в мембранах хлоропластов, полученных нами ранее (Ладыгин, 1991).

В данной работе мы ставили перед собой две задачи: 1 – изучить биогенез глазного пятна от образования первых глобул до развития максимально структурированной органеллы; 2 – установить состав каротиноидов в глобулах глазного пятна исходного дикого штамма и впервые с помощью мутантов доказать возможность экспериментального изменения их состава. Обе задачи можно было решить только с использованием пигментных мутантов от белых до темно-зеленых, в первом случае, а также мутантов с измененным составом каротиноидов в мембранах хлоропластов во втором. Наличие большого набора обоих типов мутантов, полученных нами ранее (Ладыгин, 1991), позволило нам решить обе задачи. Мы установили все этапы развития глазного пятна и впервые показали возможность экспериментального изменения состава каротиноидов в глобулах глазного пятна у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*.

1. Формирование ультраструктуры глазного пятна

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

С помощью белого мутанта Б-1, не содержащего ни хлорофилла, ни каротиноидов, нам удалось обнаружить самые первые этапы начала формирования глазного пятна. Так у мутанта Б-1 было обнаружено глазное пятно, состоящее всего из 2–3-х липидно-каротиноидных глобул (рис. 28, а), а у светочувствительного почти весь первый ряд глобул (рис. 28, б).



Рис. 28. Ультраструктурная организация глазного пятна на поперечных срезах в хлоропластах мутантов: белого Б-1 (а), белого светочувствительного Б-3 в темноте (б) и желтого Ж-4 на свету (в). Увеличение: $\times 80000$.

Мы получили три типа желтых мутантов. Мутант Ж-1 – желтый в темноте и зеленеющий на свету подобно высшим растениям. Мутант Ж-3 – зеленый в темноте и фенотипически желтый на свету. Этот мутант терял хлорофилл на свету только при доступе

O₂. При посеве же иглой уколом внутрь столбика агара, мутант Ж-3 и на свету оставался зеленым, т.е. фотодеструкция и обесцвечивание были только при доступе O₂ на свету. Мутант Ж-4 постоянно был желтым, как на свету так и в темноте (Семенова, Ладыгин, 1975; Ладыгин, 1991). Исследование желтых мутантов показало, что степень развития глазного пятна четко коррелирует с содержанием каротиноидов. Наличие или отсутствие хлорофилла и соответствующая степень развития мембранной системы, в меньшей степени влияло на формирование глазного пятна. Практически во всех вариантах в хлоропластах желтых мутантов мы наблюдали достаточно хорошо развитое глазное пятно, как правило, состоящее из двух рядов глобул (рис. 28, в). У них наблюдали только начальные этапы формирования тилакоидов.



Рис. 29. Ультраструктурная организация глазного пятна на поперечных срезах в хлоропластах светло-зеленого мутанта С-48 (а), клеток дикого типа К(+) (б) и мутанта Т-8 (в) после глутаросмиевой фиксации. Увеличение: $\times 80000$.

В группе светло-зеленых мутантов, с различным содержанием и соотношением хлорофиллов «*a*» и «*b*», но накапливающих практически то же самое количество каротиноидов, что и у желтых мутантов, мы наблюдали у них близкий уровень развития глазного пятна, но с хорошо развитыми тилакоидами (рис. 29, *a*).

В клетках дикого типа К(+), как правило, наблюдалось формирование глазного пятна, состоящего из двух–трех рядов липидно-каротиноидных глобул, в зависимости от накопления пигментов (рис. 29, *б*).

Однако у темно-зеленого мутанта Т-8, накапливающего в 2–3 раза больше, чем в контроле каротиноидов и хлорофиллов, глазное пятно могло формировать до четырех рядов глобул (рис. 29, *в*), что было обнаружено впервые.

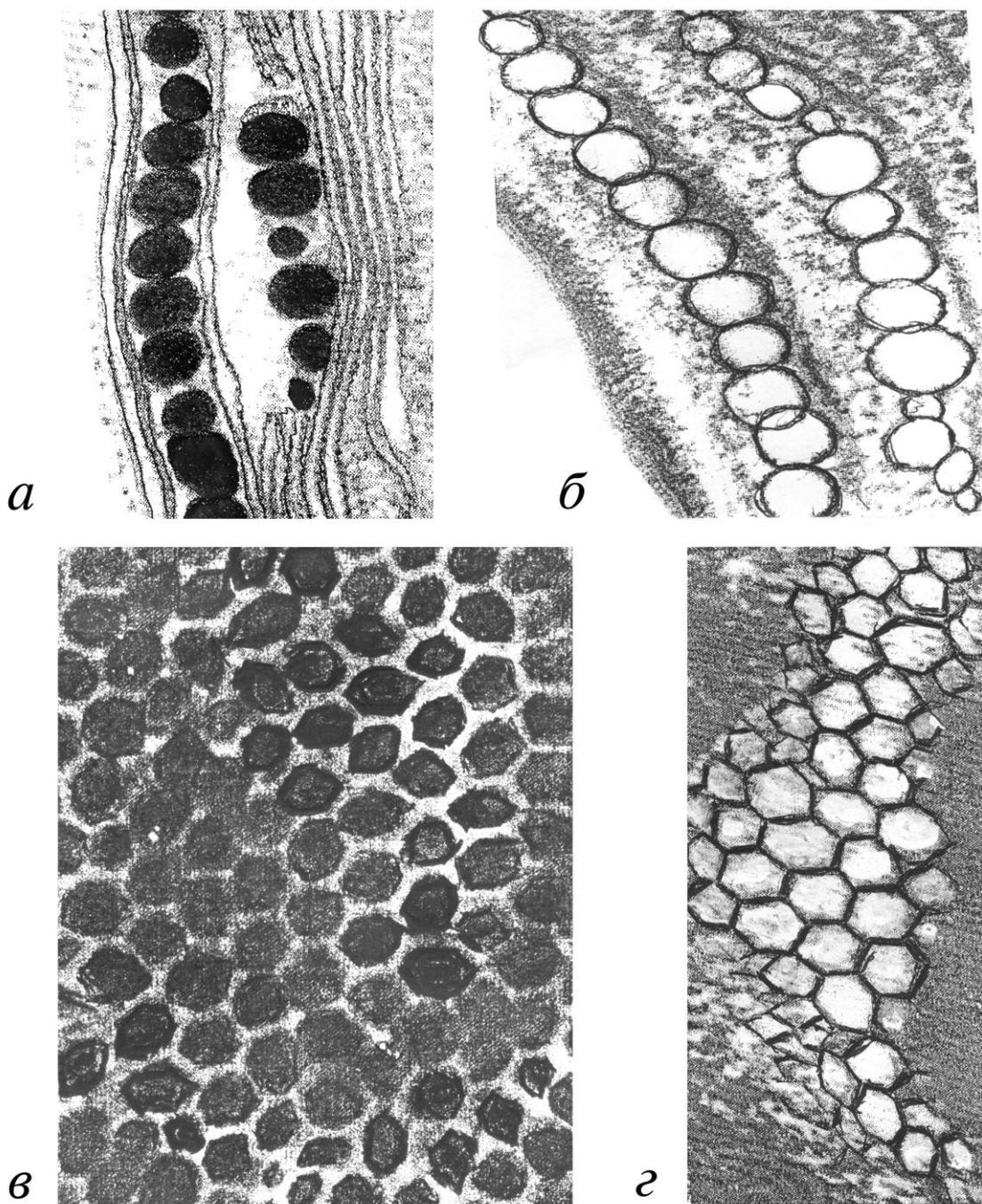


Рис. 30. Ультраструктурная организация глазного пятна на поперечных срезах после глутар-осмиевой (*a*) и глутаровой фиксации (*б*), а также на продольных срезах после глутар-осмиевой (*в*) и глутаровой фиксации (*г*) клеток дикого типа К(+), на свету. Увеличение: $\times 100000$.

Таким образом, благодаря серии пигментных мутантов нам впервые удалось установить все ранние этапы биогенеза формирования глазного пятна. Кроме того было показано, что степень развития глобул глазного пятна хорошо коррелирует с накоплением каротиноидов и в меньшей мере зависит от содержания хлорофиллов. Причем, благодаря мутантам, мы впервые изучили биогенез глазного пятна от 2–3 глобул до формирования 4-х рядов липидно-каротиноидных глобул у темно-зеленых мутантов.

После фиксации глутаровым альдегидом было установлено, что каждая липидно-каротиноидная глобула окружена белковой мембраной (Семенова, 1978). Обнаружить наличие мембраны вокруг глобул глазного пятна можно различными способами: либо фиксацией белковых компонентов мембран глутар-альдегидом и последующей экстракцией липидов и пигментов этанолом и ацетоном в процессе обезвоживания образцов для электронной микроскопии. В этом случае мы наблюдали оставшиеся округлые белковые компоненты, окружавшие глобулы глазного пятна (рис. 30, б). Либо когда для фиксации мы брали очень старые (более 30 суток роста на свету) клетки, в которых имела место частичная деградация липидно-каротиноидных компонентов хлоропласта и, в том числе, глазного пятна. В результате мы наблюдали разрушение внутренней структуры глобул глазного пятна и сохранение окружающих их белковых мембран. При этом форма окружающих мембран полностью сохраняла контуры всех рядов глобул глазного пятна (Семенова, 1978; Семенова, Ладыгин, 2013, 2014). Следует особо отметить, что на поперечных срезах глобулы глазного пятна имеют округлую или овальную форму (рис. 30, а, б).

В то же время на продольных срезах глазного пятна (рис. 30, в, г), особенно после экстракции липидно-каротиноидных компонентов, хорошо видно, что внутри каждого слоя глобул глазка мембраны имеют четкую гексагональную структуру (рис. 30, г). Продольный срез (вид сверху) глазного пятна по своей структуре напоминает структуру пчелиных сот (Ладыгин, 2014). Подобные структуры глазного пятна были так же обнаружены и у зеленой водоросли *Spermatozopsis similis* (Renninger et al., 2001).

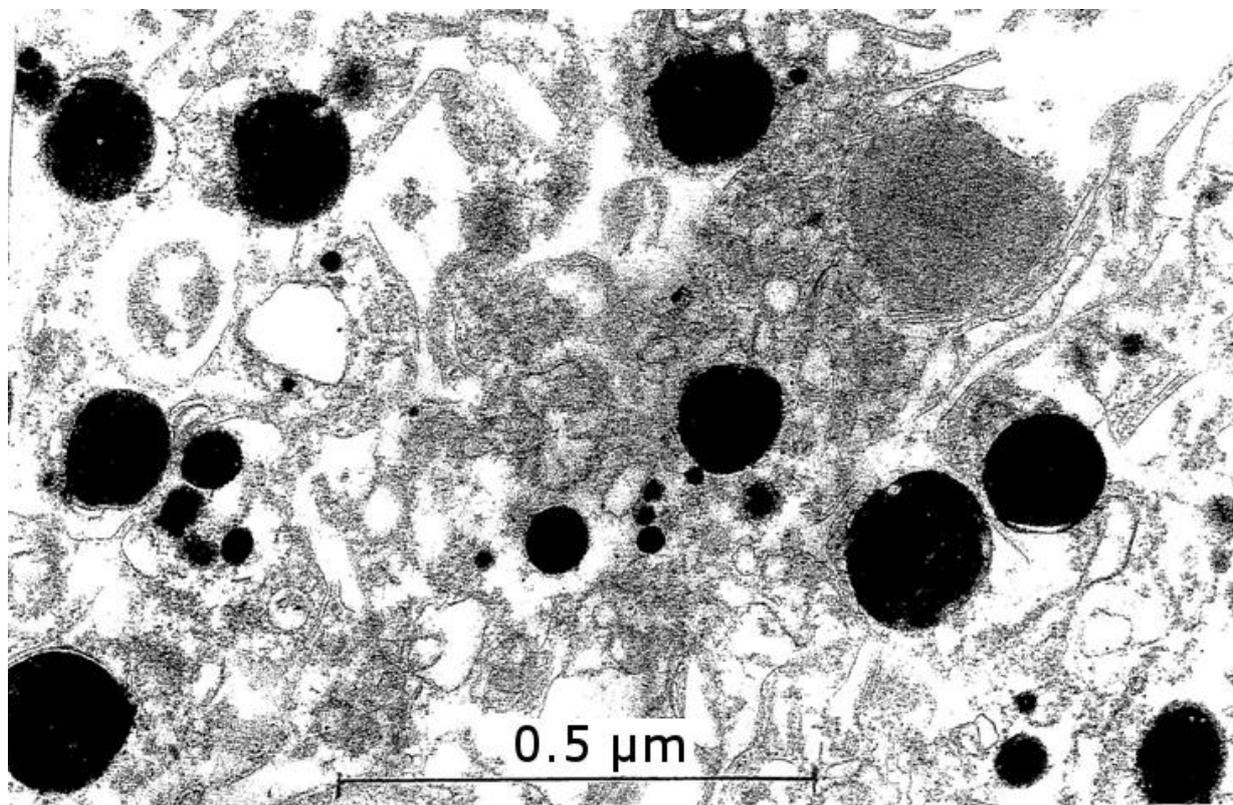


Рис. 31. Ультраструктура выделенных липидно-каротиноидных глобул глазного пятна после глутар-осмиевой фиксации (глобулы черного цвета). Увеличение: $\times 300000$.

2. Состав каротиноидов в глобулах глазного пятна

В нашей работе необходимо было выяснить два вопроса: 1 – установить основные каротиноиды, входящие в состав глобул глазного пятна; и 2 – выяснить может ли изменяться их состав, при существенном изменении состава каротиноидов в мембранах хлоропластов у мутантов *Ch. reinhardtii*. Для того, чтобы ответить на эти вопросы мы выделяли из разрушенных хлоропластов фракцию липидно-каротиноидных глобул глазного пятна путем дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы (Ладыгин, Семенова, 2014). Желтую или оранжевую полосу №1 глобул глазного пятна переносили в отдельную пробирку. Затем фракцию глобул глазного пятна использовали для биохимических, электронномикроскопических и спектрофотометрических исследований. Каждая глобула глазного пятна представляет собой мембранный пузырек, заполненный липидами и каротиноидами.

Электронномикроскопически мы установили, что выделенная нами центрифугированием фракция №1 действительно содержала липидно-каротиноидные глобулы глазного пятна (рис. 31). При осмиевой фиксации они выглядели как черные, округлые глобулы, часто связанные между собой в ассоциаты различной величины. Подобные структуры были описаны ранее для глазков *Spermatozopsis similis* (Grung et al., 1994; Renninger et al., 2001). Они образуются при различной степени обработки ультразвуком аппарата глазного пятна.

Таблица 2. Процентное содержание каротинов в мембранах хлоропластов клеток дикого типа K(+) и мутантов А-90 и С-41 *Chlamydomonas reinhardtii*.

Штаммы	Содержание каротинов, %			
	α-каротин	β-каротин	β-зеакаротин	ζ-каротин
Дикий тип K(+)	4.9 ± 1.7	95.1 ± 3.2	0	0
Мутант А-90	57.4 ± 3.9	42.6 ± 2.8	0	0
Мутант С-41	0	43.8 ± 2.6	17.7±2.7	38.5 ± 2.7

Мы провели предварительные исследования и показали, что в состав глобул глазного пятна входят, главным образом, каротины (Ладыгин, 2014). Поэтому именно этой группе каротиноидов мы уделяли особое внимание в этой работе. Биохимические и спектрофотометрические исследования, проведенные нами на глобулах глазного пятна, показали, что в клетках дикого типа K(+) основным каротиноидом является β-каротин с максимумом поглощения при 464 нм (рис. 32, а).

Таблица 3. Максимумы поглощения каротинов из клеток дикого типа K(+) и мутантов А-90 и С-41 *Chlamydomonas reinhardtii*.

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

Учитывая, что в мембранах хлоропластов клеток дикого типа K(+) соотношение α - и β -каротинов составляет 5:95, можно заключить, что основным пигментом глобул глазного пятна штамма K(+) является β -каротин (табл. 2 и 3). Входит ли в их состав α -каротин, у клеток дикого типа, сказать трудно из-за очень низкого его содержания в хлоропластах зеленых водорослей (Hager, Meyer-Bertenath, 1966).

Существенных количеств ксантофиллов в глобулах глазного пятна мы не обнаружили. На основании полученных нами данных, можно утверждать, что в состав глобул глазного пятна входят каротины. Причем, у клеток дикого типа K(+) главным образом β -каротин.

3. Изменение состава каротинов глазного пятна путем мутагенеза

Для того, чтобы выяснить может ли α -каротин входить в состав глобул глазного пятна мы провели дополнительные исследования на мутанте А-90, накапливающим в мембранах хлоропластов до 60% α -каротина и уменьшенное до 40% содержание β -каротина (табл. 2). Анализ пигментов глобул глазного пятна мутанта А-90 показал, что основным пигментом глобул глазного пятна у него является α -каротин с максимумом поглощения 457 нм (рис. 32). Следовательно, можно утверждать, что состав каротинов глобул глазного пятна может изменяться одновременно с изменением их состава в мембранах хлоропластов. Очевидно глазное пятно мутанта А-90 содержит примерно такой же процент α -каротина (до 60%), как и мембраны хлоропластов этого мутанта. Эти результаты дали нам основание утверждать, что основными пигментами глобул глазного пятна являются каротины, причем, состав α - и β -каротинов изменяется одновременно с изменением их состава в мембранах хлоропластов каждого из штаммов, если судить по максимумам поглощения (табл. 3).

Чтобы окончательно убедиться в правильности нашей гипотезы мы провели еще одно дополнительное исследование на мутанте С-41, у которого в мембранах хлоропластов накапливается до 38% ζ -каротина, 19% β -зеакаротина и 43% β -каротина (табл. 2). Высокое содержание ζ -каротина в мембранах хлоропласта мутанта С-41 позволяет изучить возможность включения его в состав глобул глазного пятна. Полученные нами результаты четко показали, что в глобулах глазного пятна мутанта С-41 содержится ζ -каротин (Ладыгин, 2014). Вероятно такое же высокое количество ζ -каротина (рис. 32, в), как и в мембранах хлоропластов. Видно, что в спектр поглощения глазного пятна мутанта С-41 существенный вклад вносит ζ -каротин с максимумами поглощения при 409 и 433 нм (рис. 33) и β -каротин с максимумом 464 нм.

Чтобы убедиться в правильности наших рассуждений о принадлежности определенных полос поглощения конкретным каротинам мы выделили хроматографически чистые β -каротин и ζ -каротин из клеток мутанта С-41 (рис. 33, б). Из полученных результатов видно достаточно хорошее совпадение максимумов поглощения каротинов из глобул глазного пятна (рис. 32) и чистых индивидуальных каротинов из мембран хлоропластов целых клеток (рис. 33).

Таким образом, на основании полученных нами результатов на клетках дикого типа K(+), мутанта А-90, с высоким содержанием α -каротина и мутанта С-41, с высоким содержанием ζ -каротина, мы пришли к выводу о том, что основными пигментами глазного пятна являются каротины. Причем, впервые было установлено, что состав и соотношение изомеров каротинов в глобулах глазного пятна у мутантов может изменяться в зависимости от изменения их состава и соотношения в мембранах хлоропластов *Ch. reinhardtii* (Ладыгин, Семенова, 2013; Ладыгин, 2014).

Таким образом, наши исследования показали, что у *Ch. reinhardtii* глазное пятно, состоящее из 1–4 рядов глобул, расположено в верхней части хлоропласта. Причем, глобулы каждого ряда глазного пятна располагаются на одном из тилакоидов непосредственно под оболочкой хлоропласта, плотно прилегающей к плазмомембране. Считалось, что они состоят

из рядом расположенных липидно-каротиноидных глобул, не разделенных между собой. Теперь показано, что они окружены мембранами.

Считается, что с окружающими мембранами ячеек глазного пятна связаны различные формы ретиналя и родопсина (Beckmann, Hegemann, 1991; Derguini et al., 1991; Hegemann et al., 1991). Внутренняя структура каждой из ячеек заполнена липидно-каротиноидными глобулами. Состав пигментов, входящих в эти глобулы до сих пор окончательно не был установлен, хотя он представлял очень большой интерес.

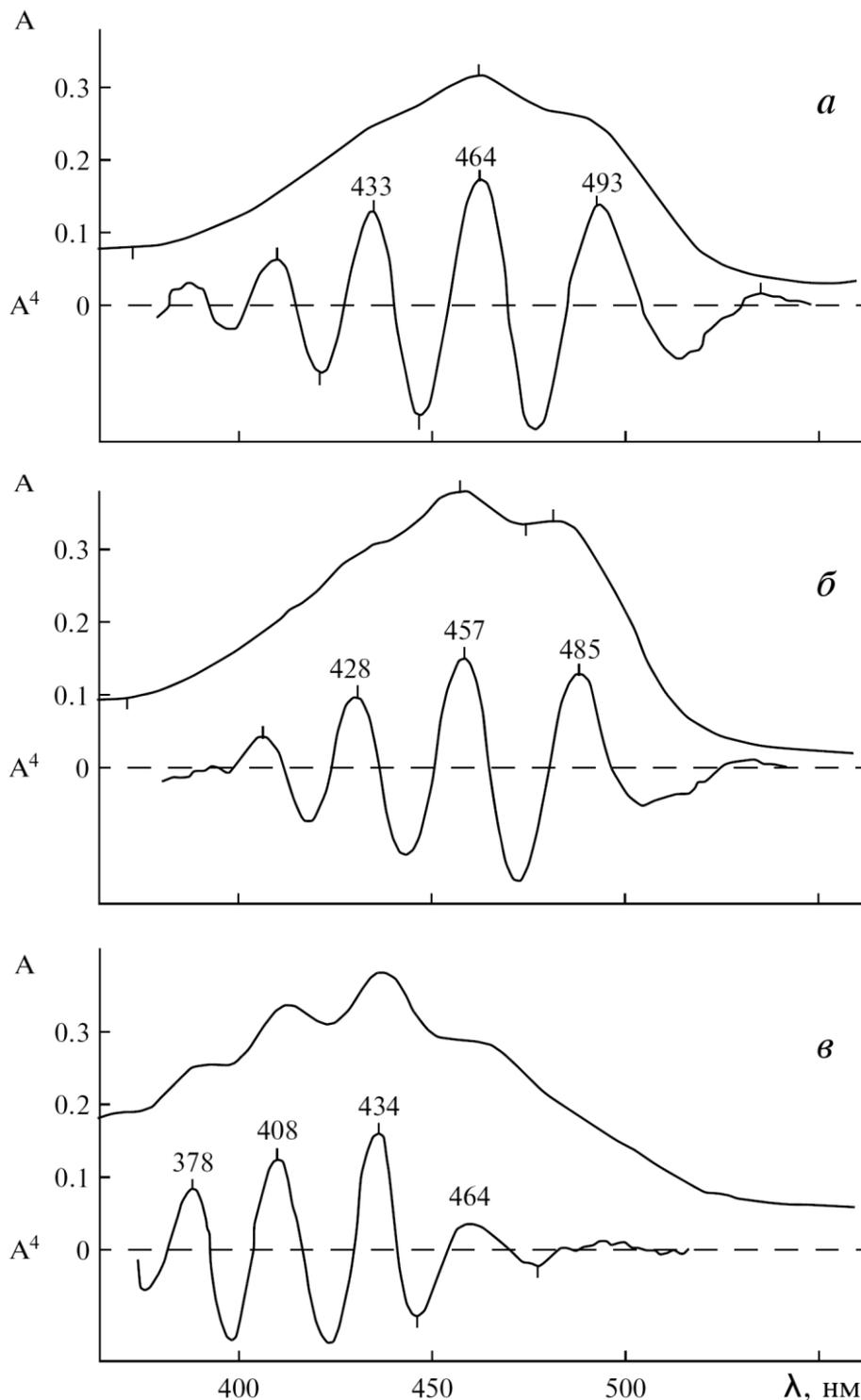


Рис. 32. Спектры поглощения каротинов в хлороформе из глобул глазного пятна (A) и их четвертые производные (A⁴) клеток дикого типа К(+), мутанта А-90 с высоким содержанием α-каротина (*б*) и мутанта С-41 с высоким содержанием ζ-каротина (*в*).

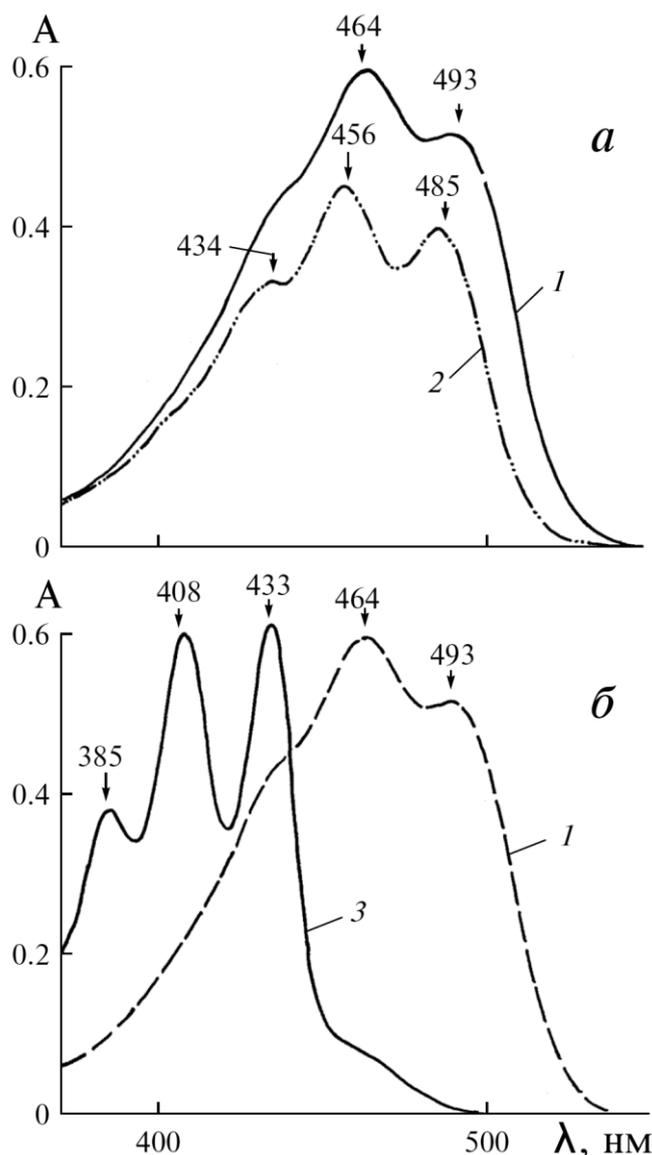


Рис. 33. Спектры поглощения в хлороформе хроматографически выделенных β -каротина (1) и α -каротина (2) из мутанта А-90 (а), а так же β -каротина (1) и ζ -каротина (3) из мутанта С-41 (б).

Наблюдения, основанные на фотоповедении мутантов, с нарушениями по биосинтезу каротиноидов, при экзогенном добавлении ретиналя или некоторых аналогов ретиналя: 11-*cis*-ретиналя (Foster et al., 1984; Hegemann et al., 1988) или *all-trans*-ретиналя (Hegemann et al., 1991; Takahashi et al., 1991) было показано, какие рецепторные пигменты необходимы для функционирования фототаксиса у *Ch. reinhardtii*. В этих исследованиях были получены результаты с помощью жидкостной хроматографии высокого разрешения (HPLC) ретиноидов из экстрактов целых клеток или фракций мембран из штаммов дикого типа и мутантов *Ch. reinhardtii*. Установлено, что ретиналь может быть в форме *all-trans* (Derguini et al., 1991; Beckmann, Hegemann, 1991), либо *all-trans* и 13-*cis* (Renninger et al., 2001) изомеров из целых клеток, а также из изолированных интактных глазных пятен из *Spermatozopsis similis all-trans*- и 11-*cis*-ретиналя (Kreimer et al., 1991). Эти фоторецепторные пигменты, по-видимому, локализованы в мембранах окружающих глобулы глазного пятна (Foster, Smyth, 1980; Melkonian, Robenek, 1984).

Некоторые авторы считают, что глазное пятно – не является фоторецептором для фототаксиса зеленой водоросли, а лишь играет важную вспомогательную роль в генерации сигнала. Они полагают, что вращение клеток при движении связано с модуляцией сигнала фоторецепторного локуса путем периодического его освещения и затенения (Bosco,

Feinleib, 1979; Foster, Smyth, 1980; Melkonian, Robenek, 1980). Так некоторые авторы считают, что фототаксическая ориентация клеток мутанта *eu 627, mt(-) Ch. reinhardtii* (у которого глазок отсутствует или сильно редуцирован) осуществляется путем затеняющих свойств хлоропласта и является необходимым для генерации сигнала (Kreimer et al., 1992). В то же время они не отрицают, что интактное глазное пятно является необходимым для более точной фототаксической ориентации (Kreimer et al., 1991; Morel-Laurens, Bird, 1995). Дополнительной функцией глазного пятна, вероятно, является важность расширения фототаксического сигнала и зоны чувствительности при низких плавных скоростях движения клетки (Kreimer et al., 1992).

Во всех исследованиях глазного пятна жгутиковых зеленых водорослей проявление фототаксической активности на свету имеет место в тех случаях, когда падающий свет располагается перпендикулярно главному пятну (Foster, Smyth, 1980; Morel-Laurens, Feinleib, 1983; Kreimer, Melkonian, 1990). Сейчас считается, что у зеленых водорослей точная фототаксическая ориентация зависит как от отражающих, так и поглощающих свойств глазного пятна (Kreimer, Melkonian, 1990; Riiffer, Nultsch, 1991; Kreimer et al., 1992). Химические изменения происходящие в глазном пятне и влияющие на его функциональные свойства, пока еще не установлены.

Нарушение структуры глазного пятна у мутанта *eu 627, mt(-) Ch. reinhardtii* в условиях быстрого деления клеток является идеально удобной моделью для изучения этих эффектов. Анализ отражающих свойств глазного пятна этого мутанта в синхронных культурах с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа показал (Kreimer et al., 1992), что отражающие свойства глазного пятна у этого мутанта схожи с таковыми штамма дикого типа и определяют фотоориентацию популяции клеток и фотоэлектрический ответ. Такие исследования были проведены и на других мутантах *Ch. reinhardtii*, в том числе на мутантах с отсутствием глазного пятна (Harz, Hegemann, 1991; Kreimer et al., 1992; Ладыгин и др., 1973), на которых было установлено, что вспышки света с длиной волны 500 и 440 нм при редукции глазного пятна не приводили к фототаксической ориентации клеток. Функциональное состояние фоторецепторных пигментов также мало изменяло поведение мутантных клеток. В то же время инкубация клеток мутанта с высокой концентрацией *all-trans* – ретиналя (10 мМ), независимо от биосинтеза каротиноидов, приводила к усилению отражающей способности глазного пятна (Kreimer et al., 1992). Эти данные показывают важное значение глазного пятна, как в поглощении фототаксически активного света, так и в четкой ориентации клеток к свету в процессе фототаксиса (Kreimer et al., 1992).

В последнее десятилетие активно изучается биохимический состав белков мембран глазного пятна (Wagner et al., 2008). Особое внимание уделяется исследованию родопсина и изомеров ретиналя (Ладыгин и др., 1973; Renninger et al., 2001; Dieckmann, 2003). Недавно была описана редукция каротинов и глазного пятна у белого светочувствительного мутанта с блокировкой синтеза фермента фитоинсинтазы (Lawson, Satir, 1995; Inwood et al., 2008). Эти результаты подтверждают наше заключение о том, что без каротиноидов не образуется глазное пятно. В зависимости от содержания каротиноидов в хлоропластах *Ch. reinhardtii* глазное пятно может содержать от 1 до 4 рядов липидно-каротиноидных глобул. Причем, каждый ряд липидно-каротиноидных глобул окружен мембранами, которые на продольном срезе имеют гексагональную структуру схожую с пчелиными сотами. На поперечном срезе каждая глобула глазного пятна имеет овальную или округлую форму. Такую же структуру имеет глазное пятно у зеленой водоросли *Spermatozopsis similis*, в глобулах которого было обнаружено преобладающее накопление каротинов (Renninger et al., 2001; Grung et al., 1994).

На основании проведенных нами исследований можно заключить, что липидно-каротиноидные глобулы глазного пятна одноклеточной зеленой микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* содержат каротины. Впервые удалось показать, что у мутантов состав каротинов может изменяться в зависимости от изменения их состава в мембранах хлоропластов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы рассмотрели современное состояние знаний о биохимических и генетических механизмах биосинтеза каротиноидов в пластидах различных видов водорослей. Представлены данные о двух путях биосинтеза ключевых C₅-изопреновых единиц: из ацетата (C₂) в цитоплазме и из глюкозы (C₆) в хлоропластах до изопентенилдифосфата (C₅). Далее от изопентенилдифосфата (C₅) и диметилаллилдифосфата (C₅) у высших растений и водорослей биосинтез каротиноидов осуществляется по единой схеме с последующим превращением их до геранилдифосфата (C₁₀), фарнезилдифосфата (C₁₅), геранилгеранилдифосфата (C₂₀) и фитоина (C₄₀). Детально рассмотрены все этапы десатурации фитоина до формирования ациклических соединений: фитофлуина, ζ-каротина, нейроспорина, ликопина, а также их циклизации до α-, β- и ε-каротинов. Показано, как в процессе последовательного окисления каротинов путем формирования гидрокси-, эпокси- и оксогрупп образуются циклические ксантофиллы хлоропластов и хромопластов. Анализируются ферменты и генетический контроль всех этапов процесса биосинтеза каротиноидов в хлоропластах эукариот.

Изучение локализации и функциональной роли каротиноидов в хлоропластах растений и различных видов водорослей показало, что основными функциями каротиноидов являются фотозащитная, светособирающая, структурная, а также участие в фотохимических процессах фотосистем I и II. Такие ксантофиллы, как неоксантин, фукоксантин, перидинин и аллоксантин, имеющие алленовую или ацетиленовую связь, выполняют в основном светособирающую функцию. Они передают поглощенную энергию света на хлорофилл *b*. Другие ксантофиллы, занимающие строго специфические локусы внутри светособирающих хлорофилл-*a/b*-белковых комплексов фотосистем I и II, выполняют либо структурную роль (лютеин), либо фотозащитную (зеаксантин, антраксантин, виолаксантин). При избыточном освещении в присутствии кислорода каротиноиды ксантофилловых циклов предохраняют хлорофиллы и липиды фотосинтетических мембран от фотодеструкции. В хлоропластах эукариот обнаружено три типа ксантофилловых циклов: виолаксантиновый, лютеин-5,6-эпоксидный и диадиноксантиновый. В данной работе рассмотрены и детально обсуждены сходства и различия реакций эпоксидации и деэпоксидации этих циклов. Показана специфика распределения ксантофилловых циклов среди высших растений, пресноводных и морских водорослей.

Здесь нами подробно рассмотрена общая характеристика недавно обнаруженного у высших растений лютеин-5,6-эпоксидного цикла. Показана локализация этого цикла в мембранах хлоропластов и его функционирование в зависимости от интенсивности света в сравнении с широко распространенным и хорошо изученным виолаксантиновым циклом. Предполагается, что в этих циклах могут участвовать либо одни и те же ферменты – виолаксантиновая деэпоксидаза и зеаксантиновая эпоксидаза, либо виолаксантиновая деэпоксидаза и различные зеаксантиновые эпоксидазы – обычная и измененная в результате мутации.

Анализ функциональной роли каротиноидов в хлоропластах водорослей и высших растений позволил сделать вывод о том, что они выполняют четыре основные функции: фотохимическую, структурную, светособирающую и фотозащитную. Каротины в основном локализируются в ядровых хлорофилл-белковых комплексах реакционных центров ФС-I и ФС-II. Они участвуют в фотохимических процессах этих комплексов и защищают их от фотодеструкции. Напротив, ксантофиллы локализируются как в основных светособирающих комплексах ЛНС-I и ЛНС-II внешней периферической антенны, так и в минорных комплексах CP24, CP26 и CP29 внутренней антенны фотосистемы II.

Очень важно отметить два момента: во-первых, далеко не все ксантофиллы связаны с пигмент-белковыми комплексами, а лишь меньшая их часть; во-вторых, внутри комплексов различные специфические функции выполняют только определенные типы ксантофиллов. Так, структурную роль в организации мономеров ЛНС-II комплексов выполняют две

молекулы лютеина в локусах *L1* и *L2*, соответственно в тримерах ЛНС-II таких молекул будет шесть. В то же время в защите от фотодеструкции и стабилизации фотосинтетических мембран тилакоидов у высших растений и зеленых водорослей (*Chlorophyta*) участвуют зеаксантин, антераксантин, виолаксантин, а также лютеин и лютеин-5,6-эпоксид. У морских водорослей *Chromophyta*, помимо ксантофиллов виолаксантинового цикла функции фотозащиты и стабилизации мембран выполняют диадиноксантин и диатоксатин. Светособирающую функцию выполняют алленовые и ацетиленовые каротиноиды: у *Chlorophyta* это неоксантин, а у *Chromophyta* – фукоксантин, вошериаксантин, гетероксантин, перидинин и аллоксантин.

Молекулы неоксантина, выполняющие светособирающую функцию, локализируются в главном светособирающем хлорофилл-*a/b*-белковом комплексе ФС-II (ЛНС-II). В этом комплексе неоксантин занимает специфический строго определенный локус *N1*. Поглощенная молекулами неоксантина в локусах *N1* энергия света передается только на хлорофилл *b* антенны ФС-II. Непосредственно на хлорофилл *a* реакционных центров фотосистем с молекул неоксантина локусов *N1* энергия света передаваться не может. Следовательно, эти молекулы неоксантина у *Chlorophyta* в фотохимических реакциях фотосистем I и II не участвуют, а выполняют только светособирающую функцию. Такую же функцию светосбора у *Chromophyta* выполняют фукоксантин, вошериаксантин, гетероксантин, перидинин и аллоксантин.

В светособирающих комплексах ФС-II помимо двух локусов лютеина *L1* и *L2* и одного – неоксантина *N1* есть специфический локус для виолаксантина *V1*. В ходе последовательных реакций дезэпоксидации ксантофиллового цикла виолаксантин в локусе *V1* может замещаться вначале антераксантином, а затем зеаксантином. Эти ксантофиллы виолаксантинового цикла (виолаксантин ↔ зеаксантин), так же как и ксантофиллы лютеин-5,6-эпоксидного (лютеин-5,6-эпоксид ↔ лютеин) и диадиноксантинового (диадиноксантин ↔ диатоксатин) циклов, выполняют фотозащитную функцию, предохраняя хлорофилл и липиды мембран хлоропластов от фотодеструкции при избыточном освещении и от окисления активными формами кислорода. Реакции дезэпоксидации и эпоксидации в этих трех циклах осуществляются с участием одних и тех же ферментов: виолаксантиновой дезэпоксидазы (ген *Vde1*) и зеаксантиновой эпоксидазы (ген *Zep1*).

Таким образом, нами детально охарактеризованы светособирающая, структурная и фотозащитная функции каротиноидов. Описаны механизмы функционирования и филогенетические особенности локализации трех ксантофилловых циклов. Однако многие аспекты происхождения, особенности функционирования этих циклов, а также значимость каротиноидов в онтогенезе и филогенезе различных видов водорослей еще предстоит выяснить.

Следует особо отметить ещё одну функциональную особенность каротиноидов, характерную для подвижных микроводорослей, обладающих фототаксисом и имеющих специализированную органеллу – глазное пятно. Участие каротиноидов в фототаксисе оценивали по составу пигментов глазного пятна. Детально исследовали биогенез ультраструктуры глазного пятна в хлоропластах мутантов одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. С помощью серии пигментных мутантов установлено, что развитие ультраструктуры глазного пятна коррелирует с накоплением каротиноидов. В зависимости от их содержания, глазное пятно образует от 1 до 4 рядов липидно-каротиноидных глобул. Показано, что в глобулах глазного пятна накапливаются только каротины. Впервые обнаружено, что у мутантов с измененным составом каротинов в мембранах хлоропластов может изменяться их состав и в глобулах глазного пятна, что предполагает участие различных каротинов в фототаксисе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 422 с.
- Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в первичных фотобиологических процессах // Биол. мембраны. 1998. Т. 15. № 5. С. 517–529.
- Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М.: Мир, 1986. Т. 1. 392 с.
- Карнаухов В.Н. Биологические функции каротиноидов. М.: Наука, 1988. 240 с.
- Карнаухов В.Н. Функции каротиноидов – объект биофизических исследований // Биофизика. 2000. Т. 45. № 2. С. 364–384.
- Клячко-Гурвич Г.Л., Ладыгин В.Г., Пронина Н.А., Рябых И.Б., Семенов Н.А. Специфичность состава жирных кислот липидов у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* с различной организацией фотосистем хлоропластов // Физиология растений. 1991. Т. 38. № 6. С. 1171–1179.
- Клячко-Гурвич Г.Л., Пронина Н.А., Ладыгин В.Г., Цоглин Л.Н., Семенов В.Е. Разобщенное функционирование фотосистем I и фотосистемы II. 1. Особенности и роль десатурации жирных кислот // Физиология растений. 2000. Т. 47. № 5. С. 688–698.
- Корнюшенко Г.А., Сапожников Д.И., Евдокимова И.В. Исследование реакций виолаксантинового цикла в изолированных хлоропластах // Физиология растений. 1977. Т. 24. № 4. С. 710–717.
- Красновский А.А.-мл. Фосфоресцентный анализ синглетного молекулярного кислорода в фотобиохимических системах // Биологические мембраны. 1998. Т. 15. № 5. С. 530–548.
- Ладыгин В.Г. Пигментные мутанты *Chlamydomonas reinhardtii*, индуцированные нитрозоэтилмочевинной и ультрафиолетовыми лучами // Генетика. 1970. Т. 6. № 3. С. 42–50.
- Ладыгин В.Г. Коллекция штаммов мутантов *Chlamydomonas* Института почвоведения и фотосинтеза АН СССР, г. Пушкино // В сб.: Каталог культур микроводорослей в коллекциях СССР. Изд-во РАН. Москва. 1991. С. 152–173.
- Ладыгин В.Г. Структурно-функциональная организация фотосистем в хлоропластах *Chlamydomonas reinhardtii* // Физиология растений. 1998. Т. 45. № 5. С. 741–762.
- Ладыгин В.Г. Биосинтез каротиноидов в пластидах растений // Биохимия. 2000. Т. 65. № 10. С. 1317–1333.
- Ладыгин В.Г. Современные представления о путях биосинтеза каротиноидов в хлоропластах эукариот // Журн. общей биологии. 2002. Т. 63. № 4. С. 299–325.
- Ладыгин В.Г. Лютеин-5,6-эпоксидный цикл – новый ксантофилловый цикл в хлоропластах растений // Биологические мембраны. 2008. Т. 25. № 3. С. 163–172.
- Ладыгин В.Г. Биогенез и возможности изменения состава каротиноидов глазного пятна у мутантов микроводоросли *Chlamydomonas reinhardtii* // Микробиология. 2014. Т. 83. № 2. С. 160–169.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А. Развитие ультраструктуры и экспериментальное изменение состава каротинов глазного пятна у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Биофизика. 2013. Т. 58. № 6. С. 1005–1012.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А. Ультраструктурная организация и состав каротиноидов глазного пятна у мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 2014. Т. 56. №1. С. 48–56.
- Ладыгин В.Г., Семенова Г.А., Тагеева С.В. Развитие ламеллярной структуры пластид у пигментных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* // Цитология. 1973. Т. 15. № 7. С. 810–819.
- Ладыгин В.Г., Ширикова П.Д. Участие фотосистемы I в светоиндуцированном превращении виолаксантина в зеаксантин // Физиология растений. 1987. Т. 34. № 6. С. 1068–1072.
- Ладыгин В.Г., Ширикова П.Д. Влияние состава каротинов на устойчивость клеток водорослей к действию УФ-С-излучения // Физиология растений. 1993. Т. 40. № 4. С. 644–649.

- Ладыгин В.Г., Ширикова П.Д. Изменение состава каротиноидов в мембранах хлоропластов у двойных мутантов *Chlamydomonas reinhardtii* с нарушением различных участков фотосистемы II // Биол. мембраны. 1999. Т. 16. № 5. С. 492–502.
- Ладыгин В.Г., Ширикова П.Д. Современные представления о функциональной роли каротиноидов в хлоропластах эукариот // Журнал общей биологии. 2006. Т. 67. № 3. С. 163–189.
- Маслова Т.Г., Марковская Е.Ф. Современные представления о функционировании виолаксантинового цикла (развитие идей Д.И. Сапожникова) // Физиология растений. 2012. Т. 59. № 3. С. 472–480.
- Маслова Т.Г., Попова И.А., Корнюшенко Г.А., Королева О.Я. Развитие представлений о функционировании виолаксантинового цикла в фотосинтезе // Физиология растений. 1996. Т. 43. № 3. С. 437–449.
- Пасешниченко В.А. Новый альтернативный путь биосинтеза изопреноидов у эубактерий и растений // Биохимия. 1998. Т. 63. № 2. С. 171–182.
- Сапожников Д.И. Химическое строение каротиноидов и их превращения в растительной клетке // Успехи соврем. биологии. 1967. Т. 64. № 2. С. 248–267.
- Сапожников Д.И., Маевская А.Н., Красовская-Антропова Т.А., Приалгаускайте Л.Л., Турчина В.С. Влияние анаэробнозиса на изменение соотношения основных каротиноидов зеленого листа // Биохимия. 1959. Т. 24. № 1. С. 39–41.
- Семенова Г.А. Ультраструктурная организация глазка хламидомонады // Цитология. 1978. Т. 20. № 6. С. 603–606.
- Семенова Г.А., Ладыгин В.Г. Ультраструктура пластид трех типов мутантов *Chlamydomonas reinhardtii*, фенотипически желтых на свету или в темноте // Цитология. 1975. Т. 17. № 9. С. 1003–1008.
- Синецков О.А., Говорунова У.Г., Литвин Ф.Ф. Роль фотосинтетического аппарата и стигмы в формировании спектральной чувствительности фототаксиса у жгутиковой зеленой водоросли // Биофизика. 1989. Т. 34. № 2. С. 255–258.
- Яцко Я.Н., Дымова О.В., Головки Т.К. Дезэпоксидация пигментов виолаксантинового цикла и тепловая диссипация световой энергии у трех бореальных видов вечнозеленых хвойных растений // Физиология растений. 2011. Т. 58. С. 140–143.
- Al-Babili S., Hugueney P., Schledz M., Welsch R., Frohnmeyer H., Beyer P. Identification of a novel gene coding for neoxanthin synthase from *Solanum tuberosum* // FEBS Lett. 2000. V. 485. № 2–3. P. 168–172.
- Albrecht M., Linden H., Sandmann G. Biochemical characterization of purified ζ -carotene desaturase from *Anabaena* PCC-7120 after expression in *Escherichia coli* // Eur. J. Biochem. 1996. V. 236. № 1. P. 115–120.
- Amerongen H., Dekker J.P. Light-harvesting in photosystem II // Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. V. 13 / Eds Green B.R., Parson W.W. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. P. 219–251.
- Anderson J.M., Barrett J., 1986. Light-harvesting pigment-protein complexes of algae // Encyclopedia of Plant Physiology. V. 19. Photosynthesis III / Eds Staehelin L.A., Arntzen C.J. Berlin; Heidelberg; New York: Springer. P. 269–285.
- Andersson P.O., Gillbro T., Asato A.E., Liu R.S.H. Dual singlet state emission in a series of mini-carotenes // J. Luminescence. 1992. V. 51. P. 11–20.
- Armstrong G.A. Eubacteria show their true colors: Genetics of carotenoid pigment biosynthesis from microbes to plants // J. Bacteriol. 1994. V. 176. № 16. P. 4795–4802.
- Armsrong G.A., Hearst J.E. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis // FASEB J. 1996. V. 10. № 2. P. 228–237.
- Arsalane W., Rousseau B., Duval J.-C. Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition // Potochem. Photobiol. 1994. V. 60. P. 237–243.

- Bartley G.E., Scolnik P.A., Giuliano G.* Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1994. V. 45. № 2. P. 287–301.
- Bassi R., Pineau B., Dainese P., Marquardt J.* Carotenoid-binding proteins of photosystem II // *Eur. J. Biochem.* 1993. V. 212. P. 297–303.
- Beckmann M., Hegemann P.* *In vitro* identification of rhodopsin in the green alga *Chlamydomonas* // *Biochemistry.* 1991. V. 30. P. 3692–3697.
- Ben-Amotz A., Shaish A., Avron M.* Mode of action of the massively accumulated β -carotene of *Dunaliella bardawil* in protecting the alga against damage by excess irradiation // *Plant Physiology.* 1989. V. 91. P. 1040–1043.
- Beyer P., Mayer M., Kleining H.* Molecular oxygen and the state of geometric isomerism of intermediates are essential in the carotene desaturation and cyclization reactions in daffodil chromoplasts // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 184. № 1. P. 141–150.
- Bilger W., Fisahn J., Brummet W., Kossmann J., Willmitzer L.* Violaxanthin cycle pigment contents in potato and tobacco plants with genetically reduced photosynthetic capacity // *Plant Physiol.* 1995. V. 108. № 9. P. 1479–1486.
- Bishop N.I.* Loss of keto-carotenoid biosynthetic capacity does not impair photosynthesis in *Scenedesmus obliquus* // *Photosynth. Res.* 1992. V. 34. № 1. P. 187–192.
- Bishop N.I., Bulga B., Senger H.* Photosynthetic capacity and quantum requirement of three secondary mutants of *Scenedesmus obliquus* with deletions in carotenoid biosynthesis // *Bot. Acta.* 1998. V. 111. P. 231–235.
- Björnland T., Liaaen-Jensen S.* Distribution patterns of carotenoids in relation to chromophyte phylogeny and systematics // *The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives. Systematics Association. Special V. 38 / Eds Green J.C., Leadbeater B.S.C., Diver W.L.* Oxford: Clarendon Press. 1989. P. 37–60.
- Boscov J.S., Feinleib M.E.* Phototactic response of *Chlamydomonas* to flashes of light. II. Response of individual Cells // *Photochem. Photobiol.* 1979. V. 30. P. 499–505.
- Boudreau E., Otis C., Turmed M.* Conserves gene clusters in the highly rearranged chloroplast genomes of *Chlamydomonas moewussi* and *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 24. № 4. P. 585–602.
- Bouvier F., D'Harlingue A., Backhaus R.A., Kimagai M.N., Camara B.* Identification of neoxanthin synthase as a carotenoid cyclase paralog // *Eur. J. Biochem.* 2000. V. 267. № 3. P. 6346–6352.
- Bouvier F., D'Harlingue A., Hugueney P., Marin E., Marion-Poll A., Camara B.* Xanthophyll biosynthesis. Cloning, expression, functional reconstitution, and regulation of b-cyclohexenyl carotenoid epoxidase from pepper (*Capsicum annuum*) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 271. № 46. P. 28861–28867.
- Bouvier F., Keller Y., D'Harlingue A., Camara B.* Xanthophyll biosynthesis: molecular and functional characterization of carotenoid hydroxylases from pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1391. P. 320–328.
- Britton G.* Carotenoids UV/Visible spectroscopy // *Spectroscopy / Eds Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.* Basel: Birkhauser, 1995a. V. 1B. P. 13–62.
- Britton G.* Structure and properties of carotenoids in relation to function // *FASEB J.* 1995b. V. 9. № 15. P. 1551–1558.
- Britton G.* Overview of carotenoid biosynthesis // *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism / Eds Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H.* Basel; Boston; Berlin: Birkhauser Verlag, 1998. V. 3. P. 13–147.
- Britton G., Powls R., Schulze M.* The effect of illumination on the pigment composition of the ζ -carotenic mutant *PG-1* of *Scenedesmus obliquus* // *Arch. Microbiol.* 1977. V. 113. № 3. P. 275–280, 281–284.
- Bugos R.C., Hieber A.D., Yamamoto H.Y.* Xanthophyll cycle enzymes are members of lipocalin family, the first identified from plants // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 25. P. 15321–15324.

- Bungard R.A., Ruban A.V., Hibberd J.M., Press M.C., Horton P., Scholes J.D. Unusual carotenoid composition and a new type of xanthophyll cycle in plants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 3. P. 1135–1139.
- Caffarri S., Croce R., Breton J., Bassi R. The major antenna complex of photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light-harvesting // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 38. P. 35924–35933.
- Camara B. Plant phytoene syntase complex: component enzymes, immunology, and biogenesis // Methods Enzymol. 1993. V. 214. № 3. P. 252–365.
- Candau R., Bejarano E.R., Cerada-Olmedo E. *In vivo* channeling of substrates in an enzyme aggregate for *beta*-carotene biosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 10. P. 4936–4940.
- Christensen T. The Chromophyta, past and present // The Chromophyte Algae: Problems and Perspectives. Systematics Association. Special V. 38 / Eds Green J.C., Leadbeater B.S.C., Diver W.L. Oxford: Clarendon Press. 1989. P. 1–12.
- Chynwat V., Frank H.A. The application of the energy gap law to the S₁ energies and dynamics of carotenoids // Chem. Phys. 1995. V. 194. P. 237–244.
- Ciuliano G. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development // Plant J. 1996. V. 9. № 4. P. 505–512.
- Claes H. Biosynthese von Carotenoiden bei *Chlorella*. III. Untersuchungen über die lichtabhängige Synthese von α - und β -Carotin und Xanthophyllen bei der *Chlorella*-Mutanten 5/520 // Z. Naturforsch. 1957. B. 12B. S. 401–407.
- Corona V., Aracri B., Kosturkova G., Bartley G.E., Pitto L., Gerogetti L., Scolnik P.A., Ciuliano G. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development // Plant J. 1996. V. 9. № 4. P. 505–512.
- Croce R., Remelli R., Varotto C., Breton J., Bassi R. The neoxanthin binding site of the major light-harvesting complex (LHC-II) from higher plants // FEBS Lett. 1999a. V. 456. P. 1–6.
- Croce R., Weiss S., Bassi R., Carotenoid-binding sites of the major light-harvesting complex II of higher plants // J. Biol. Chem. 1999b. V. 274. № 42. P. 29613–29623.
- Cunningham F.X. Jr., Chamovitz J.D., Misawa N., Gantt E., Hirschberg J. Cloning and functional expression in *Escherichia coli* of a cyanobacterial gene for lycopene cyclase, the enzyme that catalyzes the biosynthesis of β -carotene // FEBS Lett. 1993. V. 328. № 1. P. 130–138.
- Cunningham F.X. Jr., Gantt E. Genes and enzyme of carotenoid biosynthesis in plants // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1998. V. 49. № 4. P. 557–583.
- Cunningham F.X. Jr., Gantt E. One ring or two? Determination of ring number in carotenoids by lycopene ϵ -cyclases // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 5. P. 2905–2910.
- Cunningham F.X. Jr., Pogson B., Sun Z., McDonald K.A., DellaPenna D., Gantt E. Functional analysis of the β - and ϵ -lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation // Plant Cell. 1996. V. 8. № 6. P. 1613–1626.
- Czygan F.-C. Primäre und sekundäre Carotenoide in chlorokokkalen Algen // Arch. Hydrobiol. Suppl. 1982. B. 60. № 4. S. 470–488.
- Davies B.H. Carotenoids: aspects of biosynthesis and enzymology // Ber. Deutsch. Bot. Ges. 1975. B. 8. № 1. S. 7–25.
- Davies B.H., Röss A.F. 7,8,11,12-Tetrahydro- γ -carotene: a novel carotene from *Phycomyces blakesleanus* // Phytochemistry. 1973. V. 13. № 2. P. 209–219.
- Davies B.H., Taylor R.F. Carotenoid biosynthesis – the early steps // Pure Appl. Chem. 1976. V. 47. № 2. P. 211–221.
- Demmig B., Winter K., Krüger A., Czygan F.C. Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. A possible role of the xanthophyll cycle in the dissipation of excess light energy // Plant Physiol. 1987. V. 84. P. 218–224.
- Demmig-Adams B. Carotenoids and photoprotection in plants: a role for the xanthophyll zeaxanthin // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1020. P. 1–24.

- Demmig-Adams B., Adams W.W. III. Chlorophyll and carotenoid composition in leaves of *Euonymus kiautschovicus* acclimated to different degrees of light stress in the field // *Austr. J. Plant Physiol.* 1996. V. 22. P. 249–260.
- Demmig-Adams B., Gilmore A.M., Adams W.W. III. *In vivo* function of carotenoids in higher plants // *FASEB J.* 1996. V. 10. №4. P. 403–412.
- Derguini F., Mazur P., Nakanishi K., Starace D.M., Saranak J., Foster K.W. All-trans-retinal is the chromophore bound to the photoreceptor of the alga *Chlamydomonas reinhardtii* // *Photochem Photobiol.* 1991. V. 54. P. 1017–1021.
- Dieckmann C.L. Eyespot placement and assembly in the green alga *Chlamydomonas* // *BioEssays.* 2003. V. 25. P. 410–416.
- Dogbo O., Camara B. Purification of isopentenyl perophosphate isomerase and geranylgeranyl pyrophosphate synthase from *Capsicum* chromoplasts by affinity chromatography // *Biochim. Biophys. Acta.* 1987. V. 920. № 1. P.140–148.
- Douce R., Joyard J. Structure and function of plastide envelope // *Advances in Botanical Research.* / Ed. Woolhouse H.W. London: Acad. Press. 1979. V. 7. P. 1–116.
- Edge R., Truscott T.G. Carotenoid radicals and the interaction of carotenoids with active oxygen species // *Photochemistry of Carotenoids* / Eds Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 1999. P. 223–234.
- Eichenberger W., Boschetti A., Michel H.P. Lipid and pigment composition of a chlorophyll-*b*-deficient mutant *pg-113* of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Plant Physiol.* 1986. V. 66. № 4. P. 589–594.
- Eijkelhoff C., Dekker J.-P. Determination of the pigment stoichiometry of the photochemical reaction center of photosystem II // *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. V. 1231. № 1. P. 21–28.
- Emenhiser C., Englert G., Sander L.C., Ludwig B., Schwartz S.J. Isolation and structural elucidation of the predominant geometrical isomers of α -carotene // *J. Chromatogr.* 1996. V. 719. № 3. P. 333–343.
- Engelman R., Jortner J. The energy gap law for radiationless transitions in large molecules // *Mol. Phys.* 1970. V. 18. P. 145–164.
- Eskling M., Arvidsson P.-O., Akerlund H.-E. The xanthophyll cycle, its regulation and components // *Physiol. Plantarum.* 1997. V. 100. P. 806–816.
- Falkowski P.G., Chen Y.-B. Photoacclimation of light harvesting systems in eucaryotic algae // *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis.* / Eds Green B.R., Parson W.W. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 423–447.
- Foster K.W., Smyth R.D. Light antennas in phototactic Algae // *Microbiol. Rev.* 1980. V. 44. P. 572–630.
- Foster K.W., Saranak J., Patel N., Zarilli G., Okabe M., Kline T., Nakanishi K. A rhodopsin is the functional photoreceptor for phototaxis in the unicellular eukaryote *Chlamydomonas* // *Nature.* 1984. V. 311. P. 756–759.
- Francis G.W., Knutsen G., Lien T. Loroanthin from *Chlamydomonas reinhardtii* // *Acta Chem. Scan.* 1973. V. 27. № 6. P. 3601–3608.
- Francis G.W., Strand L., Lien T., Knutsen G. Variations in the carotenoid content of *Chlamydomonas reinhardtii* throughout the cell cycle // *Arch. Microbiol.* 1975. V. 104. № 3. P. 249–254.
- Frank H.A., Bautista J.A., Yosue J.S., Young A.J. Mechanism nonphotochemical quenching in green plants: Energies of the lowest excited singlet states of Violaxanthin and Zeaxanthin // *Biochemistry.* 2000. V. 39. P. 2831–2837.
- Frank H.A., Chynwat V., Desamero R.Z.B., Farhoosh R., Erickson J., Bautista J. The lifetime and energies of the first excited singlet states of diadinoxanthin and diatoxanthin: The role of these molecules in excess energy dissipation in algae // *Biochim. Biophys. Acta.* 1996. V. 1277. P. 243–252.

- Frank H.A., Chynwat V., Desamero R.Z.B., Farhoosh R., Erickson J., Bautista J. On the photophysics and photochemical properties of carotenoids and their role as light-harvesting pigments in photosynthesis // Pure Appl. Chem. 1997. V. 69. P. 2117–2124.
- Frank H.A., Cogdell R.J. Carotenoids in photosynthesis // Photochem. Photobiol. 1996. V. 63. № 3. P. 257–264.
- Frank H.A., Cua A., Chynwat V., Young A.J., Goztola D., Wasielewski M.R. Photosynthesis of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis // Photosynth. Res. 1994. V. 41. P. 389–395.
- Fromme P., Schlodder E., Jansson S. Structure and function of the antenna system in photosystem I // Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. / Eds Green B.R., Parson W.W. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 253–279.
- Gal A., Zer H., Ohad I. Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. News and views // Physiol. Plantarum. 1997. V. 100. P. 869–885.
- García-Plazaola J.I., Artetxe U., Duflabert M.K., Becerril J.M. Role of photoprotective systems of holmoak (*Quercus ilex*) in the adaptation to winter conditions // J. Plant Physiol. 1999. V. 155. P. 625–630.
- García-Plazaola J.I., Errasti E., Hernandez A., Becerril J.M. Occurrence and operation of the lutein epoxide cycle in *Quercus species* // Functional Plant Biol. 2002. V. 29. P. 1075–1080.
- García-Plazaola J.I., Hernandez A., Errasti E., Becerril J.M. Occurrences and operation of the lutein epoxide cycle in *Quercus species* // Funct. Plant Biol. 2002. V. 29. P. 1075–1080.
- García-Plazaola J.I., Hernandez A., Olano J.M., Becerril J.M. The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation // Functional Plant Biol. 2003. V. 30. P. 319–324.
- García-Plazaola J.I., Hormaetxe K., Hernandez A., Olano J.M., Becerril J.M. The lutein epoxide cycle in vegetative buds of woody plants // Functional Plant Biol. 2004. V. 31. P. 815–823.
- Gilmore A.M. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle dependent photoprotection in higher plant chloroplast and leaves // Physiol. Plantarum. 1997. V. 99. № 2. P. 197–209.
- Gilmore A.M., Govindjee. How higher plants respond to excess light: energy dissipation in photosystem II // Concepts in Photobiology: Photosynthesis and Photomorphogenesis / Eds Singhal G.S., Renger G., Sopory S.K., Irrgang K.-D., Govindjee. New Delhi: Narosa. 1999. P. 513–548.
- Gilmore A.M., Hazlett T.L., Govindjee. Xanthophyll cycle dependent quenching of photosystem II chlorophyll a fluorescence: Formation of a quenching complex with a short lifetime // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 2273–2277.
- Gilmore A.M., Shinkarev V.P., Hazlett T.L., Govindjee. Quantitative analysis of the effects of intrathylakoid pH and xanthophyll cycle pigments on chlorophyll a fluorescence lifetime distributions and intensity in thylakoids // Biochemistry. 1998. V. 37. № 39. P. 13582–13593.
- Gilmore A.M., Yamamoto H.Y. Linear models relating xanthophylls and lumen acidity to non-photochemical fluorescence quenching. Evidence that antheraxanthin explains zeaxanthin-independent quenching // Photosynth. Res. 1993. V. 35. P. 67–78.
- Goericke R., Welschmeyer N.A. Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. II. The ¹⁴CO₂-labeling kinetics of carotenoids // J. Phycol. 1992. V. 28. P. 507–517.
- Goodwin T.W. Carotenoid biosynthesis // Carotenoids / Ed. Isler O. Basel: Birkhauser, 1971. P. 577–636.
- Goodwin T.W. Biosynthesis of carotenoids: an overview // Methods Enzymol. 1993. V. 214. № 2. P. 330–340.
- Goodwin T.W. Plant carotenoid research 1945–1985 // J. Plant Physiol. 1994. V. 143. № 3. P. 440–443.
- Goodwin T.W., Williams R.J.H. A mechanism for the cyclization of an acyclic precursor to form β-carotene // Biochem. J. 1965. V. 94. № 1. P. 5c–7c.
- Goodwin T.W., Williams R.J.H. A mechanism for the biosynthesis of α-carotene // Biochem. J. 1965. V. 97. № 1. P. 28c–32c.

- Goss R. Substrate specificity of the violaxanthin de-epoxidase of the primitive green alga *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae) // *Planta*. 2003. V. 217. P. 801–812.
- Goss R., Böhme K., Wilhelm C. The xanthophyll cycle of *Mantoniella squamata* converts violaxanthin into antheraxanthin but not to zeaxanthin: consequences for the mechanism of enhanced non-photochemical energy-dissipation // *Planta*. 1998. V. 205. P. 613–621.
- Goss R., Richter M., Wild A. Pigment composition of PSII pigment protein complexes purified by anion exchange chromatography: identification of xanthophyll cycle pigment binding proteins // *J. Plant Physiol.* 1997. V. 151. P. 115–119.
- Gounaris K., Chapman D.J., Booth P.J., Crystall B., Giorgi L.B., Klug D.R., Porter G., Barber J. Comparison of the D1/D2/cytochrome b559 reaction center complex of photosystem II isolated by two different methods // *FEBS Lett.* 1990. V. 265. № 1–2. P. 88–92.
- Green B.R., Anderson J.M., Parson W.W. Photosynthetic membranes and their light-harvesting antennas // *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis* / Eds. Green B.R., Parson W.W. Dordrecht–Boston–London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 1–28.
- Grotz B., Molnr P., Stransky H., Hager A. Substrate specificity and functional aspects of violaxanthin-de-epoxidase, an enzyme of the xanthophyll cycle // *J. Plant Physiol.* 1999. V. 154. P. 437–446.
- Grumbach K.H. Distribution of chlorophylls, carotenoids and quinones in chloroplasts of higher plant // *Z. Naturforsch.* 1983. B. 38C. № 6. S. 996–1002.
- Grung M., Kreimer G., Calenberg M., Melkonian M., Liaaen-Jensen S. Carotenoids in the eyespot apparatus of the flagellate green alga *Spermatozopsis similes*: Adaptation to the retinal-based photoreceptor // *Planta*. 1994. V. 193. P. 38–43.
- Gruszecki W.J., Grudzinski W., Banaszek-Glos A., Matula M., Kerner P., Krupa Z., Sielewiesiuk J. Xanthophyll pigments in light-harvesting complex II in monomolecular layers: localisation, energy transfer and orientation // *Biochim. Biophys. Acta.* 1999. V. 1412. № 2. P. 173–183.
- Gust D. Molecular wires and girders // *Nature*. 1994. V. 372. № 6502. P. 133–134.
- Hager A. Chloroplasten-Farbstoffe, ihre papierchromatographische Trennung und ihre Veränderungen durch Auenfaktoren // *Z. Naturforsch.* 1955. B. 10B. S. 310–312.
- Hager A. Über den Einfluß klimatischer Faktoren auf den Blattfarbstoffgehalt Höherer Pflanzen // *Planta*. 1957. B. 49. S. 524–560.
- Hager A. Die Zusammenhänge zwischen lichtinduzierten Xanthophyll-Umwandlungen und Hill-Reaktion // *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 1966. B. 79. S. 94–107.
- Hager A. Untersuchungen über die Ruckreaktionen im Xanthophyll-Cyclus bei *Chlorella*, *Spinacia* und *Taxus* // *Planta*. 1967. B. 76. S. 138–148.
- Hager A. Lichtbedingte pH-Emiedrigung in einem Chloroplasten-Kompartiment als Ursache der enzymatischen Violaxanthin-Zeaxanthin-Umwandlung; Beziehungen zur Photophosphorylierung // *Planta*. 1969. B. 89. S. 224–243.
- Hager A. Die reversiblen, lichtabhängigen Xanthophyllumwandlungen im Chloroplasten // *Ber. Deutsch. Bot. Ges.* 1975. B. 88. S. 27–44.
- Hager A. The reversible, light-induced conversions of xanthophylls in the chloroplast // *Pigments in plants* / Ed. Czygan F.-C. Stuttgart: Fischer. 1980. P. 57–79.
- Hager A., Holocher K. Localization of the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin deepoxidase within the thylakoid lumen and abolition of its mobility by a (light-dependent) pH decrease // *Planta*. 1994. V. 192. № 4. P. 581–589.
- Hager A., Meyer-Bertenrath T. Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide Und Chlorophylle von Beeten, Algen and isolierten Chloroplasten mit Hilfe dunnschichtchromatographischer Methoden // *Planta*. 1966. V. 69. № 3. P. 198–217.
- Hager A., Meyer-Bertenrath T. Untersuchungen über die Ruckreaktionen im Xanthophyll-Cyclus bei *Chlorella*, *Spinacia* und *Taxus* // *Planta*. 1967. V. 76. № 2. P. 149–168.
- Hartel H., Lokstein H., Grimm B., Bank B. Kinetic studies on the xanthophyll cycle in barley leaves. Influence of antenna size and relations to nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching // *Plant Physiol.* 1996. V. 110. № 2. P. 471–482.

- Harz H., Hegemann P. Rhodopsin-regulated calcium currents in *Chlamydomonas* // Nature. 1991. V. 351. P. 489–491.
- Hashimoto A., Koyama Y. The 2^1Ag state of a carotenoid bound to spinach chloroplast as revealed by picosecond transient Raman spectroscopy // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1017. № 2. P. 181–186.
- Havaux M., Gruszecki W.I. Indications of a regulatory effect of zeaxanthin on thylakoid membrane fluidity // Photochem. Photobiol. 1993. V. 58. № 4. P. 607–614.
- Havaux M., Niyogi K.K. The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. P. 8762–8767.
- Hegemann P., Gfirtner W., Uhl R. All-trans retinal constitutes the functional chromophore in *Chlamydomonas* rhodopsin // Biophys. J. 1991. V. 60. P. 1477–1489.
- Hegemann P., Hegemann U., Foster K.W. Reversible bleaching of *Chlamydomonas reinhardtii* rhodopsin *in vivo* // Photochem. Photobiol. 1988. V. 48. P. 123–128.
- Heinze I., Pfündel E., Hühn M., Dau H. Assembly of light harvesting complex II (LHC-II) in the absence of lutein. A study on the α -carotenoid-free mutant c-2A'-34 of the green alga *Scenedesmus obliquus* // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1320. P. 188–194.
- Hieber A.D., Bugos R.C., Yamamoto H.Y. Plant lipocalins: violaxanthin de-epoxidase and zeaxanthin epoxidase // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1482. № 1–2. P. 84–91.
- Hirschberg J. Molecular biology of carotenoid biosynthesis // Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism / Eds Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Basel; Boston; Berlin: Birkhauser-Verlag, 1998. V. 3. P. 149–194.
- Hobe S., Niemeier H., Bender A., Paulsen P. Carotenoid binding sites in LHC-IIb. Relative affinities towards major xanthophylls of higher plants // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 616–624.
- Horton P., Ruban A.V. The role of LHC-II in energy quenching // Photoinhibition of photosynthesis – From Molecular Mechanisms to the Field / Eds Backer N.R., Bowyer J.R. Oxford: Bios Scientific Publ. 1994. P. 111–128.
- Horton P., Ruban A.V., Rees D., Pascal A.A., Noctor G., Young A.J. Control on the light-harvesting function of chloroplast membranes by aggregation of the LHC-II chlorophyll-protein complex // FEBS Lett. 1991. V. 292. P. 1–4.
- Horton P., Ruban A.V., Walters R.G. Regulation of light harvesting in green plants // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1996. V. 47. P. 65–84.
- Horton P., Ruban A.V., Young A.J. Regulation of the structure and function of the light harvesting complexes of photosystem II by the xanthophyll cycle // Photochemistry of Carotenoids / Eds Frank H.A., Young A.J., Britton G., Cogdell R.J. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 1999. P. 271–291.
- Hundle B.S., Brien D.A.O., Beyer P., Kleinig H., Hearst J.J. *In vivo* expression and activity of lycopene cyclase and β -carotene hydroxylase from *Erwinia herbicola* // FEBS Lett. 1993. V. 315. № 2. P. 329–334.
- Inwood W., Yoshihara C., Zalpuri R., Kim K.-S., Kustu S. The ultrastructure of a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant strain lacking phytoene synthase resembles that of a colorless alga // Molecular Plant. 2008. V. 1. № 6. P. 925–937.
- Jahns P. The xanthophyll cycle in intermittent light-grown pea plants. Possible functions of chlorophyll-*a/b*-binding proteins // Plant Physiol. 1995. V. 108. № 1. P. 149–156.
- Joyard J., Teyssier E., Miegé C., Berny-Seigneurin D., Marechal E., Block M.A., Dorne A.-J., Rolland N., Ajlani G., Douce R. The biochemical machinery of plastid envelope membranes // Plant Physiol. 1998. V. 118. № 3. P. 715–723.
- Klauer H. Industrial and commercial uses of carotenoids // IUPAC Carotenoids: Chemistry and Biochemistry / Eds Britton G., Goodwin T.W. Oxford: Pergamon Press, 1982. P. 309–317.
- Kleinig H., Britton G. Carotenoid biosynthesis in higher plants // Physiol. Veg. 1982. V. 20. № 6. P. 735–755.

- Kobayashi M., Kakizano T., Nagai S. Astaxanthin production by a green alga *Haematococcus pluvialis* accompanied with morphological changes in acetate media // J. Ferment. Bioeng. 1991. V. 71. P. 335–339.
- Konermann L., Yruela I., Holzwarth A.R. Pigment assignment in the absorption spectrum of the photosystem II reaction center by site-selection fluorescence spectroscopy // Biochemistry. 1997. V. 36. № 24. P. 7498–7502.
- Krause G.H., Jahns P. Pulse amplitude modulated chlorophyll fluorometry and its application in plant science // Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. / Eds Green B.R., Parson W.W. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 373–399.
- Kreimer G., Brohsonn U., Melkonian M. Isolation and partial characterization of the photoreceptive organelle for phototaxis of a flagellate green alga // Eur. J. Cell Biol. 1991. V. 55. P. 318–327.
- Kreimer G., Melkonian M. Reflection confocal laser scanning microscopy of eyespots in flagellated green algae // Eur. J. Cell Biol. 1990. V. 53 P. 101–111.
- Kreimer G., Overlander C., Sineschekov O.A., Stolzis H., Nultsch W., Melkonian M. Functional analysis of the eyespot in *Chlamydomonas reinhardtii* mutant *ey 627, mt(-)* // Planta. 1992. V.188. № 4. P. 513–521.
- Krinsky N.I., Levine R.P. Carotenoids of wild type and mutant strain of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Physiol. 1964. V. 39. № 4. P. 680–687.
- Kühlbrandt W., Wang D.N. Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography // Nature. 1991. V. 350. № 6314. P. 130–134.
- Kühlbrandt W., Wang D.N., Fujiyoshi Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography // Nature. 1994. V. 367. № 6464. P. 614–621.
- Kull D., Pfander H. Appendix: List of new carotenoids // Carotenoids: Isolation and Analysis // Eds Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Basel: Birkhauser. 1995. V. 1A. P. 295–317.
- Kushwaha S.C., Suzue G., Subbarayan C., Porter J.W. The conversion of phytoene ¹⁴C to acyclic, monocyclic and dicyclic carotenoids and the conversion of lycopene-15,15'-³H to mono- and dicyclic carotenes by soluble enzyme systems obtained from plastides of tomato fruits // J. Biol. Chem. 1970. V. 245. № 18. P. 4708–4717.
- Latowski D., Burda K., Strzalka K. A mathematical model describing kinetics of conversion of violaxanthin to zeaxanthin via intermediate antheraxanthin by the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase // J. Theor. Biol. 2000. V. 206. № 4. P. 507–514.
- Lavaud J., Rousseau B., Etienne A.L. Enrichment of the light-harvesting complex in diadinoxanthin and implications for the nonphotochemical fluorescence quenching in Diatoms // Biochemistry. 2003. V. 42. № 19. P. 5802–5808.
- Lavaud J., Rousseau B., Gorkom H.J., van, Etienne A.L. Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum* // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 1398–1406.
- Lawson M.A., Satir P. Characterization of the eyespot regions of «Blind» *Chlamydomonas* mutants after restoration of photophobic responses // J. Eukaryotic Microbiology. 1995. V. 41. № 6. P. 593–601.
- Lee A.L.-C., Thornber J.P. Analysis of the pigment stoichiometry of pigment-protein complexes from barley (*Hordeum vulgare*) // Plant Physiol. 1995. V. 107. P. 565–574.
- Liaaen-Jensen S. Carotenoids in chemosystematics // Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism / Eds Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H., Basel; Boston; Berlin: Birkhauser Verlag. 1998. V. 3. P. 217–247.
- Lichtenthaler H.K. The stress concept in plants: an introduction // Ann. N.-Y. Acad. Sci. 1998. V. 851. P. 187–198.
- Lichtenthaler H.K., Schwender J., Disch A., Rohmer M. Biosynthesis of isoprenoid in higher plant chloroplasts proceeds via a nevalonate-independent pathway // FEBS Lett. 1997. V. 400. № 3. P. 271–274.

- Linden H., Misawa N., Saito T., Sandmann G. A novel carotenoid biosynthesis gene coding for ζ -carotene desaturase: functional expression, sequence and phylogenetic origin // *Plant Mol. Biol.* 1994. V. 24. № 3. P. 369–379.
- Lohr M., Wilhelm C. Pigment synthesis and xanthophyll cycle in diatoms under high light stress and during low recovery // *Photosynthesis: Mechanisms and Effects* / Ed. Garab G. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 1998. P. 2313–2316.
- Lohr M., Wilhelm C. Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 15. P. 8784–8789.
- Lohr M., Wilhelm C. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model // *Planta.* 2001. V. 212. P. 382–391.
- Lotan T., Hirschberg J. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding *beta*-C-4-oxygenase, that converts *beta*-carotene to the ketocarotenoid canthaxanthin in *Haematococcus pluvialis* // *FEBS Lett.* 1995. V. 364. № 2. P. 125–128.
- Macko S., Wehner A., Jahns P. Comparison of violaxanthin de-epoxidation from the stroma and lumen sides of isolated thylakoid membranes from *Arabidopsis*: implications for the mechanism of de-epoxidation // *Planta.* 2002. V. 216. №2. P. 309–314.
- Macpherson A.N., Hiller R.G. Light-harvesting systems in chlorophyll *c*-containing algae // *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis.* / Eds Green B.R., Parson W.W. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 323–352.
- Marin E., Nussaume L., Quesada A., Gonneau M., Sotta B., Hugueney P., Frey A., Marion-Poll A. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana* // *EMBO J.* 1996. V. 15. P. 2331–2342.
- Maroti J., Pataky S. The dependence of light-induced violaxanthin transformation on the ratio of stroma lamellae // *Acta Biol. Szeged.* 1983. V. 29. № 1–4. P. 201.
- Matsubara S., Gilmore A.M., Ball M.C., Anderson J.M., Osmond C.B. Sustained down-regulation of photosystem II in mistletoes during winter depression of photosynthesis // *Functional Plant Biol.* 2002. V. 29. P. 1157–1169.
- Matsubara S., Gilmore A.M., Osmond C.B. Diurnal and acclimatory responses of violaxanthin and lutein epoxide in the Australian mistletoe *Amyema miquelii* // *Austr. J. Plant Physiol.* 2001. V. 28. P. 793–800.
- Matsubara S., Naumann M., Martin R., Nichol C., Rascher U., Morosinotto T., Bassi R., Osmond B. Slowly reversible de-epoxidation of lutein-epoxide in deep shade leaves of a tropical tree legume may “lock-in” lutein-based photoprotection during acclimation to strong light // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. №. 411. P. 461–468.
- Matsubara S., Morosinotto T., Bassi R., Christian A.-L., Fischer-Schliebs E., Lüttge U., Orthen B., Franco A.C., Scarano F.R., Forster B., Pogson D.J., Osmond C.B. Occurrence of the lutein-epoxide cycle in mistletoes of the *Loranthaceae* and *Viscaceae* // *Planta.* 2003. V. 217. P. 868–879.
- Melkonian M., Robenek H. The eyespot apparatus of flagellated green algae: a critical review // *Prog. Phycol. Res.* 1984. V. 3. P. 193–268.
- Melkonian M., Robenek H. Eyespot membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*: a freeze-fracture study // *J. Ultrastruct. Res.* 1980. V. 72. P. 90–102.
- Milborrow B.V. Stereochemical aspects of carotenoid biosynthesis // *Carotenoid Chemistry and Biochemistry* / Eds Britton G., Goodwin T.W. Oxford: Pergamon Press. 1982. P. 279–295.
- Miller N.J., Sampson J., Candlias L.P., Bramley P.M., Rice-Evans C.A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls // *FEBS Lett.* 1996. V. 384. № 3. P. 240–242.
- Mimuro M., Magashima U., Takaichi S., Nasimura Y., Yamazaki I., Katoh T. Molecular structure and optical properties of carotenoids for the *in vivo* energy transfer function in the algal photosynthetic pigment system // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 108. № 2. P. 271–274.

- Mimuro M., Tomo T., Nishimura Y., Yamazaki I., Satoh K. Identification of a photochemically inactive pheophytin molecule in the spinach D1-D2-Cyt.b559 complex // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. V. 1232. № 1/2. P. 81–88.
- Misawa N., Nakagawa M., Kobayashi K., Yamamoto S., Isawa Y., Nakamura K., Harashima K. Elucidation of the *Erwinia uredovora* carotenoid biosynthetic pathway by functional analysis of gene products expressed in *Escherichia coli* // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. № 3. P. 6704–6712.
- Montane M.-H., Tardy F., Kloppstech K., Havaux M. Differential control of xanthophylls and light-induced stress proteins as opposed to LH-chlorophyll-*a/b*-protein during photosynthesis acclimation of barley leaves to light irradiance // *Plant Physiol.* 1998. V. 118. № 1. P. 227–235.
- Morel-Laurens N.M.L., Bird D.J. Effects of cell division on the stigma of wild-type and an “eyeless” mutant of *Chlamydomonas* // *J. Ultrastruc. Res.* 1995. V. 87. P. 46–61.
- Morel-Laurens N.M.L., Feinleib M.E. Photomovement in an “eyeless” mutant of *Chlamydomonas* // *Photochem. Photobiol.* 1983. V. 37. P. 189–194.
- Morosinotto T., Caffarri S., Dall’Osto L., Bassi R. Mechanistic aspects of the xanthophyll dynamics in higher plant leaves // *Physiol. Plant.* 2003. V. 119. P. 347–354.
- Müller J.-L., Li X.-P., Niyogi K.K. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy // *Plant Physiol.* 2001. V. 125. P. 1558–1566.
- Nanba O., Satoh K. Isolation of a PS-II reaction center consisting of D1 and D2 polypeptides and cytochrome b559 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1987. V. 84. P. 109–112.
- Nitsche H. Die Identität von Loroxanthin mit Pirenoxanthin, Trollein und Trihydroxy- α -carotin // *Arch. Microbiol.* 1974. V. 95. № 1. P. 79–90.
- Niyogi K.K. Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches // *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1999. V. 50. P. 333–359.
- Niyogi K.K., Björkman O., Grossman A.R. *Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching // *Plant Cell.* 1997. V. 9. P. 1369–1380.
- Niyogi K.K., Björkman O., Grossman A.R. The role of specific xanthophylls in photoprotection (*lor-1*) // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 25. P. 14162–14167.
- Niyogi K.K., Shih C., Chow W.S., Pogson B.J., DellaPenna D., Björkman O. Photoprotection in zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis* // *Photosynth. Res.* 2001. V. 67. P. 139–145.
- Nultsch, W., Hader, D.-P. Photomovement in motile microorganisms-II // *Photochem. Photobiol.* 1988. V. 47. P. 837–869.
- Olaizola M., Yamamoto H.Y. Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (*Bacillariophyceae*) // *J. Phycol.* 1994. V. 30. P. 606–612.
- Olson J.A., Krinsky N.I. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators // *FASEB J.* 1995. V. 9. № 15. P. 1547–1550.
- Owens T.G., Shreve A.P., Albrecht A.C. Dynamics and mechanism of singlet energy transfer between carotenoids and chlorophyll: light harvesting and nonphotochemical fluorescence quenching // *Research in photosynthesis.* / Ed. Murata N. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 1992. V. 1. P. 171–178.
- Peterman E.J.G., Gradinaru C.C., Calcoen F., Borst J.C., van Grondelle R., van Amerongen H. Xanthophylls in light-harvesting complex II of higher plants: Light harvesting and triplet quenching // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 40. P. 12208–12215.
- Pfündel E., Bilger W. Regulation and possible function of the violaxanthin cycle // *Photosynth. Res.* 1994. V. 42. P. 89–109.
- Phillip D., Ruban A.V., Horton P., Asato A., Young A.J. Quenching of chlorophyll fluorescence in the major light harvesting complex of photosystem II // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 1492–1497.

- Plumley F.G., Schmidt G.W. Reconstitution of chlorophyll-*a/b*-light-harvesting complexes: xanthophyll-dependent assembly and energy transfer // Proc. Natl. Acad. Sci. 1987. V. 84. P. 146–150.
- Pogson B.J., McDonald K.A., Truong M., Britton G., DellaPenna D. *Arabidopsis* carotenoid mutants demonstrate that lutein is not essential for photosynthesis in higher plants // Plant Cell. 1996. V. 8. P. 1627–1639.
- Pogson B.J., Niyogi K.K., Björkman O., DellaPenna D. Altered xanthophyll compositions adversely affect chlorophyll accumulation and non-photochemical quenching in *Arabidopsis* mutants // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 13324–13329.
- Polivka T., Zigmantas D., Sundstrom V., Formaggio E., Cinque G., Bassi R. Carotenoid S(1) state in recombinant light-harvesting complex of photosystem II // Biochemistry. 2002. V. 41. № 2. P. 439–450.
- Polle J.E., Niyogi K.K., Melis A. Absence of lutein, violaxanthin and neoxanthin affects the functional chlorophyll antenna size of photosystem-II but not that of photosystem-I in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* // Plant Cell Physiol. 2001. V. 42. № 5. P. 482–491.
- Porter J.W. Enzymatic synthesis of carotenoid and related compounds // Pure Appl. Chem. 1969. V. 20. № 4. P. 449–481.
- Powls R., Britton G. The role of isomers of phytoene, phytoene, phytofluene and ζ -carotene in carotenoid biosynthesis by a mutant strain C-6D of *Scenedesmus obliquus* // Arch. Microbiol. 1977. V. 115. № 1. P. 175–179.
- Qureshi A.A., Andrewes A.G., Qureshi N., Porter J.W. The enzymatic conversion of *cis*-[¹⁴C] phytofluene, *trans*-[¹⁴C]phytofluene and *trans*-[¹⁴C]- ζ -carotene to more unsaturated preparation of red tomato fruits // Arch. Biochem. Biophys. 1974. V. 162. № 1. P. 93–125.
- Rabinowitch H.D., Budowski P., Kedar N. Carotenoids and epoxide cycles in mature-green tomatoes // Planta. 1975. V. 122. № 1. P. 91–97.
- Renninger S., Backendorf E., Kreimer G. Sub fractionation of eyespot apparatuses from the green alga *Spermatozopsis similis*: isolation and characterization of eyespot globules // Planta. 2001. V. 213. P. 51–63.
- Riiffer U., Nultsch W. Flagellar photoresponses of *Chlamydomonas* cells held on micropipettes: II. Change in flagellar beat pattern // Cell Motil. Cytoskeleton. 1991. V. 18. P. 269–278.
- Rock C.D., Zecvaart J.A.D. The *aba* mutant of *Arabidopsis thaliana* is impaired in epoxy-carotenoid biosynthesis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 3. P. 7496–7499.
- Rohmer M. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants // Nat. Prod. Rep. 1999. V. 16. № 5. P. 565–574.
- Rohmer M., Khani M., Simonin P., Sutter B., Sahn H. Isoprenoid biosynthesis in eubacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate // Biochem J. 1993. V. 295 (Pt. 2). № 4. P. 517–524.
- Ronen G., Cohen M., Zamir D., Hirschberg J. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: expression of the gene for lycopene ϵ -cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant *Delta* // Plant J. 1999. V. 17. № 4. P. 341–351.
- Ruban A.V., Belgio E., Duffy C.D.P. Design and dynamics of light harvesting antenna of photosystem II // В кн. Современные проблемы фотосинтеза / Под ред. Аллахвердиев С.И., Рубин А.Б., Шувалов В.А. М.–Ижевск: Институт компьютерных исследований. 2014. Т. 1. С. 41–68.
- Ruban A.V., Calkoen F., Kwa S.L.S., Grondelle R., Horton P., Dekker J.P. Characterisation LHC-II in the aggregated state by linear and circular dichroism spectroscopy // Biochim. Biophys. Acta. 1997a. V. 1321. P. 61–70.
- Ruban A.V., Lee P.J., Wentworth M., Young A.J., Horton P. Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light-harvesting complexes // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. № 15. P. 10458–10465.
- Ruban A.V., Pascal A.P., Robert B., Horton P. Configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants. Spectroscopic analysis of isolated light-harvesting

- complex of photosystem II and thylakoid membranes // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 27. P. 24862–24870.
- Ruban A.V., Pesaresi P., Wacker U., Irrgang K.-D., Bassi R., Horton P. The relationship between the binding of dicyclohexylcarbodiimide and pH-dependent quenching of chlorophyll fluorescence in the light harvesting proteins of photosystem II // *Biochemistry.* 1998a. V. 37. P. 11586–11591.
- Ruban A.V., Phillip D., Young A.J., Horton P. Carotenoid-dependent oligomerisation of the major light harvesting complex of photosystem II in plants // *Biochemistry.* 1997b. V. 36. P. 7855–7859.
- Ruban A.V., Phillip D., Young A.J., Horton P. Excited state energy level does not determine the differential effect of violaxanthin and zeaxanthin on chlorophyll fluorescence quenching in isolated light harvesting complex of photosystem II // *Photochem. Photobiol.* 1998b. V. 68. P. 829–834.
- Ruban A.V., Young A.J., Pascal A.P., Horton P., 1994. The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes // *Plant Physiol.* V. 104. P. 227–234.
- Saccardy K., Pieneau B., Roche O., Cornic G. Photochemical efficiency of photosystem II and xanthophyll cycle components in *Zea mays* leaves exposed to water stress and high light // *Photosynth. Res.* 1998. V. 56. № 1. P. 57–66.
- Sandmann G. Carotenoid analysis in mutants from *Escherichia coli* transformed with carotenogenic gene cluster and *Scenedesmus obliquus* mutant C-6D // *Methods Enzymol.* 1993. V. 214. № 3. P. 340–347.
- Sandmann G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants // *Eur. J. Biochem.* 1994. V. 223. № 1. P. 7–24.
- Sandmann G., Albrecht M., Schurr G., Knorz O., Roger P. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli* // *Trends Biotechnol.* 1999. V. 17. № 6. P. 233–237.
- Sapozhnikov D.I. Investigation of violaxanthin cycle // *J. Pure Appl. Chem.* 1973. V. 35. № 1. P. 47–61.
- Sarry J.-F., Montillet J.-L., Sauvaire Y., Havaux M. The protective function of the xanthophyll cycle in photosynthesis // *FEBS Lett.* 1994. V. 353. P. 147–150.
- Scheer H. The pigments // *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis.* / Eds Green B.R., Parson W.W. Dordrecht; Boston; London: Kluwer Acad. Publ. 2003. V. 13. P. 29–81.
- Schiedt K. Absorption and metabolism of carotenoids in birds, fish and crustaceans // *Carotenoids: Biosynthesis and Metabolism* / Eds Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Basel; Boston; Berlin: Birkhauser Verlag. 1998. V. 3. P. 285–358.
- Schledz M., al-Babili S., von Lingig J., Haubruck H., Rabbani S. Phytoene synthase from *Narcissus pseudonarcissus*: functional expression, galactolipid requirement, topological distribution in chromoplasts and induction during flowering // *Plant J.* 1996. V. 10. № 5. P. 781–792.
- Schutte H.-R.V. Secondary plant substances: aspects of carotenoid biosynthesis // *Progress in Botany.* 1983. V. 45. № 1. P. 120–135.
- Schwieter U., Englert G., Rigassi N., Vetter W. Physical and organic methods in carotenoid research // *Pure Appl. Chem.* 1969. V. 20. № 4. P. 365–420.
- Scolnik P.A., Giuliano G. Regulation of a carotenoid biosynthesis gene promoter during plant development // *Plant J.* 1996. V. 9. № 2. P. 505–512.
- Sharkey T.D. Some like It hot // *Science.* 2000. V. 287. № 5452. P. 435–436.
- Siefermann D., Yamamoto H.Y. Properties of NADH and oxygen-dependent zeaxanthin epoxidation in isolated chloroplasts // *Arch. Biochem. Biophys.* 1975a. V. 171. P. 70–77.
- Siefermann D., Yamamoto H.Y. NADPH and oxygen-dependend zeaxanthin epoxidation in isolated chloroplasts // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975b. V. 62. P. 456–461.
- Siefermann D., Yamamoto H.Y. Light-induced de-epoxidation in letuce chloroplasts. VI. De-epoxidation in grana and stroma lamellae // *Plant Physiol.* 1976. V. 57. № 6. P. 939.

- Siefermann-Harms D.* Carotenoids in photosynthesis. 1. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function // *Biochim. Biophys. Acta.* 1985. V. 811. P. 325–355.
- Siefermann-Harms D.* The light-harvesting and photoprotective function of carotenoids in photosynthetic membranes // *Plant Physiol.* 1987. V. 69. № 4. P. 561–568.
- Siefermann-Harms D.* Light and temperature control of season-dependent changes in the a- and P-carotene content of spruce needles // *J. Plant Physiol.* 1994. V. 143. P. 488–494.
- Siefermann-Harms D., Hertzberg S., Borch G., Liaaen-Jensen S.* Lactucaxanthin, an ϵ,ϵ -carotene-3,3'-diol from *Lactuca sativa* L. // *Phytochemistry.* 1981. V. 20. № 1. P. 85–88.
- Siefermann-Harms D., Joyard J., Douce R.* Light-induced changes of the carotenoid levels in chloroplasts envelopes // *Plant Physiol.* 1978. V. 61. P. 530–533.
- Simidjiev I., Bardza V., Mustardy L., Garab G.* Role of thylakoid lipids in the structural flexibility of lamellar aggregates of the isolated light-harvesting chlorophyll *a/b* complex of photosystem II // *Biochemistry.* 1998. V. 37. № 12. P. 4169–4173.
- Sirevog R., Levine R.P.* Transcription and translation for carotenoid synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* // *Planta.* 1973. V. 111. № 1. P. 73–84.
- Smirnoff N.* Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2000. V. 355. № 1402. P. 1455–1464.
- Smirnoff N., Wheeler G.L.* Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2000. V. 35. № 4. P. 291–314.
- Snyder A.M., Clark B.M., Robert B., Ruban A.V., Bungard R.A.* Carotenoid specificity of light-harvesting complex II binding sites; occurrence of 9-*cis*-violaxanthin in the neoxanthin-binding site in the parasitic angiosperm *Cuscuta reflexa* // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 7. P. 5162–5168.
- Stransky H., Hager A.* Das Carotinoid und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyll-Cycles in verschiedenen Algenklassen. IV. Chemosystematische Betrachtung // *Arch. Microbiol.* 1970. V. 73. № 3. P. 315–323.
- Straub O.* List of carotenoids // *Key to carotenoids* / Ed. Pfander H. 2nd ed. Basel: Birkhauser Verlag. 1987. P. 11–296.
- Subczynski W.K., Markowska E., Gruszecki W.I., Siewiewsiuk J.* Effect of polar carotenoids on dimyristoylphosphatidylcholine membranes: a spin-label study // *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. V. 1105. P. 97–108.
- Sun Z., Gantt E., Cunningham, F.X., Jr.* Cloning and functional analysis of the β -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana* // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. P. 24349–24352.
- Takahashi T., Yoshihara K., Watanabe M., Kubota M., Johnson R., Derguini F., Nakanishi K.* Photoisomerization of retinal at 13-ene is important for phototaxis of *Chlamydomonas reinhardtii*: simultaneous measurements of phototactic and photophobic responses // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991. V. 178. P. 1273–1279.
- Tardy F., Havaux M.* Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, light-harvesting system and photoinhibition resistance of a zeaxanthin-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana* // *J. Photochem. Photobiol.* 1996. V. 34. P. 87–94.
- Tardy F., Havaux M.* Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1330. № 2. P. 179–193.
- Telfer A., Dhimi S., Bishop S.M., Phillips D., Barber J.* Beta-carotene quenches singlet oxygen formed by isolated photosystem II reaction centers // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 48. P. 14469–14474.
- Thayer S.S., Björkman O.* Carotenoid distribution and de-epoxidation in thylakoid pigment-protein complexes from cotton leaves and bundle-sheath cells of maize // *Photosynth. Res.* 1992. V. 33. P. 213–225.
- Thayer S.S., Björkman O.* Leaf xanthophyll content and composition in sun and shade determined by HPLC // *Photosynth. Res.* 1990. V. 23. P. 331–343.

- Thompson G.A., Jr. Lipids and membrane function in green algae // *Biochim. Biophys. Acta*. 1996. V. 1302. № 1. P. 17–45.
- Tracewell C.A., Vrettos J.S., Bautista J.A., Frank H.A., Brudvig G.W. Carotenoid photooxidation in photosystem II // *Arch. Biochem. Biophys.* 2001. V. 385. № 1. P. 61–69.
- Verhoeven A.S., Adams III W.W., Demmig-Adams B., Croce R., Bassi R. Xanthophyll cycle pigment localization and dynamics during exposure to low temperatures and light stress in *Vinca major* // *Plant Physiol.* 1999. V. 120. P. 727–738.
- Wagner V., Ulmann K., Mollwo A., Kaminski M., Mittag M., Kreimer G. Phosphoproteome of *Chlamydomonas reinhardtii* eyespot fraction includes key proteins of light signaling pathway // *Plant Physiol.* 2008. V. 146. P. 772–788.
- Weedon B.C.L., Moss C.P. Structure and nomenclature // *Carotenoids: Isolation and Analysis* / Eds Britton G., Liaaen-Jensen S., Pfander H. Basel: Birkhauser, 1995. V. 1A. P. 27–70.
- Wehner A., Storf S., Jahns P., Schmid V.H. De-epoxidation of violaxanthin in light-harvesting complex I proteins // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 26. P. 26823–26829.
- Wentworth M., Ruban A.V., Horton P. The functional significance of the monomeric and trimeric states of the photosystem II light harvesting complex // *Biochemistry*. 2004. V. 43. P. 501–509.
- Wilhelm C. The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll *b*- and chlorophyll *c*-containing algae // *Plant Physiol. Biochem.* 1990. V. 28. P. 293–306.
- Wollman F.-A., Minai L., Nechushtai R. The biosynthesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes // *Biochim. Biophys. Acta*. 1999. V. 1411. № 1. P. 21–85.
- Xu C.C., Jeon Y.A., Hwang H.J., Lee C.H. Suppression of zeaxanthin epoxidation by chloroplast phosphatase inhibitors in rice leaves // *Plant Sci.* 1999. V. 146. P. 27–34.
- Yamamoto H.Y. Biochemistry of the violaxanthin cycle in higher plants // *Pure Appl. Chem.* 1979. V. 51. P. 639–648.
- Yamamoto H.Y. Xanthophyll cycles // *Methods Enzymol.* 1985. V. 110. P. 303–312.
- Yamamoto H.Y., Bassi R. Carotenoids: localization and function // *Advances in Photosynthesis. Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions.* / Eds Ort D.R., Yocum C.F. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ. 1996. V. 4. P. 539–563.
- Yamamoto H.Y., Nakayama T.O.M., Chichester C.O. Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls // *Arch. Biochem.* 1962. V. 97. P. 168–173.
- Young A.J. Occurrence and distribution of carotenoids in photosynthetic systems // *Carotenoids in Photosynthesis* / Eds Young A.J., Britton G. London: Chapman and Hall. 1993. P. 16–71.
- Young A.J., Britton G. The distribution of α -carotene in photosynthetic pigment-protein complexes of higher plants // *Plant Science*. 1989. V. 64. № 2. P. 179–183.
- Young A.J., Phillip D., Frank H.A., Ruban A.V., Horton P. The xanthophyll cycle and carotenoid mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis // *Pure Appl. Chem.* 1997. V. 69. P. 2125–2130.
- Zhu X.F., Suzuki K., Okada K., Tanaka K., Nakagawa T. Cloning and functional expression of a novel geranylgeranyl pyrophosphate synthase gene from *Arabidopsis thaliana* in *Escherichia coli* // *Plant Cell. Physiol.* 1997. V. 38. № 3. P. 357–361.