

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ФУНДАМЕНТАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ БИОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ
АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Ветошкина Дарья Васильевна

РОЛЬ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В АДАПТАЦИИ
ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА К УСЛОВИЯМ ОСВЕЩЕНИЯ

03.01.04 – биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.б.н. Иванов Б.Н.

к.б.н. Борисова М.М.

Пушино – 2016 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	9
1.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФОТОСИНТЕЗЕ.....	9
1.2. СТРОЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ТИЛАКОИДОВ	11
1.2.1. Реакционный центр фотосистемы 2	13
1.2.2. Светособирающая антенна ФС2.....	17
1.2.3. Образование суперкомплекса РЦ ФС2-ЛНСП	19
1.2.4. Пул пластохинона	21
1.2.5. Цитохромный b6/f комплекс.....	22
1.2.6. Реакционный центр фотосистемы 1	23
1.2.7. АТФ-синтаза.....	27
1.3. АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ К ИЗМЕНЕНИЯМ УСЛОВИЙ ОСВЕЩЕНИЯ	27
1.3.1. State transitions.....	28
1.3.2. Долговременная адаптация к изменениям в условиях освещения	32
1.4. РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ПУЛА ПЛАСТОХИНОНА ПРИ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ ОСВЕЩЕНИЯ	33
1.5. ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ХЛОРОПЛАСТАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ.....	34
1.5.1. Фотосистема 2	34
1.5.2. Пул пластохинона	36
1.5.3. Фотосистема 1	37
1.5.4. Строма хлоропластов	39
1.6. СИГНАЛЬНАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА	40
1.7. STN7 КИНАЗА	42
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	54
3.1. ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА ВНУТРИ ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЫ	54
3.1.1. Влияние МВ на скорость транспорта электронов	54
3.1.2. Определение насыщающей концентрации цитохрома <i>c</i>	56
3.1.3. Влияние цитохрома <i>c</i> на скорость поглощения кислорода	57
3.1.4. Пути образования пероксида водорода в присутствии и отсутствие МВ....	58
3.2. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ПРОТЕКАНИЯ РЕАКЦИИ МЕЖДУ PXH_2 И O_2^-	59

3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТАПА БИОСИНТЕЗА АНТЕННЫХ БЕЛКОВ, ЗА СЧЕТ КОТОРОГО ПРОИСХОДИТ УМЕНЬШЕНИЕ РАЗМЕРА АНТЕННЫ ФС2, ПРИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ АДАПТАЦИИ <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> К ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА	62
3.3.1. Изменения фотосинтетических параметров в течение 5-ти дневной адаптации к условиям высокой интенсивности света	63
3.3.2. Изменение уровня экспрессии генов, кодирующих белки светособирающей антенны ФС2, в ходе адаптации к условиям повышенной освещенности растений <i>A. thaliana</i> дикого типа	66
3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИГНАЛА ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ РАЗМЕРА СВЕТОСОБИРАЮЩЕЙ АНТЕННЫ ФС2 ПРИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ АДАПТАЦИИ	67
3.4.1. Влияние снижения количества пероксида водорода в листьях на размер антенны ФС2 при повышенной освещенности	67
3.4.1.1. Условия, при которых происходило снижение количества пероксида водорода в листьях на высоком свету.....	67
3.4.1.2. Содержание пероксида водорода и относительный уровень восстановления ПХ-пула в листьях при выбранных условиях	68
3.4.1.3. Уменьшение в содержании пероксида водорода в листьях при высокой интенсивности света приводит к отсутствию регуляции размера антенны ФС2...	70
3.4.2. Влияние увеличения количества пероксида водорода в листьях на размер антенны ФС2 при низкой интенсивности света	74
3.4.2.1. Условия, при которых происходит увеличение H ₂ O ₂ в листьях при низкой интенсивности света	74
3.4.2.2. Содержание пероксида водорода и относительный уровень восстановления ПХ-пула в листьях при выбранных условиях	75
3.4.2.3. Увеличение в содержании пероксида водорода при низкой интенсивности света приводит к уменьшению размера антенны ФС2	77
3.5. СВЯЗЬ МЕЖДУ КОЛИЧЕСТВОМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ЛИСТЬЯХ И ПРОТЕКАНИЕМ ПРОЦЕССА STATE TRANSITIONS	80
3.5.1. Разработка экспериментального подхода для оценки протекания state transitions на целых листьях.....	80
3.5.1.1. Определение времени освещения актиничным светом, необходимого для достоверной оценки state transitions	81
3.5.1.2. Определение влияния интенсивности актиничного света во время измерений на протекание state transitions	87
3.5.2. Влияние повышения интенсивности света во время выращивания растений <i>A. thaliana</i> на потенциальную возможность протекания процесса state transitions в листьях. Выявление связи между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием state transitions в этих условиях.	93
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	99
ВЫВОДЫ	102

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ФЭТЦ – фотосинтетическая электрон-транспортная цепь
- ФС1 – фотосистема 1
- ФС2 – фотосистема 2
- РЦ – реакционный центр
- ПХ-пул – пул пластохинона
- ПХ – окисленный пластохинон
- ПХ^{•-} – однократно восстановленный пластохинон, пластосемихинон
- ПХН₂ – пластогидрохинон
- Хл – хлорофилл
- МВ – метивиологен
- Фд – ферредоксин
- АТФ – аденозинтрифосфат
- ВОК – водоокисляющий комплекс
- НФТ - нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a*
- Lhca – светособирающие белки фотосистемы 1
- Lhcb – светособирающие белки фотосистемы 2
- ЛНСII – мажорная часть светособирающей антенны фотосистемы 2, представленная тримерами
- АФК – активные формы кислорода

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В ходе своей жизнедеятельности растения постоянно сталкиваются с изменениями в условиях окружающей среды, что привело к формированию в их фотосинтетическом аппарате большого числа адаптационных механизмов. Известно, что при изменении освещенности растений оптимизация фотосинтетической активности на стадии поглощения энергии квантов света происходит за счет адаптационных механизмов, осуществляемых посредством изменений в функционировании светособирающих комплексов, таких как: 1) механизм кратковременной адаптации, *state transitions*, запуск которого происходит уже в первые минуты освещения, и 2) механизм долговременной адаптации, включающийся при длительном воздействии света. Процесс *state transitions* заключается в миграции части светособирающей антенны фотосистемы 2 между фотосистемой 2 и фотосистемой 1, что приводит к перераспределению световой энергии между этими фотосистемами. При долговременной адаптации к условиям повышенной освещенности происходит уменьшение размера антенны фотосистемы 2 за счет подавления биосинтеза периферических белков антенны, что приводит к уменьшению количества поглощенных квантов света и, в конечном счете, к оптимизации работы фотосинтетического аппарата. До настоящего времени оставалось неизвестным, подавление какого именно этапа биосинтеза белков, транскрипции или трансляции, происходит при уменьшении размера антенны фотосистемы 2 при долговременной адаптации к повышенной освещенности.

Механизм кратковременной адаптации и механизм долговременной адаптации запускаются изменениями в окислительно-восстановительном состоянии пула пластохинона – центрального звена переноса электронов в фотосинтетический электрон-транспортной цепи. Однако до сих пор остается невыясненной молекулярная природа сигнала, поступающего из пула пластохинона и инициирующего эти адаптационные изменения.

Среди хлоропластных сигналов активные формы кислорода, в частности пероксид водорода, играют важную роль в различных сигнальных путях. Ранее было показано, что внутри тилакоидной мембраны происходит образование пероксида водорода и предположено, что пероксид водорода образуется в реакции супероксидного радикала с дважды восстановленным пластохиноном, пластогидрохиноном. Пероксид водорода, образованный при участии пула пластохинона, может выполнять сигнальную функцию и передавать информацию об окислительно-восстановительном состоянии пула

пластохинона. Однако непосредственно участие пероксида водорода в адаптационных изменениях долгое время оставалось недоказанным.

Цель и задачи работы. Целью работы являлось исследование роли пероксида водорода в адаптации растений к условиям освещения, осуществляемой посредством изменений в функционировании светособирающих комплексов, таких как: механизм кратковременной адаптации, state transitions, который заключается в миграции части светособирающей антенны фотосистемы 2 между фотосистемой 2 и фотосистемой 1, и механизм долговременной адаптации, при которой происходит уменьшение размера антенны фотосистемы 2 за счет подавления биосинтеза периферических белков антенны.

Задачи, поставленные в работе:

- Установить, происходит ли образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны при скоростях электронного транспорта, близких к физиологическим.
- Определить роль пероксида водорода в уменьшении размера антенны фотосистемы 2 при адаптации к долговременной повышенной освещенности.
- Определить, существует ли корреляция между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием процесса state transitions.

Научная новизна. Начиная с 1960-1970-х годов, ученые многих стран мира вовлечены в изучение молекулярного механизма передачи сигнала фотосинтетической электрон-транспортной цепью об окислительно-восстановительном состоянии пула пластохинона. До сих пор, однако, остается невыясненным, каким образом восстановленный пластохинон, пластогидрохинон, напрямую или опосредованно через взаимодействие с пластогидрохинон-окисляющим сайтом цитохромного b6/f комплекса, инициирует каскад сигнальных путей, необходимых для запуска адаптационных изменений. В настоящей работе представлены доказательства в пользу того, что пероксид водорода является неотъемлемым звеном в инициировании сигнальных путей.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в работе данные об участии пероксида водорода в регуляции размера антенны фотосистемы 2 расширяют знания о сигнальных путях в высших растениях и открывают перспективы для выяснения более детального механизма передачи сигнала от хлоропласта к ядру, необходимого для регуляции уровня экспрессии ядерных генов.

В ходе диссертационной работы был разработан методический подход, позволяющий оценить протекание state transitions на целых растениях с помощью измерений кинетики релаксации нефотохимического тушения после освещения.

Кроме того, разработаны экспериментальные подходы, позволяющие регулировать количество пероксида водорода в листьях, что может быть в дальнейшем использовано при исследовании роли пероксида водорода в различных процессах.

Положения, выносимые на защиту:

1. Образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны происходит при скоростях электронного транспорта, близких к физиологическим и является результатом протекания реакции между пластохиноном и супероксидным радикалом.
2. Пероксид водорода выполняет сигнальную роль в ходе долговременной адаптации к повышенной освещенности; происходящее при этой адаптации уменьшение размера антенны фотосистемы 2 происходит за счет уменьшения уровня экспрессии генов, кодирующих белки светособирающей антенны фотосистемы 2.
3. Разработан экспериментальный подход, основанный на исследовании релаксации нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* после освещения, позволяющий выявить протекание процесса state transitions в листьях.
4. При увеличении интенсивности света до 600 мкмоль квантов/м²с в листьях арабидопсиса полностью перестает протекать state transitions, в то время как в листьях ячменя при этой интенсивности света state transitions происходит.
5. Увеличение количества пероксида водорода в листьях приводит к ингибированию возвращения светособирающих белков (L-тример) от ФС1 к ФС2 в процессе state transitions.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФОТОСИНТЕЗЕ

Возникновение процесса фотосинтеза является событием, изменившим облик планеты. Мы не знаем точно, когда появился первый фотосинтезирующий организм и как он выглядел, однако, мы знаем, что этот организм появился миллиарды лет назад в условиях, значительно отличающихся от современных (Cavalier-Smith, 2006). Только фотосинтезирующие организмы обладают способностью использовать энергию квантов света для разложения химически устойчивой молекулы H_2O на электроны, протоны и кислород. Использовать воду в качестве источника электронов вместо имеющихся в значительно меньшем количестве соединений, таких как сероводород, стали фотосинтезирующие микроорганизмы, предки нынешних цианобактерий (Bekker et al., 2004). Деятельность именно этих древних микроорганизмов привела к поступлению кислорода в атмосферу Земли и созданию нынешней, кислородной, атмосферы (для обзора см. Hohmann-Marriott and Blankenship, 2011). Накопление кислорода в атмосфере привело к формированию новых условий: кислород, а вернее его активные формы, стали опасной угрозой для фотосинтезирующих организмов, которым пришлось развить большое количество механизмов для защиты от окислительного стресса.

Существуют два типа фотосинтеза: бесхлорофилльный и хлорофилльный фотосинтез. Бесхлорофилльный фотосинтез, как предполагается, был эволюционно первичным механизмом запасания энергии электромагнитного излучения. Считается, что наиболее древними организмами, преобразовавшими энергию света в химическую, были археи, осуществляющие бесхлорофилльный фотосинтез, при котором не происходит образования восстановителя НАДФН и фиксации CO_2 , а энергия запасается лишь в форме АТФ. Несколько позже, в ходе эволюции возникли организмы (зеленые, пурпурные бактерии и другие группы зубактерий), использовавшие одну из фотосистем, позволяющую осуществлять аноксигенный фотосинтез, при котором в качестве источника электронов использовались соединения с низким редокс-потенциалом (водород, сульфиды и сероводород, сера, соединения железа (II), нитриты). Система оксигенного фотосинтеза, при которой в электрон-транспортной цепи совместно функционируют две фотосистемы, характерная для цианобактерий и происшедших от них в ходе эндосимбиоза хлоропластов водорослей и высших растений, возникла от 3,5 до 2,4 миллиардов лет назад (Cardona, 2016). Появление фотосистемы второго типа позволило использовать в качестве источника электронов воду, не склонную выступать в окислительно-восстановительных

процессах в роли восстановителя (Dismukes et al., 2001). С появлением кислородных фотосинтезирующих организмов увеличивалось содержание молекулярного кислорода на Земле, что привело к накоплению кислорода в водах мирового океана, окислению горных пород, формированию защитного озонового слоя и накоплению кислорода в атмосфере планеты. Возникновение системы кислородного фотосинтеза явилось причиной перестройки древней восстановительной атмосферы Земли и формированию современной атмосферы окислительного типа. Формирование озонового слоя, защищающего поверхность Земли от ультрафиолетового излучения, сделало возможным выход жизни на сушу.

Кислородный фотосинтез - единственный биологический процесс, который идет в направлении увеличения свободной энергии. Все остальные процессы проходят за счет энергии, накопленной в процессе фотосинтеза первичными продуцентами. Первые опыты по изучению кислородного фотосинтеза были проведены Джозефом Пристли в 1770 – 1780-х годах, он открыл выделение кислорода растениями, однако, не показал, что для этого растениям нужен свет, это позже сделал Ян Ингенхауз. Еще позже было установлено, что помимо выделения кислорода, растения поглощают углекислый газ и при участии воды синтезируют на свету органические соединения. До 1893 года процесс восстановления CO_2 растениями до органических молекул называли «ассимиляцией». В 1893 году Шарль Барне предложил новое слово для обозначения биосинтетического процесса, происходящего в зеленых растениях – «фотосинтез».

Важным этапом в изучении фотосинтеза стало выделение хлорофилла в 1818 г. Пьером Пельтье и Жозефом Кавенту. Разделить и изучить пигменты удалось в дальнейшем М.С. Цвету с помощью метода хроматографии. Развивая положения Р. Майера, К.А. Тимирязевым были изучены спектры поглощения хлорофилла и показано, что именно поглощенные солнечные лучи (кванты солнечного света) хлорофиллом позволяют повысить энергию системы, создавая, вместо слабых связей С-О и О-Н, высокоэнергетические связи С-С.

В 1937 году Роберт Хилл установил, что процесс окисления воды и ассимиляцию CO_2 можно разобщить, это открытие положило начало представлениям о световых и темновых реакциях фотосинтеза. Механизм процесса ассимиляции CO_2 (СЗ-путь фотосинтез) был раскрыт Мелвином Кальвином в 1940-х годах, за эту работу ему была присуждена Нобелевская премия в 1961 году.

Окислительно-восстановительную сущность фотосинтеза (кислородного и аноксигенного) установил Корнелис ван Ниль: кислород в фотосинтезе образуется полностью из воды, что экспериментально было подтверждено в 1941 г. А.П.

Виноградовым в опытах с изотопной меткой. В 1955 г. был выделен фермент рибулозобисфосфат-карбоксилаза/оксигеназа. В 1960 г. Ю.С. Карпиловым и М. Хэтчем, в 1966 г. К. Слэком был описан C₄-путь фотосинтеза.

1.2. СТРОЕНИЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ТИЛАКОИДОВ

Фотосинтез растений протекает в обособленных двумембранных органеллах – хлоропластах. Внутреннее содержание хлоропластов, строма, пронизана мембранами, называемыми ламеллами. Ламеллы образуют стопки – граны. Внутритилакоидное пространство отделено от стромы и называется люменом. В мембранах тилакоидов находятся пигменты и белковые комплексы, необходимые для светоиндуцированного переноса электрона от воды на ферредоксин, восстановления НАДФ⁺ и синтеза АТФ. Ферменты, необходимые для ассимиляции CO₂, располагаются в строме. Таким образом, световые и темновые стадии фотосинтеза разделены территориально внутри хлоропласта.

В работе Эмерсона с соавторами (Emerson et al., 1957) было показано наличие двух фотохимических систем, возбуждение которых происходит при освещении разными длинами волн – коротковолновой (680 нм), соответствующей фотосистеме 2 (ФС2) и длинноволновой (700 нм), соответствующей фотосистеме 1 (ФС1). ФС2 содержит в качестве первичного донора электронов П680, а ФС1 содержит П700. Эти две фотосистемы взаимодействуют через серию окислительно-восстановительных реакций в линейном транспорте электронов от воды к НАДФ⁺. Z-схема, предложенная Хиллом и Бендалом (Hill and Bendall, 1960), располагает компоненты фотосинтетической электрон-транспортной цепи согласно их окислительно-восстановительным потенциалам. Согласно Z-схеме, электроны от воды поднимаются против термодинамического градиента при поглощении двух квантов света последовательно двумя фотосистемами.

В фотосинтетической электрон-транспортной цепи тилакоидов происходят первичные процессы фотосинтеза: поглощение энергии кванта света, разделение зарядов, создание протонного градиента для синтеза АТФ. Все эти функции и определили строение электрон-транспортной цепи. Реакции кислородного фотосинтеза у высших растений и цианобактерий катализируются четырьмя надмолекулярными белковыми комплексами, расположенными в тилакоидной мембране. Два из этих комплексов, ФС2 и ФС1, содержат большое количество хлорофиллов, которые поглощают световую энергию и переносят энергию возбуждения к реакционным центрам, в которых и происходит первичное разделение зарядов. Электроны движутся от ФС2 через цитохромный b₆/f комплекс к ФС1

и далее используются на восстановление НАДФ^+ до НАДФН . Первичный донор ФС2 – P680 получает электрон от воды. В результате электронного транспорта формируется H^+ градиент через мембрану, который используется при синтезе АТФ. В высших растениях ФС2 содержится в гранах, в то время как в ламеллах располагается ФС1 (Andersson and Anderson, 1980) и АТФаза (Miller and Staehelin 1976), цитохромный b6/f комплекс представлен в обеих частях. Основной функциональной единицей ФС является кор-комплекс, в дополнение к кор-комплексу растения и цианобактерии имеют антенную систему, основная функция которой – увеличение площади поглощения световой энергии. Крупные надмолекулярные комплексы взаимодействуют друг с другом с помощью небольших переносчиков электронов. Так, пластохинон связывает ФС2 и цитохромный b6/f комплекс, а пластоцианин связывает цитохромный b6/f комплекс и ФС1. Электроны от ФС1 переносятся на ферредоксин, который впоследствии, с участием ферредоксин- НАДФ^+ редуктазы, восстанавливает НАДФ^+ . На рис. 1 представлена схема строения электрон-транспортной цепи.

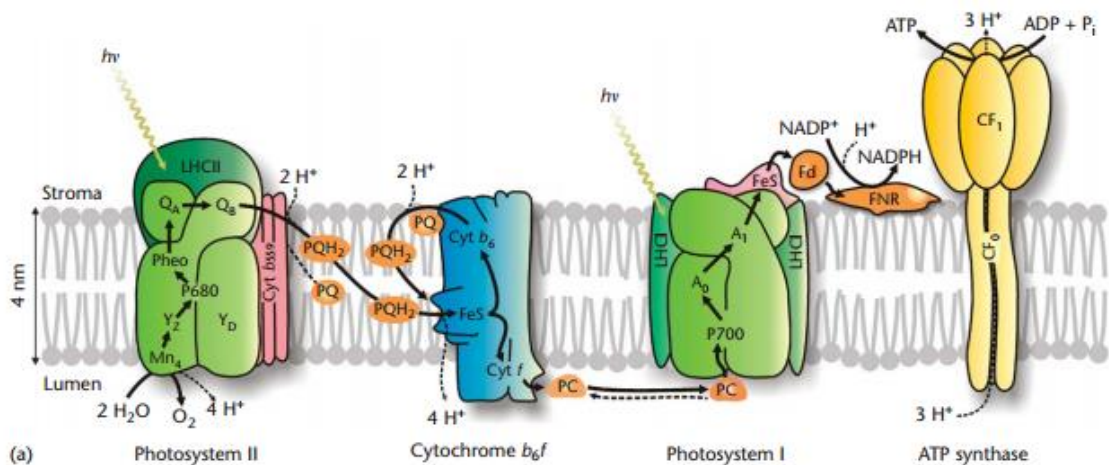


Рисунок 1. Строение электрон-транспортной цепи тилакоидов высших растений. P680 и P700 – первичные доноры ФС2 и ФС1, соответственно; $(\text{Mn})_4$ – марганцевый кластер водоокисляющего комплекса; Yz – остаток тирозина белка D1; Pheo – феофитин, Qa и Qb – хиноновые переносчики электрона ФС2; LHCII – мажорная часть светособирающей антенны ФС2; Cyt b559 – цитохром b559; PQ – пластохинон; PQH_2 – пластогидрохинон; Cyt b6 - цитохром b6; FeS – железосерный центр Риска; Cyt f – цитохром f; PC – пластоцианин; A_0 – первичный акцептор ФС1; A_1 – филлохинон; Fd – ферредоксин; LHCI – светособирающая антенна ФС1; FNR – ферредоксин- НАДФ^+ оксидоредуктаза; CF_0 – мембранная часть АТФазы; CF_1 – периферическая часть АТФазы.

(Рисунок из книги Encyclopedia of Life Sciences, Govindjee et al., 2010)

В нормальных условиях, когда растение не находится в условиях стресса, практически весь фотосинтетический электронный транспорт используется на восстановление НАДФ⁺ до НАДФН, т.е. протекает линейный электронный транспорт. В таких условиях от 5 до 10 % электронов может переноситься на кислород *in vivo* (Mubarakshina et al., 2010). Перенос электронов на кислород называется псевдоциклическим электронным транспортом или реакцией Мелера (Mehler et al., 1951) и приводит к образованию активных форм кислорода (АФК). В условиях стресса перенос электронов на кислород может достигать 50% от общего электронного транспорта в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (Kozuleva and Ivanov, 2016). Кроме того, стрессовые условия приводят также и к активации циклического электронного транспорта вокруг ФС1 (Cornic and Massacci, 1996).

1.2.1. Реакционный центр фотосистемы 2

ФС2 является водо/пластохинон оксидоредуктазой, в результате серии светоиндуцированных реакций переноса электронов ФС2 осуществляет окисление воды до протонов и молекулярного кислорода. В высших растениях ФС2 состоит из коровой части, которая отвечает за разделение зарядов, и антенной системы, которая выполняет функцию светосбора и транспорта энергии к реакционным центрам. За последние годы было получено большое количество структур интактной ФС2 с разным разрешением от среднего 4-10 ангстрем до высокого разрешения, 1.9 ангстрем (Zouni et al., 2001, Kamiya and Shen, 2003, Ferreira et al., 2004, Loll et al., 2005, Guskov et al., 2009, Umena et al., 2011, Suga et al., 2015), также получены структуры отдельных субъединиц (Cormann et al., 2009) и светособирающего комплекса ФС2 (Liu et al., 2004, Pan et al., 2011). Однако большинство структур в высоком разрешении были получены для цианобактериальных ФС2 комплексов, которые являются более стабильными по сравнению с ФС2 комплексами высших растений.

Комплекс ФС2 состоит примерно из 30 белковых субъединиц, некоторые из которых кодируются в ядре, а другие в самом хлоропласте. Два центральных белка ФС2 D1 и D2 содержат пигменты, которые осуществляют светоиндуцированное разделение зарядов, и кофакторы переноса электронов (рис. 2). Эти белки связывают всего 8 типов редокс компонентов: хлорофиллы, каротиноиды, феофетин, пластохинон, тирозин, магний, железо и цитохром *b559*. Однако в транспорт электронов от воды к пластохинону вовлечены только следующие компоненты: марганец-кислород-кальциевый кластер (Mn₄CaO₅), тирозин, димер хлорофилла, который также называют P680, мономерный

хлорофилл, феофетин (PheoD1) и две молекулы пластохинона Qa и Qb (Hendry, Wydrzynski, 2003; Debus, 1992, Govindjee et al., 2010, Umena et al., 2011)

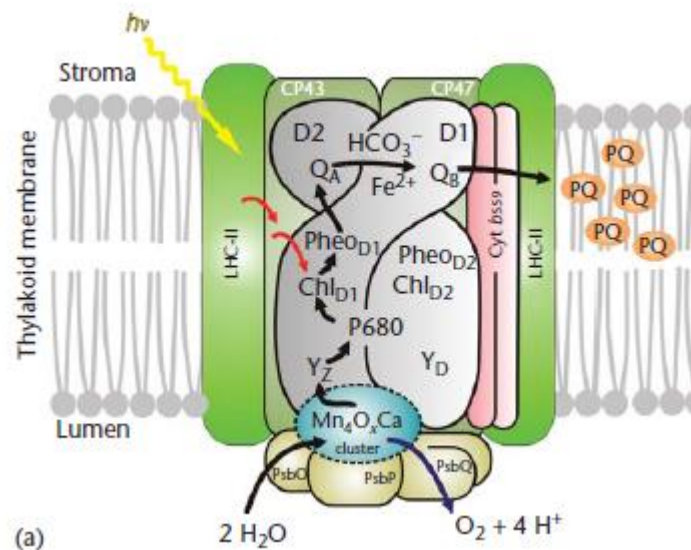


Рисунок 2. Структура фотосистемы 2. D1 и D2 – центральные белки ФС2; CP47 и CP 43 – коровые светособирающие пигмент-белковые комплексы; LHCII – мажорная часть светособирающей антенны ФС2; Mn_4O_xCa – марганец-кислород-кальциевый кластер водоокисляющего комплекса; PsbO, PsbP, PsbQ – субъединицы ФС2, связанные с выделением кислорода; Yz, Y_D – остатки аминокислоты тирозин белка D1 и D2, соответственно, P680 - первичный донор ФС2; Chl D1, Chl D2 – хлорофилл D1 и D2 белка, соответственно, PheoD1 и PheoD2 – феофитин D1 и D2 белка; Qa и Qb – хиноновые переносчики электронов ФС2; Fe^{2+} - негемовое железо; HCO_3^- - бикарбонат ион; Cyt b559 – цитохром b559; PQ – пластохинон.

В дополнение к этим компонентам, кор-комплекс ФС2 содержит два внутренних (коровых) антенных белка CP43 и CP47, связывающих 29 молекул хлорофилла *a*, 12 каротиноидов, 1 негемовое железо, один или более хлорид ион и один бикарбонат ион. Подробная информация о других белках, входящих в состав ФС2, и об их функциях, представлена в таблице 1.

Таблица 1. Характеристика белков, входящих в состав фотосистемы, 2 и их функции (Составлена по Croce, 2012 и Govindjee et al., 2010)

ген	Белок	Масса, кДа	Пигменты	Функция
psb A	D1	38,3	3 Хл <i>a</i> , 1 Фео, β -каротин	Формирует реакционный центр, Qb связан с D1

psb B	CP47	56,6	16 Хл а, β-каротин	светосбор
psb C	CP43	51,6	13 Хл а, β-каротин	светосбор
psb D	D2	39,4	3 Хл а, 1 Фео, β-каротин	Формирует реакционный центр, Qa связан с D2
psb E	α-субъединица цитохрома b559	9,5	гем	Связывает b-гем, может участвовать в фотопротекции
psb F	β-субъединица цитохрома b559	5,1	гем, β-каротин	Связывает b-гем, может участвовать в фотопротекции
psb H	PsbH	7,3	β-каротин	Включен в цикл репарации D1, участвует в стабилизации комплекса
psb I	Psb I	4,4	β-каротин	Стабилизация комплекса
psbJ	PsbJ	4,1	β-каротин	Влияет на поток электронов на акцепторной стороне
psbK	PsbK	4,1	β-каротин	Стабилизация комплекса
psbL	PsbL	4,3	β-каротин	Влияет на связывание пластохинона
psbM	PsbM	4,0	β-каротин	Стабилизирует димерный комплекс
psbO	PsbO, OEC 33	30		Вовлечен в оптимизацию выделения кислорода
psbP	PsbP, OEC 23	23		Вовлечен в оптимизацию выделения кислорода
psbQ	PsbQ, OEC 16	17		Необходим для стабильного выделения кислорода
psbR		10		?
psbS		22		Фотопротекция за счет нефотохимического тушения

psbTn		5		Репарация ФС2
psbT		3,9		Стабилизация Qa сайта
psbW		6,1		Димеризация ФС2
psbX		4,3		Стабилизация Хл z
psbY		?		?
PsbZ		6,8	β -каротин	Стабилизация суперкомплекса

Белки D1 и D2 со всеми кофакторами формируют симметричную структуру, в которой существуют два потенциальных пути для транспорта электронов. Однако только один из этих путей является активным (рис. 2).

Первичная фотохимическая реакция в ФС2 приводит к разделению зарядов и образованию пары $P680^+/Pheo^-$ в течение 8 пс (Greenfield et al., 1997). Далее существуют два механизма: рекомбинация зарядов и возвращение к начальному состоянию или быстрый перенос электрона от $Pheo^-$ к Qa (Deligiannakis and Rutherford, 1996). От Qa^- электрон переносится на другую молекулу пластохинона – Qb. Получив два электрона и два протона, Qb становится полностью восстановленным и способен покинуть сайт связывания в ФС2. Параллельно с этими событиями, тирозин из полипептидной цепи D1 передает электрон к $P680^+$, скорость электронного переноса на этом участке составляет от 20 нс до 35 мс, в зависимости от редокс состояния компонентов водоокисляющего цикла.

Pierre Joliot вместе с коллегами при изучении выделения кислорода водорослями на подачу вспышки света (Joliot et al., 1969) обнаружили, что выделение кислорода является функцией от количества вспышек с периодом четыре. Эти классические эксперименты показывают, что каждый комплекс ФС2 работает независимо от других и что для выделения одной молекулы кислорода необходимы четыре фотохимические реакции (Joliot and Kok, 1975). Основываясь на этих результатах, Кок предложил модель окисления воды, в которой кислород-выделяющий комплекс мог существовать в одном из пяти состояний, называемых S0, S1, S2, S3, S4 (Рис. 3), стабилизация которых зависит от присутствия бикарбоната (Shevela et al., 2006; Zharmukhamedov et al., 2013).

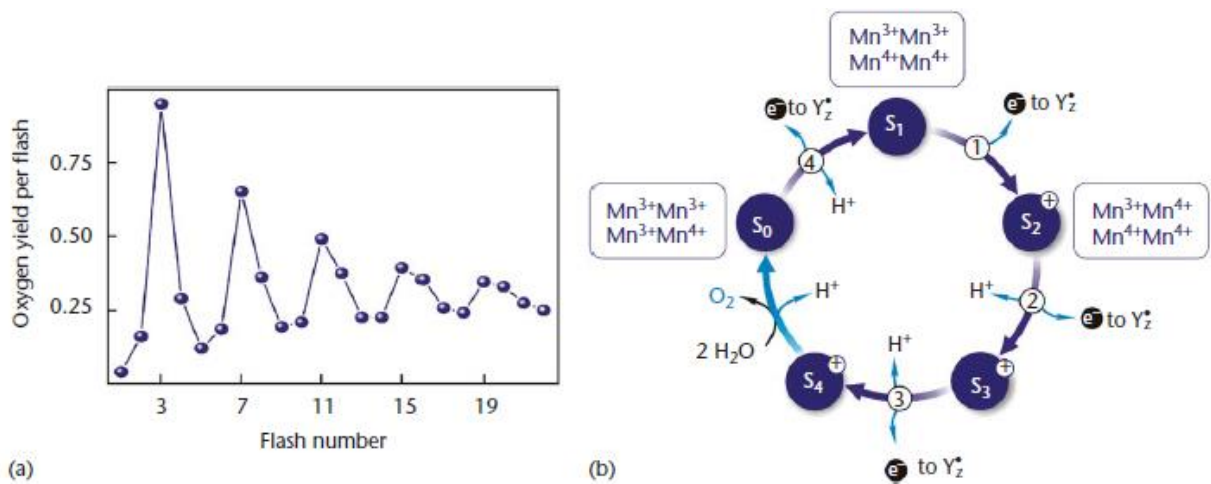


Рисунок 3. а – выделение кислорода при подаче вспышек; б - модель окисления воды, в которой кислород-выделяющий комплекс находится в одном из пяти состояний - S₀, S₁, S₂, S₃, S₄. (Joliot and Kok, 1975).

Полный водоокисляющий цикл приводит в результате к образованию одной молекулы кислорода, выделению 4 протонов в люмен, и переносу четырех электронов через реакционный центр ФС2 к пулу пластохинона.

1.2.2. Светособирающая антенна ФС2

Функцией антенной системы является светосбор и перенос энергии к реакционным центрам. Антенные системы состоят из белков, кодируемых генами семейства *lhc* (light-harvesting complex), эти белки связывают по 8-14 молекул хлорофилла и 2-4 молекулы каротиноидов. Существует два подкласса Lhc белков, одни из которых связан с ФС2, другой с ФС1, и соответственно обозначаемые Lhcb и Lhca белки по классификации Jansson (Jansson, 1999). В *Arabidopsis thaliana* обнаружено шесть пептидов в антенном комплексе ФС1 и семь в антенном комплексе ФС2 (Jansson, 1999, Ganeteg et al., 2004), кроме того, было высказано предположение о том, что белок Lhcb4.3 является отдельным типом Lhc белков, которому предложено присвоить название Lhcb8 на основании его присутствия только в некоторых видах растений, например *Arabidopsis thaliana*, и отличной от других белков Lhcb4 регуляции (Klimmek et al., 2006). Гены, кодирующие белки Lhca5, Lhca6, Lhcb7 и Lhcb8 являются редко экспрессируемыми, предполагают, что они экспрессируются в условиях и тканях, отличных от тех, в которых экспрессируются обильные белки Lhca1-4 и Lhcb1-6 (Klimmek et al., 2006). Lhca и Lhcb белки имеют общее эволюционное происхождение и консервативную структуру организации. Основным

отличием пигмент-белковых комплексов, содержащих Lhca и Lhcb белки, является наличие в Lhca-содержащих комплексах хлорофиллов, способных к поглощению дальнего красного света. Lhcb-содержащие пигмент-белковые комплексы имеют максимум поглощения при 680 нм, а все Lhca-содержащие пигмент-белковые комплексы имеют максимум поглощения свыше 700 нм, в некоторых условиях комплексы Lhca3- и Lhca4-хлорофилл способны поглощать при 726 и 730 нм, соответственно (Schmid et al., 1997, Croce et al., 2002, Schmid et al., 2002). Отличия, наблюдаемые в спектральных характеристиках хлорофиллов, объясняются именно отличными взаимодействиями хлорофиллов с белками (Croce et al., 2007).

Светособирающие комплексы имеют разную четвертичную структуру: белки Lhcb1 – 3 формируют гетеротримерный комплекс, обозначаемый ЛНСII, в то время как Lhcb4, Lhcb5 и Lhcb6 представлены в виде мономеров (Dainese and Bassi, 1991). Lhca-содержащие комплексы состоят из двух гетеродимеров Lhca1-Lhca4 и Lhca2-Lhca3 (Croce and Bassi, 1998).

ЛНСII, основной светособирающий комплекс ФС2, состоит, как описано выше, из продуктов генов *lhcb1 – 3*, наиболее распространенным из которых является белок Lhcb1. Белки Lhcb1 и Lhcb2 обладают очень высокой степенью гомологии, однако, по последним данным, выполняют разные функции при кратковременной адаптации к стрессовым условиям (Pietrzykowska et al., 2014). Структура комплекса ЛНСII, полученная с высоким разрешением (Liu et al., 2004), показала, что каждый мономер содержит 14 сайтов связывания хлорофиллов (8 Хл *a* и 6 Хл *b*). Интересно, что некоторые сайты связывания хлорофиллов могут связывать и Хл *a*, и Хл *b* не только при *in vitro* реконструкции (Giuffra et al. 1997), но и *in vivo*, в зависимости от доступности Хл *b* (Hirashima et al., 2006). Каждый мономер ЛНСII имеет 3 трансмембранные спирали и две амфипатические спирали (Liu et al., 2004). Структура четырех антенных комплексов ФС1 была получена с меньшим разрешением, чем для антенны ФС2 (Amunts et al., 2007). Структура показала наличие 13-14 сайтов связывания хлорофиллов для каждого из Lhca белков.

Несмотря на структурную схожесть, индивидуальные антенные комплексы имеют отличия в биохимических и спектральных свойствах. Часть этих отличий объясняется различиями в пигментном составе, хотя все Lhc белки связывают Хл *a*, Хл *b*, лютеин и виолаксантин, их относительные количества могут отличаться для разных субъединиц. Кроме того, было показано, что сайты связывания неоксантина присутствуют только в Lhcb белках, в то время как сайты связывания β-каротина есть только в Lhca белках (Bassi et al., 1993, Croce et al., 2002).

1.2.3. Образование суперкомплекса РЦ ФС2-ЛНСII

Суперкомплекс ФС2 состоит из димера кор-комплекса ФС2, связанного с Lhcb-содержащими комплексами, при чем в этом суперкомплексе количество антенных белков зависит от условий выращивания. В состав каждого суперкомплекса входят: димер кор-комплекса, 4 ЛНСII тримера и по 2 мономерных белка Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6. В растениях *Arabidopsis thaliana* обнаружены суперкомплексы ФС2 следующего состава: димерный кор-комплекс C2, 2 S (strongly bound) тримера ЛНСII – прочно связанные с кор-комплексом тримеры через CP43 и 2 M (moderately bound) тримера ЛНСII – умеренно связанные с кор-комплексом тримеры, расположенные со стороны Lhcb4 и Lhcb6 белков. Тример S, по-видимому, состоит из двух белков Lhcb1 и одного белка Lhcb2, а тример M из двух Lhcb1 и одного Lhcb3 белков (Damkjær et al., 2009) (Рис. 4).

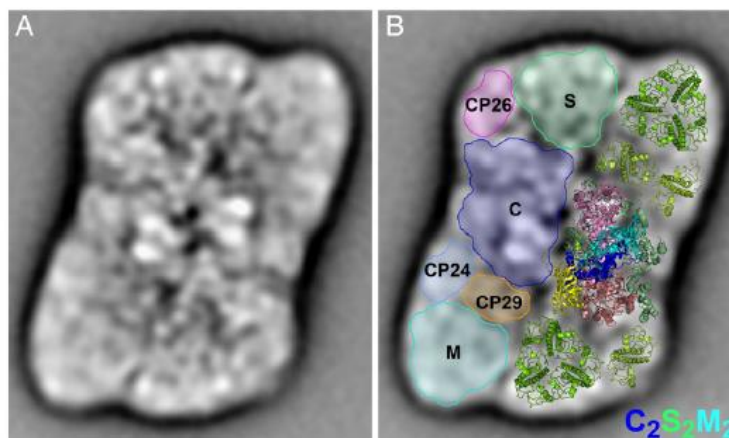


Рисунок 4. Суперкомплекс ФС2. С – кор-комплекс ФС2, S – тример ЛНС II, прочно связанный с кор-комплексом; М – тример ЛНС II, умеренно связанный с кор-комплексом; CP29, CP26, CP24 – мономерные пигмент-белковые комплексы, содержащие белки Lhcb4, Lhcb5 и Lhcb6 соответственно.

При использовании слабых детергентов (β -мальтозид) могут быть получены комплексы: Lhcb4-Lhcb6-M тример, что говорит об их достаточно прочной связи (Bassi and Dainese, 1992). Эксперименты с использованием мутантных растений показали, что белок Lhcb5 находится, вероятно, вблизи CP43, а белок Lhcb6 расположен вблизи CP47 (Harrer et al., 1998, Yakushevskaya et al., 2001). Кроме S и M тримеров, показано существование L (loosly bound) тримера, слабо связанного с кор-комплексом ФС2, но все же способного эффективно переносить энергию к реакционному центру ФС2 (Dekker and

Воекета, 2005). Суперкомплексы ФС2 называют C2S2M2 (Воекета et al. 1999a), кроме того встречаются небольшие комплексы C2S2 и крупные C2S2M2L.

В мутантах с заблокированным синтезом белка Lhcb4 не происходит формирование суперкомплекса C2S2M2, предполагая, что наличие этого белка является необходимым для формирования и стабильности этого комплекса (Yakushevskaya et al., 2003). С другой стороны, в работах (Yakushevskaya et al., 2001, Воекета et al., 1999b) было показано существование комплексов C2S2M2, в состав которых не входил белок Lhcb5. Lhcb6 белок присутствует только в C2S2M2 суперкомплексах, которые не формируются в отсутствие этого белка (Kovacs et al., 2006), так как этот белок определяет связь М тримера с остальным суперкомплексом.

Недавно была получена структура C2S2 суперкомплекса растений шпината с разрешением 3.2 ангстрем (Wei et al., 2016) (Рис. 5).

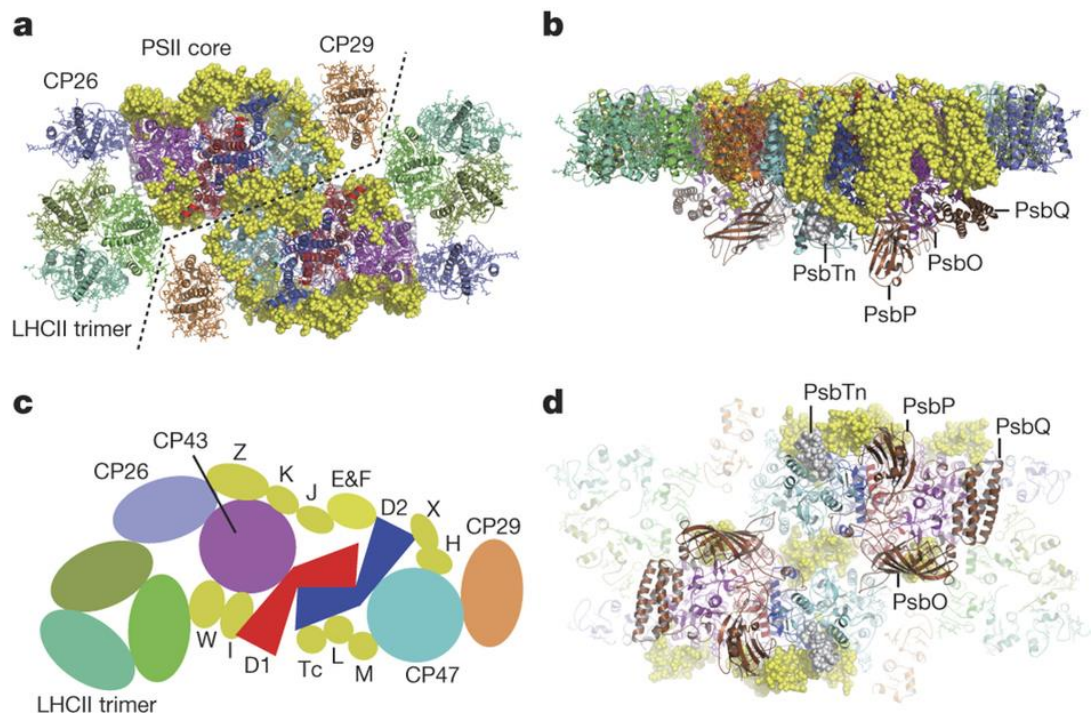


Рисунок 5. Структура C2S2 суперкомплекса ФС2 растений шпината. а – вид со стромальной стороны; б – вид сбоку вдоль плоскости мембраны. Штриховая линия показывает расположение границы раздела между двумя мономерами. с – схема, показывающая расположение субъединиц суперкомплекса, цвет субъединиц на схеме совпадает с цветом на рисунке а; д – часть суперкомплекса, экспонированная в люмен.

Этот комплекс формирует гомодимер, каждый мономер состоит из корового комплекса, представленного четырьмя большими внутренними субъединицами (D1, D2, CP43 и CP47), двенадцатью низкомолекулярными мембраноприлежащими субъединицами

(PsbE, PsbF, PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbTc, PsbW, PsbX и PsbZ) (Рис. 5 а-с), а также четырьмя внешними субъединицами, которые экспонированы в люмен (PsbO, PsbP, PsbQ and PsbTn) (Рис. 5 d).

Оказалось, что D1, D2, CP43 и CP47 субъединицы практически идентичны в высших растениях и цианобактериях. Аминокислотные последовательности шпината белков D1 (PsbA), D2 (PsbD), CP47 (PsbB) и CP43 (PsbC) составляют 85%, 90%, 77% и 84% гомологии, соответственно, с таковыми ФС2 *Thermosynechococcus vulcanus*, структура для которых была получена Umena и др. (2011) с высоким разрешением в 1.9 ангстрем. Кроме того, связывающие сайты кофакторов внутри корового комплекса также обладают высокой гомологичностью у растений шпината и *Thermosynechococcus vulcanus*.

1.2.4. Пул пластохинона

Пул пластохинона (ПХ-пул) – мобильный переносчик электронов от ФС2 к цитохромному b6/f комплексу. Вопрос диффузии и мобильности пластохинона внутри липидной фазы тилакоидной мембраны широко обсуждается в литературе (Joliot and Joliot, 1992, Blackwell et al. 1994, Marchal et al., 1998, Kirchhoff et al., 2002, Tremmel et al., 2003). Пластохинон представляет собой молекулу 2,3-диметил-1,4-бензохинона с боковой цепью, состоящей из 9 изопрениловых единиц (Рис. 6).

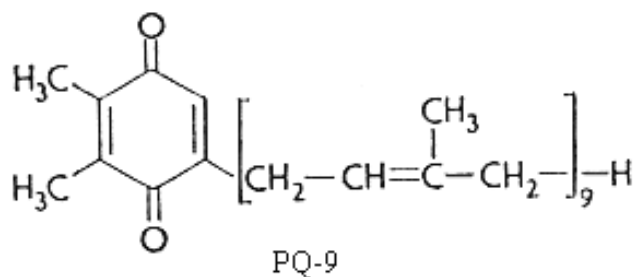


Рисунок 6. Строение молекулы пластохинона

Редокс-активной частью служит бензохиноновое кольцо, а боковая цепь обеспечивает нахождение молекулы в гидрофобном матриксе тилакоидной мембраны. Часть пластохинона расположена в пластоглобулах (Tevini and Steinmüller, 1985), но только пластохинон, локализованный в тилакоидной мембране, является фотохимически активным, т.е. претерпевает обратимые редокс превращения. На каждый реакционный центр ФС2 приходится 5-10 молекул ПХ (Kirchhoff et al., 2000; Lichtenthaler, 2007). В тилакоидной мембране пластохинон может существовать в одной из трех редокс форм:

окисленный пластохинон (ПХ), однократно восстановленный пластохинон, пластосемихинон (ПХ^{•-}) и полностью восстановленный (+ 2 электрона, + 2 протона) пластохинол (ПХН₂) (Рис. 7).



Рисунок 7. Редокс превращения пластохинона.

Кроме линейного электронного транспорта, ПХ-пул участвует в Q-цикле, в циклическом электроном транспорте (Biggins, 1974) и в хлордыхании (Casano, 2000, Peltier and Cournac, 2002). Кроме того, однократно восстановленный семихинон, пластохинон, способен восстанавливать кислород (Khorobrykh and Ivanov, 2002). Также пластохинон, а именно пластогидрохинон, выполняет антиоксидантную функцию, нейтрализуя супероксидный радикал (Ivanov et al., 2007; Mubarakshina and Ivanov, 2010; Hundal et al., 1995, Kruk et al., 2003) и синглетный кислород (Kruk and Trebst, 2008, Gruszka et al., 2008, Kruk et al., 2016).

Окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула играет важную роль в долговременной адаптации растений к условиям освещения (Yang et al., 2001, Escoubas et al., 1995, Durnford and Falkowski, 1997), в протекании state transitions (Allen et al., 1981, Vener et al., 1998) и биосинтезе каротиноидов (Steinbrenner and Linden, 2003). Кроме того, окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула вовлечено в регуляцию экспрессии хлоропластных генов (Zer and Ohad, 2003) и генов, кодируемых в ядре, например, аскорбатпероксидазы (Chang et al., 2004), супероксиддисмутазы (Ślesak et al., 2003)

1.2.5. Цитохромный b6/f комплекс

Цитохромный b6/f комплекс является пластохинон-пластоцианин оксидоредуктазой. Этот комплекс, как и ПХ-пул, функционирует в линейном транспорте электронов, циклическом транспорте и в Q-цикле, а также участвует в формировании трансмембранного протонного градиента, необходимого для синтеза АТФ. Ряд кристаллических структур был получен для цианобактериальных цитохромных комплексов (Kurisu et al., 2003, Yan et al., 2006,

Yamashita et al., 2007). Комплекс представляет собой димер с молекулярной массой около 220 кДа. Основными субъединицами комплекса являются: цитохром b6, цитохром f, железосерный белок Риске и субъединица IV, кроме того, в состав входят малые субъединицы PetG, PetL, PetM, PetN. Также в состав каждого мономера цитохромного b6/f комплекса входят два пигмента: хлорофилл и β-каротин.

Центр Риске представляет собой 2Fe-2S железосерный центр и является высокопотенциальным, что не характерно для железосерных центров. Цитохром b6 содержит два нековалентно связанных гема b-типа (низкопотенциальный и высокопотенциальный). Цитохром f ковалентно связывает гем c-типа. Цитохромный b6/f комплекс имеет ассиметричную структуру: цитохром b6 и субъединица IV пронизывают мембрану насквозь, одна аминокислотная цепь цитохрома f внедряется в мембрану, образуя якорь, гем этого цитохрома расположен со стороны люмена. Железосерный центр Риске также расположен с люменальной стороны и лишь слегка утоплен в мембрану.

В цитохромном b6/f комплексе различают две ветви переноса электрона: низкопотенциальную и высокопотенциальную. Молекула полностью восстановленного пластохинона (первичный пластогидрохинон) связывается в сайте связывания на люменальной стороне (p-сайт или донорный сайт) и передает один электрон к железосерному центру Риске, далее на цитохром f и к пластоцианину. Второй электрон либо сразу, либо с помощью семихинона (Crofts, 2004, Forquer et al., 2006) переносится сначала на низкопотенциальный b гем, а затем на высокопотенциальный гем. В n-сайте (акцепторный сайт) связывания окисленный пластохинон дважды восстанавливается до пластогидрохинона электронами с высокопотенциального b-гема, присоединяя два протона из стромы. Таким образом, генерируется вторичный пластогидрохинон (Laisk et al., 2016), который проходит к люменальному p-сайту (Baniulis et al., 2008) и передает один электрон через центр Риске к пластоцианину, а другой к низкопотенциальной цепи. В результате функционирования Q-цикла 4 протона выделяются в люмен в результате окисления первичного и вторичного пластогидрохинонов, т.е. на один электрон, пришедший к ФС1, в строму выделяется два протона.

1.2.6. Реакционный центр фотосистемы I

Комплекс ФС1 является пластоцианин-ферредоксин оксидоредуктазой и осуществляет перенос электрона от пластоцианина к ферредоксину. ФС1 состоит из 19 субъединиц в высших растениях (10 из которых являются консервативными для цианобактерий и высших растений). Комплекс ФС1, как и ФС2, состоит из 2 частей: 1) коровой части,

которая содержит кофакторы электрон-транспортной цепи вместе с внутренней антенной системой, и 2) внешней антенной системы, состоящей из продуктов генов *lhc*.

Для ФС1, так же, как и для ФС2, были получены кристаллические структуры с различным разрешением (Jordan et al., 2001, Ben-Shem et al., 2003, Amunts et al., 2007, Amunts et al., 2010, Mazor et al., 2015). Однако, как и в случае с ФС2, большинство структур получено для ФС1 термофильных бактерий. Реакционный центр растительной ФС1 состоит из 12 субъединиц (Рис. 8). (Mazor et al., 2015).

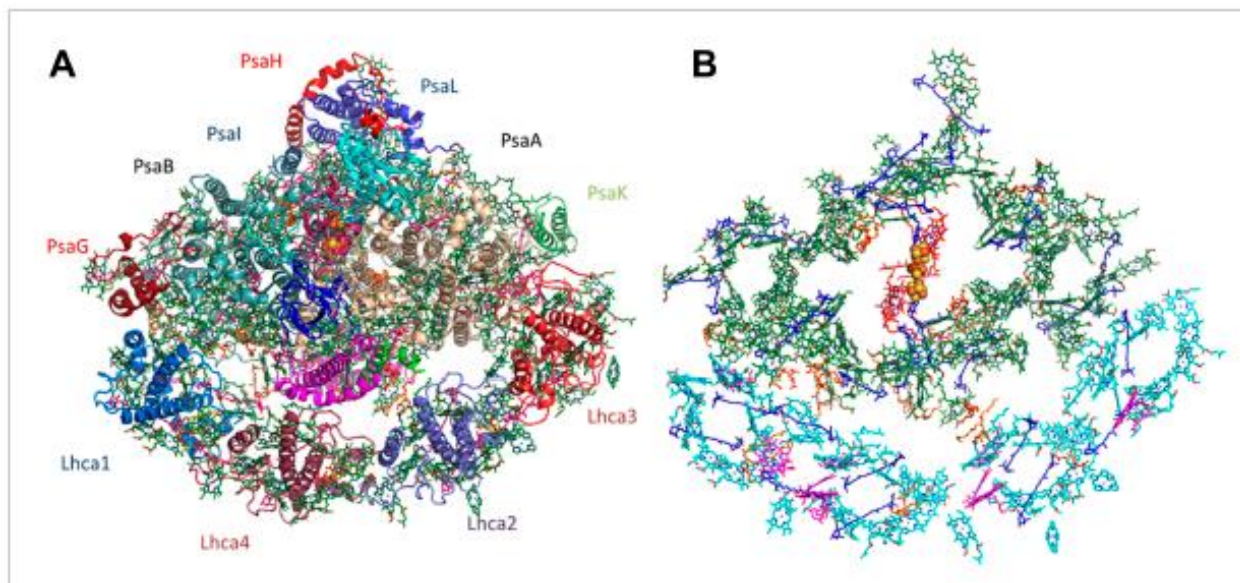


Рисунок 8. Строение реакционного центра ФС1 (Mazor et al. 2015). А – вид со стромальной стороны мембраны. В – Организация пигментов в ФС1 – LHCI суперкомплексе.

Субъединицы PSI-A, PSI-B, PSI-C высоко консервативны и очень схожи у растений и других фотосинтезирующих организмов. Эти три субъединицы содержат все кофакторы переноса электронов в ФС1: P700 (димер Хл *a*, который осуществляет разделение зарядов), A₀ (молекула Хл *a*), A₁ (филлохинон) и Fx [4Fe-4S] железосерный кластер. Как и ФС2, ФС1 содержит две цепочки кофакторов переноса электронов, предполагается, что только одна из этих цепей функционирует при линейном переносе электрона (Guergova-Kuras et al., 2001). Однако в работе на водорослях было выдвинуто предположение о функционировании обоих филлохинонов, т.е. кофакторов обеих цепей (Joliot and Joliot, 1999).

PSI-C это небольшой белок, который связывает терминальные акцепторы электрона – Fa и Fb, которые оба являются [4Fe-4S] железосерными кластерами. PSI-D –

субъединица примерно 18 кДа, экспонированная в строуму. Эта субъединица формирует сайт связывания ферредоксина, было показано, что взаимодействие происходит даже между изолированной субъединицей PSI-D и ферредоксином (Фд) (Pandini et al., 1999). PSI-E является PSI-D подобной субъединицей, также экспонирована в строуму. В растениях ячменя показано существование связи между этой субъединицей и ферредоксин:НАДФ⁺ оксидоредуктазой (Andersen et al., 1992). В экспериментах с использованием мутантных растений *Arabidopsis thaliana*, в которых была подавлена экспрессия одного из двух генов, кодирующих PSI-E, было показано изменение фенотипа растений, снижение роста на 50%, высокая восприимчивость к фотоингибированию (Varotto et al., 2000). PSI-H субъединица была найдена только в зеленых водорослях и растениях (Sheller et al., 2001). Растения арабидопсиса, в которых был заблокирован биосинтез этой субъединицы, были мало жизнеспособны (Naver, 1999). Более того, эти растения были неспособны к протеканию state transitions при воздействии света различного спектрального состава (Lunde et al., 2000). Процесс state transitions заключается в перераспределении части светособирающей антенны ФС2 (LHCII) между ФС2 и ФС1 при предпочтительном возбуждении одной или другой фотосистемы. При отсутствии субъединицы PSI-H LHCII остается около ФС2 при освещении ФС2-специфичным светом. PSI-L - интегральный мембранный белок с молекулярной массой примерно 18 кДа. Искусственное удаление этой субъединицы приводит также к потере PSI-H, что говорит об их прочной связи. PSI-I субъединица, по-видимому, обеспечивает связь между PSI-H и PSI-L (Jansson, 1996). PSI-F является белком, экспонированным в люмен, и сайтом связывания пластоцианина (Bengis and Nelson, 1977, Farah et al., 1995). Растения *Arabidopsis thaliana* без этой субъединицы практически не обладают жизнеспособностью даже при низкой интенсивности света (Haldrup et al., 2000). PSI-N также экспонирована в люмен, масса субъединицы примерно 10кДа. Диссоциация этой субъединицы от ФС1 в растениях шпината не оказывала значительного влияния на транспорт электронов (He and Malkin, 1992). Однако на трансгенных растениях арабидопсиса без этой субъединицы было показано снижение скорости восстановления П700⁺ пластоцианином (Haldrup et al., 1999). PSI-J – небольшой белок, масса 4-5 кДа. Видимо, основной функцией этого белка является стабилизация структуры PSI-F. PSI-G и PSI-K интегральные субъединицы 9 и 11 кДа, соответственно. По некоторым косвенным экспериментам были сделаны выводы о связи этих субъединиц со светособирающим комплексом ФС1, например, при обработке, приводящей к разделению ФС1 и Lhca антенны происходило также удаление PSI-K (Ikeuchi et al., 1990). Кроме того, в мутантных растениях ячменя *viridis zb63*, которые практически полностью лишены ФС1, но

сохраняют светособирающую антенну ФС1, эти субъединицы также сохранялись (Knoetzel et al., 1998). Позже в работе (Jensen et al., 2000) связь между светособирающей антенной ФС1 и PSI-K была показана напрямую.

Как и в ФС2, в ФС1 поглощение фотона приводит к разделению зарядов, т.е. к образованию $P700^+$, который затем восстанавливается за счет пластоцианина. Далее $P700^+$ передает электрон на A_0 – мономер хлорофилла *a*, который, в свою очередь, передает его на прочно связанный филлохинон. От филлохинона электрон передается на [4Fe-4S] железосерный центр Fx. Fx передает электрон на терминальные акцепторы Fa и Fb, которые восстанавливают ферредоксин, белок с молекулярной массой 11 кДа, в состав которого входит 2Fe-2S железосерный центр. В результате восстановления НАДФ с участием ферредоксина под действием ферредоксин:НАДФ оксидоредуктазы образуется НАДФН – конечный продукт линейного транспорта электронов.

Кроме линейного транспорта электронов, ФС1 вовлечена в циклический и псевдоциклический электронный транспорт. При циклическом транспорте электронов происходит увеличение образования АТФ без образования НАДФН. С момента открытия циклического электронного транспорта (ЦЭТ) до настоящего момента накоплено большое количество информации о механизме и роли циклического транспорта (для обзора см. Kramer and Evans, 2011). Основная принятая модель ЦЭТ заключается в переносе электронов от ФС1 к окисленному пластохинону, что в результате приводит к образованию пластогидрохинона с поглощением двух протонов из стромы хлоропласта. Затем пластогидрохинон окисляется с помощью цитохромного b6/f комплекса, при этом два протона выделяются в люмен. Несмотря на большое внимание к ЦЭТ, до сих пор остается не выясненным каким именно образом передается электрон от ФС1 к пластохинону. Предполагают, что это может происходить прямо через ферредоксин и другие небольшие белки, такие как PGR5 (Munekage et al., 2002) и PGRL1 (Hertle et al., 2013) или через НАДФН дегидрогеназу (Livingston et al., 2010, Strand et al., 2016). В нормальных условиях ЦЭТ составляет примерно 10% от линейного транспорта электронов (Baker and Ort, 1992, Avenson et al., 2005). Однако в некоторых условиях, например, в начальные этапы фотосинтеза (Joliot and Joliot, 2006) или в отсутствие CO_2 (Harbinson and Foyer, 1991) скорость ЦЭТ значительно возрастает.

ФС1 также вовлечена в транспорт электронов на кислород, и как следствие, в образование активных форм кислорода (см. далее); данный процесс впервые был показан в работе Мелера (Mehler, 1951) как образование пероксида водорода тилакоидами на свету. Реакция Мелера в различных видах и при различных условиях может составлять от

5 до 50 % от общего транспорта электронов (Mubarakshina et al., 2010; Kozuleva and Ivanov, 2016).

1.2.7. АТФ-синтаза

Фермент АТФ-синтаза имеет универсальную важность как основной источник АТФ во всех типах организмов. В хлоропластах в результате функционирования линейного, циклического транспорта электронов и Q-цикла происходит перенос протонов из стромы в люмен и формирование протонного градиента, который используется для синтеза молекул АТФ из АДФ и фосфата. АТФ-синтазы бактерий, митохондрий и хлоропластов относятся к F_0F_1 типу и состоят из периферической F_1 и мембранной F_0 частей. Получен ряд кристаллических структур АТФ-синтазы разных организмов (Hausrath et al., 1999, Gibbons et al., 2000, Menz et al., 2001, Kabaleeswaran et al., 2006, Bowler et al., 2007); кристаллических структур для АТФ-синтазы хлоропластов высших растений получено значительно меньше (Groth and Pohl, 2001). F_0 состоит из субъединицы a , двух субъединиц b и 10-15 субъединиц c , количество субъединиц c зависит от вида организма (для хлоропластов растений 14) (Varco-Merth et al., 2008). F_1 состоит из чередующихся друг с другом 3α и 3β субъединиц, расположенных вокруг спирали γ -субъединицы, а также по одной δ , ϵ -субъединице. Преобразование энергии в процессе синтеза АТФ происходит в два этапа. Первый этап заключается в преобразовании трансмембранной разности потенциалов в механическую энергию вращения «ротора», состоящего из c -субъединиц и соединенных с ними γ - и ϵ -субъединиц, вращающихся вокруг неподвижного «статора», состоящего из $3\alpha 3\beta \delta a 2b$ (более детально Weber and Senior, 2003, Мальян, 2014). На втором этапе происходит превращение механической энергии вращения в химическую энергию макроэргических связей в АТФ. Синтез АТФ из АДФ и фосфата происходит за счет конформационных изменений в каталитических центрах, которые, в основном, сформированы спиралями β -субъединиц (Abrahams et al., 1994).

1.3. АДАПТАЦИЯ РАСТЕНИЙ К ИЗМЕНЕНИЯМ УСЛОВИЙ ОСВЕЩЕНИЯ

Растения часто сталкиваются с изменениями в качестве и количестве падающего света: изменение освещения в течении дня, облачность, затенённость другими растениями и т.д. Все это привело к формированию в фотосинтетическом аппарате растений большого количества адаптационных механизмов.

При перевозбуждении электрон-транспортной цепи (например, при увеличении интенсивности света) растения не способны использовать всю получаемую энергию в фотохимических реакциях, что приводит к возрастанию продукции АФК. В таких условиях растения способны к активации нефотохимического тушения (НФТ) (Puthiyaveetil et al., 2012) избыточной энергии возбуждения. НФТ представлено несколькими процессами: механизм энергозависимого тушения qE (Ruban et al., 2012), процесс state transitions qT и фотоингибирование, которое заключается в разрушении D1 белка ФС2. Механизмы qE регулируются с помощью изменения рН люмена. В развитие qE вносят вклад протонирование PsbS белка и виолаксантиновый цикл. Зависимость PsbS от рН связана с наличием в его структуре кислотных остатков с люминальной стороны (Li et al., 2004). Протонирование PsbS белка влечет за собой конформационные изменения в белке Lhcb4 (Ahn et al., 2008, Betterle et al., 2009), взаимодействующим с PsbS белком. Конформационные изменения белка Lhcb4 приводят к реорганизации светособирающего комплекса ФС2. Вилоксантиновый цикл запускается при протонировании виолаксантиндеэпоксидазы, которая ускоряет синтез зеаксантина (Morosinotto et al., 2002, Nilkens et al., 2010), накопление которого приводит к увеличению диссипации избыточной энергии в тепло (Ruban et al., 2012). Превращение виолаксантина в зеаксантин - быстрый процесс, в то время как релаксация этого компонента НФТ является длительным процессом и занимает 1-3 часа.

При длительном воздействии света высокой интенсивности происходит запуск долговременной адаптации растений. Важную роль в адаптационных процессах играет фотосинтетическая антенная система, которая участвует и в светосборе, и в защите фотосинтетического аппарата. Регулирование абсорбции световой энергии может происходить в короткие времена: процесс state transitions, который заключается в перераспределении части антенной системы ФС2 между двумя фотосистемами, и в более длительные времена: долговременная адаптация за счет транскрипционной и трансляционной регуляции экспрессии генов *lhcb*.

1.3.1. State transitions

Процесс «state transitions» представляет собой краткосрочную адаптацию фотосинтетических организмов к изменениям в спектральном составе света и заключается в миграции светособирающего пигмент-белкового комплекса фотосистемы 2, ЛНСII, между ФС2 и ФС1 под действием света. State transitions – процесс, поистине, уникальный, поскольку характеризует пространственное перемещение пигмент-белковых комплексов.

Избыток света, который превышает возможности электронного транспорта, может приводить к фотоингибированию, т.е. повреждению фотосинтетических компонентов под действием света. Протекание state transitions позволяет перераспределить энергию возбуждения между фотосистемами, что необходимо для оптимизации процесса фотосинтеза в новых условиях.

В высших растениях лишь небольшая часть внешнего пула ЛНСII (15-20% от общей антенны) участвует в state transitions (Delosme et al., 1996), тогда как в водорослях практически вся светособирающая антенна мигрирует от ФС2 к ФС1 и обратно.

На рисунке 9 представлена классическая схема протекания state transitions: при освещении ближним красным светом, возбуждающим преимущественно реакционные центры (РЦ) ФС2, или в других условиях, приводящих к предпочтительному возбуждению РЦ ФС2 по сравнению с РЦ ФС1, уровень восстановления ПХ-пула значительно увеличивается.

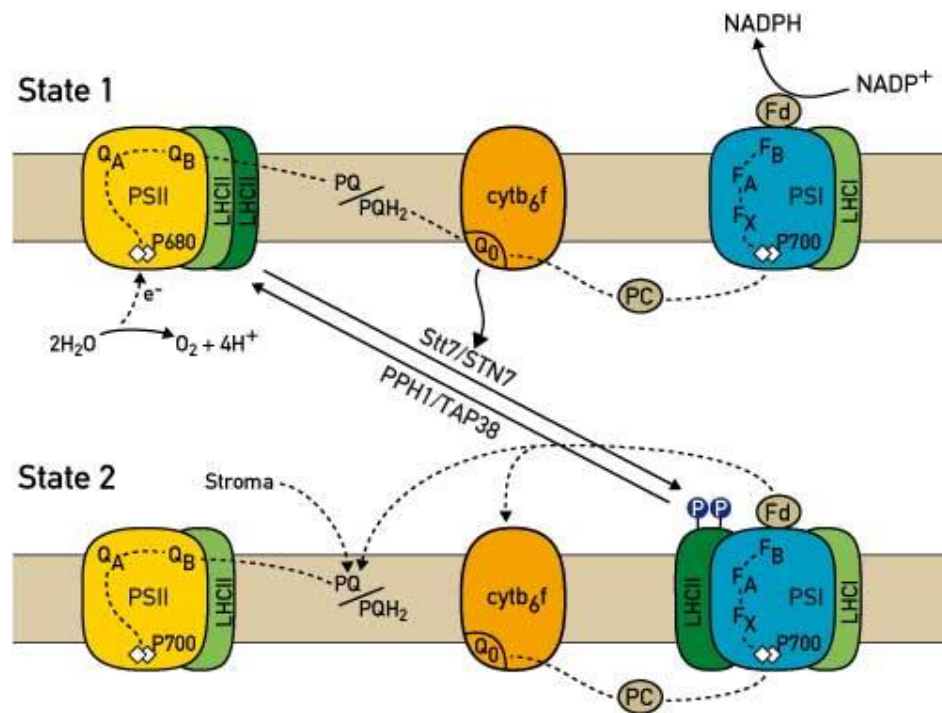


Рисунок 9. Схема протекания перехода state 1 – state 2, обусловленного активацией фермента STN7 киназы, и перехода state 2 – state 1, обусловленного активацией фермента PPH1/TAP38 фосфатазы.

Перевосстановленное состояние ПХ-пула приводит к активации STN7 киназы (Bellafiore et al., 2005), которая приводит к фосфорилированию белков ЛНСII (Bennett, 1979). Предполагают, что активация киназы происходит при связывании ПХН₂ в р-сайте цитохромного b₆/f комплекса (Vener et al., 1997, Zito et al., 1999). После

фосфорилирования белков, ЛНСII диссоциирует от ФС2 и связывается с ФС1, такое состояние называется state 2, состояние 2 (Рис. 9). При миграции ЛНСII к ФС1 происходит перераспределение энергии возбуждения, что приводит к окислению ПХ-пула.

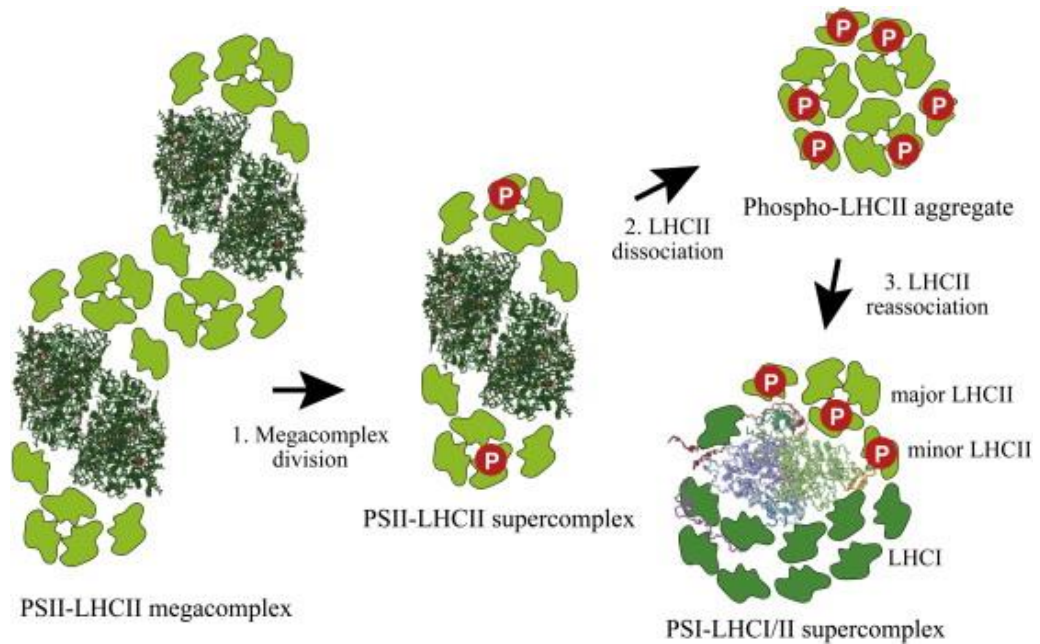


Рисунок 10. Формирование состояния 2, обусловленное фосфорилированием белков ЛНСII и их миграцией от ФС2 к ФС1 (Minagawa, 2013).

Процесс миграции антенны является обратимым: окисленное состояние ПХ-пула и предпочтительное возбуждение ФС1, например, при освещении дальним красным светом, возбуждающим преимущественно РЦ ФС1, приводят к активации фермента фосфатазы РРН1/ТАР38 (Pribil et al., 2010, Shapiguzov et al., 2010) и дефосфорилированию белков ЛНСII. Вероятно, киназа при этом переходит в неактивное состояние; дефосфорилирование белков ЛНСII приводит к миграции ЛНСII обратно к ФС2. Это состояние называется состояние 1 (state1). Эта классическая модель является упрощенной. Ранее было показано, что стромальные ламеллы, обогащенные ФС1, содержат больше фосфорилированных ЛНСII по сравнению с гранальной фракцией, которая обогащена ФС2 (Kyle et al., 1983, Bassi et al., 1988). Однако в более поздних работах было показано, что фосфорилированные белки ЛНСII тримеров встречаются во всей тилакоидной мембране, т.е. и в гранах, обогащенных ФС2, и в ламеллах, обогащенных ФС1 (Tikkanen et al., 2008, Grieco et al., 2012, Leoni et al., 2013). Таким образом, классическая теория не может полностью объяснить физиологическую роль обратимого фосфорилирования ЛНСII. Более того, классическая теория основана на распределении ФС1-ЛНСII и ФС2-ЛНСII в различных областях тилакоида, однако, видимо, ФС2 и ФС1 энергетически связаны через общую светособирающую антенну, состоящую из ЛНСII тримеров (Grieco

et al., 2015) и существует эффективный перенос энергии возбуждения между двумя фотосистемами (Yokono et al., 2015).

В работе Wientjes et al., 2013a было показано, что ЛНСII-тримеры связаны с обеими фотосистемами в большинстве световых условий и только освещение дальним красным светом или обработка светом высокой интенсивности приводит к миграции ЛНСII от ФС1 к ФС2, что противоречит общему предположению о том, что ЛНСII связан с ФС1 только при кратковременной адаптации.

До сих пор до конца нерешенным остается вопрос о том, какие именно белки участвуют в state transitions. С помощью использования мутантных растений с уменьшенным содержанием белков Lhcb1 *amiLhcb1* и Lhcb2 *amiLhcb2* было показано комплементарное, но отличное участие этих белков в state transitions (Pietrzykowska et al., 2014). Lhcb1 белок важен для расстыковки гран при фосфорилировании белков ЛНСII-тримера, в то время как Lhcb2 белок необходим для стекинга ЛНСII-тримера с ФС1 (Pietrzykowska et al., 2014). В ряде моделей даже предполагалось участие М и S тримеров в процессе state transitions (Dietzel et al., 2011, Minagawa, 2011) в дополнение к L-тримеру. С одной стороны, Lhcb3, который является компонентом М-тримера, не обнаруживается в стромальных ламеллах в состоянии 2 (state 2) (Bassi et al., 1988) и в составе комплекса ФС1-ЛНСII (Galka et al., 2012). С другой стороны при state1 – state2 переходе в некоторых работах (Kouril et al., 2005) наблюдалось уменьшение фракции C2S2M2 и увеличение фракции C2S2M1, это наблюдение предполагает миграцию М-тримера от ФС2. Кроме того, в мутантах с заблокированным синтезом Lhcb3 не наблюдалось прямого влияния на протекание процесса state transitions, однако скорость процесса несколько увеличивалась (Damkjaer et al., 2009), что может быть связано с увеличенным содержанием Lhcb1 белка в этих мутантах и, таким образом, с большим количеством субстрата для STN7 киназы.

В отличие от классической модели, в более поздних работах было показано, что фосфорилирование не ограничено L-тримером, но имеет место и для других тримеров, которые, однако, остаются в составе суперкомплекса ФС2, показывая, что фосфорилирование недостаточно для диссоциации ЛНСII от ФС2 (Wientjes et al., 2013b, Tikkanen et al., 2010, Mekala et al., 2014) и нет прямой корреляции между степенью фосфорилирования светособирающих белков и протеканием state transitions. Таким образом, до сих пор остается до конца невыясненным механизм протекания и регуляции state transitions (глава 3.5).

1.3.2. Долговременная адаптация к изменениям в условиях освещения

При долговременной адаптации высших растений к условиям высокой интенсивности света происходит уменьшение размера антенны ФС2 (Ballottari et al., 2007, Wientjes et al., 2013в), что приводит к уменьшению абсорбции световой энергии и предотвращению перевосстановления ЭТЦ. При долговременном увеличении интенсивности света уровень Lhcb1, Lhcb2 белков регулируется сильнее, чем уровень белка Lhcb3. В минорной антенне также, по-видимому, количество Lhcb6 уменьшается, в то время как количество белков Lhcb4 и Lhcb5 не изменяется (Ballottari et al., 2007, Wientjes et al., 2013в). В то время как отношение ЛНСII/ФС2-кор меняется, отношение ЛНСI/ФС1-кор остается неизменным. В работе с растениями дикого типа было оценено, что при выращивании растений при освещении светом интенсивностью 20 мкмоль квантов/ м²с отношение ЛНСII тримеров на один димер реакционного центра фотосистемы 2 в среднем составляет 7.4; при освещении светом интенсивностью 100 мкмоль квантов/ м²с – 4.8; при освещении светом интенсивностью 800 – 1100 мкмоль квантов/ м²с – 3.8 (Kouřil et al., 2013).

Регулирование размера антенны ФС2 при долговременной адаптации требует регулирования биосинтеза светособирающих белков ФС2. В работе с мутантными растениями ячменя, лишенными ФС1, было показано, что уменьшение размера антенны ФС2, осуществляемое путем подавления биосинтеза белков Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6, происходило в этих растениях на этапе трансляции, в то время как изменений в транскрипции генов обнаружено не было (Frigerio et al., 2007). Однако остается не выясненным на каком этапе биосинтеза белков происходит регуляция размера антенны ФС2 у растений дикого типа (глава 3.3).

Для долговременной также, как и для кратковременной регуляции функционирования светособирающих комплексов, т.е. state transitions, центральную роль играет окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула (Escoubas et al., 1995, Chen et al., 2004, Frigerio et al., 2007). При подавлении экспрессии STN7 киназы в растениях *Arabidopsis thaliana* происходит не только подавление state transitions, но и нарушается перестройка фотосинтетического аппарата, необходимая для протекания адаптации растений к долговременной повышенной освещенности (Bonardi et al., 2005; Tikkanen et al., 2006, Pesaresi et al., 2009, Bergner et al., 2015). Таким образом, STN7 киназа, реагируя на окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула, может быть центральным звеном и при кратко- и при долговременной регуляции светосбора на уровне антенны ФС2. Может быть выдвинуто, как минимум, три предположения о том, каким образом STN7 участвует в регуляции долговременной адаптации: 1) фосфорилированное состояние

ЛНСП само по себе является сигналом, 2) конформационные изменения тилакоидной мембраны, связанные с протеканием state transitions, могут инициировать сигнал, 3) может существовать какой-то неизвестный белок-сенсор, который активируется STN7 киназой и является, таким образом, сигналом.

1.4. РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ПУЛА ПЛАСТОХИНОНА ПРИ АДАПТАЦИИ РАСТЕНИЙ К УСЛОВИЯМ ОСВЕЩЕНИЯ

Лимитирующей стадией электронного транспорта от ФС2 к ФС1 (при отсутствии лимитирования интенсивностью света) является стадия окисления восстановленного пластохинона, пластогидрохинона, цитохромным b6/f комплексом. Окислительно-восстановительное состояние пула пластохинона зависит от способности ФС2 донировать электроны и способности ФС1 акцептировать электроны, именно поэтому отношение окисленного пластохинона (ПХ) к восстановленному (ПХН₂) служит хорошим индикатором равновесия между поглощением света и скоростью электронного транспорта. Окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула является основным регуляторным компонентом в коротко- и долговременных ответах на изменения в условиях освещения, таких как state transitions и изменение синтеза ФС1 и ФС2 белков (Allen et al., 1981, Yang et al., 2001, Fey et al., 2005, Pesaresi et al., 2011, Lepetit et al., 2013).

Было показано, что окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула регулирует экспрессию *psaAB* и *psbA*, коровых субъединиц соответственно ФС1 и ФС2, а также экспрессию гена *lhcb1*, кодирующего белок антенны ФС2 (Escoubas et al., 1995, Pfannschmidt et al., 1999, Tullberg et al., 2000, Pfannschmidt et al., 2001, Chen et al., 2004). В работе (Adamiec et al., 2008) было показано, что среди исследованных 24000 генов экспрессия 663 изменялась под действием высокого света. Экспрессия 50 из этих генов изменялась в ответ на изменение окислительно-восстановительного состояния ПХ-пула.

Для изучения участия пула пластохинона в регуляции размера антенны ФС2 у высших растений проводили эксперименты с использованием *viridis zb63* – мутантных растений ячменя (*Hordeum vulgare*), лишенных ФС1, но сохраняющих функционально активную ФС2 (Frigerio et al., 2007). В условиях отсутствия ФС1, пул пластохинона был перевосстановлен даже при низкой интенсивности света. Мутантные растения в таких условиях имели минимальный размер антенны ФС2 и не были способны к дальнейшему уменьшению размера антенны при переходе к высокой интенсивности света. Эти данные подтверждают тот факт, что окислительно-восстановительное состояние пула пластохинона служит ключевым звеном в регуляции размера антенны ФС2.

Однако до сих пор остается невыясненной молекулярная природа сигнала, поступающего из пула пластохинона и инициирующего адаптационные изменения. Ранее было показано, что ПХ-пул вовлечен в образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны (см. далее). Можно предположить, что пероксид водорода, образованный при участии ПХ-пула, передает информацию об окислительно-восстановительном состоянии и является носителем сигнала от пула пластохинона.

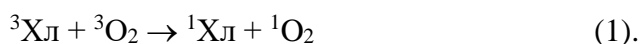
1.5. ОБРАЗОВАНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ХЛОРОПЛАСТАХ ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

В основном состоянии молекула O_2 имеет два неспаренных электрона, локализованных на различных разрыхляющих орбиталях (триплетное состояние). Большинство органических молекул находится в синглетном состоянии, что ограничивает их спонтанную реакцию с молекулами кислорода, и это является благоприятным фактором для жизни организма. Однако ряд форм кислорода обладают большей реакционной способностью: они называются активными формами кислорода (АФК). К АФК относят: супероксидный анион радикал ($O_2^{\cdot-}$) и его протонированную форму, пергидроксильный радикал (HO_2^{\cdot}), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал (HO^{\cdot}), синглетный кислород (1O_2), а также гидропероксид ($ROOH$) и радикалы органических молекул: пероксидный радикал (ROO^{\cdot}) и алкоксильный радикал (RO^{\cdot}).

В хлоропластах высших растений могут образовываться все вышеперечисленные формы активного кислорода, при этом значительная генерация синглетного кислорода возможна только в тилакоидных мембранах, поскольку в них сосредоточены молекулы хлорофилла.

1.5.1. Фотосистема 2

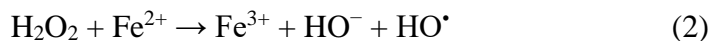
В нормальных физиологических условиях структурно-функциональная организация ФС2 не допускает переноса электронов и энергии от компонентов ФС2 на кислород. Поэтому *in vivo*, а также в изолированных интактных хлоропластах и в неповрежденных тилакоидах, ФС2 не вносит заметный вклад в продукцию АФК на свету (Asada et al., 1994). Синглетный кислород, 1O_2 , в хлоропластах образуется почти исключительно при взаимодействии 3O_2 с молекулой хлорофилла (Хл) в триплетном состоянии (реакция 1):



Перенос энергии от $^3\text{Хл}$ на $^3\text{O}_2$ происходит очень эффективно: константа скорости тушения кислородом триплетного состояния фотосенсибилизаторов в растворах близка к $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, и квантовый выход генерации достигает 80% (обзор: Krasnovsky, 1994). Однако квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ в интактных хлоропластах по оценкам в работе (Krasnovsky, 1994) составляет 0,1%.

Супероксидный радикал образуется в результате переноса электрона на молекулу O_2 . В фрагментах тилакоидных мембран, обогащенных ФС2 и почти не содержащих ФС1 (ФС2-мембранах), генерация $\text{O}_2^{\cdot-}$ в оптимальных для функционирования ФС2 условиях была очень мала или вообще не наблюдалась (Ananyev et al., 1994). Когда функционирование водоокисляющего комплекса нарушено специальными обработками, а донирование электронов к P680^+ происходит от искусственных доноров, скорость образования $\text{O}_2^{\cdot-}$ может достигать 10 – 20 мкмоль $\text{O}_2^{\cdot-}$ /мг Хл в час, что составляет менее 1% от максимально потенциальной скорости электронного транспорта в этих препаратах в присутствии эффективных искусственных акцепторов электронов (Ananyev et al., 1994; Хоробрых с соавт., 2002). Таким образом, наблюдаемые скорости восстановления кислорода в препаратах ФС2, возможно, являются следствием нарушения целостности этих комплексов при их выделении и не отражают участие ФС2 в восстановлении кислорода в хлоропластах в интактных тилакоидных мембранах *in vivo*. В качестве восстановителей O_2 на акцепторной стороне ФС2 обычно рассматривают феофитин (Ananyev et al., 1994) и хиноновые акцепторы – первичный, Q_A (Ананьев и Климов, 1988; Klimov et al., 1993; Cleland and Grace, 1999), и вторичный, Q_B (реже). Также в литературе обсуждается участие цитохрома *b559* в восстановлении кислорода (Pospíšil, 2012).

Перекись водорода в ФС2 возникает, в основном, при спонтанной или катализируемой дисмутации супероксидных радикалов, продуцируемых с участием этой фотосистемы. Образование в ФС2 *гидроксильного радикала* происходит, как и в других частях клетки, главным образом, в результате разложения H_2O_2 в реакции Фентона.



В качестве катализаторов могут выступать содержащиеся в этой фотосистеме металлы переменной валентности, в частности Mn^{2+} , связанный с Mn_4CaO_5 кластером в донорной части ФС2 или железо в ее акцепторной части.

1.5.2. Пул пластохинона

ПХ-пул тилакоидных мембран, помимо того, что является одним из ключевых звеньев электрон-транспортной цепи, служит также генератором $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 .

Супероксидный радикал. Первые данные о возможности светозависимого образования $O_2^{\bullet-}$ в ПХ-пуле были получены в опытах с изолированными тилакоидами при ингибировании окисления ПХН₂ цитохромным комплексом в присутствии динитрофенил-2-йод-4-нитротимола (ДНФ-ИНТ) (Cleland and Grace, 1999; Khorobrykh and Ivanov, 2002). Супероксид-зависимое восстановление цитохрома *c* в присутствии ДНФ-ИНТ показало, что начальным этапом восстановления O_2 в ПХ-пуле является генерация $O_2^{\bullet-}$ (Khorobrykh and Ivanov, 2002), т.е. в ПХ-пуле осуществляется одноэлектронное восстановление молекулы O_2 . Участие ПХН₂ в таком восстановлении маловероятно, поскольку E_{m7} для пары ПХ^{•-}/ПХН₂ (+370 мВ) намного выше, чем E_{m7} для пары $O_2/O_2^{\bullet-}$. Величины окислительно-восстановительных потенциалов компонентов ПХ-пула позволяют предполагать, что восстановление O_2 в этом пуле может происходить только с участием ПХ^{•-}, данное предположение было подтверждено экспериментально (Khorobrykh and Ivanov, 2002).

Пероксид водорода. Дальнейшие исследования участия ПХ-пула в восстановлении кислорода выявили ряд фактов, которые не могли быть объяснены только описанным выше восстановлением молекул O_2 молекулами ПХ^{•-}. В тилакоидах при функционировании полной ФЭТЦ при высокой интенсивности света участие ПХ-пула в восстановлении кислорода достигает почти 50% при pH 5,0, когда ПХ^{•-} очень слабо восстанавливает O_2 , а при более высоких pH – даже 60 – 70% (Khorobrykh et al., 2004). Оказалось, что общая скорость образования $O_2^{\bullet-}$ в суспензии тилакоидов, рассчитанная из скорости поглощения O_2 , была существенно выше, чем скорость появления $O_2^{\bullet-}$ вне тилакоидных мембран, измеренная при помощи гидрофильных ловушек, в частности цитохрома *c*, и различие увеличивалось с увеличением интенсивности света (Mubarakshina et al., 2006). Для объяснения этих фактов было предположено (обзоры: Иванов, 2008; Mubarakshina and Ivanov, 2010), что супероксидные радикалы, образующиеся как при участии ПХ^{•-}, так и при участии компонентов акцепторной части ФС1, вступают в реакцию с молекулами ПХН₂ в тилакоидной мембране (реакция 3):



В результате реакции (3) должно происходить образование H_2O_2 в тилакоидной мембране. Реакция (3) очень выгодна термодинамически вследствие большой разницы

величин E_m пар $PX^{\cdot-}/PXH_2$ (+370 мВ) и $O_2^{\cdot-}/H_2O_2$ (+940 мВ), что обеспечивает теоретическую константу равновесия 5×10^9 (и даже выше, если в реакции участвует HO_2^{\cdot}). Действительно, в работе с изолированными тилакоидами, при подавлении реакции дисмутации $O_2^{\cdot-}$ вне тилакоидных мембран, а также в люмене, было зарегистрировано образование H_2O_2 , которое можно назвать внутримембранным (Mubarakshina et al., 2006). Однако в данной работе кислород был единственным акцептором электронов от тилакоидов, что создает условия отличные от *in vivo* условий.

Представленные данные не предполагают участия каких-либо ферментов в образовании восстановленных форм кислорода в ПХ-пуле при окислении его компонентов. В литературе, однако, широко обсуждается окисление ПХ-пула с участием, так называемой, пластидной терминальной оксидазы (РТОХ) (Cournac et al., 2000), рассматриваемое как заключительный этап хлородыхания. Фермент имеет родство с цианид-нечувствительной альтернативной оксидазой митохондрий и также содержит в составе активного центра два атома негемового железа. Предполагалось (обзор: McDonald et al., 2011), что РТОХ обеспечивает альтернативный путь оттока электронов из ПХ-пула, как для предотвращения фотоингибирования ФС2, когда такой отток через ФС1 ограничен, так и для создания условий для протекания циклического электронного транспорта вокруг ФС1. Детальные исследования показывают, однако, что в высших растениях возможный перенос электронов от ПХ-пула с участием РТОХ либо вообще не заметен, либо может вносить только минимальный вклад, менее одного процента, в фотосинтетический транспорт (Trouillard et al., 2012). Более вероятно участие РТОХ в окислении ПХ-пула в водорослях (Houille-Vernes et al., 2011). Единственной доказанной функцией РТОХ является ее участие в биосинтезе каротиноидов на начальной стадии развития пластид (Kuntz, 2004). Однако существуют предположения, что РТОХ может участвовать в хлородыхании (Rumeau et al., 2007), в биогенезе хлоропластов (Putarjunan et al., 2013), а также играть существенную роль при стрессовых условиях (McDonald et al., 2011; Sun and Wen, 2011; Krieger-Liszkay and Feilke, 2015).

1.5.3. Фотосистема I

Акцепторную сторону ФС1 обычно рассматривают как главный участок ФЭТЦ, где происходит перенос электронов к кислороду (обзоры: Elstner, 1982; Badger, 1985).

Супероксидный радикал, как показало светозависимое йодирование белков в изолированных тилакоидах, в течение первых секунд освещения образуется почти исключительно в комплексе ФС1, что указывает на участие мембранных переносчиков

электронов в ФС1 в качестве основных восстановителей молекул O_2 (Takahashi and Asada, 1988). Благодаря низким окислительно-восстановительным потенциалам восстанавливать O_2 потенциально способны все переносчики электрона, расположенные в акцепторной части ФС1: A_0 (хлорофилл a), A_1 (филлохинон), F_X , F_A и F_B (железо-серные центры Fe_4S_4 типа). На основании экспериментальных данных на роль восстановителей O_2 в ФС1 были предложены A_1 (Kruk et al., 2003, Козулева с соавт., 2007) и F_X (Takahashi and Asada, 1988). В ряде работ было предположено (обзор: Asada et al., 1974), что в неповрежденных тилакоидах генерация $O_2^{\cdot-}$, по крайней мере, частично происходит внутри тилакоидной мембраны. Предположение было основано, в частности, на стимулирующем влиянии слабых кислот на образование H_2O_2 , что трактовалось как поставка этими кислотами протонов в мембрану для осуществления дисмутации $O_2^{\cdot-}$ в ее апротонном матриксе (Takahashi and Asada, 1988). В этой же работе восстановление цитохрома c после короткой (10 мкс) вспышки света наблюдалось в секундном диапазоне, что было интерпретировано как отражение диффузии $O_2^{\cdot-}$ в среду от места его образования внутри мембраны. В работе (Шувалов и Красновский, 1975), регистрируя фотохемилюминесценцию люминола после вспышки света, также наблюдали появление $O_2^{\cdot-}$ в среде с секундной временной задержкой. Генерация $O_2^{\cdot-}$ внутри тилакоидной мембраны на свету была доказана в работе (Kozuleva et al., 2011). В работе (Kozuleva et al., 2014) было показано участие A_1 в восстановлении кислорода.

Пероксид водорода, появляющийся в хлоропластах на свету, в значительной степени образуется из супероксидных радикалов, генерируемых в ФС1. Дисмутация $O_2^{\cdot-}$, возникших с участием ФС1 в гидрофобной зоне тилакоидной мембраны, затруднена вследствие их сильного электростатического взаимоотталкивания в среде с низкой диэлектрической постоянной. Однако они могут превратиться в H_2O_2 в мембране, вступив в реакцию с молекулами ПХН₂ (см. реакцию 3). Супероксидные радикалы, избежавшие этой реакции и вышедшие из мембраны, дисмутируют *in vivo*, в основном, при участии СОД, расположенной вблизи поверхности тилакоидной мембраны.

Гидроксильный радикал, по-видимому, не образуется непосредственно в результате реакций, протекающих в комплексе ФС1. Однако, поскольку молекулы H_2O_2 могут накапливаться вблизи этой фотосистемы, то при наличии рядом атомов негемового железа, ее функционирование может стимулировать образование HO^{\cdot} . Было найдено, что железо-серные центры ФС1, связанные с тилакоидной мембраной, действительно увеличивают образование HO^{\cdot} (Snyrychova et al., 2006).

1.5.4. Строма хлоропластов

Часто предполагается, что не связанный с мембраной компонент ФЭТЦ ферредоксин (Фд) играет основную роль в процессе образования супероксидного радикала. Было показано, что восстановленный дитионитом или фотохимически Фд окисляется кислородом с образованием $O_2^{\cdot-}$ (Misra and Fridovich, 1971). В ряде работ было показано, что добавка Фд в суспензию тилакоидов заметно увеличивала скорость поглощения O_2 , измеряющуюся как с помощью кислородного электрода (Иванов с соавт., 1980), так и масс-спектрометрически (Furbank and Badger, 1983). Это указывало на потенциальное участие Фд в восстановлении кислорода в хлоропластах. Вопрос о роли Фд в восстановлении O_2 был решен в опытах с изолированными тилакоидами путем количественного сопоставления скорости восстановления O_2 на свету и скорости окисления кислородом восстановленного Фд (Kozuleva and Ivanov, 2010). Оказалось, что и в отсутствие, и в присутствии НАДФ⁺ электроны, восстанавливающие кислород, поступают как от Фд^{восст.}, так и от мембранных переносчиков ФЭТЦ; следовательно, измеряемая скорость восстановления O_2 – сумма этих двух процессов, соотношение скоростей которых зависит от концентрации Фд, интенсивности освещения и присутствия НАДФ⁺. В отсутствие НАДФ⁺ доля восстановления O_2 с участием Фд в зависимости от концентрации Фд составляла от 30 до 70%. В присутствии НАДФ⁺ именно мембранные компоненты ФЭТЦ играли основную роль в восстановлении O_2 (Kozuleva and Ivanov, 2016). С увеличением интенсивности света возрастание потока электронов к кислороду происходило, прежде всего, за счет увеличения восстановления O_2 мембранными компонентами (Kozuleva and Ivanov, 2010).

Основываясь на том, что светозависимое восстановление O_2 в интактных хлоропластах выше, чем в изолированных тилакоидах в отсутствие каких-либо добавок, и величина $K_m(O_2)$ в первом случае выше, было высказано предположение (Asada, 2000), что какой-то компонент стромы, но не Фд, участвует *in vivo* в переносе электронов к O_2 .

В литературе неоднократно ставился вопрос об участии в этом процессе конечного переносчика ФЭТЦ, ферредоксин-НАДФ-оксидоредуктазы (ФНР) (Goetze and Carpentier, 1994). На роль восстановителя O_2 в хлоропластах был предложен (Asada, 1999) еще другой флавиновый фермент – монодегидроаскорбатредуктаза (МДГАР), основная функция которой заключается в восстановлении монодегидроаскорбата. Глутатионредуктаза так же, как ФНР и МДГАР, увеличивала скорость образования $O_2^{\cdot-}$ при добавке в суспензию тилакоидов (Miyake et al., 1998). Предполагалось также, что

нитритредуктаза, использующая $\text{Fd}^{\text{восст}}$ в качестве донора электронов для синтеза NH_4^+ из NO_2^- , в отсутствие субстрата может восстанавливать O_2 (Robinson, 1988).

Пероксид водорода образуется в строме, в основном, при дисмутации $\text{O}_2^{\cdot-}$, которая протекает почти исключительно с участием СОД, содержание которой достаточно велико. Реакция восстановления O_2 также приводит к образованию H_2O_2 в строме. В качестве восстановителей могут выступать, прежде всего, такие низкомолекулярные соединениями как аскорбат (Munné-Bosch and Alegre, 2002) и глутатион (Dalton et al., 1986), а также ряд веществ, в частности сахара (Morelli et al., 2003, Bolouri-Moghaddam et al., 2010) и флавоноиды, которые обычно не рассматриваются как восстанавливающие агенты.

Гидроксильный радикал может образоваться в строме из H_2O_2 в присутствии металлов переменной валентности (см. раздел 2). Реакция Фентона, весьма вероятна в строме хлоропластов, где имеется железо, использующееся для включения в состав многих хлоропластных белков на завершающих стадиях их биосинтеза. Железо, входящее в состав белков, прежде всего, негемовое железо, также может катализировать реакцию Фентона. Такое действие, как показано в ряде работ (Hosein and Palmer, 1983; Bowyer and Camilleri, 1985; Snyrychova et al., 2006), проявляет и $\text{Fd}^{\text{восст}}$.

1.6. СИГНАЛЬНАЯ РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

Повышение продукции АФК в хлоропластах может происходить при различных изменениях в условиях окружающей среды таких, как свет, температура, засуха или при атаке патогенами (Ivanov et al., 2012). Все АФК способны к окислительному повреждению белков, ДНК и липидов, запуская программируемую клеточную смерть (для обзора Foyer and Noctor, 2009). Показано, что АФК также функционируют как сигнальные молекулы, участвуя в регуляции развития растения и в адаптационных процессах (Ivanov et al., 2012).

Время полужизни синглетного кислорода около $2 \cdot 10^{-7}$ с в клетках (Gorman and Rodgers, 1992), по оценкам (Sies and Menck, 1992) расстояние, на которое он способен диффундировать в условиях близких к физиологическим составляет 10^{-8} м. Таким образом, синглетный кислород способен реагировать только с липидами, нуклеиновыми кислотами и белками, которые находятся в непосредственной близости от места его генерации (Martinez et al., 2003, Davies, 2004, Girotti and Kriska, 2004).

Супероксидный анион радикал также имеет короткое время полужизни около $2 \cdot 10^{-6}$ – $4 \cdot 10^{-6}$ с (Gechev et al., 2006).

Гидроксильный радикал является наиболее реакционноспособной АФК, может реагировать и повреждать липиды и аминокислоты, входящие в состав мембран. Клетка

не способна к детоксикации гидроксильного радикала с помощью ферментативных антиоксидантов.

Наиболее стабильной из АФК является пероксид водорода (время полужизни $1 \cdot 10^{-3}$ с (Henzler and Steudle, 2000, Gechev and Hille, 2005)). Пероксид водорода способен мигрировать от места его образования к другим компартментам и даже в соседние клетки (Henzler and Steudle, 2000). Поэтому именно пероксид водорода может рассматриваться в качестве основной сигнальной молекулы (Baier and Dietz, 2005; Vanderauwera et al., 2005; Slesak et al., 2007; Desikan et al., 2001).

Различные АФК, по-видимому, запускают различные сигнальные пути, поэтому в ответ на различные стрессовые факторы растения продуцируют различные АФК. Например, в ответ на повреждение патогенами продуцируется пероксид водорода и супероксидный анион радикал (Overmyer et al., 2003), в то время как при абиотическом стрессе, например, при увеличении интенсивности света, засухе или низкой температуре генерируются не только эти АФК, но и синглетный кислород также генерируется в хлоропластах (Hideg et al., 1998, Fryer et al., 2002, Hideg et al., 2002).

Участие пероксида водорода в адаптации растений к факторам окружающей среды широко обсуждается в литературе (Prasad et al., 1994, Dat et al., 1998, Lopez-Delgado et al., 1998, Karpinski et al., 1999). В частности, было показано, что модуляция уровня пероксида водорода в растениях приводит к активации ряда ядерных генов (Lopez-Delgado et al., 1998, Gadjev et al., 2006). Один из основных путей участия пероксида водорода в передаче ретроградного сигнала от хлоропласта к ядру заключается в иницировании митоген-активированных протеинкиназ (МАПК), которые являются начальным звеном сигнального каскада, расположенного в цитоплазме. Найдено, что часть молекул H_2O_2 , образованных в хлоропластах на свету, диффундирует через аквапорины в мембране хлоропласта в цитоплазму (Mubarakshina et al., 2010; Borisova- Mubarakshina et al., 2012). Количество молекул H_2O_2 , выходящих из хлоропластов, увеличивается с увеличением интенсивности света (Mubarakshina et al., 2010). Эти эксперименты позволили объяснить способность хлоропластной H_2O_2 иницировать киназный сигнальный путь в цитоплазме (обзор: Полесская, 2007). Результатом функционирования системы МАПК является изменение экспрессии генов в результате действия на факторы транскрипции в ядре и, как следствие, возникновение адаптационного ответа на стрессовые условия.

Изменения в клетке в ответ на стрессовые условия могут происходить не только на этапе транскрипции генов (Dietz, 2014), но и на этапе трансляции при синтезе белковой молекулы. Было показано, что молекулы H_2O_2 способны окислять фактор элонгации трансляции, блокируя, таким образом, образование новых белков (Oba et al., 2011).

В физиологических условиях пероксид водорода выполняет сигнальную функцию за счет окисления сульфгидрильных групп белков, поскольку именно цистеиновые остатки ферментов, в том числе киназ, являются основной мишенью пероксида водорода в биологических системах (Calvo et al., 2013; Kim et al., 2000; Chen et al., 2001). Показан целый ряд ферментов, участвующих в адаптации растений, регуляция активности которых происходит непосредственно за счет окисления-восстановления сульфгидрильных групп (Guyton et al., 1996).

1.7. STN7 КИНАЗА

Использование мутантных водорослей *C. reinhardtii* дефицитных по state transitions позволило выявить Stt7 киназу, которая ответственна за фосфорилирование LHCP. В арабидопсисе два гомолога Stt7 существует – STN7 и STN8 киназы. Анализ одиночных и двойных мутантов по этим киназам показал, что фосфорилирование белков LHCP осуществляется только STN7 киназой (Bonardi et al., 2005). В STN8 мутанте не отсутствовал state transitions, но наблюдалось значительное уменьшение светоиндуцированного фосфорилирования коровых белков ФС2, хотя уровень фосфорилирования этих белков все же оставалась на детектируемом уровне (Tikkanen et al., 2010, Tikkanen et al., 2008). Это остаточное фосфорилирование коровых белков было связано с активностью STN7 киназы и полное отсутствие фосфорилированных белков в тилакоидах наблюдалось в случае двойных мутантов *stn7stn8* (Bellafiore et al., 2005, Bonardi et al., 2005).

Киназа STN7, осуществляющая фосфорилирование белков LHCP, представляет собой трансмембранный белок (Derege et al., 2003). N-терминальный конец STN7 киназы экспонирован в люмен тилакоидов и содержит 2 цистеиновых остатка, которые ответственны за активность данного фермента (Lemeille et al., 2009). В темноте цистеиновые остатки восстановлены (-HS SH-), и киназа является неактивной. Под действием света происходит окисление фермента (-S-S-), в результате чего киназа переходит в активное состояние (Lemeille et al., 2009). Однако в работе (Wunder et al., 2007) было показано, что STN7 активируется не через активацию люменальных, а через активацию стромальных цистеиновых остатков. Наряду с этим, предполагается, что есть и другой механизм активации STN7: активация каталитического домена путем взаимодействия фермента с цитохромным b6/f комплексом на свету. Возможно, оба механизма необходимы для активации киназы STN7. Инактивация фермента происходит

через восстановление дисульфидного мостика на высоком свете (Rintamaki et al., 2000, Puthiyaveetil, 2011).

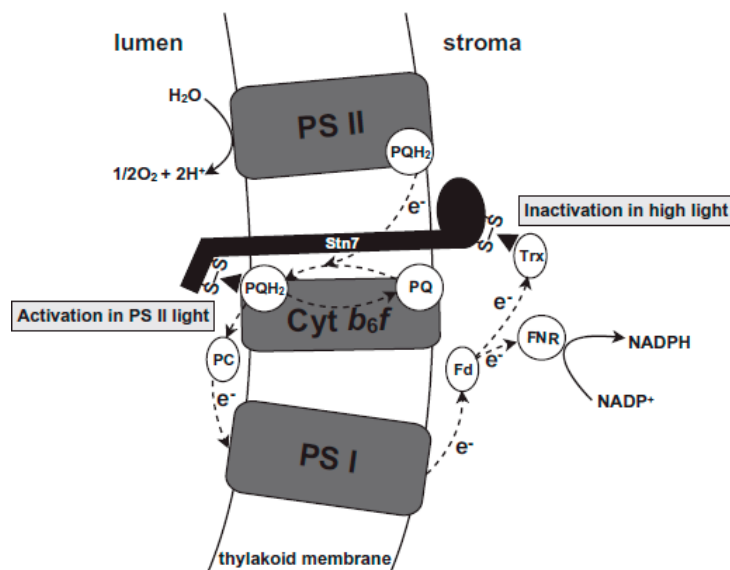


Рисунок 11. Регуляция активности STN7 киназы. Взято из Puthiyaveetil 2011. В работе предполагается, что активация происходит за счет люменальных, а инактивация за счет стромальных цистеиновых остатков.

Несмотря на большое количество данных в литературе, механизм активации STN7 киназы до сих пор остается дискутируемым. Было показано, что state transitions не запускается при отсутствии функционального цитохромного b6/f комплекса в *C. reinhardtii* (Lemaire et al., 1986, Wollman and Lemaire 1988), также, как и в высших растениях (Bennett et al., 1988, Gal et al., 1987). Предполагается, что железо-серный белок Рискс, экспонированный в люмен, играет критическую роль в активации каталитического домена STN7 киназы. Было показано, что этот белок способен к конформационным изменениям в зависимости от состояния Qo сайта (ПХН₂-окисляющего сайта) (Breyton, 2000, Finazzi et al., 2001). После связывания ПХН₂ в Qo сайте, происходит сдвиг белка Рискс в направлении к Qo сайту в мембране, что приводит к активации STN7 киназы и фосфорилированию субъединицы V цитохромного b6/f комплекса. Последующие окисление ПХН₂ запускает обратный сдвиг белка Рискс от мембраны, что приводит к высвобождению STN7 киназы из цитохромного b6/f комплекса и связыванию с ЛНСII. Эта модель предполагает физическую связь между STN7 киназой и цитохромным b6/f комплексом, которая была показана в очищенной фракции цитохромного b6/f комплекса высших растений (Gal et al., 1990).

Несмотря на то, что была показана возможность прямой связи ЛНСII и STN7 киназы, остается неизвестным каким образом STN7 киназа фосфорилирует белки ЛНСII: прямо или через активацию неизвестных сигнальных каскадов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Растительный материал

В работе были использованы:

Растения гороха посевного (*Pisum sativum*), выращенные в оранжерее, интенсивность света выращивания – 100 мкмоль квантов/м²с.

Растения ячменя обыкновенного (*Hordeum vulgare*), выращенные в климатической камере при t=20°C, при различной интенсивности света, светопериоде 8/16 часов (день/ночь) или при постоянном освещении (см. Результаты и обсуждение).

Растения арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*) экотип Columbia и мутантные растения арабидопсиса с заблокированным синтезом STN7 киназы. Мутантные растения были получены из лаборатории Dagio Leister. Растения в фазе четырех настоящих листьев пикировали в горшки объемом 150 мл. Для экспериментов использовали листья 2-2,5 месячных растений, выращенных в климатической камере при t=19°C при различной интенсивности света, светопериоде 8/16 часов или 16/8 часов.

2. Выделение тилакоидов из листьев гороха

Тилакоиды выделяли из двух верхних ярусов 10-14 дневных проростков гороха. Листья гомогенизировали с помощью гомогенизатора в течение 10-15 с в 100 мл среды выделения. Состав среды выделения: 0,4 М сахароза, 25 мМ Hepes-КОН (pH 7.6), 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂. Непосредственно перед выделением в среду добавляли 5мМ аскорбат натрия и 0.1 % бычий сывороточный альбумин. Гомогенат фильтровали через 4 слоя нейлоновой ткани и центрифугировали 1 мин 6000 об/мин на центрифуге К-23 при 0°C. Осадок суспендировали в 30 мл среды шокирования и выдерживали 1,5 минуты для разрушения оболочек хлоропластов. Состав среды шокирования: 25 мМ Hepes-КОН (pH 7.6), 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂. Затем добавляли в эквивалентном количестве среду, содержащую 0,2 М сахарозу, 25 мМ Hepes-КОН (pH 7.6), 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и центрифугировали 3.5 минуты при 3500 об/мин. Осадок дважды промывали в 30 мл среды, содержащей 0,4 М сахарозу, 25 мМ Hepes-КОН (pH 7.6), 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и каждый раз центрифугировали 3 минуты при 3000 об/мин. Осадок суспендировали в 1-2 мл последней среды. Тилакоиды хранили во льду и в темноте.

3. Выделение тилакоидов из листьев ячменя

Выделение тилакоидов проводили, как описано в Bassi et al., 1985. Листья гомогенизировали в среде T1, содержащей 0,1М Трицин/КОН pH 7.8, 0.4 сорбитол, 0.5% сухое молоко, 0.2 мМ бензамидин, 1мМ аминокaproновую кислоту, 0.2 мМ PMSF. Гомогенат фильтровали через четыре слоя нейлоновой ткани и затем центрифугировали 1500*g 15 минут при 4°C. Супернатант отбрасывали, осадок, содержащий хлоропласты, суспендировали в среде T2. Состав среды T2: 25 мМ Hepes/КОН pH 7.5, 10 мМ ЭДТА. В среде T2 происходило разрушение мембран хлоропластов. Полученную смесь, содержащую тилакоиды, центрифугировали 10000*g 10 минут. Осадки ресуспендировали в T3 среде, содержащей 50% глицерин, 10 мМ Hepes/КОН pH 7.5, 1 мМ ЭДТА. В среде T3 тилакоиды хранили при температуре -80°C до проведения анализа.

4. Выделение тилакоидов из листьев арабидопсиса

Выделение тилакоидов из листьев арабидопсиса проводили, как описано ранее (Ignatova et al., 2011). Листья арабидопсиса предварительно помещали в холодильник на 2 часа для разложения крахмала, большое количество которого ухудшает качество препаратов. Непосредственно перед экспериментом листья взвешивали для расчёта оптимального количества среды для гомогенизации (из расчета 1 часть листовой массы к 5 частям среды).

Все среды для выделения тилакоидов готовили на двукратном солевом концентрате:

Конечная концентрация	соль	Навеска на 1 л, г
35 мМ	K ₂ HPO ₄	16
15 мМ	NaH ₂ PO ₄	4,6
5 мМ	MgSO ₄	3.695
10 мМ	KCl	1,5

Листья гомогенизировали в среде выделения: 0.4 М сахараза, 20 мМ аскорбат натрия, 2мМ ЭДТА. Полученный гомогенат фильтровали через 4 слоя нейлоновой ткани. Далее осаждали хлоропласты 3400*g 6 минут. Осадок суспендировали в среде шокирования и инкубировали 20 минут при температуре 0°C. Среда шокирования представляет собой разбавленную в 10 раз среду выделения. Далее проводили низкоскоростное центрифугирование 120*g 1.5 минуты, полученный осадок отбрасывали. Из супернатанта осаждали тилакоиды 3400*g 6 минут, полученные осадки суспендировали в среде

суспендирования и снова осаждали тилакоиды при том же режиме, эту процедуру повторяли дважды. Состав среды суспендирования: 0.4 М сахараза, 2 мМ аскорбат натрия, 0,5 мМ ЭДТА. После последней отмывки тилакоиды суспендировали в 1 мл среды, добавляли 10% глицерин и хранили при температуре -80°C до проведения анализа.

5. Определение концентрации хлорофилла

Для определения содержания хлорофилла 20 мкл пробы растворяли в 1 мл 95% этанола и центрифугировали в течение 5 мин при $3\ 400 \times g$ на центрифуге MiniSpin (Германия). После этого измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длинах волн 664.2 и 648.6 нм. Концентрацию хлорофилла определяли, используя уравнение Lichtenthaler, 1987.

$$C_{a+b} = (5.24 * A_{664.2} + 22.24 * A_{648.6}) / l$$

$$C_a = 13.36 * A_{664.2} - 5.19 * A_{648.6}$$

$$C_b = 27.43 * A_{648.6} - 8.12 * A_{664.2}$$

где C_{a+b} – общее содержание хлорофилла a и b , A – оптическая плотность при соответствующей длине волны, l – длина оптического пути.

6. Инкубация листьев ячменя

Инкубацию листьев ячменя в присутствии и отсутствие каталазы проводили при высокой интенсивности света (1000 мкмоль квантов/м²с) и в отсутствие каталазы при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м²с). Листья помещали на поверхность инкубационной среды. Инкубацию проводили в течение 5 дней при постоянном освещении (рис. 12 А).

Листья ячменя инкубировали в присутствии и отсутствие пероксида водорода в дистиллированной воде. Инкубацию проводили при постоянном освещении светом низкой интенсивности (100 мкмоль квантов/м²с) в течение 5 дней. Листья в вертикальном положении помещались в эппендорф и были погружены в воду нижней частью листа. Среда инкубации ежедневно меняли, край листа подрезали (рис. 12 Б).



Рисунок 12. Инкубация листьев ячменя. А – инкубация при низкой интенсивности света (НС, 100 мкмоль квантов/м²с) и при высокой интенсивности света (1000 мкмоль квантов/м²с) в отсутствие (ВС) и присутствии каталазы (ВС каталаза). Б – инкубация при низкой интенсивности света в отсутствие (К) и в присутствии 50 мМ и 100 мМ пероксида водорода.

7. Инкубация листьев с NaF

Для инкубации листа ячменя или листа арабидопсиса прокалывали с нижней стороны, оставляя целым верхний слой клеток. Проколотой стороной лист помещали в чашку Петри, содержащую 15 мМ NaF и инкубировали в темноте в течение 1 часа.

8. Измерение флуоресценции хлорофилла *a* листьев

8.1 Измерения флуоресценции хлорофилла на свету

Флуоресценция хлорофилла была измерена, используя ПАМ-флуориметры РАМ-101 и miniРАМ (Walz, Германия) после предварительной адаптации листьев или суспензии тилакоидов к темноте. Измерения флуоресценции хлорофилла *a* суспензии тилакоидов проводили в специальной Walz-ячейке.

Эффективный квантовый выход (Y) и коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла (qN) были рассчитаны по следующим формулам: $Y = (F_m' - F_s) / F_m'$ и $qN = (F_m - F_m') / (F_m - F_0')$, где F_m – максимальный уровень флуоресценции в ответ на подачу вспышки насыщающего света на адаптированном к темноте объекте. F_s – стационарный уровень флуоресценции при включенном актиничном свете. F_m' – максимальный уровень флуоресценции в ответ на подачу насыщающей вспышки, подаваемой в ходе стационарного освещения актиничным светом. F_0' – уровень флуоресценции сразу после выключения действующего света.

Относительный уровень восстановления ПХ-пула оценивали согласно Tullberg et al., 2000 по формуле $1 - (F_m' - F_s) / (F_m' - F_0')$. Изменения флуоресценции регистрировали с помощью программы WinControl.

8.2 Измерения релаксации НФТ после освещения

Для оценки релаксации коэффициента нефотохимического тушения (qN) после освещения подавали вспышки насыщающего света ($8000 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$, продолжительность вспышки – 0.8 с) на 1,3,6,9,12,15,18,21 и 24 минутах темноты. При более частой подаче вспышек происходило частичное подавление релаксации нефотохимического тушения. Также было проверено, что в отсутствие насыщающих вспышек нефотохимическое тушение полностью релаксировало в темноте в течение 24 минут.

Измерения релаксации qN проводили на отделенных листьях с помощью ПАМ-флуориметра miniPAM (Walz, Германия). Во время предварительной темновой адаптации и самого измерения нижний край листа находился в воде для предотвращения пересыхания листа.

8.3. Измерение индукционных кривых быстрой флуоресценции, ОЛР-кинетик
ОЛР-кинетики записывали с помощью флуориметра, описанного в работе Kreslavski et al., (2014). Для измерения использовали синий свет. На основе полученных кинетик рассчитывали следующие параметры:

F_v/F_m – максимальный квантовый выход;

$ABC/RC = (M_0/V_J) (F_v/F_m)$ - видимый размер антенны ФС2;

$ET_{20}/RC = (M_0/V_J) (1 - V_J)$ - максимальный поток электронов, перенесенных от от Q_a к Q_b в расчете на РЦ ФС2;

$\phi RE_{1o} = (F_v/F_m) (1 - V_J)$ - максимальный поток электронов, перенесенных к конечным акцепторам ФС1 в расчете на РЦ ФС2;

где V_J – относительный уровень флуоресценции в фазе J. $V_J = (F_{2мс} - F_0) / (F_m - F_0)$;

M_0 - начальный наклон кривой относительной величины интенсивности переменной флуоресценции, выражает скорость переноса электрона на начальном этапе

$M_0 = 4 (F_{0,3мс} - F_0) / (F_m - F_0)$

V_I - относительная переменная флуоресценция в момент времени 30 мс (I фаза) после включения действующего света, $V_I = (F_{30мс} - F_0) / (F_m - F_0)$

9. Оценка уровня экспрессии генов, кодирующих Lhcb белки

Из листьев, замороженных в жидком азоте, с помощью Aurum total RNA mini Kit (Bio Rad, США) экстрагировали тотальную РНК и обрабатывали ДНКазами для предотвращения контаминации геномной ДНК. Затем 400 нг каждого РНК образца использовали для обратной транскрипции с помощью BioRad iScript reverse transcription supermix reagents. Количественная ОТ-ПЦР была проведена в трех независимых повторностях. Данные были нормализованы по экспрессии гена актина, который является геном домашнего хозяйства и экспрессируется на постоянном уровне. ПЦР реакцию проводили с помощью IQ5 cyclor (Bio Rad, США). Для арабидопсиса были использованы праймеры к генам *lhcb2.2*, *lhcb3* и *lhcb6* (Xu et al., 2012). Для ячменя были использованы праймеры к генам *lhcb1*, *lhcb3* и *lhcb6* (Frigerio et al., 2007), последовательности олигонуклеотидов, использованные для *lhcb4*: прямой CTCTTAAGTGGTTCGGTGGT, обратный TCCTATGTGATCGGACCAGC; *lhcb5*: прямой GATCTACTTGCCCAACGG, обратный CATGGATGAGCTCAAAGGCC.

10. Денатурирующий электрофорез

Денатурирующий электрофорез проводили согласно Schagger and von Jagow (1987) в 12-18% градиентном полиакриламидном геле, используя трис-трициновый буфер. Электрофорез проводили при комнатной температуре, подавая 100 мА на гель. В каждую лунку геля вносили тилакоиды с содержанием хлорофилла 8 мкг. Разделение проводили в камере PROTEAN II xi Cell, Bio-Rad (США). Для визуализации белковых полос гели инкубировали в течение 2-3 часов в 0,25% растворе кумасси G-250, который диффундировал в гель и прочно связывался с белками. Отмывку фонового окрашивания проводили в среде, содержащей 96% этанол и 10% уксусную кислоту в течение 1-2 дней, периодически заменяя раствор свежим до тех пор, пока общий фон геля не становился значительно светлее окрашенных белковых полос (Остерман, 1981).

11. Измерение кислородного обмена в суспензии тилакоидов

Оценку скорости поглощения/выделения кислорода суспензией тилакоидов проводили с помощью закрытого электрода кларковского типа, заполненного 1М КСl. Измерения проводили в термостатируемой стеклянной ячейке (объем = 0.3 мл) $t=21^{\circ}\text{C}$. Реакционную смесь освещали красным светодиодом ($\lambda > 660 \text{ nm}$), интенсивность света регулировали с помощью нейтральных светофильтров. Скорости поглощения/выделения кислорода рассчитывали с помощью программы Power Graph.

12. Измерение скорости восстановления цитохрома *c*

Восстановление цитохрома *c* в суспензии тилакоидов измеряли по увеличению поглощения при длине волны 550 нм по сравнению с 540 нм. Для измерения использовался двухволновой спектрофотометр (Hitachi 557, Япония). Фотоумножитель экранировался от действующего света с помощью светофильтра СЗС-22. Коэффициент молярной экстинкции $19\text{мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ был использован при расчетах (Davis and San Pietro, 1977). Супероксид-зависимая скорость восстановления цитохрома *c* была рассчитана как разница между скоростью восстановления цитохрома *c* в отсутствие и присутствии супероксиддисмутазы (СОД). СОД – фермент, катализирующий реакцию дисмутации супероксидных радикалов до H_2O и O_2 . Суспензию освещали с помощью галогеновой лампы через красный светофильтр ($\lambda > 620$ нм). Основная реакционная смесь содержала 0,4 М сахараза, 25 мМ Нерес-КОН (рН 7.6), 20 мМ NaCl, 5 мМ MgCl_2 и 10 мкг Хл/мл тилакоиды.

13. Определение количества пероксида водорода в листьях

Измерение количества пероксида водорода было основано на перекисном окислении люминола (Cormier and Prichard, 1968). Листья (50-100 мг) замораживали в жидком азоте. Затем замороженный лист переносили в 0.4 мкл 2М трихлоруксусной кислоты и гомогенизировали. Экстракцию пероксида водорода проводили с помощью 3 мл 0.05 М К-фосфатного буфера (рН 8.5). Для удаления пигментов суспензию инкубировали в течение 1 часа с активированным углем (250 мг). Полученную смесь центрифугировали 20 мин $10\,000 \times g$. Супернатант отбирали и титровали с помощью 2М КОН до рН 8.5. Для определения содержания пероксида водорода использовали 50 мкл полученного экстракта, к которому с помощью дозатора вносили 1 мл смеси люминола ($2,26 \times 10^{-4}$ М) и пероксидазы (1×10^{-6} М). Для построения калибровочной кривой использовали растворы пероксида водорода с известной концентрацией.

14. Измерение пероксидазной активности

Предварительно взвешенные листья ячменя растирали с песком. К полученному листовому гомогенату добавляли 3 мл К-фосфатного буфера рН 7.0. В случае определения пероксидазной активности в листьях после адаптации к высокой интенсивности света во все образцы вносили Polycler AT для связывания фенолов. Затем образцы центрифугировали 5 минут при $3\,400 \times g$ и полученные супернатанты использовали для определения пероксидазной активности. В качестве субстрата использовали 1мМ 3,3 - диаминобензидин, измерения проводили на спектрофотометре Hitachi 557 (Япония) при

длине волны 450нм. Состав реакционной смеси: 150 мкл супернатанта, 10 мМ пероксид водорода, 1мМ 3,3 - диаминобензидин, К-фосфатный буфер рН 7.0.

15. Вестерн-блот анализ

Для оценки количества белков с помощью вестерн-блот анализа тилакоиды разделяли, как описано ранее (Ballottari et al., 2004). Результаты реакции с антителами оценивали с помощью денситометрии. Gel-Pro Analyser 3.1. Alkaline Phosphatase Conjugate Substrate Kit был использован для визуализации белковых полос. 5 мкл Precision Plus Protein Kaleidoscope (10–250 кДа) (Bio-Rad, США) использовали в качестве маркера молекулярных весов.

16. Измерение количества крахмала в листьях

Для анализа брали свежесобраные тилакоиды ячменя, объемы проб для анализа нормировали по количеству хлорофилла. К пробам добавляли до 1 мл 96% спирт. Проводили центрифугирование 5 мин 3 400 * g. Полученные осадки высушивали до полного удаления спирта. Крахмал растворяли в 200 мкл кипящей воды в течение 30 минут и затем центрифугировали (Kaplan et al., 2012). 25 мкл полученного супернатанта использовали для реакции с 0,12% иодидом калия. Интенсивность окрашивания измеряли при 620 нм, используя спектрофотометр Hitachi 557. Картофельный крахмал был использован для построения калибровочной кривой.

17. Измерение спектров низкотемпературной флуоресценции хлорофилла

Измерение спектров низкотемпературной флуоресценции проводили на целых листьях ячменя или арабидопсиса. Перед измерением листья предварительно затемняли в течение 1 часа для полного перехода светособирающего комплекса антенны ФС2 от ФС1 к ФС2 (так как известно, что на свету часть антенны переходит от ФС2 к ФС1, и этот процесс обратим в темноте), таким образом инициировали состояние 1 (state 1) (Bassi et al., 1988). Для стандартизации измерений площадь листа была нормализована. Лист помещали в специальную «лопатку», в которой образец замораживался и затем измерялся в жидком азоте при 77К. Измерения проводили на спектрофлуориметре Hitachi 850 при длине волны возбуждения флуоресценции 435 нм. С помощью полученных спектров низкотемпературной флуоресценции для каждого образца определяли соотношение пиков ФС1/ФС2. За «0» принимали отношение пиков флуоресценции ФС1/ФС2, измеренное сразу после темновой адаптации. Для инициации перехода в state 2 был использован свет, возбуждающий преимущественно ФС2, для чего использовали интерференционный

светофильтр ($\lambda = 647$ нм). Для каждого варианта эксперимента было проведено более 5 независимых измерений.

18. Измерение интенсивности света

Измерение интенсивности света проводили с помощью прибора LI - 250 Quantum Sensor.

19. ЭПР измерения

Измерения ЭПР спектров проводили с помощью спектрометра EMX-6 (Bruker, Германия) при постоянной температуре 22°C. Добавку спин метки проводили следующим способом: 10 мкл 10^{-2} М раствор спин пробы SASL-16 (Sigma) в хлороформе вносили на стенки эппендорфа и высушивали, после чего к метке добавляли 50 мкл суспензии тилакоидов (концентрация Хл 100мкг/мл). Тилакоиды инкубировали с меткой в течение 10 минут в темноте во льду. После инкубации образцы переносили в калиброванные стеклянные капилляры и записывали спектры без освещения при мощности 20 мВт. Три спектра для каждого измерения усредняли для увеличения сигнала. Сигнал тилакоидов без метки вычитали из полученных спектров.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ОБРАЗОВАНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА ВНУТРИ ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНЫ

3.1.1. Влияние МВ на скорость транспорта электронов

Хлоропласт является одним из основных источников АФК в растениях на свету. Ранее было показано, что при увеличении интенсивности света происходит увеличение образования и супероксидного радикала, и пероксида водорода компонентами фотосинтетической электрон-транспортной цепи (Ivanov et al., 2012). Более того, было показано, что увеличение в образовании $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 при увеличении освещенности происходит в результате увеличения образования этих АФК, преимущественно, внутри тилакоидной мембраны, а не в строме (Mubarakshina et al., 2006). Образование супероксидного радикала внутри мембраны было показано в работах (Kozuleva et al., 2011; Kozuleva et al., 2014). Доказательства образования пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны были представлены в (Мубаракшина и др., 2006; Mubarakshina et al., 2006; Borisova-Mubarakshina et al., 2012).

Однако ранее образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны было показано на изолированных тилакоидах без добавления акцепторов: в таких условиях кислород является единственным акцептором электронов от фотосинтетической электрон-транспортной цепи и скорости переноса электронов по цепи гораздо ниже потенциально возможных скоростей. Поэтому в данной работе была исследована возможность образования пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны в присутствии эффективного акцептора электронов, который может обеспечить высокую скорость электронного транспорта, близкую к физиологической. Природным акцептором электронов от ФС1 является ферредоксин (Фд), использование которого в этой работе оказалось невозможным из-за его способности восстанавливать цитохром *c* (Asada et al., 1974), который был использован для предотвращения образования пероксида водорода в водной фазе. Поэтому был выбран другой эффективный акцептор электронов метилвиологен (МВ), который акцептирует электроны от компонентов ФС1 – F_A/F_B – и переносит их к кислороду ($k = 8 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$), образуя супероксидный радикал.

Для исследования влияния добавки МВ (1 мкМ) к суспензии тилакоидов на скорость фотосинтетического электронного транспорта было проведено измерение

скорости поглощения кислорода при двух интенсивностях света: 25 мкмоль квантов/м²с и 180 мкмоль квантов/м²с (рис. 13).

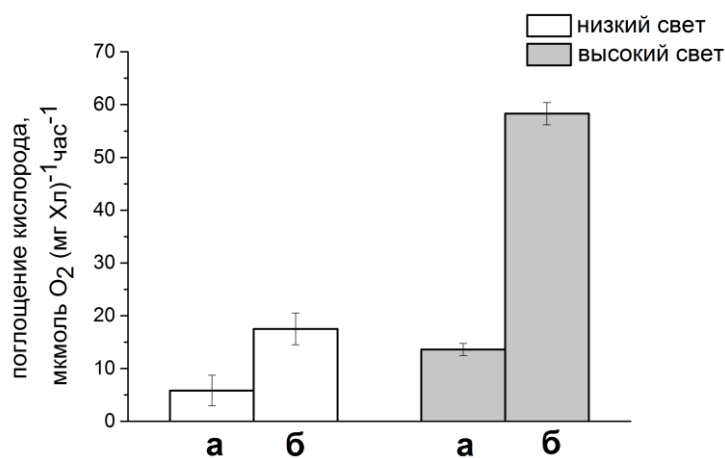


Рисунок 13. Влияние интенсивности света на скорость поглощения кислорода в отсутствие (а) и в присутствии (б) 1 мкМ МВ. Белые столбики — интенсивность света 25 мкмоль квантов/м²с, серые столбики — интенсивность света 180 мкмоль квантов/м²с. Значения представлены как средние ± SE.

Кислород выделяется в результате работы водоокисляющего комплекса ФС2. При этом, стехиометрия между переносом электронов от воды к кислороду такова, что перенос 4 электронов по цепи сопровождается поглощением 1 молекулы O₂, т.е. $e^- : O_2 \downarrow = 4 : 1$ (Allen and Hall, 1973), и в случае, когда кислород является единственным акцептором (рис. 13а) и в случае, когда МВ, акцептируя электроны от компонентов ФС1, переносит их на кислород (рис. 13б). Поэтому при освещении суспензии тилакоидов в случае, когда кислород является финальным акцептором (рисунок 13), скорость поглощения кислорода из-за его восстановления преобладает над скоростью его выделения в ВОК. Потому наблюдается поглощение кислорода. Скорость поглощения кислорода, которая отражает общую скорость электронного транспорта, увеличивалась в присутствии 1 мкМ МВ (рис. 13, а vs б). Больше увеличение скорости в присутствии 1 мкМ МВ наблюдалось при интенсивности света 180 мкмоль квантов/м²с. Скорость транспорта электронов в электрон-транспортной цепи может быть оценена из скорости поглощения кислорода, согласно описанной выше стехиометрии. В нашем эксперименте в присутствии МВ при интенсивности света 180 мкмоль квантов/м²с скорость электронного транспорта составляла около 240 мкэквивалентов e⁻/мг Хл час. Это несколько меньше, чем максимальные физиологические скорости, однако похожие значения наблюдаются при некоторых стрессовых условиях, таких как, например, недостаток CO₂ из-за закрытия

устыиц (Vico et al., 2013).

Таким образом, для работы были подобраны условия, позволяющие получить скорости транспорта электронов относительно близкие к физиологическим.

3.1.2. Определение насыщающей концентрации цитохрома *c*

Для оценки образования пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны был использован подход, предложенный в работе (Mubarakshina et al., 2006). Данный подход основан на использовании цитохрома *c*, водорастворимого белка, который действует, как ловушка супероксидных радикалов, окисляя их до O_2 . Цитохром *c* не способен проникать внутрь тилакоидной мембраны и взаимодействует с супероксидными радикалами только вне мембраны, предотвращая образование пероксида водорода в водной фазе тилакоидной суспензии. Для того, чтобы цитохром *c* улавливал все супероксидные радикалы, образованные вне тилакоидной мембраны, необходимо использовать его в значительных количествах, т.е. в насыщающей концентрации. При оценке насыщающей концентрации цитохрома *c* важно учитывать, что цитохром *c* может быть восстановлен не только супероксидными радикалами, но и компонентами электрон-транспортной цепи (Kruk et al., 2003). Поэтому необходимо определить именно насыщающую концентрацию для супероксид-зависимого восстановления цитохрома *c*. Для этого была измерена скорость восстановления цитохрома *c* в отсутствие и присутствии СОД, разница между которыми отражает супероксид-зависимое восстановление цитохрома *c* (Рис. 14).

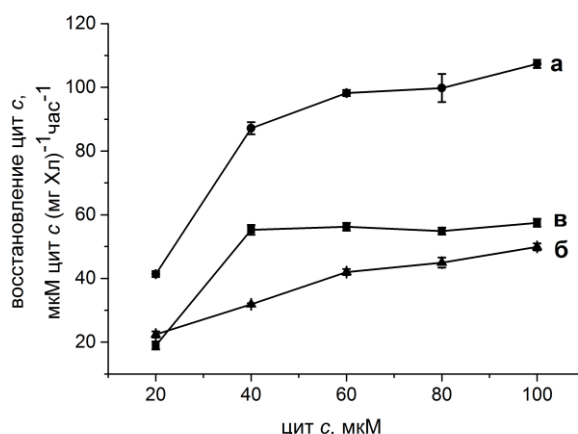


Рисунок 14. Зависимость скорости восстановления цитохрома *c* на свету от концентрации цитохрома *c*. а — скорость восстановления цитохрома *c* в отсутствие СОД, б - скорость восстановления цитохрома *c* в присутствии СОД, в — супероксидзависимая

скорость восстановления цитохрома *c*, рассчитанная, как разница между а и б.

Интенсивность света 180 мкмоль квантов/м²с. Значения представлены, как среднее ± SE.

В присутствии 1 мкМ МВ скорость супероксидзависимого восстановления цитохрома *c* насыщалась при концентрации цитохрома *c* равной 40 мкМ (рис. 14 с). Эти данные свидетельствуют о том, что при этой концентрации цитохром *c* улавливает все супероксидные радикалы, образованные вне тилакоидной мембраны. Для дальнейших экспериментов был использован 60 мкМ цитохром *c*.

3.1.3. Влияние цитохрома *c* на скорость поглощения кислорода

В присутствии цитохрома *c*, который, окисляя супероксидные радикалы, приводит к дополнительному выделению кислорода, скорость поглощения кислорода не превышает скорость выделения кислорода системой. Потому добавка цитохрома *c* к тилакоидной суспензии, изменяя стехиометрии процессов, приводит к выделению кислорода, а не к поглощению, как в отсутствие цитохрома *c* (рис. 13 vs 15).

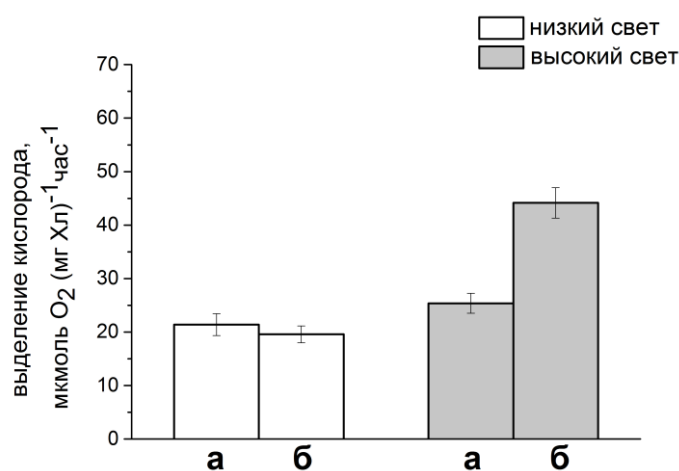


Рисунок 15. Влияние интенсивности света на скорость выделения кислорода в отсутствие (а) и в присутствии (б) 100 ед/мл каталазы. Реакционная среда содержала 1 мкМ МВ и 60 мкМ цитохром *c*. Белые столбики интенсивность света — 25 мкмоль квантов/м²с, серые столбики — интенсивность света 180 мкмоль квантов/м²с. Значения представлены, как среднее ± SE.

Для того, чтобы определить происходит ли образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны в присутствии эффективного акцептора электронов — МВ и цитохрома *c* в насыщающей концентрации, скорость выделения кислорода суспензией

тилакоидов в присутствии и отсутствие каталазы была измерена (рис. 15). Каталаза — фермент, катализирующий распад пероксида водорода на молекулу кислорода и воду. Если в присутствии цитохрома *c*, который предотвращает образование пероксида водорода вне мембраны, добавка каталазы приводит к выделению кислорода, это показывает образование пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны.

На рисунке 15 видно, что добавка каталазы при низкой интенсивности света не оказывает влияния на скорость выделения кислорода (а vs б, белые столбики). В то время как добавка каталазы при высокой интенсивности света приводила к значительному увеличению скорости выделения кислорода (а vs б, серые столбики). Таким образом, при высокой интенсивности света, даже в присутствии МВ, пероксид водорода образуется внутри тилакоидной мембраны. Отличие между скоростью выделения кислорода в присутствии и отсутствие каталазы (рис. 15) может быть использовано для оценки количества пероксида водорода, образованного внутри тилакоидной мембраны.

При разложении пероксида водорода с помощью каталазы происходит образование 1 молекулы O_2 из 2 молекул H_2O_2 . На высоком свету скорость образования пероксида водорода внутри мембраны составила 38 ± 4 мкмоль H_2O_2 /мг Хл час (рис. 15). Если скорость образования пероксида водорода в отсутствие цитохрома *c* (рис. 13) принять за 100%, то образование пероксида внутри мембраны составит 30%.

3.1.4. Пути образования пероксида водорода в присутствии и отсутствие МВ

В отсутствие МВ или других акцепторов, таких как Фд, терминальные кофакторы ФС1, Fa/Fb, восстанавливают кислород до супероксидного радикала вне тилакоидной мембраны. Далее эти супероксидные радикалы конвертируются в H_2O_2 в результате реакции дисмутации (путь 1 образования пероксида водорода рисунок 16А). Нельзя исключить, что небольшие количества $O_2^{\cdot-}$ могут дисмутировать в непосредственной близости от поверхности тилакоидной мембраны и не улавливаясь цитохромом *c*, когда он присутствует в среде (путь 2 образования пероксида водорода, рисунок 16Б). Другим источником $O_2^{\cdot-}$ вне мембраны может быть реакция O_2 с пластосемихиноном на границе раздела фаз мембрана/вода (Mubarakshina and Ivanov, 2010).

Третий путь - это образование H_2O_2 внутри тилакоидной мембраны в результате реакции $O_2^{\cdot-}$ с полностью восстановленным пластохиноном (рисунок 16).

Преимуществом использования МВ, кроме более высоких скоростей транспорта электронов, является значительное уменьшение 2-го пути образования H_2O_2 . В результате, пероксид водорода, в основном, образуется внутри тилакоидной мембраны с помощью 3-

го пути.

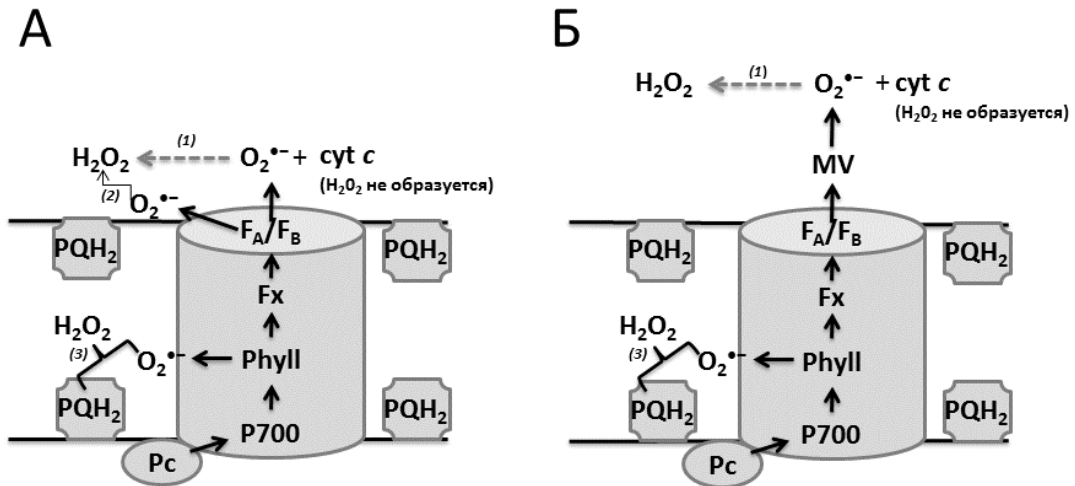


Рисунок 16. Предполагаемая схема переноса электронов и образования пероксида водорода с участием компонентов ФС1 в отсутствие (А) и в присутствии (Б) МВ. Черные стрелки — пути переноса электронов, пунктирные стрелки — пути образования пероксида водорода в отсутствие цитохрома с. P700 — реакционный центр ФС1; Fx, [4Fe-4S] и Phyll, филосемихинон — переносчики электронов в ФС1; F_A и F_B — терминальные кофакторы переноса электронов ФС1; Pc, пластоцианин, - донор электронов для ФС1; PQH₂, пластогидрохинон.

Известно, что целый ряд адаптационных механизмов, в том числе механизмов, основанных на регулировании функционирования светособирающей антенны ФС2, таких как state transitions и уменьшение размера антенны ФС2 при долговременной адаптации, регулируются окислительно-восстановительным состоянием пула пластохинона. Однако до сих пор остается не выясненной молекулярная природа сигнала, несущего информацию об окислительно-восстановительном состоянии пула пластохинона и приводящего к запуску state transitions или к уменьшению размера антенны ФС2. Можно предположить, что пероксид водорода, образованный с участием восстановленного пула пластохинона внутри тилакоидной мембраны, является сигналом об окислительно-восстановительном состоянии ПХ-пула и может участвовать в запуске адаптационных механизмов.

3.2. ДОКАЗАТЕЛЬСТВО ПРОТЕКАНИЯ РЕАКЦИИ МЕЖДУ ПХН₂ И O₂^{•-}

Для доказательства того, что пероксид водорода в тилакоидной мембране образуется в результате реакции между ПХН₂ и O₂^{•-} была использована ксантин/ксантиноксидазная система, которую добавляли к суспензии тилакоидов. Показано, что

ксантин/ксантинооксидазная система является более эффективным источником $O_2^{\cdot-}$, чем KO_2 при нейтральных значениях pH (Brawn and Fridovich, 1980). Все эксперименты проводили при pH 7.6, также, как и при измерении образования пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны. Редокс активное хиноновое кольцо ПХ-пула имеет тенденцию к образованию водородных связей с молекулами воды и поэтому располагается близко к зонам поверхности мембраны, находящимся в контакте с водой. Необходимо было подобрать такие условия, чтобы ксантинооксидаза плотно прилегала к поверхности тилакоидной мембраны, и генерация супероксидного радикала происходила в непосредственной близости от редокс активной части пластогидрохинона. Лучшая посадка ксантинооксидазы на мембрану достигалась после выдерживания тилакоидов в течение 24 часов во льду в темноте перед началом измерений. Для исследования структурных изменений в тилакоидной мембране, произошедших за 24 часа инкубации тилакоидов во льду в темноте, по сравнению с тилакоидами сразу после выделения использовали метод электронного парамагнитного резонанса и спиновую метку SASL-16, которая встраивается в липидные области мембран.

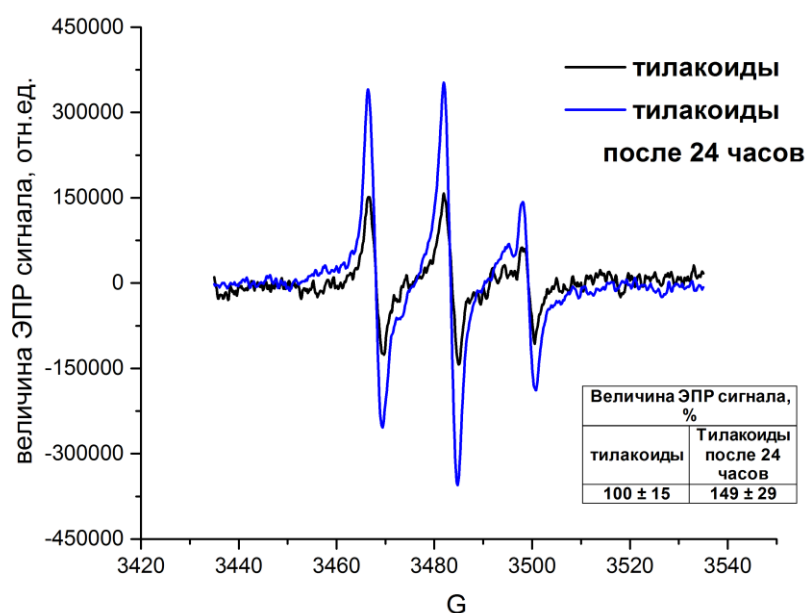


Рисунок 17. ЭПР спектры метки SASL-16, полученные на тилакоидных мембранах сразу после выделения (тилакоиды, черная линия) и после 24 часов выдерживания во льду в темноте (тилакоиды после 24 часов, синяя линия).

С помощью измерения ЭПР спектров было показано, что через 24 часа после выделения тилакоидов, происходило изменение вязкости тилакоидной мембраны (рис. 17). Из рисунка 17 видно, что уровень ЭПР сигнала метки SASL-16 значительно возрастает

через 24 часа выдерживания тилакоидов в темноте. Возрастание ЭПР сигнала объясняется увеличением вращательной подвижности спиновой метки внутри мембраны, а также большим количеством ЭПР метки, которое проникло внутрь тилакоидной мембраны и свидетельствует об изменении структуры мембраны тилакоидов. По-видимому, меньшая "жесткость" тилакоидной мембраны через 24 часа после выделения тилакоидов облегчила связывание метки с мембраной; а также должна была обеспечить лучшую посадку ксантиноксидазы на поверхность тилакоидной мембраны.

В дальнейшем проводили измерения относительного уровня восстановления ПХ-пула, который отражает уровень содержания пластогидрохинона (ПХН₂) в тилакоидной мембране, в отсутствие и присутствии ксантин/ксантиноксидазной системы (табл. 2).

Таблица 2. Максимальный квантовый выход в темноте до освещения (Fv/Fm), степень восстановления ПХ-пула и максимальный квантовый выход в темноте после освещения (Fv/Fm после освещения), измеренные на тилакоидах сразу после выделения и после 24 часов хранения тилакоидов во льду. Интенсивность измерительного света 100 мкмоль квантов/м²с. Все измерения проводили в присутствии ксантина.

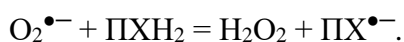
Свежевыделенные тилакоиды	Fv/Fm	Относительный уровень восстановления ПХ-пула	Fv/Fm после освещения
+ ксантин	0.71 ± 0.007	0.43 ± 0.004	0.67±0.008
+ ксантиноксидаза	0.71 ± 0.005	0.44 ± 0.008	0.67±0.008
Тилакоиды после 24 часов	Fv/Fm в темноте	Относительный уровень восстановления ПХ-пула	Fv/Fm в темноте после освещения
+ ксантин	0,63±0,002	0,50±0,006	0,60±0,001
+ ксантиноксидаза	0,62±0,003	0,41±0,005	0,59±0,002
+БСА + ксантин	0,64±0,010	0,38±0,002	0,58±0,016
+БСА + ксантиноксидаза	0,64±0,001	0,37±0,003	0,59±0,001

Из таблицы 2 видно, что добавка ксантин/ксантиноксидазной системы к тилакоидам, выделенным непосредственно перед измерением, не оказывала влияния на относительный уровень восстановления ПХ-пула. Однако степень восстановления ПХ-пула уменьшалась примерно на 18% при добавке ксантин/ксантиноксидазной системы к тилакоидам после 24 часов выдерживания во льду в темноте. Для того, чтобы определить связан ли наблюдаемый эффект с посадкой ксантиноксидазы на тилакоидную мембрану, к суспензии тилакоидов перед добавкой ксантиноксидазы добавляли бычий сывороточный альбумин (БСА) белок, способный прикрепляться к мембране (Kawamura et al., 2013). В присутствии БСА, добавка ксантиноксидазы к тилакоидам после их выдерживания в течении 24 часов во льду в темноте, не приводила к снижению относительного уровня восстановления ПХ-пула.

Эти результаты показывают, что «старение» тилакоидов, которое достигается их выдерживанием в течение 24 часов в темноте, приводит к облегчению реакции между ПХН₂ и O₂^{•-}, генерируемыми ксантин/ксантиноксидазной системой, что отражается на степени восстановления ПХ-пула на свету.

Важно отметить, что добавка ксантин/ксантиноксидазной системы не оказывала деструктивного влияния на фотосинтетический аппарат, что видно по одинаковым значениям максимальных квантовых выходов (Fv/Fm) в присутствии и отсутствие добавки ксантиноксидазы (табл. 2). Более того, похожие значения максимальных квантовых выходов наблюдались в присутствии и отсутствие ксантиноксидазы после освещения, что говорит об отсутствии негативного эффекта супероксидного радикала, образованного ксантин/ксантиноксидазной системой, на работу тилакоидов в ходе освещения.

Таким образом, в результате данного этапа работы было показано, что к образованию пероксида водорода внутри тилакоидной мембраны может приводить реакция между супероксидным радикалом и молекулами пластогидрохинона:



3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭТАПА БИОСИНТЕЗА АНТЕННЫХ БЕЛКОВ, ЗА СЧЕТ КОТОРОГО ПРОИСХОДИТ УМЕНЬШЕНИЕ РАЗМЕРА АНТЕННЫ ФС2, ПРИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ АДАПТАЦИИ *ARABIDOPSIS THALIANA* К ВЫСОКОЙ ИНТЕНСИВНОСТИ СВЕТА

Уменьшение размера антенны ФС2 при увеличении освещенности может происходить за счет подавления биосинтеза светособирающих белков, таких как Lhcb1, Lhcb2, Lhcb 3 и

Lhcb6 (Morosinotto et al., 2006). Однако остается неизвестным на какой стадии биосинтеза белков происходит регуляция в ответ на изменения в интенсивности света (см. обзор литературы).

3.3.1. *Изменения фотосинтетических параметров в течение 5-ти дневной адаптации к условиям высокой интенсивности света*

Растения *Arabidopsis thaliana* (экотип Columbia), адаптированные к интенсивности света 70 мкмоль квантов/м²с и светопериоду 16/8 день/ночь, переносили в условия высокой интенсивности света (360 мкмоль квантов/м²с). Часть растений оставляли при низкой интенсивности света и использовали в качестве контроля.

Через 1 день после переноса растений в условия высокой интенсивности света, эффективный квантовый выход ФС2 на свету был значительно ниже при высокой интенсивности света, чем при низкой (рис. 18Б). В то же время нефотохимическое тушение флуоресценции хлорофилла *a* (НФТ) оказалось выше (рис. 18В), указывая на возрастание диссипации энергии в тепло. После 5 дней в условиях высокой интенсивности света, световая энергия используется растениями более эффективно, что следует из увеличения квантового выхода и снижения НФТ (рис. 18В). Уровень восстановления ПХ-пула в растениях в первый день после переноса в условия высокой интенсивности света был значительно выше по сравнению с таковым, полученным до начала адаптации (рис. 18А). После 5 дней адаптации к высокому свету относительный уровень восстановления ПХ-пула был значительно ниже (рис. 18А). Похожие изменения в функциональных свойствах ФЭТЦ при изменении уровня освещенности наблюдались в работе (Walters et al., 2003).

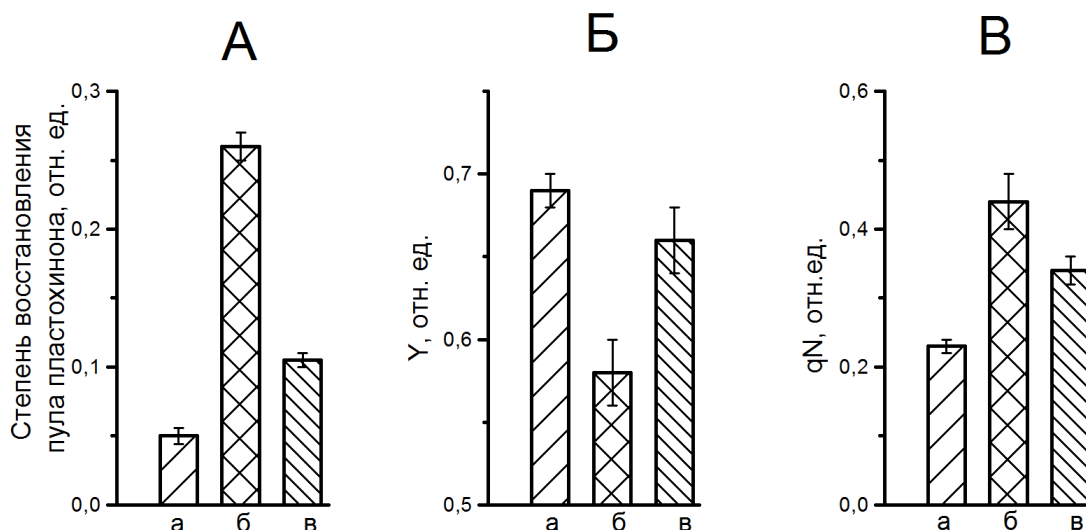


Рисунок 18. Относительный уровень восстановления пула пластохинона (А), Y - эффективный квантовый выход ФС2 (Б) и qN - коэффициент нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла a (В) в листьях растений *Arabidopsis thaliana* в процессе адаптации к изменению освещенности. а – растения, адаптированные к низкой интенсивности света ($50 \text{ мкмоль квантов/ м}^2 \text{ с}$); б - растения через 1 день после переноса в условия высокой интенсивности света; в - растения после 5 дней в условиях высокой интенсивности света ($360 \text{ мкмоль квантов/ м}^2 \text{ с}$). Все измерения проводили при той же интенсивности света, что и интенсивность света выращивания.

Максимальный квантовый выход ФС2, измеренный в темноте, был 0.80 ± 0.01 в растениях до их переноса в условия высокой интенсивности света; 0.79 ± 0.01 сразу после переноса и 0.81 ± 0.01 после 5 дней в условиях высокой интенсивности света. Эти результаты означают, что уменьшение эффективного квантового выхода на высоком свете, которое наблюдается сразу после переноса растений в условия высокой интенсивности света, и увеличение квантового выхода через 5 дней адаптации происходили не за счет изменений в способности ФС2 к разделению зарядов. Видимо, выше описанные изменения характеристик транспорта электронов происходят из-за адаптации фотосинтетического аппарата к условиям высокой интенсивности света.

Антенные коровые субъединицы ФС2 и мажорные тримерные комплексы ФС2 характеризуются различным содержанием хлорофилла a (Хл a) и b (Хл b). Коровые субъединицы CP47 и CP43 связывают Хл a , в то время как минорные антенные белки CP29, CP 26, CP 24, а также мажорные ЛНСII комплексы связывают не только Хл a , но и также Хл b . В высших растениях уменьшение размера антенны ФС2 при долговременном увеличении интенсивности света происходит в основном за счет уменьшения количества

ЛНСII тримеров, что приводит к уменьшению в количестве Хл *b* (Lindahl *et al.*, 1995; Ballottari *et al.* 2007; Frigerio *et al.*, 2007). Поэтому увеличение в отношении Хл *a*/Хл *b* отражает уменьшение размера антенны ФС2 (Lindahl *et al.*, 1995), и изменения в составе светособирающей антенны ФС2 могут отслеживаться по изменениям в отношении Хл *a*/Хл *b*. В данной работе на 3-4 день после переноса растений в условия высокой интенсивности света, отношение Хл *a*/Хл *b* увеличивалось от 2.0 до 2.4, показывая уменьшение количества периферических комплексов, которые содержат Хл *b*. Для оценки изменений, происходящих в количестве антенных белков в ходе пятидневной адаптации, проводили электрофорез белков тилакоидных мембран в денатурирующих условиях.

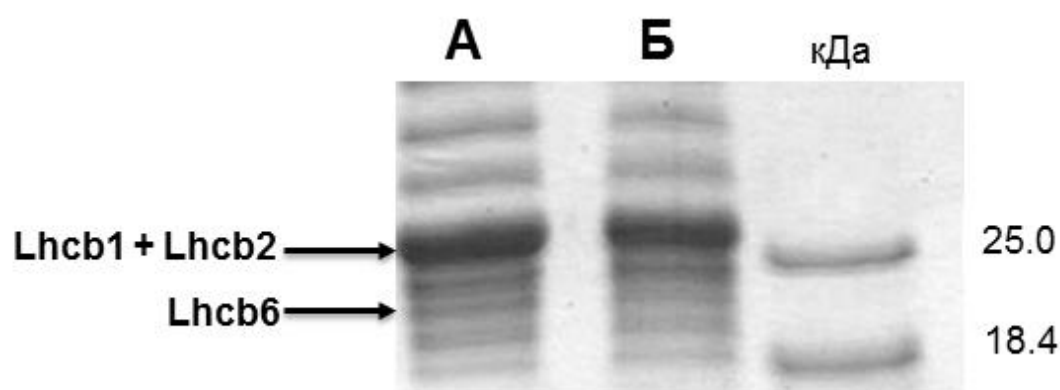


Рисунок 19. Денатурирующий электрофорез белков тилакоидов (8 мкг хлорофилла мл⁻¹) из листьев растений *Arabidopsis thaliana* после 5-ти дней выращивания в условиях низкой интенсивности света - 50 мкмоль квантов/м²с (А) и высокой интенсивности света – 360 мкмоль квантов/м²с (Б); справа - электрофорез белков-метчиков.

Денситометрический анализ гелей (рисунок 19) показывает, что плотность полос, соответствующих сумме белков Lhcb1 и Lhcb2, а также Lhcb6 белку была на 15% ниже в растениях, адаптированных к высокой интенсивности света по сравнению с растениями, выращенными на низкой интенсивности света. Это служит еще одним доказательством того, что в выбранных нами условиях действительно происходит уменьшение размера антенны ФС2.

3.3.2. Изменение уровня экспрессии генов, кодирующих белки светособирающей антенны ФС2, в ходе адаптации к условиям повышенной освещенности растений *A. thaliana* дикого типа

Через 5 дней после переноса растений в условия высокой интенсивности света происходило уменьшение уровня экспрессии генов *At2g05070*, *At5g54270* и *At1g15820*, которые кодируют антенные белки Lhcb2.2, Lhcb3 и Lhcb6, соответственно (рисунок 20).

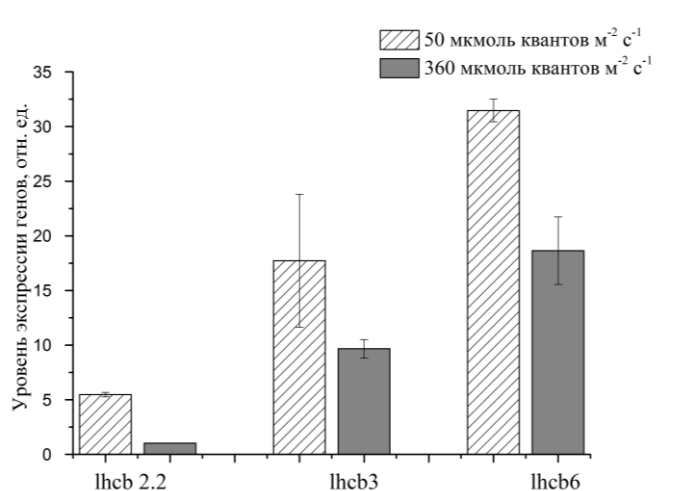


Рисунок 20. Экспрессия генов *At2g05070*, *At5g54270* и *At1g15820*, кодирующих антенные белки Lhcb2.2, Lhcb3 и Lhcb6 в листьях *A. thaliana* при разной интенсивности света. Штриховые столбики – 50 мкмоль квантов/м²с, серые столбики – 360 мкмоль квантов/м²с.

Таким образом, регуляция размера светособирающей антенны ФС2 происходит, вероятнее всего, на стадии транскрипции, или на пост-транскрипционном этапе, а не на стадии трансляции, как предполагалось ранее. Известно, что регуляция размера антенны ФС2 при долговременной адаптации связана с окислительно-восстановительным состоянием ПХ-пула. В нашей работе происходило значительное возрастание относительного уровня восстановления ПХ-пула через 1 день после переноса растений в условия высокой интенсивности света (рис. 18), что согласуется с этим предположением. Однако неизвестно, как окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула, находящегося в тилакоидной мембране, может влиять на транскрипцию генов светособирающих белков, находящихся в ядре. Ранее в данной работе (глава 3.1.4) уже было высказано предположение о возможной сигнальной роли молекул пероксида водорода, образованных в реакции супероксидного радикала с пластогидрохиноном.

3.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СИГНАЛА ДЛЯ РЕГУЛЯЦИИ РАЗМЕРА СВЕТОСОБИРАЮЩЕЙ АНТЕННЫ ФС2 ПРИ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ АДАПТАЦИИ

Для подтверждения участия пероксида водорода в модуляции размера антенны ФС2 при возрастании освещенности были использованы два независимых подхода, позволяющие регулировать количество пероксида водорода в листьях ячменя. 1) экспериментальные условия были подобраны так, чтобы снизить количество пероксида водорода в листьях при инкубации в условиях высокой интенсивности света. 2) экспериментальные условия были подобраны так, чтобы увеличить содержание пероксида водорода в листьях при инкубации в условиях низкой интенсивности света.

3.4.1. Влияние снижения количества пероксида водорода в листьях на размер антенны ФС2 при повышенной освещенности

3.4.1.1. Условия, при которых происходило снижение количества пероксида водорода в листьях на высоком свету

Отделенные 5-7 дневные листья ячменя в течение 5 дней освещали светом низкой интенсивности или светом высокой интенсивности в отсутствие и присутствии экзогенной каталазы. Каталаза способна проникать в апопласт, приводя к оттоку пероксида водорода из клетки и эффективно снижая количество H_2O_2 в клеточных органеллах. Более того, пероксид водорода способен выходить из листа в среду инкубации (рис. 21). Листья ячменя обрезали примерно на 5 мм с обеих сторон для улучшения проникновения каталазы в лист и облегчения диффузии пероксида водорода в инкубационную среду из листа. Не наблюдалось выхода пероксида водорода в среду в темноте. В то время как при освещении светом высокой интенсивности происходило увеличение уровня пероксида водорода в среде в 2-5 раз. Предполагается, что каталаза в среде может привести к возрастанию оттока пероксида водорода из листа.

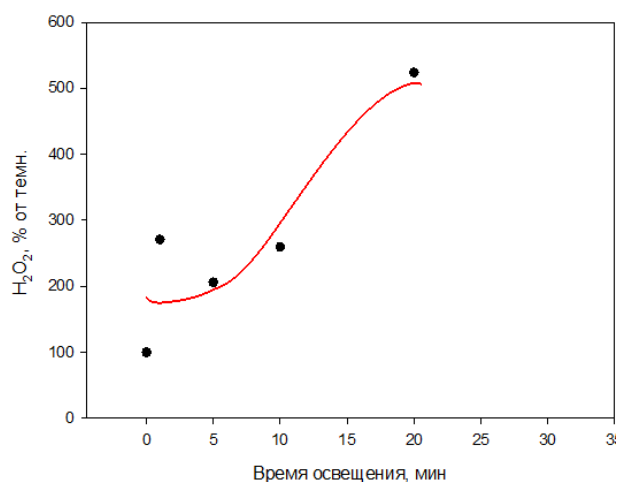


Рисунок 21. Динамика выхода пероксида водорода из листа в среду в ходе освещения. За 100% принято содержание пероксида водорода в среде в темноте.

3.4.1.2. Содержание пероксида водорода и относительный уровень восстановления ПХ-пула в листьях при выбранных условиях

На рисунке 22 показаны изменения в количестве пероксида водорода в листьях ячменя в ходе инкубации в условиях низкой (100 мкмоль квантов/м²с) или высокой (1000 мкмоль квантов/м²с) интенсивности света в отсутствие или присутствии каталазы (1200 ед./мл) в среде инкубации.

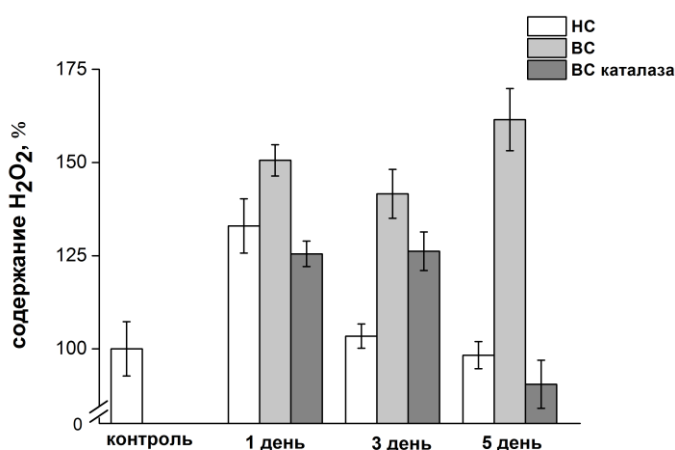


Рисунок 22. Количество пероксида водорода в листьях ячменя, измеренное при инкубации листьев при низкой интенсивности (НС, 100 мкмоль квантов/м²с) или при высокой интенсивности (1000 мкмоль квантов/м²с) света в отсутствие или присутствии каталазы в среде инкубации (ВС каталаза) в течение 5 дней. Контроль: количество пероксида водорода в листьях ячменя до начала инкубации. За 100% принято значение

0.346 мкмоль H₂O₂/г сырого веса (контрольное значение). Значения представлены как среднее ±SD.

1-ый день: ВС vs HC: P < 0.1, ВС каталаза vs HC: нет достоверных отличий, ВС каталаза vs ВС: P < 0.05. 3-ий день: ВС vs HC: P < 0.01, ВС каталаза vs HC: P<0.05, ВС каталаза vs ВС: P < 0.5. 5-ый день: ВС vs HC: P < 0.01, ВС каталаза vs HC: нет достоверных отличий, ВС каталаза vs ВС: P < 0.01.

Через один день после инкубации при освещении светом низкой интенсивности листья претерпевали окислительный стресс, который детектировали по увеличению содержания H₂O₂ в листьях. На третий день количество H₂O₂ в листьях снижалось, достигая того же уровня, что и в контрольных листьях (рис. 22). Освещение светом низкой интенсивности не имела дальнейшего эффекта на содержание пероксида водорода в листьях. Инкубация листьев в условиях высокой интенсивности света приводила к значительному накоплению пероксида водорода в первый день и уровень H₂O₂ оставался высоким в ходе всей инкубации. Уровень пероксида водорода в листьях, инкубированных в условиях высокой интенсивности света, но в присутствии в среде инкубации каталазы, оставался ниже чем на высоком свету в отсутствие каталазы (рис. 22). На 5 день обработки высокой интенсивностью света уровень пероксида водорода в присутствии каталазы оказывался схожим с наблюдаемым в листьях, инкубируемых при низкой интенсивности света.

Интересно, что при инкубации листьев ячменя в присутствии каталазы в листьях происходила активация внутренних антиоксидантных систем (табл. 3), в частности пероксидаз, что также приводило к снижению пероксида водорода в листьях.

Таблица 3. Пероксидазная активность в листьях ячменя после 5-дневной инкубации при низкой интенсивности света (HC, 100 мкмоль квантов/м²с) или при высокой интенсивности света (1000 мкмоль квантов/м²с) в отсутствие или присутствии каталазы (ВС каталаза) в среде инкубации.

	Пероксидазная активность, мкм ДАБ/г мин		
	HC	BC	BC каталаза
1 день	7.8±0.9	8.6±1.5	23.1±0.3
5 день	13.8±0.7	14±1	23.3±0.7

Рисунок 23 показывает изменения в относительном уровне восстановления ПХ-пула в листьях ячменя в ходе инкубации листьев при низкой интенсивности света и при

высокой интенсивности света в присутствии и отсутствие каталазы в среде инкубации.

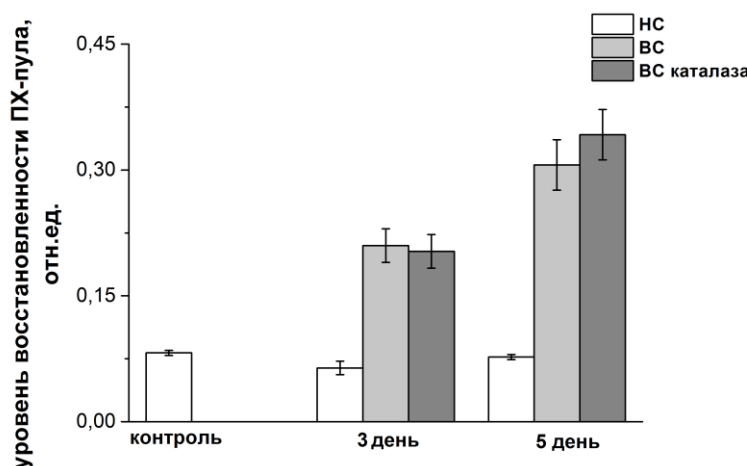


Рисунок 23. Относительный уровень восстановления ПХ-пула в листьях ячменя, измеренный при инкубации листьев при низкой интенсивности света (НС, 100 мкмоль квантов/м²с) или при высокой интенсивности (1000 мкмоль квантов/м²с) в отсутствие или присутствии каталазы (ВС каталаза) в течение 5 дней. Контроль: степень восстановления ПХ-пула в листьях ячменя до начала инкубации. Действующий свет при измерении соответствовал интенсивности света при инкубации листьев.

Инкубация в условиях низкой интенсивности света не оказывала значительного влияния на окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула. Инкубация при высокой интенсивности света приводила к увеличению в уровне восстановления ПХ-пула и в присутствии, и в отсутствие каталазы (рис. 23).

Таким образом, экспериментальные условия позволили снизить количество пероксида водорода в листьях при инкубации при высокой интенсивности света (рис. 22) на фоне высокого уровня восстановления ПХ-пула, характерного для высокой интенсивности света (рис. 23).

3.4.1.3. Уменьшение в содержании пероксида водорода в листьях при высокой интенсивности света приводит к отсутствию регуляции размера антенны ФС2

На рисунке 24 показаны изменения в отношении $X_l a/X_l b$ в листьях ячменя при выбранных условиях инкубации. В среде без каталазы отношение $X_l a/X_l b$ начинало увеличиваться после 3-го дня нахождения в условиях высокой интенсивности света, наибольшее увеличение в соотношении хлорофиллов происходило на 5 день. В то время

как при низкой интенсивности света отношение хлорофиллов не менялось в ходе всей адаптации. Эти данные отражают уменьшение размера антенны ФС2 в условиях повышенной освещенности. Когда листья инкубировали при высокой интенсивности света, но в присутствии каталазы в среде, отношение $Xл\ a/Xл\ b$ практически не изменялось, как и при низкой интенсивности света. На основании этих данных было предположено, что размер антенны ФС2 не уменьшался при высокой интенсивности света при добавке каталазы в среду инкубации.

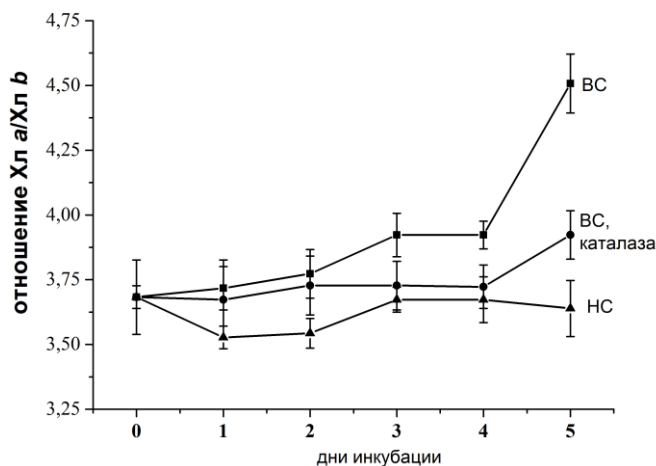


Рисунок 24. Отношение хлорофилла *a* к хлорофиллу *b* ($Xл\ a/Xл\ b$), измеренное в листьях ячменя в ходе инкубации при низкой интенсивности света (НС, 100 мкмоль квантов/ m^2c) или при высокой интенсивности (ВС, 1000 мкмоль квантов/ m^2c) в отсутствие или присутствии каталазы (1200 ед/мл). Значения представлены как средние \pm SD. Каждая точка получена в шести независимых экспериментах.

Для того, чтобы проверить, влияет ли инкубация на высоком свете в присутствии и отсутствие каталазы на состав тилакоидной мембраны, проводили электрофорез в денатурирующих условиях (рис. 25); после чего с помощью денситометрии проводили сравнение интенсивности окрашивания белковых полос.

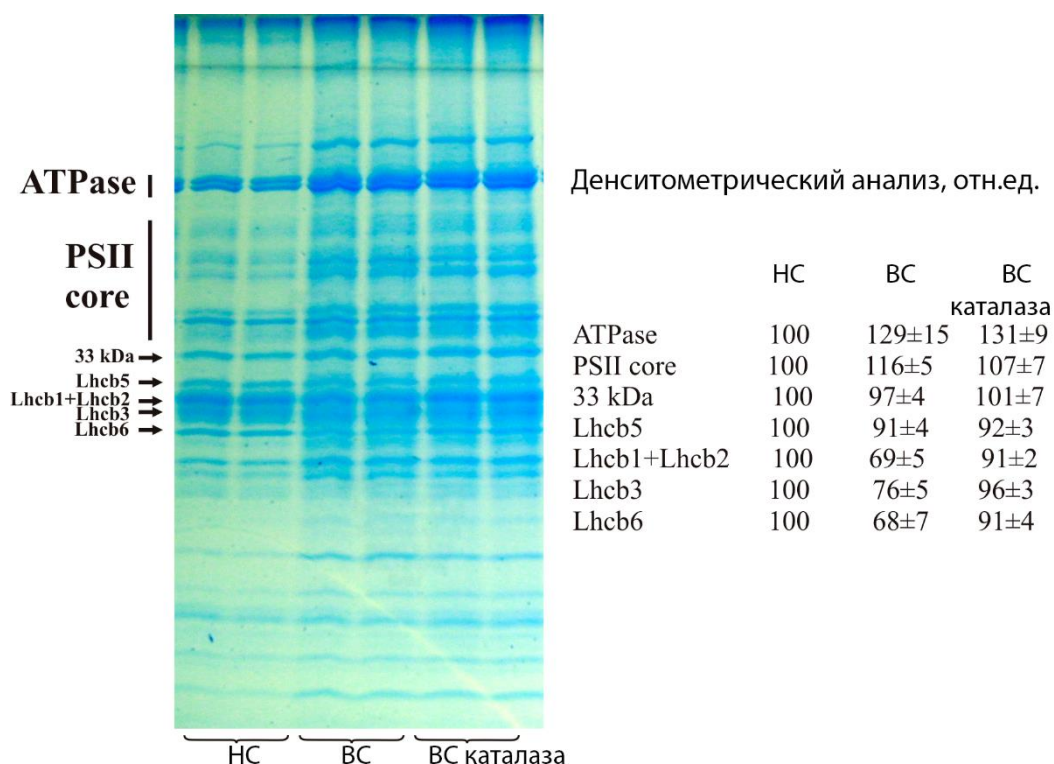
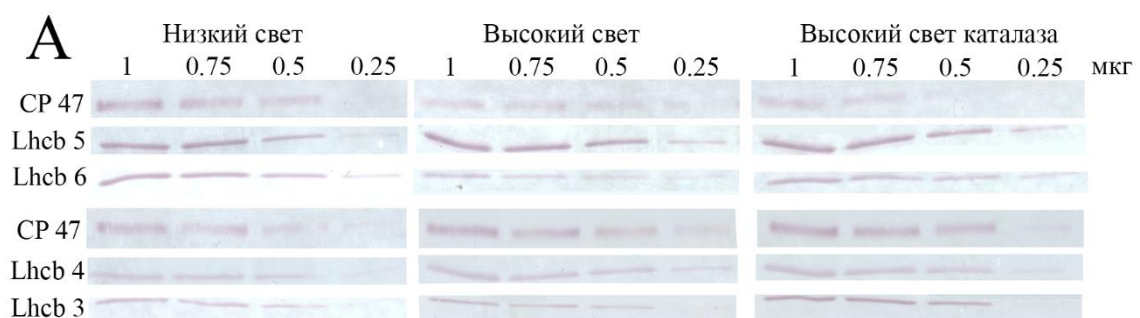


Рисунок 25. Денатурирующий электрофорез (слева) и результаты денситометрического анализа (справа) тилакоидных белков, изолированных из листьев ячменя через 5 дней инкубации при низкой интенсивности света (НС, 100 мкмоль квантов/м²с) или высокой интенсивности света (1000 мкмоль квантов/м²с) в отсутствие (BC) или присутствии каталазы (BC каталаза). Количество каждого белка нормализовано к количеству соответствующего белка в листьях, инкубированных при низкой интенсивности света, и взятого за 100%. Значения представлены как среднее ± SD. Каждая точка получена в шести независимых экспериментах.

Количество белков Lhcb1+Lhcb2 существенно уменьшалось при инкубации в условиях высокой интенсивности света по сравнению с листьями, инкубированными при низкой интенсивности. Однако такого уменьшения не наблюдалось, когда листья инкубировали в условиях высокой интенсивности света, но в присутствии каталазы. Более того, денситометрический анализ показал, что количество белков Lhcb3 и Lhcb6 изменялось схоже с количеством Lhcb1+Lhcb2 белков, в то время как таких отличий не наблюдалось в количестве белка Lhcb5. Как представлено выше, именно уменьшение в биосинтезе Lhcb1, Lhcb2, Lhcb 3 и Lhcb6 белков приводит к уменьшению размера антенны ФС2, но не Lhcb5 (Morosinotto et al., 2006). Также в качестве контроля была проанализирована полоса белка 33 кДа, которая соответствует субъединице ВОК. Никаких изменений в интенсивности этой полосы не наблюдалось при всех условиях инкубации.

Известно, что растения, выращенные в условиях высокой интенсивности света, в дополнение к уменьшенной антенне ФС2, имеют более высокое отношение ФС2/ФС1, большее количество кофакторов переноса электронов, Рубиско и АТФазы (Anderson, 1986). На рисунке 25 видно, что содержание АТФазы было значительно выше на высоком свету по сравнению с низким. И уменьшенное содержание пероксида водорода в листьях при инкубации с каталазой не влияло на количество АТФазы. Это означает, что уровень АТФазы регулируется с помощью сигнала отличного от пероксида водорода.

Для количественной оценки содержания Lhcb белков в листьях ячменя после 5-дневной инкубации в условиях низкой интенсивности света или высокой интенсивности света в отсутствие и присутствии каталазы проводили Вестерн-блот анализ с помощью специфичных антител, полученные результаты нормализовали на содержание корового белка CP47 (рис. 26 А, Б). Вестерн-блот анализ подтвердил, что в листьях содержится большее количество белков Lhcb3 и Lhcb6, когда листья освещали светом низкой интенсивности или светом высокой интенсивности, но в присутствии каталазы, однако их количество было ниже при освещении светом высокой интенсивности в отсутствие каталазы (рис. 26 Б). Никаких значительных изменения не наблюдалось в количестве белков Lhcb4 и Lhcb5, которые не участвуют в изменении размера антенны ФС2 на высоком свету (Ballottari *et al.*, 2007). Результаты, представленные здесь, показывают, что инкубация листьев ячменя при высокой интенсивности света, но в присутствии экзогенной каталазы, не вызывает адапционного уменьшения количества белков Lhcb1+2, Lhcb3 и Lhcb6.



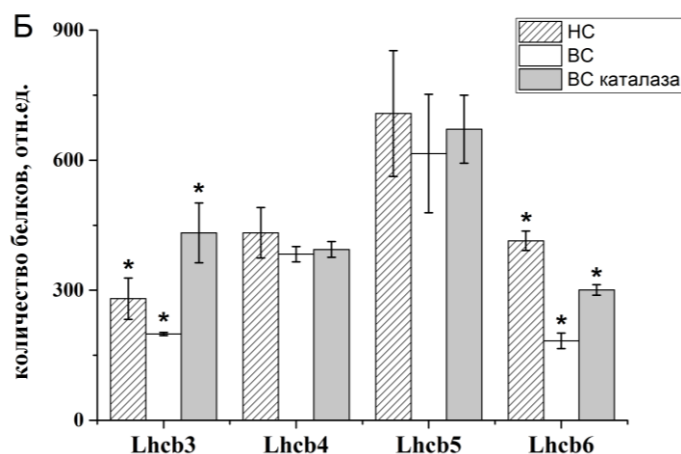


Рисунок 26. Вестерн-блот (А) и денситометрический анализ (Б) белков Lhcb3, Lhcb4, Lhcb5, Lhcb6 в тилакоидах, изолированных из листьев после 5 дней инкубации в условиях низкой интенсивности света (НС, 100 мкмоль квантов/м²с) или высокой интенсивности света (1000 мкмоль квантов/м²с) в отсутствие (ВС) или присутствии каталазы (ВС каталаза). Для каждой точки использованы четыре разведения. Значения представлены как среднее ± SD двух независимых экспериментов.

Таким образом, при уменьшении количества пероксида водорода в листьях, несмотря на высокий уровень восстановления ПХ-пула, в листьях ячменя не происходило уменьшения размера антенны ФС2 в условиях длительной повышенной освещенности растений.

3.4.2. Влияние увеличения количества пероксида водорода в листьях на размер антенны ФС2 при низкой интенсивности света

3.4.2.1. Условия, при которых происходит увеличение H₂O₂ в листьях при низкой интенсивности света

Отделенные листья ячменя инкубировали в течение 5 дней при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м²с) в отсутствие (контроль) или в присутствии экзогенного пероксида водорода (50 мМ или 100 мМ) в среде инкубации. Только небольшая часть H₂O₂ проникала в цитоплазму клеток и строму хлоропластов, так как при диффузии в листе H₂O₂ сталкивается с антиоксидантными системами, расположенными в различных тканях. Из таблицы 4 видно, что после 5 дневной инкубации листьев ячменя эффективный квантовый выход ФС2 был даже выше в присутствии 100 мМ H₂O₂, коэффициент НФТ (qN) был ниже в присутствии увеличенной концентрации пероксида водорода в среде

инкубации по сравнению с контрольными листьями.

Полученные результаты говорят об отсутствии негативного влияния пероксида водорода в выбранной концентрации на фотохимические процессы в ФС2. Более того, более высокое значение квантового выхода и более низкое значение qN в листьях, инкубированных в течении 5 дней в присутствии 100 мМ пероксида водорода, по сравнению с контрольными листьями, отражает протекание адаптационных изменений в фотосинтетическом аппарате листьев при добавке в инкубационную среду пероксида водорода.

Таблица 4. Влияние инкубации листьев ячменя в отсутствие и присутствии пероксида водорода в разных концентрациях в течении 5 дней при низкой интенсивности света на эффективный квантовый выход ФС2 (Y), коэффициент нефотохимического тушения (qN) и $Xл\ a/Xл\ b$ отношение. Значения представлены как среднее \pm SD. Количество хлорофиллов - в процентах от соответствующего содержания в контроле.

Добавки к среде инкубации	Y	qN	$Xл\ a/Xл\ b$	$Xл\ a, \%$	$Xл\ б, \%$	Содержание крахмала, нг/мл
-	0.65 ± 0.03	0.33 ± 0.04	2.9 ± 0.08	100	100	15 ± 6
50 мМ H_2O_2	0.67 ± 0.04	0.22 ± 0.09	3.0 ± 0.02	100	96	60 ± 12
100 мМ H_2O_2	0.72 ± 0.01	0.12 ± 0.02	3.4 ± 0.09	101	85	550 ± 29

Из таблицы 4 видно, что после 5 дней инкубации в присутствии пероксида водорода в листьях ячменя накапливается большее количество крахмала по сравнению с листьями, инкубированными в отсутствие пероксида водорода. Известно, что накопление крахмала в листьях происходит при высокой интенсивности света (Forde et al., 1975, Lichtenthaler et al., 1981), таким образом инкубация листьев в присутствии пероксида водорода имитирует, по крайней мере частично, условия высокой интенсивности света.

3.4.2.2. Содержание пероксида водорода и относительный уровень восстановления ПХ-пула в листьях при выбранных условиях

На рисунке 27 показаны изменения в содержании пероксида водорода в листьях ячменя в ходе инкубации при низкой интенсивности света в отсутствие и присутствии H_2O_2 в среде инкубации. Видно, что в ходе всей инкубации количество пероксида водорода

незначительно выше в листьях, инкубированных в присутствии 50 мМ H₂O₂, по сравнению с контрольными листьями. Инкубация листьев в присутствии 100 мМ H₂O₂ приводила к увеличению уровня пероксида водорода на 25% по сравнению с контрольными листьями на третий день и к двукратному увеличению уровня пероксида водорода на пятый день инкубации.

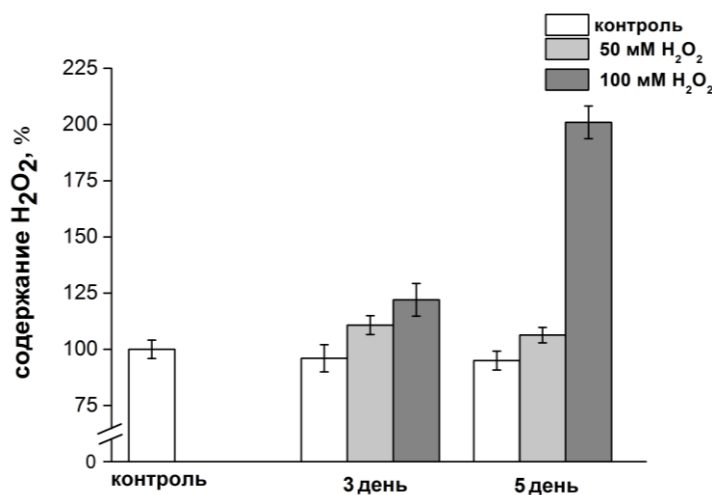


Рисунок 27. Количество пероксида водорода в листьях ячменя в течение 5 дней инкубации в отсутствие (НС) и присутствии H₂O₂ (50 мМ H₂O₂ и 100 мМ H₂O₂) в среде инкубации при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м²с). Значения представлены как средние ± SD. За 100% принято значение 0.346 мкмоль H₂O₂/г сырого веса (контрольное значение). 3 день: НС 50 мМ H₂O₂ vs НС: P < 0.1; НС 100 мМ H₂O₂ vs НС: P < 0.05; НС 100 мМ H₂O₂ vs НС 50 мМ H₂O₂: P < 0.5; 5 день: НС 50 мМ H₂O₂ vs НС: P < 0.5; НС 100 мМ H₂O₂ vs НС: P < 0.001; НС 100 мМ H₂O₂ vs НС 50 мМ H₂O₂: P < 0.001.

На пятый день инкубации содержание пероксида водорода в листьях, инкубированных в присутствии 100 мМ пероксида водорода, было схоже с количеством пероксида водорода в листьях, инкубированных при высокой интенсивности света (рис. 27 vs 22). Это подтверждает, что инкубация листьев при низкой интенсивности света в среде, содержащей 100 мМ пероксид водорода, имитирует накопление пероксида водорода в листьях при высокой интенсивности света. Поэтому выбранная для инкубации концентрация пероксида водорода является адекватной для исследования роли пероксида водорода в растениях дикого типа.

На рисунке 28 показаны значения относительного уровня восстановления ПХ-пула в листьях ячменя после 5 дней инкубации в отсутствие и присутствии пероксида водорода в среде инкубации при низкой интенсивности света. Более низкий уровень восстановления ПХ-пула наблюдался в листьях, инкубированных в присутствии 100 мМ H₂O₂, по

сравнению с листьями, инкубированными в контрольных условиях. Не было значительного отличия (согласно тесту Стьюдента) в восстановлении ПХ-пула в листьях, инкубированных в присутствии 50 мМ H_2O_2 , по сравнению с контролем. Более низкий уровень восстановления ПХ-пула после 5 дней инкубации в среде в присутствии 100 мМ пероксида водорода также, как и более высокое значение квантового выхода ФС2 при освещении (табл. 4), свидетельствуют об адаптационных изменениях, произошедших в фотосинтетическом аппарате.

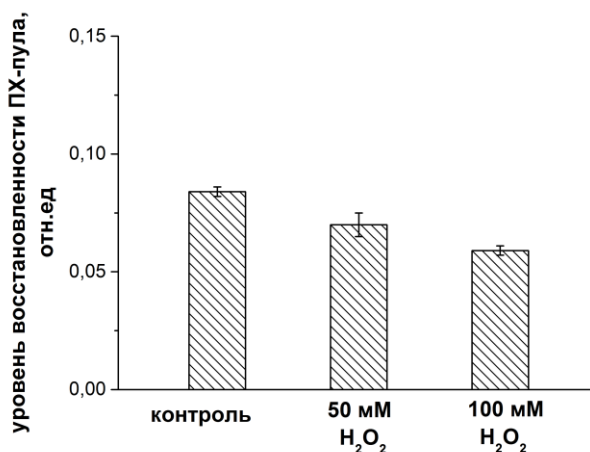


Рисунок 28. Относительный уровень восстановления ПХ-пула, измеренный после 5 дневной инкубации листьев ячменя в отсутствие и присутствии H_2O_2 при низкой интенсивности света ($100 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$). Интенсивность действующего света во время измерения $100 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$. Значения представлены как средние $\pm SE$. Контроль vs 100 мМ H_2O_2 : $P < 0.05$.

Таким образом, второй экспериментальный подход позволил увеличить количество пероксида водорода на фоне низкого уровня восстановления ПХ-пула в листьях при инкубации в условиях низкой интенсивности света.

3.4.2.3. Увеличение в содержании пероксида водорода при низкой интенсивности света приводит к уменьшению размера антенны ФС2

Отношение $X_l a / X_l b$ было несколько выше в листьях, инкубированных 5 дней в присутствии 50 мМ H_2O_2 по сравнению с контрольными листьями (Табл. 4). При использовании более высокой концентрации пероксида водорода (100 мМ) наблюдалось более высокое значение отношения $X_l a / X_l b$. Более того, отношение $X_l a / X_l b$ увеличивалось при инкубации в присутствии H_2O_2 за счет уменьшения содержания $X_l b$, в то время как количество $X_l a$ оставалось на постоянном уровне.

Для исследования влияния пероксида водорода на количество белков светособирающей антенны ФС2 проводили электрофоретическое разделение белков тилакоидных мембран в денатурирующих условиях. На рисунке 29 представлены результаты.

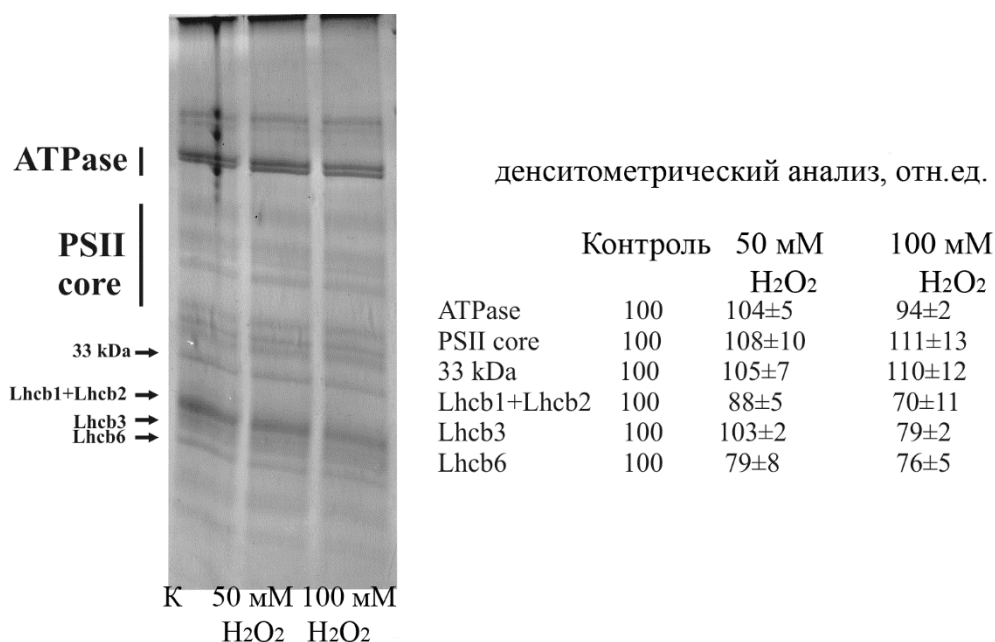


Рисунок 29. Денатурирующий электрофорез (слева) и результаты денситометрического анализа (справа) тилакоидных белков, изолированных из листьев ячменя после 5 дней инкубации в отсутствии (К, контроль) или присутствии пероксида водорода (50 мМ или 100 мМ H₂O₂) при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м²с). За 100% принято количество соответствующего белка в дорожке геля контрольного варианта.

Денситометрический анализ показал, что инкубация листьев в присутствии H₂O₂ влияет на количество Lhcb белков. Количество Lhcb1+Lhcb2 белков было ниже при инкубации с пероксидом водорода, чем в контрольных листьях. Количество белков Lhcb3 и Lhcb6 также уменьшалось при добавке H₂O₂. Интенсивность полосы, соответствующей 33 кДа белку, существенно не изменялась.

Меньшее количество Lhcb1 и Lhcb2 белков в листьях ячменя после 5-дневной инкубации в присутствии H₂O₂ было подтверждено с помощью Вестерн-блот анализа (рис. 30).

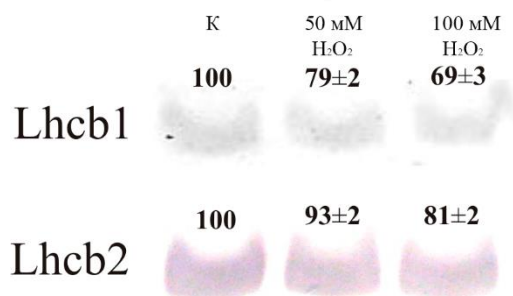


Рисунок 30. Вестерн-блот анализ белков Lhcb1 и Lhcb2 в тилакоидах, изолированных из листьев ячменя после 5 дней инкубации в отсутствие (К) и присутствии пероксида водорода в разных концентрациях (50 мМ H₂O₂ и 100 мМ H₂O₂) в инкубационной среде, при инкубации при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м²с). 2 мкг Хл помещали в каждый трек мини-геля. Оценку уровня белков проводили с помощью специфичных антител. Значения представлены как средние ±SD. За 100% принято количество белков в контрольном образце.

В главе 3.3 было показано, что при уменьшении размера антенны ФС2 при долговременной адаптации к свету высокой интенсивности происходит подавление экспрессии генов, кодирующих белки светособирающей антенны ФС2. Поэтому следующим этапом работы было проверено, влияет ли инкубация листьев ячменя в присутствии пероксида водорода при низкой интенсивности света на уровень экспрессии генов, кодирующих Lhcb белки (рис. 31).

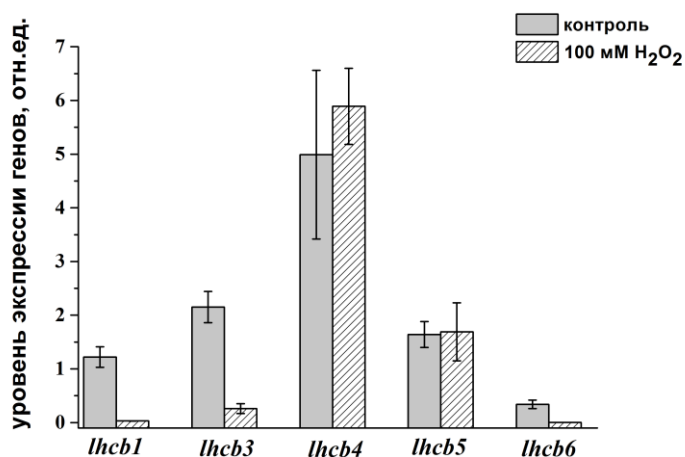


Рисунок 31. Количественный ПЦР анализ уровня экспрессии *lhcb1*, *lhcb2*, *lhcb3*, *lhcb4*, *lhcb5* и *lhcb6* генов в листьях ячменя после 5 дней инкубации при низкой интенсивности света (100 мкмоль квантов/м²с) в отсутствие (контроль) и присутствии 100 мМ пероксида водорода в среде инкубации. Значения представлены как среднее ±SD.

Из результатов количественного ПЦР анализа видно, что увеличение содержания пероксида водорода в листьях приводило к уменьшению в уровне мРНК *lhcb1*, *lhcb2*, *lhcb3* и *lhcb6* генов, в то время как не наблюдались изменения в уровне экспрессии генов *lhcb4*, *lhcb5* (рис. 31). Как было ранее показано в работе (Frigerio et al., 2007) уменьшение размера антенны ФС2 при долговременной адаптации растений дикого типа к повышенной освещенности происходит за счет подавления биосинтеза белков Lhcb1, Lhcb2, Lhcb3 и Lhcb6. При инкубации листьев ячменя в присутствии 100 мМ пероксида водорода происходило уменьшения уровня экспрессии генов, кодирующих именно эти белки, что подтверждает участие пероксида водорода в сигнальном пути, приводящему к уменьшению размера антенны ФС2.

Таким образом, увеличение количества пероксида водорода в листьях приводило к запуску адаптации и уменьшению размера антенны ФС2 при инкубации в условиях низкой интенсивности света.

3.5. СВЯЗЬ МЕЖДУ КОЛИЧЕСТВОМ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА В ЛИСТЯХ И ПРОТЕКАНИЕМ ПРОЦЕССА STATE TRANSITIONS

3.5.1. *Разработка экспериментального подхода для оценки протекания state transitions на целых листьях*

Существуют несколько экспериментальных подходов по измерению state transitions:

1) оценка фосфорилирования Lhcb белков. Оценка количества фосфорилированных Lhcb белков проводится с помощью использования специфических антител к фосфорилированным Lhcb белкам (P-Lhcb) или с помощью антител к фосфорилированному треонину. В зависимости от того, находятся ли белки антенны ФС2 в фосфорилированном или дефосфорилированном состоянии можно судить о том с какой из фотосистем связаны ЛНСII тримеры и, соответственно, о переходах из одного состояния в другое. Однако, в последних работах (Tikkanen et al., 2010, Mekala et al., 2015) показано, что степень фосфорилирования Lhcb белков не отражает протекание state transitions напрямую.

2) Измерение спектров низкотемпературной флуоресценции хлорофилла *a* обеих фотосистем. Известно, что переход из состояния 1 в состояние 2 приводит к увеличению соотношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 относительно темноты, а переход из состояния 2 в состояние 1 – возвращает к начальному уровню.

3) Измерение нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* ФС2

при комнатной температуре. Известно, что релаксация НФТ состоит из трех компонентов: энергозависимого компонента (qE), среднего по времени релаксации (qT или qM), и медленно релаксирующего компонента, связанного с фотоингибированием (qI) (Lichtenthaler et al., 2005). О природе среднего компонента до сих пор в литературе нет однозначного ответа. Ранее этот компонент связывали с протеканием state transitions, однако в работе (Nilkens et al., 2010) было показано, что основным процессом, вносящим вклад в развитие этого среднего компонента НФТ, может быть не state transitions, а обратный переход зеаксантина в виолоксантин. Кроме того, в работе (Cazzaniga et al., 2013) этот компонент связывали с расхождением хлоропластов к клеточной стенке во время освещения.

Целью нашей работы было подобрать такие условия измерения релаксации НФТ, при которых один из компонентов релаксации будет отражать state transitions.

3.5.1.1. Определение времени освещения актиничным светом, необходимого для достоверной оценки state transitions

Релаксация НФТ после освещения отражает релаксацию целого ряда светоиндуцированных процессов, в том числе и state transitions. Вклад различных компонентов может зависеть от времени освещения. В работе были использованы растения арабидопсиса дикого типа и мутантные растения с заблокированным синтезом STN7 киназы, а также листья ячменя, инкубированные в присутствии и отсутствие NaF, ингибитора фосфотаз.

Проводили измерение значений эффективного квантового выхода и qN (коэффициент НФТ) в ходе освещения в зависимости от времени при интенсивности действующего света $60 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$ (рис. 32).

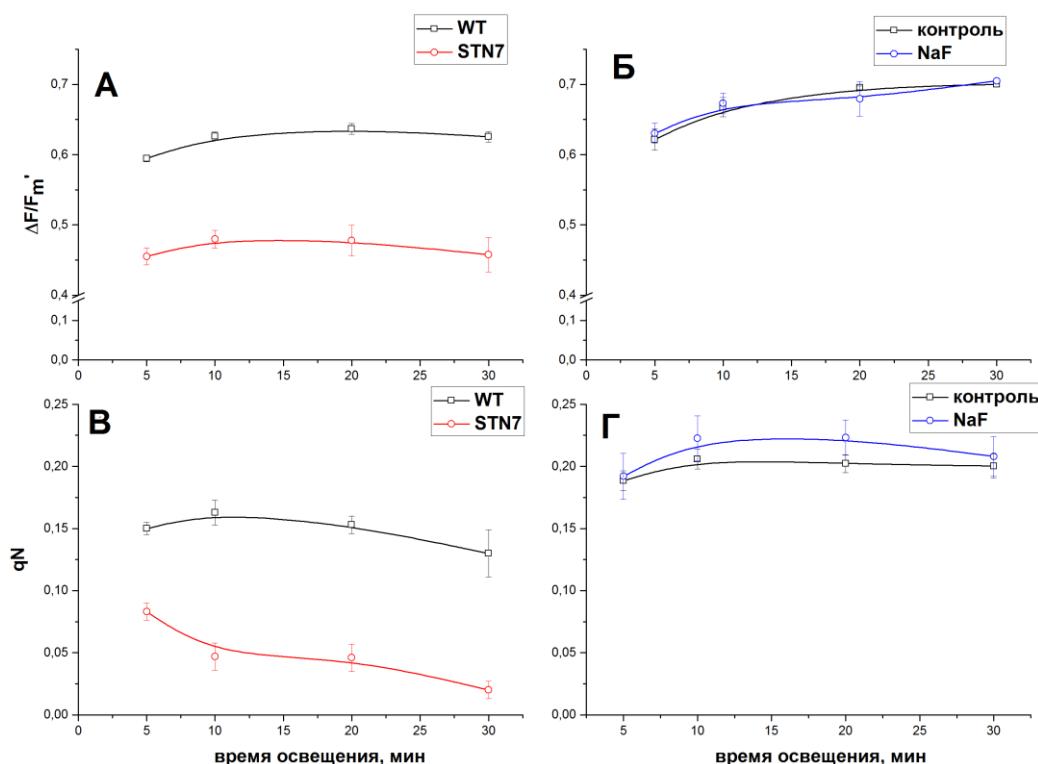


Рисунок 32. Зависимость эффективного квантового выхода ($\Delta F/F_m'$) и коэффициента нефотохимического тушения (qN) от времени освещения, измеренные на листьях арабидопсиса (А, В) дикого типа (WT, черные линии) и STN7 мутантных растений (STN7, красные линии), также как на листьях ячменя (Б, Г), инкубированных в отсутствие (контроль, черные линии) и в присутствии NaF (NaF, синие линии). Интенсивность действующего света при измерении 60 мкмоль квантов/ $m^2 \cdot c$.

Как видно из рисунка 32, значения эффективного квантового выхода и qN были схожи при инкубации листьев ячменя в отсутствие и присутствии NaF в отличие от растений арабидопсиса, в которых значения квантового выхода и qN были выше в растениях дикого типа по сравнению с мутантными растениями. Последний результат согласуется с (Wagner et al., 2008). В мутанте без STN7 киназы полностью отсутствует state transitions и значит во время освещения не происходит перехода из состояния 1 в состояние 2, чем и объясняются отличия в qN и квантовых выходах между мутантом и диким типом на свету. В то время как инкубация в присутствии NaF не блокирует переход на свету из состояния 1 в состояние 2, поэтому в присутствии и отсутствие NaF на свету значения $\Delta F/F_m'$ и qN не отличались.

Для оценки влияния продолжительности освещения на протекание state transitions проводили измерение релаксации НФТ на листьях арабидопсиса дикого типа и мутантных растениях после освещения светом низкой интенсивности в течении 5, 10 и 20 минут (рис. 33 А, Б и В, соответственно).

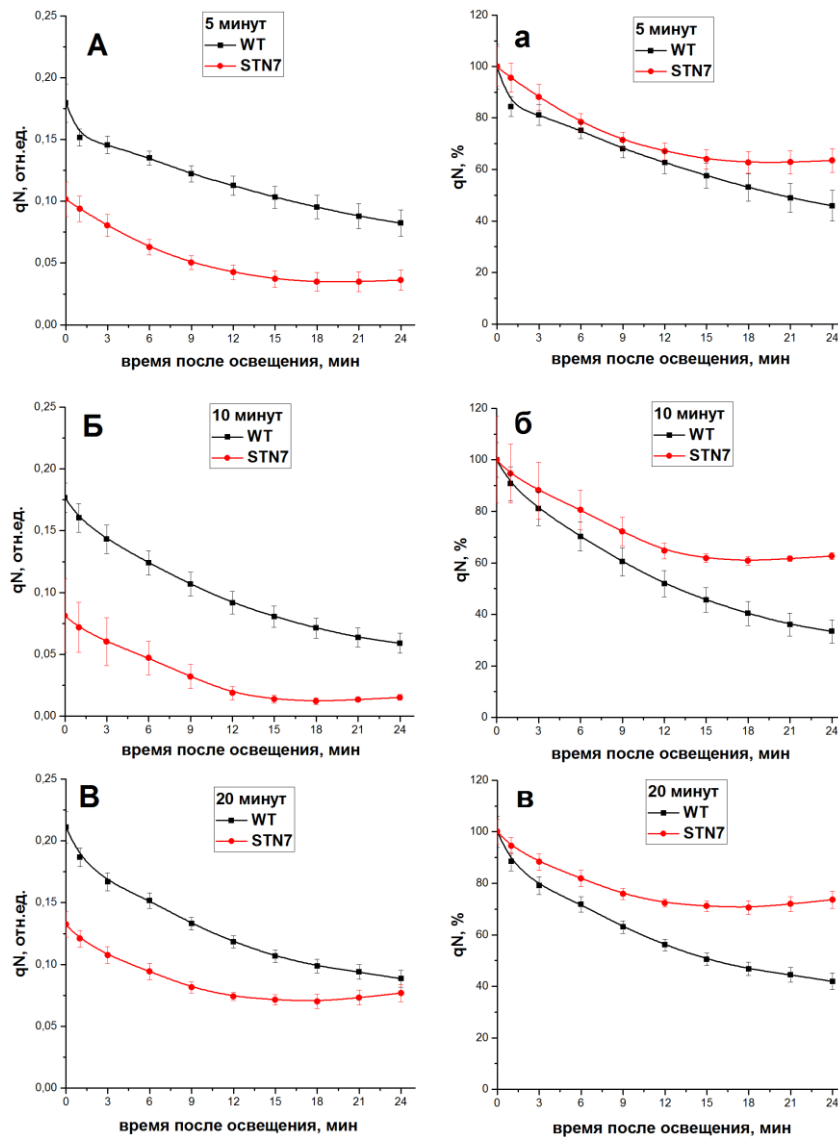


Рисунок 33. Кривые релаксации qN (левые рисунки), измеренные на листьях арабидопсиса дикого типа (черные линии) и *STN7* мутантных растениях (красные линии) после освещения в течении 5 минут (А), 10 минут (Б), 20 минут (В). Нормализованные кривые релаксации qN представлены на правых рисунках 5 минут (а), 10 минут (б), 20 минут (в). Интенсивность действующего света $60 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$. Результаты представлены как средние $\pm \text{SE}$.

Ход релаксации qN отличался у растений дикого типа и мутантных растениях: qN в мутантных растениях релаксировал примерно до 12-15 минуты в темноте, после чего достигал стационарного значения, в то время как в диком типе и после 12-15 минуты продолжалась релаксация. Плато в релаксации qN у мутантных растений достигалось в одно и тоже время, не зависимо от продолжительности предварительного освещения. Полученные результаты (рис 33 А, Б, В) были нормализованы, начальные точки релаксации qN мутантных растений и qN дикого типа были взяты за 100% (рис. 33 а, б, в).

В случае нормализованных кривых хорошо видно, что после 5 минут освещения разница в ходе релаксации между диким типом и мутантными растениями меньше, чем после 10 и 20 минут освещения. Это показывает, что 5 минут недостаточно для полного протекания и корректной оценки state transitions.

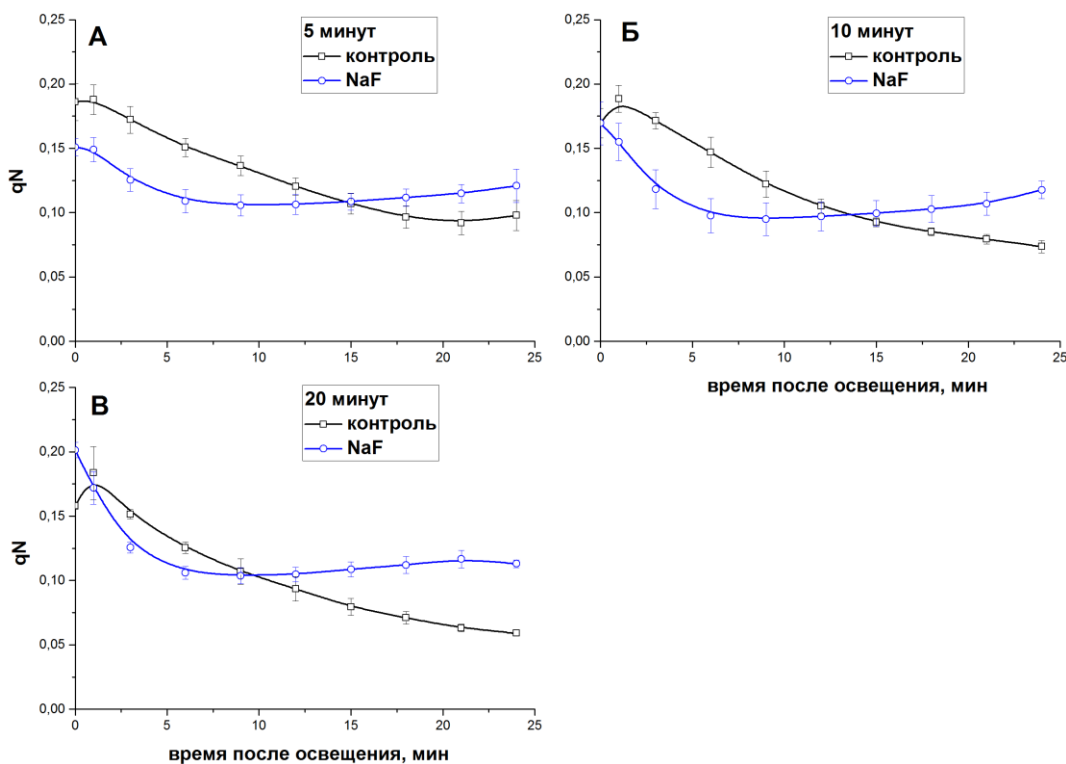


Рисунок 34. Кривые релаксации qN , измеренные на листьях ячменя в отсутствие (черные линии) и присутствии 15 мМ NaF (синие линии) после 5 минут (А), 10 минут (Б) и 20 минут (В) освещения. Интенсивность действующего света 60 мкмоль квантов/м²с. Результаты представлены как среднее \pm SE.

При измерении релаксации qN в листьях ячменя, инкубированных в присутствии и отсутствие NaF были получены похожие результаты, однако значение qN в листьях, инкубированных в присутствии NaF, достигало плато уже на 9 минуте в темноте, вне зависимости от продолжительности предварительного освещения (рис. 34).

Отличия, наблюдаемые в ходе кривых релаксации qN в отсутствие и присутствии NaF, были связаны с протеканием релаксации state transitions. Из рисунка 34 видно, что максимальные отличия в релаксации qN в листьях, инкубированных в присутствии и отсутствие NaF, наблюдались после 20 минут освещения, что отражает наибольший вклад state transitions в НФТ при этой продолжительности освещения.

Релаксация qN , связанная с возвращением антенны ФС2 из состояния 2 в состояние 1, обнаруживается в листьях ячменя уже на 9 минуте, в то время как в листьях

арабидопсиса релаксацию state transitions детектировали только на 15 минуте. Для того, чтобы проверить, является ли эта разница отличием между протеканием и релаксацией state transitions у двух разных видов растений или эта разница отражает результат разных подходов, нами была проведена инкубация листьев арабидопсиса дикого типа в присутствии и отсутствие NaF (рис. 35).

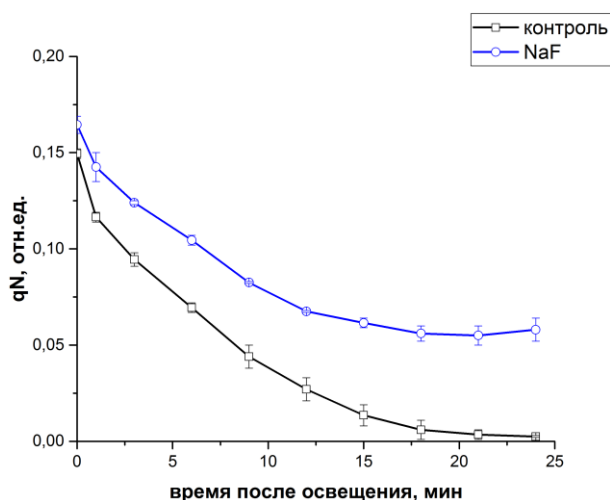


Рисунок 35. Кривые релаксации qN , измеренные на листьях арабидопсиса дикого типа после инкубации в отсутствие (контроль, черная линия) и в присутствии 15 мМ NaF (NaF, синяя линия). Интенсивность измерительного света 60 мкмоль квантов/м²с. Результаты представлены как средние \pm SE.

Значение qN в присутствии NaF в листьях арабидопсиса также достигало плато после 15 минут в темноте, показывая, что в этих двух видах растений релаксация процесса state transitions происходит в разное время.

С помощью двух отличных методов блокировки state transitions и при использовании двух разных видов растений было показано, что для корректной оценки протекания state transitions, а именно перехода из состояния 1 в состояние 2, необходимым временем освещения является 20 минут.

Для подтверждения полученных результатов проводили измерение спектров низкотемпературной флуоресценции для листьев ячменя и арабидопсиса дикого типа (рис. 36).

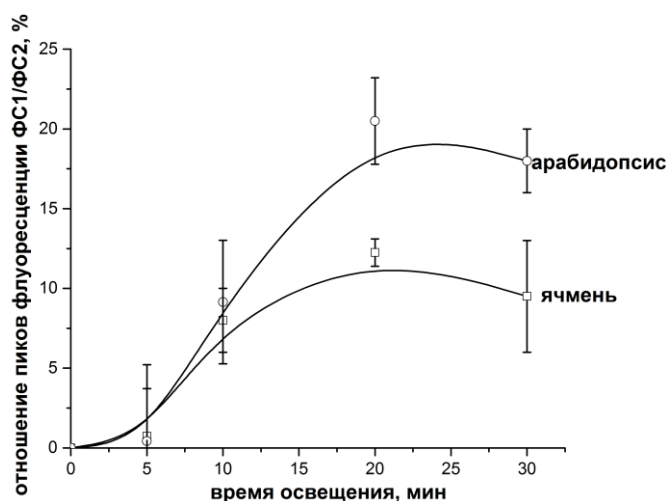


Рисунок 36. Зависимость отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 от времени освещения листьев арабидопсиса или ячменя. Интенсивность света 60 мкмоль квантов/м²с. Результаты представлены как средние ±SE.

На рисунке представлены светоиндуцированные изменения в отношении пиков флуоресценции ФС1/ФС2. Значения представлены в процентах относительно значения, измеренного на листьях, адаптированных к темноте. После 5 минут освещения и в листьях арабидопсиса и в листьях ячменя происходят незначительные изменения отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2, что говорит о незначительном протекании перехода из состояния 1 в состояние 2. Только после 20 минут освещения в обоих видах растений достигается наибольшее возрастание отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 по сравнению с темнотой. При дальнейшем увеличении времени освещения до 30 минут не происходило увеличения отношения флуоресценции ФС1/ФС2, что отражает полное протекание state transitions после 20 минут освещения.

В случае листьев арабидопсиса при измерении кривых релаксации НФТ при комнатной температуре для оценки протекания state transitions могло быть достаточно и 10 минут освещения, в то время как по результатам измерения спектров низкотемпературной флуоресценции оказалось, что необходимым является 20 минут освещения. Данное противоречие связано с методом измерения state transitions. При измерении кривых релаксации НФТ возможна оценка процесса отхода антенны от ФС2 (без связывания антенны с ФС1), для которого, видимо, может быть достаточно и 10 минут, в то время как при измерении низкотемпературной флуоресценции стабильные значения отражают и отход антенны от ФС2 и ее связывание с ФС1. Таким образом было показано, что для полного протекания state transitions (перехода из состояния 1 в состояние 2) необходимым временем освещения в обоих видах растений является 20 минут.

Интересно, что % изменения отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 в листьях ячменя оказался ниже по сравнению с арабидопсисом, что может отражать более высокую способность растений *Arabidopsis thaliana* к state transitions. Участие большего количества белков в state transitions в листьях арабидопсиса может объяснить более длительное время необходимое для релаксации qN , связанного со state transitions по сравнению с ячменем (15 минут vs 9 минут).

3.5.1.2. Определение влияния интенсивности актиничного света во время измерений на протекание state transitions

Используя описанный выше подход, проводили оценку протекания state transitions в листьях арабидопсиса и ячменя при разной интенсивности действующего света. На рисунке 37 представлены результаты измерения релаксации qN в листьях арабидопсиса после 20 минут освещения светом разной интенсивности.

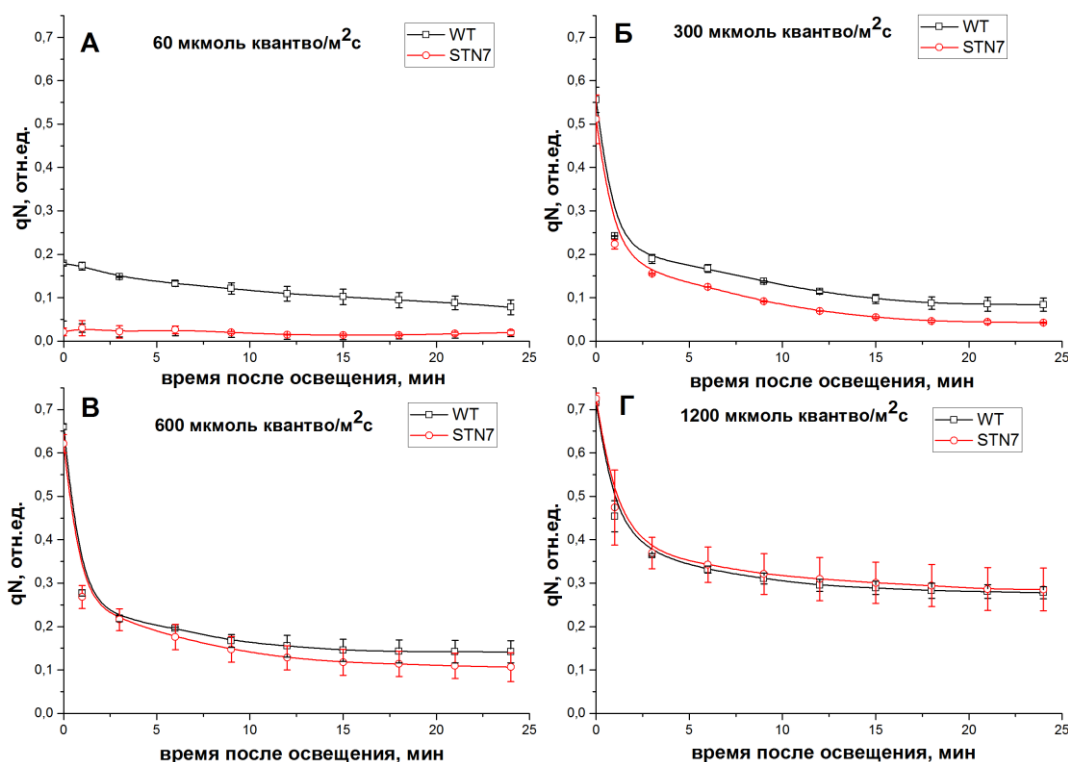


Рисунок 37. Кривые релаксации qN , измеренные на листьях арабидопсиса дикого типа (WT, черные линии) и STN7 мутантных растениях (красные линии) при различной интенсивности действующего света. А – 60 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$, Б – 300 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$, В – 600 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$, Г – 1200 $\mu\text{mol photons/m}^2\text{s}$.

Продолжительность освещения – 20 минут. Результаты представлены как средние \pm SE.

Из рисунка видно, что уже при интенсивности света 300 мкмоль квантов/м²с в растениях арабидопсиса дикого типа и STN7 мутантных растениях наблюдается практически одинаковый ход релаксации qN, что говорит о незначительном вкладе state transitions в НФТ или об экранировании вклада state transitions в НФТ другими процессами, происходящими при высокой интенсивности света. В то время как в листьях ячменя, инкубированных в присутствии и отсутствие NaF при этой же интенсивности света, наблюдается отличный ход кривых релаксации qN, также, как и при интенсивности 600 мкмоль квантов/м²с (рис. 38), что говорит о протекании state transitions в листьях ячменя при этих интенсивностях.

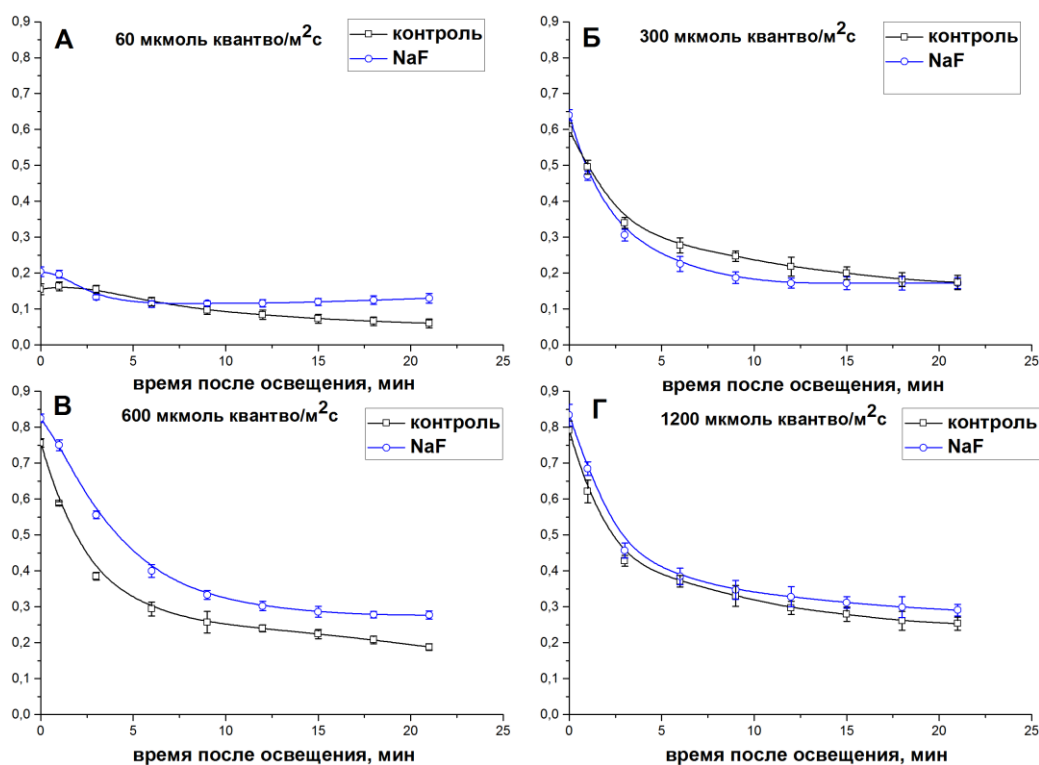


Рисунок 38. Кривые релаксации qN, измеренные на листьях ячменя в отсутствие (контроль, черные линии) и в присутствии NaF (NaF, синие линии) при разных интенсивностях действующего света. А – 60 мкмоль квантов/м²с, Б – 300 мкмоль квантов/м²с, В – 600 мкмоль квантов/м²с, Г – 1200 мкмоль квантов/м²с.

Продолжительность освещения – 20 минут. Результаты представлены как среднее ±SE.

Только при увеличении интенсивности света выше 600 мкмоль квантов/м²с в листьях ячменя, инкубированных в присутствии и отсутствие NaF наблюдается одинаковый ход релаксации qN и, следовательно, скорее всего отсутствие state transitions.

Считается, что state transitions происходит только при низкой интенсивности света (100–200 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹). Существуют непрямые свидетельства в пользу того, что при высокой интенсивности света state transitions не протекает, поскольку может

происходить ингибирование фермента киназы восстановленным на свету тиоредоксином (Lemeille and Rochaix, 2010). Однако полученные результаты показывают, что по-видимому, для разных видов растений существуют различные критические интенсивности света, при которых state transitions перестает происходить.

Влияние интенсивности света на протекание state transitions в листьях арабидопсиса и ячменя было также проверено с помощью измерения спектров низкотемпературной флуоресценции (рис. 39, 40).

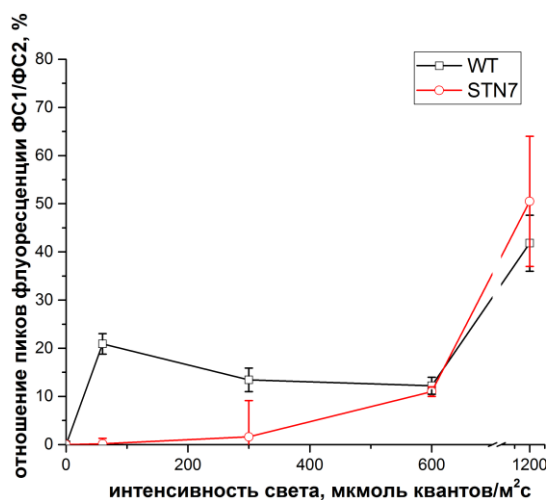


Рисунок 39. Зависимость отношения пиков флуоресценция ФС1/ФС2 от интенсивности света, измеренная на листьях арабидопсиса дикого типа (WT, черная линия) и STN7 мутантных растений (STN7, красная линия). Продолжительность освещения 20 минут. Результаты представлены как среднее \pm SE.

В растениях арабидопсиса дикого типа (рис 39.) при низкой интенсивности света (50-60 мкмоль квантов/м²с) происходило возрастание отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 относительно темнового значения, отражая протекание state transitions, в то время как у мутантных растений изменения в отношении пиков не наблюдались при этой интенсивности света. Дальнейшее увеличение интенсивности света до 300 мкмоль квантов/м²с приводило к снижению отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 по сравнению с отношением ФС1/ФС2 при низкой интенсивности света у растений дикого типа, свидетельствуя о замедлении протекания state transitions. Однако при интенсивности света 600 мкмоль квантов/м²с и более высоких наблюдались схожие изменения отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 в STN7 мутанте и диком типе, что говорит о том, что при этой интенсивности света изменения в отношении пиков не связаны с протеканием state transitions.

В листьях ячменя при интенсивностях света 50-60 мкмоль квантов/м²с, 300 мкмоль

квантов/м²с и 600 мкмоль квантов/м²с наблюдались одинаковые изменения отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2, что говорит об одинаковом протекании state transitions при всех выбранных интенсивностях света (рис. 40) и согласуется с данными, полученными при измерении релаксации qN.

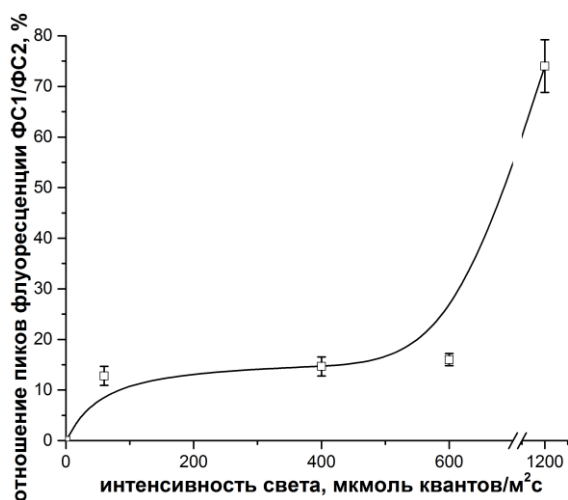


Рисунок 40. Зависимость отношения пиков флуоресценция ФС1/ФС2 от интенсивности света, измеренная на листьях ячменя. Продолжительность освещения 20 минут. Результаты представлены как среднее \pm SE.

Неожиданными оказались значительные изменения (от 40 до 70% по сравнению с темновыми значениями) отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2 при максимально используемой интенсивности света – 1200 мкмоль квантов/м²с и в листьях арабидопсиса (при этом одинаковые значения отношения пиков наблюдались в STN7 мутантных растениях и диком типе), и в листьях ячменя. Такие значительные изменения не могут быть связаны с протеканием state transitions, так как известно, что в высших растениях мигрировать может только 15-20% светособирающей антенны ФС2. Дополнительно, было исследовано влияние выдерживания листьев в течение 20 минут в темноте (для релаксации state transitions, если этот процесс произошел) после освещения светом низкой (60 мкмоль квантов/м²с) или высокой интенсивности (1200 мкмоль квантов/м²с) на отношение ФС1/ФС2 в листьях арабидопсиса (таблица 5).

Таблица 5. Изменения в отношении пиков флуоресценции ФС1/ФС2 в % относительно темнового значения, измеренные сразу после освещения светом низкой (60 мкмоль квантов/м²с) или высокой интенсивности (1200 мкмоль квантов/м²с) или после 20 минутной релаксации в темноте, следующей за освещением светом низкой или высокой интенсивности.

	Изменения в ФС1/ФС2 отношении, % (60 мкмоль квантов/м ² с)	Изменения в ФС1/ФС2 отношении, % (1200 мкмоль квантов/м ² с)
После освещения	18±1.1	35.9±2.5
После освещения и релаксации 20 минут	2.7±0.1	34.4±0.4

В листьях, которые освещали светом низкой интенсивности, после темновой релаксации, отношение пиков ФС1/ФС2 уменьшалось от 18% до 2.7%, т.е. практически до темнового значения, наблюдаемого до освещения. Этот результат говорит о том, что при низкой интенсивности света изменения в отношении пиков флуоресценции ФС1/ФС2 связаны с переходом из состояния 1 в состояние 2 и при 20 минутной адаптации в темноте после 20 минут освещения происходит релаксация процесса state transitions и возвращение из состояния 2 в состояние 1. После освещения светом высокой интенсивности в темноте 20 минут не происходило никакой релаксации и значение отношения ФС1/ФС2 оставалось на том же уровне, что и сразу после освещения. Полученные данные подтверждают предположение о том, что при высокой интенсивности света 1200 мкмоль квантов/м²с и в листьях арабидопсиса, и в листьях ячменя происходят изменения отношения пиков флуоресценции ФС1/ФС2, связанные не с протеканием state transitions, а скорее с процессом фотоингибирования или другими реорганизационными процессами в тилакоидной мембране.

Дополнительный параметр, по которому можно проследить протекание state transitions, а именно переход из состояния 1 в состояние 2, в листьях ячменя после освещения светом разной интенсивности - это оценка уровня фосфорилированного белка Lhcb1 (одного из белков, который участвует в state transitions). Для этого листья ячменя освещали светом разной интенсивности в течение 30-ти минут, освещение проводили в присутствии NaF для предотвращения возврата состояния 2 в состояние 1. После этого выделяли тилакоиды и проводили Вестерн-блот анализ (рис. 41).

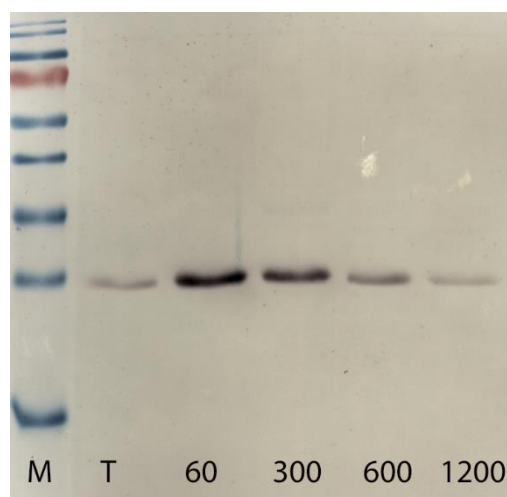


Рисунок 41. Вестерн-блот анализ с использованием тилакоидов, выделенных из листьев ячменя после 30 минут инкубации в темноте (Т) или при освещении светом интенсивностью 60 мкмоль квантов/м²с (60), 300 мкмоль квантов/м²с (300), 600 мкмоль квантов/м²с (600) и 1200 мкмоль квантов/м²с (1200). Метчик (М). В работе использовали антитела, специфичные к фосфорилированному белку Lhcb 1.

Из рисунка видно, что при всех интенсивностях света ниже 1200 мкмоль квантов/м²с в листьях ячменя накапливается значительное количество фосфорилированного белка Lhcb1, что согласуется с протеканием state transitions при этих интенсивностях света. В то время как при интенсивности света 1200 мкмоль квантов/м²с уровень фосфорилированного Lhcb1 белка соответствует таковому в листьях, адаптированных к темноте, что также согласуется с отсутствием state transitions при этой интенсивности света в листьях ячменя.

Таким образом, было показано, что в листьях арабидопсиса и ячменя увеличение интенсивности света по-разному влияет на протекание state transitions. В то время как у растений арабидопсиса наиболее полное протекание state transitions происходило при низкой интенсивности света (60 мкмоль квантов/м²с), у растений ячменя протекание state transitions происходило одинаково и при низкой и при высокой интенсивностях света (до 600 мкмоль квантов/м²с).

С помощью разработанного в данной главе подхода, на основании различий в кинетике релаксации НФТ между растениями дикого типа и мутантными растениями, нокаутированными по гену *stn7*, было установлено, что часть релаксации НФТ в растениях дикого типа отражает релаксацию процесса state transitions. Одним из ключевых факторов является продолжительность освещения листьев действующим светом не менее 20 минут, с последующими измерениями релаксации qN и оценкой вклада state transitions, начиная с

12-15 минуты до 24 минуты для растений арабидопсиса и с 9 минуты до 18-21 минуты для растений ячменя. Результат имеет важное фундаментальное значение, поскольку ранее при попытках оценить state transitions по релаксации НФТ использовали, преимущественно, пяти минутное освещение (Lichtenthaler et al., 2005).

3.5.2. *Влияние повышения интенсивности света во время выращивания растений A. thaliana на потенциальную возможность протекания процесса state transitions в листьях. Выявление связи между количеством пероксида водорода в листьях и протеканием state transitions в этих условиях.*

Растения, выросшие при низкой интенсивности света (60 мкмоль квантов/м²с), переносили в условия высокой интенсивности света (300 мкмоль квантов/м²с) на пять дней. Интенсивность 300 мкмоль квантов/м²с была выбрана в связи с тем, что это пограничная интенсивность света, при которой state transitions еще может происходить (см. главу 5.1), но при которой уже запускается долговременная адаптация растений дикого типа к высокой интенсивности света, связанная с уменьшением размера антенны ФС2 (см. главы 3.3).

В качестве подхода для проверки произошло ли уменьшение размера антенны ФС2 в ходе долговременной адаптации к повышенной освещенности не только в растениях дикого типа, но и STN7 мутантных растениях, проводили измерение ОЖР-кинетик на листьях этих растений до переноса в условия высокой интенсивности света и через 5 дней нахождения в условиях повышенной освещенности (табл.6).

Таблица 6. Влияние повышенной освещенности растений дикого типа и STN7 мутантных растениях на флуоресцентные параметры, рассчитанные на основе индукционных кривых ОЖР-кинетик. Дикий тип контроль, STN7 контроль – растения дикого типа и STN7 мутантные растения до переноса в условия высокой интенсивности света; дикий тип 5 день, STN7 5 день – растения дикого типа и STN7 мутантные растения через 5 дней в условиях повышенной освещенности (300 мкмоль квантов/м²с); Fv/Fm – максимальный квантовый выход флуоресценции.

Флуоресцентные параметры	Дикий тип контроль	STN7 контроль	Дикий тип 5 день	STN7 5 день
Fv/Fm	0.778±0.002	0.770±0,004	0.765±0,005	0.591±0,02
Видимый размер	1.92±0,02	1.98±0,03	1.76±0,02	2.09±0,12

антенны ФС2				
Поток электронов от Qa к Qb в расчете на РЦ ФС2	1,06±0,01	1,04±0,01	1,03±0,05	0,68±0,03
Поток электронов к конечным акцепторам ФС1 в расчете на РЦ ФС2	0,44±0,02	0,50±0,03	0,51±0,03	0,24±0,03

Из таблицы видно, что через 5 дней нахождения в условиях повышенной освещенности в растениях дикого типа происходило достоверное уменьшение величины параметра, пропорционального размеру антенны ФС2 (видимый размер антенны ФС2), что говорит об уменьшении размера антенны ФС2. Благодаря возможности адаптироваться к новым условиям в растениях дикого типа наблюдаются значения измеренных параметров, отражающих функционирование электронного транспорта, близкие к контрольным значениям до начала адаптации, что согласуется с данными, представленными в работе (Borisova-Mubarakshina et al., 2014). В то время как в листьях мутантных растений без STN7 киназы не происходит уменьшения размера антенны, согласно данным представленным в таблице 6, что приводит дисбалансу в работе фотосинтетического аппарата и отражается на более низких скоростях транспорта электронов, как в ФС2, так и к конечным акцепторам ФС1. Таким образом, было получено подтверждение того, что в мутантных растениях без STN7 киназы не происходит адаптации к повышенной освещенности за счет уменьшения размера антенны, что согласуется с литературными данными (Tikkanen et al., 2006).

В дальнейшем, на основании различий в кинетике релаксации НФТ (qN) после 20 минутного освещения светом низкой интенсивности (60 мкмоль квантов\м²с) между растениями дикого типа и мутантными растениями, нокаутированными по гену *stn7*, были проведены эксперименты для выявления потенциально возможного протекания state transitions в листьях этих растений в нулевой день, первый и пятый дни в условиях высокой интенсивности света (рис. 42).

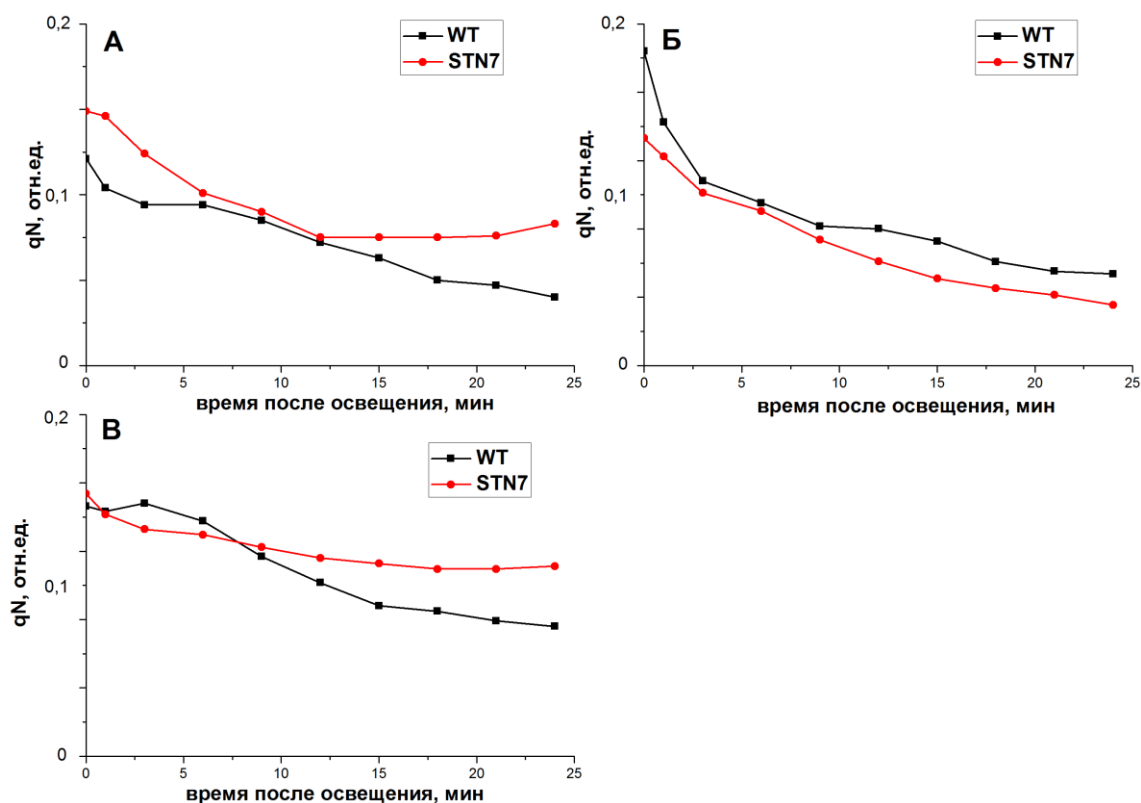


Рисунок 42. Кривые релаксации qN , измеренные на листьях арабидопсиса дикого типа (WT, черные линии) и мутантных растениях без STN7 киназы (STN7, красные линии). А – измерения проводили до переноса растений в условия высокой интенсивности света, Б – через один день после переноса растений в условия высокой интенсивности света ($300 \text{ мкмоль квантов/м}^2\text{с}$), В – через 5 дней после переноса в условия высокой интенсивности света.

На рисунке 42 видно, что через один день после переноса растений в условия высокой интенсивности света (но измерения проводились при низкой интенсивности света, см. пункт 5.1) наблюдается одинаковый ход релаксации qN в листьях STN7 мутантных растений и растений дикого типа. Через 5 дней адаптации к условиям высокой интенсивности света, как и до переноса растений в условия высокой интенсивности света (нулевой день), между мутантными растениями и растениями дикого типа наблюдаются отличия в ходе релаксации qN .

Количество пероксида водорода в листьях арабидопсиса дикого типа и STN7 мутантных растениях также оценивали в ходе пятидневного освещения растений светом высокой интенсивности (рис. 43).

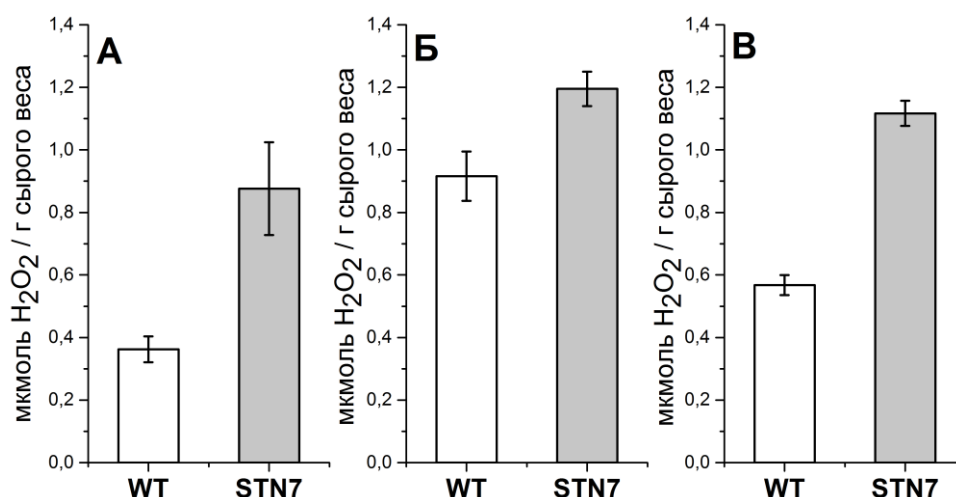


Рисунок 43. Количество пероксида водорода в листьях арабидопсиса дикого типа (WT, белые столбики) и STN7 мутантных растениях (STN7, серые столбики). А – измерения проводили до переноса растений в условия высокой интенсивности света, Б – через один день после переноса растений в условия высокой интенсивности света (400 мкмоль квантов/м²с), В – через 5 дней после переноса в условия высокой интенсивности света.

Через 1 день после переноса растений в условия высокой интенсивности света наблюдалось значительное увеличение количества пероксида водорода в листьях дикого типа, которое затем снижалось к 5-му дню. В первый день увеличение количества пероксида водорода, является сигналом для адаптации фотосинтетического аппарата к увеличению интенсивности света (глава 3.4), а к пятому дню количество пероксида водорода снижается из-за произошедших адаптационных изменений и оптимизации работы фотосинтетической электрон-транспортной цепи. В мутантных растениях с заблокированным синтезом STN7 киназы не было достоверных изменений в количестве пероксида водорода в ходе всего периода нахождения при высокой интенсивности света.

Также проводили оценку количества фосфорилированного белка Lhcb1 с помощью вестерн-блот анализа (рис. 44).

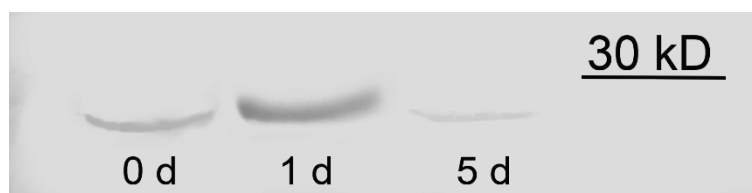


Рисунок 44. Вестерн-блот анализ фосфорилированного Lhcb1 тилакоидных мембран, выделенных до переноса в условия высокой интенсивности света (0d), через 1 (1d) и 5 дней (5d) после переноса в условия высокой интенсивности света (300 мкмоль квантов/м²с).

Из рисунка видно, что количество фосфорилированного Lhcb1 белка накапливается в 1 день адаптации растений к условиям высокой интенсивности света. Возможно, что накопление фосфорилированных белков в тилакоидной мембране может быть сигналом к переходу от кратковременной адаптации (state transitions) к долговременной адаптации (уменьшению размера антенны ФС2).

Для оценки прямого влияния пероксида водорода на уровень фосфорилирования белка Lhcb1 проводили вестерн-блот анализ, используя тилакоиды, выделенные из листьев ячменя после часовой инкубации в присутствии NaF в темноте и при освещении (50 мкмоль квантов/м²с) в присутствии и отсутствии 100 мМ H₂O₂ в среде инкубации (рис. 45). Из рисунка видно, что инкубация листьев в присутствии H₂O₂ на свету приводит к большему накоплению фосфорилированного Lhcb1 белка, чем в отсутствие пероксида водорода при тех же условиях освещения. Следовательно, показано, что увеличение количества пероксида водорода в листьях приводит к повышенному уровню фосфорилированных белков.

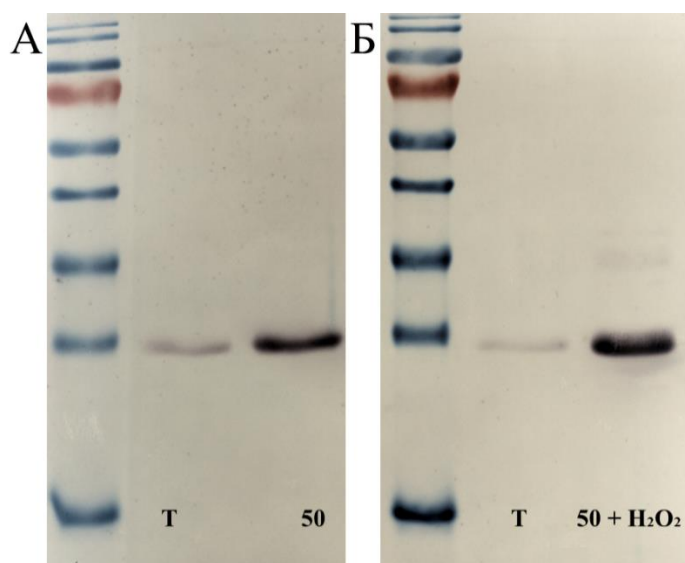


Рисунок 45. Вестерн-блот анализ с использованием тилакоидов, выделенных из листьев ячменя после часовой инкубации в отсутствие (А) и присутствии (Б) H₂O₂. После инкубации в темноте (Т) и при освещении светом интенсивностью 50 мкмоль квантов/м²с в присутствии и отсутствии 100 мМ H₂O₂. Все инкубации проводили в присутствии NaF. В работе использовали антитела, специфичные к фосфорилированному белку Lhcb 1.

Таким образом, в ходе работы нами получены принципиально новые данные о регуляции процесса state transitions при изменении уровня освещенности растений, а именно после переноса растений, выращенных при низком уровне освещенности, в

условия повышенной освещенности. Высокое содержание фосфорилированного Lhcb1 белка (фосфорилирование которого осуществляет STN7 киназа) через один день в условиях повышенной освещенности свидетельствует о том, что переход состояния 1 в состояние 2 все-таки произошел, однако, релаксация состояния 2 в состояние 1, по-видимому, не происходит (рис. 42 Б), и растения остаются «заблокированными» в состоянии 2 из-за повышенного содержания H_2O_2 в листьях (рис. 43Б). Данное предположение согласуется с увеличением накопления фосфорилированного белка Lhcb1 при увеличении количества пероксида водорода в листе (рис. 45). Одинаковый ход релаксации qN у мутантных растений и растений дикого типа при измерении в первый день свидетельствует о вкладе каких-то других процессов в НФТ в этот день, схожих у обоих типов растений.

Адаптация фотосинтетического аппарата к повышенной освещенности заключается, в том числе, в уменьшении размера антенны ФС2, которое происходит в течение первых 24 – 72 часов пребывания растений в условиях высокой освещенности (главы 3.3; 3.4). Уменьшение размера антенны происходит посредством подавления биосинтеза белков антенны ФС2, в частности, Lhcb1 и Lhcb2. Нами было установлено, что после пяти дней пребывания растений в условиях повышенной освещенности, т.е. после того, как адаптационное уменьшение размера антенны ФС2 произошло, релаксация НФТ, связанная с релаксацией состояния 2 в состояние 1 в темноте, снова может наблюдаться (рис. 42Б), что говорит о возможности полноценного протекания state transitions.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Воздействие стрессовых условий на растения приводит к накоплению в клетках активных форм кислорода (АФК), которые являются окислителями компонентов клеток и тканей, а также липидов и белков мембран. Однако в настоящее время является общепринятым, что АФК, в частности H_2O_2 , на начальных этапах стрессового воздействия играют роль как первичных, так и вторичных сигнальных молекул, вызывающих изменения в метаболизме растительных клеток. В результате запускается каскад сигнальных путей, необходимых для адаптации растений к новым условиям.

Известно, что окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула играет ключевую роль в иницировании адаптаций, осуществляемой посредством изменений в функционировании светособирающих комплексов, таких как: механизм кратковременной адаптации, *state transitions*, который заключается в миграции части светособирающей антенны фотосистемы 2 между фотосистемой 2 и фотосистемой 1, и механизм долговременной адаптации, при которой происходит уменьшение размера антенны фотосистемы 2 за счет подавления биосинтеза периферических белков антенны – Lhcb белков.

В ходе диссертационной работы было показано, что не только окислительно-восстановительное состояние ПХ-пула ответственно за регуляцию размера антенны ФС2 при долговременной адаптации к условиям освещения, но и H_2O_2 вовлечен в адаптацию фотосинтетического аппарата к высокой интенсивности света (глава 3.4).

H_2O_2 , как было установлено, образуется внутри тилакоидной мембраны в достаточном количестве при высокой интенсивности света даже в присутствии эффективного акцептора электронов, при скоростях электронного транспорта близких к физиологическим (глава 3.1). Также было показано, что образование H_2O_2 происходит в результате реакции восстановленного пластохинона, пластогидрохинона, с супероксидным радикалом (глава 3.2). Возрастание образования H_2O_2 на высоком свете связано не только с увеличением количества пластогидрохинона в ПХ-пуле, но и с увеличением продукции супероксидного радикала внутри мембраны компонентами ФС1 (Mubarakshina and Ivanov, 2010; Ivanov and Kozuleva, 2016). Можно предположить, что именно H_2O_2 , образованный при участии компонентов ПХ-пула, участвует в адаптационном ответе на изменения в условиях освещенности.

Lhcb белки кодируются в ядерном геноме (Jansson, 1999), поэтому регуляция уровня экспрессии этих генов при долговременной адаптации должна осуществляться через путь передачи сигнала хлоропласт-ядро. H_2O_2 , как сигнал иницирующий

изменения экспрессии генов, способен запускать путь передачи сигнала от хлоропласта в ядро через МАП киназный сигнальный путь. STN7 киназа, которая инициирует state transitions, также играет роль в долговременной адаптации к высокой интенсивности света (Tikkanen et al., 2006; Pesaresi et al., 2009). Кроме того, L-тример светособирающей антенны ФС2, регулирование биосинтеза белков которого вовлечено в процесс долговременной адаптации, является «подвижным» L-тримером, который задействован в state transitions (Galka et al., 2012; Hofmann, 2012). По-видимому, фосфорилирование Lhcb белков L-тримера, необходимое для процесса state transitions, также играет важную роль и в долговременной адаптации к условиям высокой освещенности (глава 3.5).

На основании всех данных, полученных в работе, нами предложена следующая схема участия H_2O_2 в адаптации фотосинтетического аппарата к изменениям в условиях освещения (рис. 44).

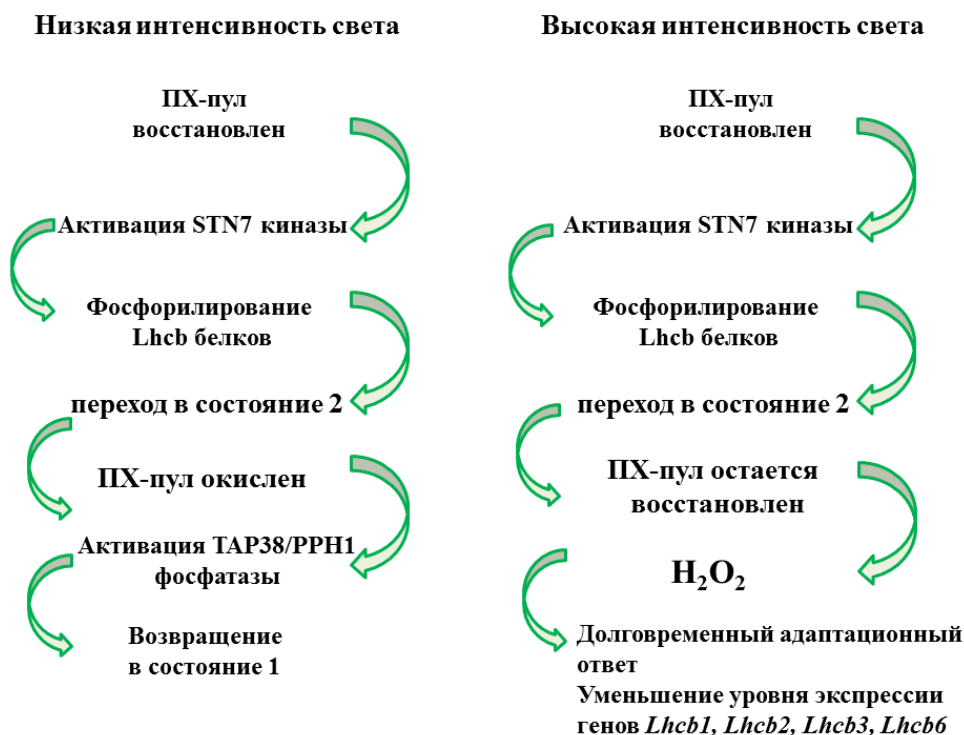


Рисунок 46. Предполагаемая схема участия пероксида водорода в адаптации фотосинтетического аппарата к изменению условий освещения.

При освещении адаптированных к темноте растений светом низкой интенсивности увеличивается уровень восстановления ПХ-пула, и происходит активация каталитического домена STN7 киназы при связывании киназы с пластогидрохинон-окисляющим сайтом цитохромного b6/f комплекса. Киназа фосфорилирует Lhcb белки L-тримера, что приводит

к миграции L-тримера от ФС2 к ФС1 и переходу в состояние 2. Уменьшение размера антенны ФС2 и увеличение размера антенны ФС1 приводит к оптимизации работы двух фотосистем и окислению ПХ-пула. Окисление ПХ-пула, в свою очередь, приводит к дефосфорилированию белков L-тримера с помощью TAP38/PPH1 фосфатазы и возвращению в состояние 1.

В случае высокой интенсивности света, при которой state transitions еще происходит, активация киназы и переход L-тримера от ФС2 к ФС1 не приводит снижению степени восстановления ПХ-пула. Поддержание высокой степени восстановления ПХ-пула приводит к накоплению пероксида водорода в тилакоидной мембране. Можно предположить, что механизм участия пероксида водорода в иницировании сигнального пути в этом случае заключается в окислении цистеиновых остатков STN7 киназы. Известно, что цистеиновые остатки большого числа ферментов (Calvo *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2000), в том числе и киназ (Chen *et al.*, 2001; Guyton *et al.*, 1996), являются основным местом действия пероксида водорода в биологических системах (Richter and Grimm, 2013; Sejudo *et al.*, 2014). Возможность влияния пероксида водорода на STN7 киназу предполагалась ранее (Vetoshkina *et al.*, 2015; Khorobrykh *et al.*, 2015; Roach *et al.*, 2015). Окисление цистеиновых остатков STN7 киназы пероксидом водорода запускает сигнальный каскад, который, возможно, приводит к активации сенсор-киназы CSK, которая также играет важную роль в адапционных сигнальных путях (Puthiyaveetil *et al.*, 2008). При этом, по-видимому, фосфатаза не активируется, так как ПХ-пул находится в восстановленном состоянии, и это приводит к накоплению фосфорилированных белков Lhcb1 и Lhcb2 в большом количестве. Накопление фосфорилированных белков служит сигналом для запуска долговременной адаптации, в результате которой происходит уменьшение уровня экспрессии *lhcb* генов. Уменьшение уровня экспрессии генов, кодирующих Lhcb белки, приводит к уменьшению размера антенны ФС2 и оптимизации работы фотосинтетического аппарата в новых условиях высокой интенсивности света.

Таким образом, на основе полученных данных нами было показано, что H₂O₂ вовлечен и в механизм долговременной адаптации, и в механизм кратковременной адаптации к условиям освещения. Увеличение количества пероксида водорода в листьях приводит к ингибированию перехода из состояния 2 (L-тример связан с ФС1) в состояние 1 (L-тример связан с ФС2), что ведет к запуску адапционного механизма, связанного с подавлением биосинтеза белков антенны ФС2 и, как следствие, к уменьшению размера антенны ФС2.

ВЫВОДЫ

11. Найдено, что образование H_2O_2 внутри тилакоидной мембраны изолированных тилакоидов происходит при скоростях электронного транспорта близких к физиологическим, и получены свидетельства, что H_2O_2 в этом случае образуется в реакции между супероксидным радикалом и пластогидрохиноном.

2. Показано, что уменьшение размера антенны фотосистемы 2, происходящее путем подавления биосинтеза белков внешней антенны, при адаптации растений к долговременной повышенной освещенности коррелирует с уменьшением транскрипции генов этих белков.

3. Установлено, что нахождение растений в условиях долговременной повышенной освещенности при экспериментальном снижении содержания H_2O_2 в листьях предотвращает адаптационное уменьшение размера антенны фотосистемы 2 даже при высоком уровне восстановления пула пластохинона. В то же время, при низкой освещенности растений экспериментальное увеличение содержания H_2O_2 в листьях приводит к уменьшению размера антенны фотосистемы 2 при низком уровне восстановления пула пластохинона.

4. Разработан экспериментальный подход оценки протекания процесса *state transitions* в листьях: на основании различий в кинетике релаксации нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла *a* в растениях арабидопсиса дикого типа и мутантных растениях, нокаутированных по гену *stn7*, а также в растениях ячменя, инкубированных в присутствии и в отсутствие NaF, выявлена часть релаксации этого тушения, которая отражает *state transitions*. Установлено, что для выявления процесса *state transitions* продолжительность освещения листьев действующим светом должна составлять не менее 20 минут, что принципиально важно, поскольку ранее для выяснения наличия или отсутствия этого процесса использовали, преимущественно, 5-ти минутное освещение.

5. Было показано, что в листьях арабидопсиса и ячменя увеличение интенсивности действующего света по-разному влияет на протекание *state transitions*: у растений арабидопсиса полное протекание *state transitions* происходило при низкой интенсивности света (60 мкмоль квантов/м²с), а у растений ячменя - одинаково при низкой и при высокой интенсивностях света (до 600 мкмоль квантов/м²с).

6. Найдено, что при адаптации растений к долговременной повышенной освещенности процесс *state transitions* не происходит в начальный период адаптации (в 1-ый день), и вновь может наблюдаться через 5 дней адаптации; при этом отсутствие *state transitions* коррелирует с повышенным содержанием H_2O_2 в листьях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutteri, R., & Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase. *Nature*, 370, 25.
2. Adamiec, M., Drath, M., & Jackowski, G. (2008). Redox state of plastoquinone pool regulates expression of *Arabidopsis thaliana* genes in response to elevated irradiance. *Acta biochimica polonica-english edition*, 55(1), 161.
3. Ahn, T. K., Avenson, T. J., Ballottari, M., Cheng, Y. C., Niyogi, K. K., Bassi, R., & Fleming, G. R. (2008). Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein. *Science*, 320(5877), 794-797.
4. Allen, J. F., & Hall, D. O. (1973). Superoxide reduction as a mechanism of ascorbate-stimulated oxygen uptake by isolated chloroplasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 52(3), 856-862.
5. Allen, J. F., Bennett, J., Steinback, K. E., & Arntzen, C. (1981). Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature*, 291(5810), 25-29.
6. van Amerongen, H., & Dekker, J. P. (2003). Light-harvesting in photosystem II. In *Light-harvesting antennas in photosynthesis*, 219-251. Springer Netherlands.
7. Amunts, A., Drory, O., & Nelson, N. (2007). The structure of a plant photosystem I supercomplex at 3.4 Å resolution. *Nature*, 447(7140), 58-63.
8. Amunts, A., Toporik, H., Borovikova, A., & Nelson, N. (2010). Structure determination and improved model of plant photosystem I. *Journal of Biological Chemistry*, 285(5), 3478-3486.
9. Ananyev, G., Renger, G., Wacker, U., & Klimov, V. (1994). The photoproduction of superoxide radicals and the superoxide dismutase activity of Photosystem II. The possible involvement of cytochrome b559. *Photosynthesis Research*, 41(2), 327-338.
10. Andersen, B., Scheller, H. V., & Møller, B. L. (1992). The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase. *FEBS letters*, 311(2), 169-173.
11. Andersson, B., & Anderson, J. M. (1980). Lateral heterogeneity in the distribution of chlorophyll-protein complexes of the thylakoid membranes of spinach chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 593(2), 427-440.
12. Anderson, J. M. (1986). Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 93-136.
13. Asada, K., Kiso, K., & Yoshikawa, K. (1974). Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination. *Journal of Biological Chemistry*, 249(7), 2175-2181.

14. Asada, K., Foyer, C. H., & Mullineaux, P. M. (1994). Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, 77-104.
15. Asada, K. (2000). The water–water cycle as alternative photon and electron sinks. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 355(1402), 1419-1431.
16. Avenson, T. J., Kanazawa, A., Cruz, J. A., Takizawa, K., Ettinger, W. E., & Kramer, D. M. (2005). Integrating the proton circuit into photosynthesis: progress and challenges. *Plant, Cell & Environment*, 28(1), 97-109.
17. Badger, M. R. (1985). Photosynthetic oxygen exchange. *Annual Review of Plant Physiology*, 36(1), 27-53.
18. Baier, M., & Dietz, K. J. (2005). Chloroplasts as source and target of cellular redox regulation: a discussion on chloroplast redox signals in the context of plant physiology. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1449-1462.
19. Baker, N. R., & Ort, D. R. (1992). Light and crop photosynthetic performance. *Topics in photosynthesis*, 12, 289-312.
20. Ballottari, M., Govoni, C., Caffarri, S., & Morosinotto, T. (2004). Stoichiometry of LHCI antenna polypeptides and characterization of gap and linker pigments in higher plants Photosystem I. *European Journal of Biochemistry*, 271(23-24), 4659-4665.
21. Ballottari, M., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., & Bassi, R. (2007). Contrasting behavior of higher plant photosystem I and II antenna systems during acclimation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(12), 8947-8958.
22. Baniulis, D., Yamashita, E., Zhang, H., Hasan, S. S., & Cramer, W. A. (2008). Structure–function of the cytochrome b6f complex. *Photochemistry and photobiology*, 84(6), 1349-1358.
23. Bassi, R., Peruffo, A. D. B., Barbato, R., & Ghisi, R. (1985). Differences in chlorophyll-protein complexes and composition of polypeptides between thylakoids from bundle sheaths and mesophyll cells in maize. *European journal of biochemistry*, 146(3), 589-595.
24. Bassi, R., Giacometti, G. M., & Simpson, D. J. (1988). Changes in the organization of stroma membranes induced by in vivo state 1-state 2 transition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 935(2), 152-165.
25. Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P., & Marquardt, J. (1993). Carotenoid-binding proteins of photosystem II. *European journal of biochemistry/FEBS*, 212(2), 297.
26. Bekker, A., Holland, H. D., Wang, P. L., Rumble, D. I. I., Stein, H. J., Hannah, J. L., Coetzee L. L. & Beukes, N. J. (2004). Dating the rise of atmospheric oxygen. *Nature*, 427(6970), 117-120.
27. Bellafiore, S., Barneche, F., Peltier, G., & Rochaix, J. D. (2005). State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 433(7028), 892-895.

28. Bennett, J. (1979). Chloroplast phosphoproteins. Phosphorylation of polypeptides of the light-harvesting chlorophyll protein complex. *European journal of biochemistry/FEBS*, 99(1), 133-137.
29. Bengis, C., & Nelson, N. (1977). Subunit structure of chloroplast photosystem I reaction center. *Journal of Biological Chemistry*, 252(13), 4564-4569.
30. Ben-Shem, A., Frolov, F., & Nelson, N. (2003). Crystal structure of plant photosystem I. *Nature*, 426(6967), 630-635.
31. Bergner, S. V., Scholz, M., Trompelt, K., Barth, J., Gäbelein, P., Steinbeck, J., Xue, H., Clowez, S., Fucile G., Goldschmidt-Clermont, M., Fufezan, C. & Hippler, M. (2015). STATE TRANSITION7-dependent phosphorylation is modulated by changing environmental conditions, and its absence triggers remodeling of photosynthetic protein complexes. *Plant physiology*, 168(2), 615-634.
32. Betterle, N., Ballottari, M., Zorzan, S., de Bianchi, S., Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Morosinotto, T., & Bassi, R. (2009). Light-induced dissociation of an antenna hetero-oligomer is needed for non-photochemical quenching induction. *Journal of Biological Chemistry*, 284(22), 15255-15266.
33. Biggins, J. (1974). The role of plastoquinone in the in vivo photosynthetic cyclic electron transport pathway in algae. *FEBS letters*, 38(3), 311-314.
34. Blackwell, M., Gibas, C., Gygax, S., Roman, D., & Wagner, B. (1994). The plastoquinone diffusion coefficient in chloroplasts and its mechanistic implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1183(3), 533-543.
35. Boekema, E. J., van Roon, H., Calkoen, F., Bassi, R., & Dekker, J. P. (1999a). Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry*, 38(8), 2233-2239.
36. Boekema, E. J., van Roon, H., van Breemen, J. F., & Dekker, J. P. (1999b). Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *European Journal of Biochemistry*, 266(2), 444-452.
37. Bolouri-Moghaddam, M. R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., & Van den Ende, W. (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS journal*, 277(9), 2022-2037.
38. Bonardi, V., Pesaresi, P., Becker, T., Schleiff, E., Wagner, R., Pfannschmidt, T., Jahns, P. & Leister, D. (2005). Photosystem II core phosphorylation and photosynthetic acclimation require two different protein kinases. *Nature*, 437(7062), 1179-1182.
39. Borisova-Mubarakshina, M. M., Kozuleva, M. A., Rudenko, N. N., Naydov, I. A., Klenina, I. B., & Ivanov, B. N. (2012). Photosynthetic electron flow to oxygen and diffusion of hydrogen

- peroxide through the chloroplast envelope via aquaporins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(8), 1314-1321.
40. Borisova-Mubarakshina, M. M., Vetoshkina, D. V., Rudenko, N. N., Shirshikova, G. N., Fedorchuk, T. P., Naydov, I. A., & Ivanov, B. N. (2014). The size of the light-harvesting antenna of higher plant photosystem II is regulated by illumination intensity through transcription of antenna protein genes. *Biochemistry (Moscow)*, 79(6), 520-523.
 41. Bowyer, J. R., & Camilleri, P. (1985). Spin-trap study of the reactions of ferredoxin with reduced oxygen species in pea chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 808(2), 235-242.
 42. Bowler, M. W., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2007). Ground state structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 282(19), 14238-14242.
 43. Brawn, K., & Fridovich, I. (1980). Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. In *Autoxidation in food and biological systems*, 429-446. Springer US.
 44. Breyton, C. (2000). Conformational Changes in the Cytochrome b₆ f Complex Induced by Inhibitor Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 275(18), 13195-13201.
 45. Calvo, I. A., Ayté, J., & Hidalgo, E. (2013) Reversible thiol oxidation in the H₂O₂-dependent activation of the transcription factor Pap1, *Journal of Cell Science*, 126(10), 2279-2284.
 46. Cardona, T. (2016). Reconstructing the Origin of Oxygenic Photosynthesis: Do Assembly and Photoactivation Recapitulate Evolution? *Frontiers in plant science*, 7.
 47. Casano, L. M., Zapata, J. M., Martín, M., & Sabater, B. (2000). Chlororespiration and Poisoning of Cyclic Electron Transport plastoquinone as electron transporter between thylakoid nadh dehydrogenase and peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 942-948.
 48. Cavalier-Smith, T. (2006). Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1470), 969-1006.
 49. Cazzaniga, S., Dall'Osto, L., Kong, S. G., Wada, M., & Bassi, R. (2013). Interaction between avoidance of photon absorption, excess energy dissipation and zeaxanthin synthesis against photooxidative stress in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 76(4), 568-579.
 50. Cejudo, F. J., Meyer, A. J., Reichheld, J. P., Rouhier, N., & Traverso, J. A. (2014). *Thiol-based redox homeostasis and signalling*. Frontiers E-books.
 51. Chang, C. C. C., Ball, L., Fryer, M. J., Baker, N. R., Karpinski, S., & Mullineaux, P. M. (2004). Induction of ASCORBATE PEROXIDASE 2 expression in wounded Arabidopsis leaves does not involve known wound-signalling pathways but is associated with changes in photosynthesis. *The Plant Journal*, 38(3), 499-511.

52. Chen, K., Vita, J. A., Berk, B. C., & Keaney, J. F. (2001) c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves SRC-dependent epidermal growth factor receptor transactivation, *The Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 16045-16050.
53. Chen YB, Durnford DG, Koblizek M, Falkowski PG (2004). Plastid regulation of Lhcb 1 transcription in the chlorophyte alga *Dunaliella tertiolecta*. *Plant Physiology*, 136, 3737–3750.
54. Cleland, R. E., & Grace, S. C. (1999). Voltammetric detection of superoxide production by photosystem II. *FEBS letters*, 457(3), 348-352.
55. Cormann, K. U., Bangert, J. A., Ikeuchi, M., Rögner, M., Stoll, R., & Nowaczyk, M. M. (2009). Structure of Psb27 in solution: implications for transient binding to photosystem II during biogenesis and repair. *Biochemistry*, 48(37), 8768-8770.
56. Cormier, M. J., & Prichard, P. M. (1968). An investigation of the mechanism of the luminescent peroxidation of luminol by stopped flow techniques. *Journal of Biological Chemistry*, 243(18), 4706-4714.
57. Cornic, G., & Massacci, A. (1996). Leaf photosynthesis under drought stress. In *Photosynthesis and the Environment* 347-366. Springer Netherlands.
58. Cournac, L., Josse, E. M., Joët, T., Rumeau, D., Redding, K., Kuntz, M., & Peltier, G. (2000). Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1402), 1447-1454.
59. Croce, R., & Bassi, R. (1998). The light-harvesting complex of photosystem I: pigment composition and stoichiometry. In *Photosynthesis: mechanisms and effects*, 421-424. Springer Netherlands.
60. Croce, R., Morosinotto, T., Castelletti, S., Breton, J., & Bassi, R. (2002). The Lhca antenna complexes of higher plants photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1556(1), 29-40.
61. Croce, R., Chojnicka, A., Morosinotto, T., Ihalainen, J. A., Van Mourik, F., Dekker, J. P., Bassi, R., and Van Grondelle, R. (2007). The low-energy forms of photosystem I light-harvesting complexes: spectroscopic properties and pigment-pigment interaction characteristics. *Biophysical journal*, 93(7), 2418-2428.
62. Croce, R. (2012). Chlorophyll-binding proteins of higher plants and cyanobacteria. In *Photosynthesis*, 127-149. Springer Netherlands.
63. Crofts, A. R. (2004). The Q-cycle—a personal perspective. *Photosynthesis research*, 80(1-3), 223-243.

64. Dainese, P., & Bassi, R. (1991). Subunit stoichiometry of the chloroplast photosystem II antenna system and aggregation state of the component chlorophyll a/b binding proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 266(13), 8136-8142.
65. Dalton, D. A., Russell, S. A., Hanus, F. J., Pascoe, G. A., & Evans, H. J. (1986). Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 3811-3815.
66. Damkjaer J. T., Kereïche S., Johnson M. P., Kovacs L., Kiss A. Z., Boekema E. J., Ruban A. V., Horton P., Jansson S. (2009) The photosystem II light-harvesting protein Lhcb3 affects the macrostructure of photosystem II and the rate of state transitions in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 3245–3256
67. Davies, M. J. (2004). Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(1), 17-25.
68. Davis, D. J., & San Pietro, A. (1977). Interactions between spinach ferredoxin and other electron carriers: The involvement of a ferredoxin: Cytochrome c complex in the ferredoxin-linked cytochrome c reductase activity of ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase. *Archives of biochemistry and biophysics*, 182(1), 266-272.
69. Dat, J. F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H., and Scott, I. M. (1998). Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 116(4), 1351-1357.
70. Debus, R. J. (1992). The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1102(3), 269-352.
71. Dekker, J. P., and Boekema, E. J. (2005). Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1706(1), 12-39.
72. Deligiannakis, Y., & Rutherford, A. W. (1996). Spin-lattice relaxation of the pheophytin, Pheo-, radical of photosystem II. *Biochemistry*, 35(35), 11239-11246.
73. Delosme, R., Olive, J., & Wollman, F. A. (1996). Changes in light energy distribution upon state transitions: an in vivo photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1273(2), 150-158.
74. Depège, N., Bellafiore, S., and Rochaix, J. D. (2003). Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science*, 299(5612), 1572-1575.
75. Desikan, R., Soheila, A. H., Hancock, J. T., & Neill, S. J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*, 127(1), 159-172.
76. Dietz, K. J. (2014). Redox regulation of transcription factors in plant stress acclimation and development. *Antioxidants & redox signaling*, 21(9), 1356-1372.

77. Dietzel, L., Bräutigam, K., Steiner, S., Schöffler, K., Lepetit, B., Grimm, B., Schottler, M., & Pfannschmidt, T. (2011). Photosystem II supercomplex remodeling serves as an entry mechanism for state transitions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 23(8), 2964-2977.
78. Dismukes, G. C., Klimov, V. V., Baranov, S. V., Kozlov, Y. N., DasGupta, J., & Tyrishkin, A. (2001). The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(5), 2170-2175.
79. Durnford, D. G., and Falkowski, P. G. (1997). Chloroplast redox regulation of nuclear gene transcription during photoacclimation. *Photosynthesis Research*, 53(2-3), 229-241.
80. Elstner, E. F. (1982). Oxygen activation and oxygen toxicity. *Annual review of plant physiology*, 33(1), 73-96.
81. Emerson, R., Chalmers, R., & Cederstrand, C. (1957). Some factors influencing the long-wave limit of photosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 43(1), 133-143.
82. Escoubas, J. M., Lomas, M., LaRoche, J., and Falkowski, P. G. (1995). Light intensity regulation of cab gene transcription is signaled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(22), 10237-10241.
83. Farah, J., Rappaport, F., Choquet, Y., Joliot, P., & Rochaix, J. D. (1995). Isolation of a psaF-deficient mutant of Chlamydomonas reinhardtii: efficient interaction of plastocyanin with the photosystem I reaction center is mediated by the PsaF subunit. *The EMBO journal*, 14(20), 4976.
84. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., & Iwata, S. (2004). Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science*, 303(5665), 1831-1838.
85. Fey, V., Wagner, R., Bräutigam, K., & Pfannschmidt, T. (2005). Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1491-1498.
86. Finazzi, G., Zito, F., Barbagallo, R. P., & Wollman, F. A. (2001). Contrasted Effects of Inhibitors of Cytochrome b₆ f Complex on State Transitions in Chlamydomonas reinhardtii the role of Q_o site occupancy in LHCII kinase activation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(13), 9770-9774.
87. Fryer, M. J., Oxborough, K., Mullineaux, P. M., & Baker, N. R. (2002). Imaging of photo-oxidative stress responses in leaves. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1249-1254.
88. Forde, B. J., Whitehead, H. C. M., & Rowley, J. A. (1975). Effect of light intensity and temperature on photosynthetic rate, leaf starch content and ultrastructure of Paspalum dilatatum. *Functional Plant Biology*, 2(2), 185-195.
89. Forquer, I., Covian, R., Bowman, M. K., Trumpower, B. L., & Kramer, D. M. (2006). Similar transition states mediate the Q-cycle and superoxide production by the cytochrome bc₁ complex. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38459-38465.

90. Foyer, C. H., & Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, *11*(4), 861-905.
91. Frigerio, S., Campoli, C., Zorzan, S., Fantoni, L. I., Crosatti, C., Drepper, F., Haehnel, W., Cattivelli, L., Morosinotto, T., and Bassi, R. (2007). Photosynthetic antenna size in higher plants is controlled by the plastoquinone redox state at the post-transcriptional rather than transcriptional level. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(40), 29457-29469.
92. Furbank, R. T., & Badger, M. R. (1983). Photorespiratory characteristics of isolated bundle sheath strands of C4 monocotyledons. *Functional Plant Biology*, *10*(5), 451-458.
93. Gal, A., Mor, T. S., Hauska, G., Herrmann, R., & Ohad, I. (1990). LHCII Kinase Activity Associated with Isolated Cytochrome b6/f Complex. In *Current Research in Photosynthesis*, 1743-1745. Springer Netherlands.
94. Galka P., Santabarbara S., Khuong T. T., Degand H., Morsomme P., Jennings R. C., Boekema E. J., Caffarri S. (2012) Functional analyses of the plant photosystem I-light-harvesting complex II supercomplex reveal that light-harvesting complex II loosely bound to photosystem II is a very efficient antenna for photosystem I in state II. *Plant Cell*, *24*, 2963–2978
95. Ganeteg, U., Klimmek, F., & Jansson, S. (2004). Lhca5—an LHC-type protein associated with photosystem I. *Plant molecular biology*, *54*(5), 641-651.
96. Gechev, T. S., & Hille, J. (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *The Journal of cell biology*, *168*(1), 17-20.
97. Gechev, T. S., Van Breusegem, F., Stone, J. M., Denev, I., & Laloi, C. (2006). Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. *Bioessays*, *28*(11), 1091-1101.
98. Gest, H. (2002). History of the word photosynthesis and evolution of its definition. *Photosynthesis research*, *73*(1-3), 7-10.
99. Gibbons, C., Montgomery, M. G., Leslie, A. G., & Walker, J. E. (2000). The structure of the central stalk in bovine F1-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nature Structural & Molecular Biology*, *7*(11), 1055-1061.
100. Girotti, A. W., & Kriska, T. (2004). Role of lipid hydroperoxides in photo-oxidative stress signaling. *Antioxidants and Redox Signaling*, *6*(2), 301-310.
101. Giuffra, E., Zucchelli, G., Sandona, D., Croce, R., Cugini, D., Garlaschi, F. M., Bassi, R. and Jennings, R. C. (1997). Analysis of some optical properties of a native and reconstituted photosystem II antenna complex, CP29: pigment binding sites can be occupied by chlorophyll a or chlorophyll b and determine spectral forms. *Biochemistry*, *36*(42), 12984-12993.
102. Goetze, D. C., & Carpentier, R. (1994). Ferredoxin-NADP⁺ reductase is the site of oxygen reduction in pseudocyclic electron transport. *Canadian journal of botany*, *72*(2), 256-260.

103. Gorman, A. A., & Rodgers, M. A. (1992). Current perspectives of singlet oxygen detection in biological environments. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, 14(3), 159-176.
104. Govindjee, J. K., Messinger, J., Whitmarsh, J., & Photosystem, I. I. (2010). Encyclopedia of Life Sciences (ELS).
105. Grieco, M., Tikkanen, M., Paakkanen, V., Kangasjärvi, S., & Aro, E. M. (2012). Steady-state phosphorylation of light-harvesting complex II proteins preserves photosystem I under fluctuating white light. *Plant physiology*, 160(4), 1896-1910.
106. Grieco, M., Suorsa, M., Jajoo, A., Tikkanen, M., & Aro, E. M. (2015). Light-harvesting II antenna trimers connect energetically the entire photosynthetic machinery—including both photosystems II and I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1847(6), 607-619.
107. Groth, G., & Pohl, E. (2001). The structure of the chloroplast F1-ATPase at 3.2 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 276(2), 1345-1352.
108. Gruszka, J., Pawlak, A., & Kruk, J. (2008). Tocochromanols, plastoquinol, and other biological prenyllipids as singlet oxygen quenchers—determination of singlet oxygen quenching rate constants and oxidation products. *Free Radical Biology and Medicine*, 45(6), 920-928.
109. Guergova-Kuras, M., Boudreaux, B., Joliot, A., Joliot, P., & Redding, K. (2001). Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(8), 4437-4442
110. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., & Saenger, W. (2009). Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature structural & molecular biology*, 16(3), 334-342.
111. Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N. J. (1996) Activation of Mitogen-activated Protein Kinase by H₂O₂ role in cell survival following oxidant injury. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(8), 4138-4142.
112. Haehnel, W. (1984). Photosynthetic electron transport in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 659-693.
113. Haldrup, A., Naver, H., & Scheller, H. V. (1999). The interaction between plastocyanin and photosystem I is inefficient in transgenic Arabidopsis plants lacking the PSI-N subunit of photosystem. *The Plant Journal*, 17(6), 689-698.
114. Haldrup, A., Simpson, D. J., & Scheller, H. V. (2000). Down-regulation of the PSI-F subunit of photosystem I (PSI) in Arabidopsis thaliana The PSI-F subunit is essential for photoautotrophic growth and contributes to antenna function. *Journal of Biological Chemistry*, 275(40), 31211-31218.

115. Hallahan, B. J., Purton, S., Ivison, A., Wright, D., & Evans, M. C. (1995). Analysis of the proposed Fe-SX binding region of Photosystem 1 by site directed mutation of PsaA in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis research*, 46(1-2), 257-264.
116. Harbinson, J., & Foyer, C. H. (1991). Relationships between the Efficiencies of Photosystems I and II and Stromal Redox State in CO₂-Free Air Evidence for Cyclic Electron Flow in vivo. *Plant physiology*, 97(1), 41-49.
117. Harrer, R., Bassi, R., Testi, M. G., & Schäfer, C. (1998). Nearest-neighbor analysis of a Photosystem II complex from *Marchantia polymorpha* L.(liverwort), which contains reaction center and antenna proteins. *European journal of biochemistry*, 255(1), 196-205.
118. Hausrath, A. C., Grüber, G., Matthews, B. W., & Capaldi, R. A. (1999). Structural features of the γ subunit of the *Escherichia coli* F1 ATPase revealed by a 4.4-Å resolution map obtained by x-ray crystallography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13697-13702.
119. Haworth, P., Watson, J. L., & Arntzen, C. J. (1983). The detection, isolation and characterization of a light-harvesting complex which is specifically associated with photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 724(1), 151-158.
120. He, W. Z., & Malkin, R. (1992). Specific release of a 9-kDa extrinsic polypeptide of photosystem I from spinach chloroplasts by salt washing. *FEBS letters*, 308(3), 298-300.
121. Hendry, G., and Wydrzynski, T. (2003). ¹⁸O isotope exchange measurements reveal that calcium is involved in the binding of one substrate-water molecule to the oxygen-evolving complex in photosystem II. *Biochemistry*, 42(20), 6209-6217.
122. Henzler, T., & Steudle, E. (2000). Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *Journal of experimental botany*, 51(353), 2053-2066.
123. Hertle, A. P., Blunder, T., Wunder, T., Pesaresi, P., Pribil, M., Armbruster, U., & Leister, D. (2013). PGRL1 is the elusive ferredoxin-plastoquinone reductase in photosynthetic cyclic electron flow. *Molecular cell*, 49(3), 511-523.
124. Hideg, É., Kálai, T., Hideg, K., & Vass, I. (1998). Photoinhibition of photosynthesis in vivo results in singlet oxygen production detection via nitroxide-induced fluorescence quenching in broad bean leaves. *Biochemistry*, 37(33), 11405-11411.
125. Hideg, É., Barta, C., Kálai, T., Vass, I., Hideg, K., & Asada, K. (2002). Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant and Cell Physiology*, 43(10), 1154-1164
126. Hill, R., & Bendall, F. (1960). Function of the two cytochrome components in chloroplasts: a working hypothesis. *Nature*, 186, 136-137.

127. Hirashima, M., Satoh, S., Tanaka, R., & Tanaka, A. (2006). Pigment shuffling in antenna systems achieved by expressing prokaryotic chlorophyllide a oxygenase in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 281(22), 15385-15393.
128. Hofmann, N. R. (2012). A refined model of state transitions in plant thylakoid membranes. *The Plant Cell*, 24(7), 2708-2708.
129. Hohmann-Marriott, M. F., and Blankenship, R. E. (2011). Evolution of photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 62, 515-548.
130. Hosein, B., & Palmer, G. (1983). The kinetics and mechanism of oxidation of reduced spinach ferredoxin by molecular oxygen and its reduced products. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 723(3), 383-390.
131. Houille-Vernes, L., Rappaport, F., Wollman, F. A., Alric, J., & Johnson, X. (2011). Plastid terminal oxidase 2 (PTOX2) is the major oxidase involved in chlororespiration in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), 20820-20825.
132. Hundal, T., Forsmark-Andrée, P., Ernster, L., & Andersson, B. (1995). Antioxidant activity of reduced plastoquinone in chloroplast thylakoid membranes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 324(1), 117-122.
133. Ignatova, L. K., Rudenko, N. N., Mudrik, V. A., & Ivanov, B. N. (2011). Carbonic anhydrase activity in Arabidopsis thaliana thylakoid membrane and fragments enriched with PSI or PSII. *Photosynthesis research*, 110(2), 89-98.
134. Ikeuchi, M., Hirano, A., Hiyama, T., & Inoue, Y. (1990). Polypeptide composition of higher plant photosystem I complex. *FEBS letters*, 263(2), 274-278.
135. Ivanov, B., Mubarakshina, M., & Khorobrykh, S. (2007). Kinetics of the plastoquinone pool oxidation following illumination. *FEBS letters*, 581(7), 1342-1346.
136. Ivanov, B., Kozuleva, M., & Mubarakshina, M. (2011). Oxygen metabolism in chloroplast. *Cell Metabolism-Cell Homeostasis and Stress Response*, 39-72.
137. Jansson, S., Andersen, B., & Scheller, H. V. (1996). Nearest-neighbor analysis of higher-plant photosystem I holocomplex. *Plant physiology*, 112(1), 409-420.
138. Jansson, S. (1999). A guide to the Lhc genes and their relatives in Arabidopsis. *Trends in plant science*, 4(6), 236-240.
139. Jensen, P. E., Gilpin, M., Knoetzel, J., & Scheller, H. V. (2000). The PSI-K subunit of photosystem I is involved in the interaction between light-harvesting complex I and the photosystem I reaction center core. *Journal of Biological Chemistry*, 275(32), 24701-24708.
140. Joliot, P., Barbieri, G., & Chabaud, R. (1969). A new model of photochemical centers in system-2. *Photochemistry and Photobiology*, 10(5), 309.

141. Joliot, P., & Kok, B. (1975). Oxygen evolution in photosynthesis. *Bioenergetics of photosynthesis*, 387-412.
142. Joliot, P., & Joliot, A. (1992). Electron transfer between photosystem II and the cytochrome b/f complex: mechanistic and structural implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1102(1), 53-61.
143. Joliot, P., & Joliot, A. (2006). Cyclic electron flow in C3 plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(5), 362-368.
144. Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., & Krauß, N. (2001). Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411(6840), 909-917.
145. Kabaleeswaran, V., Puri, N., Walker, J. E., Leslie, A. G., & Mueller, D. M. (2006). Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F1 ATPase. *The EMBO Journal*, 25(22), 5433-5442.
146. Kamiya, N., & Shen, J. R. (2003). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7-Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1), 98-103.
147. Kaplan, F., Zhao, W., Richards, J. T., Wheeler, R. M., Guy, C. L., & Levine, L. H. (2012). Transcriptional and metabolic insights into the differential physiological responses of *Arabidopsis* to optimal and supraoptimal atmospheric CO₂. *PLoS One*, 7(8), e43583.
148. Karpinski, S., Reynolds, H., Karpinska, B., Wingsle, G., Creissen, G., & Mullineaux, P. (1999). Systemic signaling and acclimation in response to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *Science*, 284(5414), 654-657.
149. Kawamura, R., Mishima, M., Ryu, S., Arai, Y., Okose, M., Silberberg, Y. R., Rao, S. R., & Nakamura, C. (2013). Controlled cell adhesion using a biocompatible anchor for membrane-conjugated bovine serum albumin/bovine serum albumin mixed layer. *Langmuir*, 29(21), 6429-6433.
150. Khorobrykh, S. A., & Ivanov, B. N. (2002). Oxygen reduction in a plastoquinone pool of isolated pea thylakoids. *Photosynthesis research*, 71(3), 209-219.
151. Khorobrykh, S., Mubarakshina, M., & Ivanov, B. (2004). Photosystem I is not solely responsible for oxygen reduction in isolated thylakoids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1657(2), 164-167.
152. Khorobrykh, S. A., Karonen, M., & Tyystjärvi, E. (2015). Experimental evidence suggesting that H₂O₂ is produced within the thylakoid membrane in a reaction between plastoquinol and singlet oxygen. *FEBS letters*, 589(6), 779-786.

153. Kim, J. R., Yoon, H. W., Kwon, K. S., Lee, S. R., and Rhee, S. G. (2000). Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Analytical Biochemistry*, 283(2), 214-221.
154. Kirchhoff, H., Horstmann, S., & Weis, E. (2000). Control of the photosynthetic electron transport by PQ diffusion microdomains in thylakoids of higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1459(1), 148-168.
155. Kirchhoff, H., Mukherjee, U., & Galla, H. J. (2002). Molecular architecture of the thylakoid membrane: lipid diffusion space for plastoquinone. *Biochemistry*, 41(15), 4872-4882.
156. Kjaerulff, S., Andersen, B., Nielsen, V. S., Møller, B. L., & Okkels, J. S. (1993). The PSI-K subunit of photosystem I from barley (*Hordeum vulgare* L.). Evidence for a gene duplication of an ancestral PSI-G/K gene. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 18912-18916
157. Klimmek, F., Sjödin, A., Noutsos, C., Leister, D., & Jansson, S. (2006). Abundantly and rarely expressed Lhc protein genes exhibit distinct regulation patterns in plants. *Plant physiology*, 140(3), 793-804.
158. Klimov, V., Ananyev, G., Zastryzhnaya, O., Wydrzynski, T., & Renger, G. (1993). Photoproduction of hydrogen peroxide in Photosystem II membrane fragments: a comparison of four signals. *Photosynthesis research*, 38(3), 409-416.
159. Klotz, L. O., Kröncke, K. D., & Sies, H. (2003). Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2(2), 88-94.
160. Knoetzel, J., Bossmann, B., & Grimme, L. H. (1998). Chlorina and viridis mutants of barley (*Hordeum vulgare* L.) allow assignment of long-wavelength chlorophyll forms to individual Lhca proteins of photosystem I in vivo. *FEBS letters*, 436(3), 339-342.
161. Kouril R., Zygadlo A., Arteni A. A., de Wit C. D., Dekker J. P., Jensen P. E., Scheller H. V., Boekema E. J. (2005) Structural characterization of a complex of photosystem I and light-harvesting complex II of *Arabidopsis thaliana*. *Biochemistry* 44, 10935–10940
162. Kouřil, R., Wientjes, E., Bultema, J. B., Croce, R., & Boekema, E. J. (2013). High-light vs. low-light: effect of light acclimation on photosystem II composition and organization in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(3), 411-419.
163. Kovács, L., Damkjær, J., Kereiche, S., Iliaia, C., Ruban, A. V., Boekema, E. J., Jansson, S., & Horton, P. (2006). Lack of the light-harvesting complex CP24 affects the structure and function of the grana membranes of higher plant chloroplasts. *The Plant Cell*, 18(11), 3106-3120.
164. Kozuleva, M. A., & Ivanov, B. N. (2010). Evaluation of the participation of ferredoxin in oxygen reduction in the photosynthetic electron transport chain of isolated pea thylakoids. *Photosynthesis research*, 105(1), 51-61.

165. Kozuleva, M., Klenina, I., Proskuryakov, I., Kirilyuk, I., & Ivanov, B. (2011). Production of superoxide in chloroplast thylakoid membranes: ESR study with cyclic hydroxylamines of different lipophilicity. *FEBS letters*, *585*(7), 1067-1071.
166. Kozuleva, M. A., Petrova, A. A., Mamedov, M. D., Semenov, A. Y., & Ivanov, B. N. (2014). O₂ reduction by photosystem I involves phyloquinone under steady-state illumination. *FEBS letters*, *588*(23), 4364-4368.
167. Kozuleva, M. A., & Ivanov, B. N. (2016). The Mechanisms of Oxygen Reduction in the Terminal Reducing Segment of the Chloroplast Photosynthetic Electron Transport Chain. *Plant & cell physiology*.
168. Kramer, D. M., & Evans, J. R. (2011). The importance of energy balance in improving photosynthetic productivity. *Plant Physiology*, *155*(1), 70-78.
169. Krasnovsky, A. A. (1994). Singlet molecular oxygen and primary mechanisms of photo-oxidative damage of chloroplasts. Studies based on detection of oxygen and pigment phosphorescence. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Section B. Biological Sciences*, *102*, 219-235.
170. Kreslavski, V. D., Lankin, A. V., Vasilyeva, G. K., Luybimov, V. Y., Semenova, G. N., Schmitt, F. J., Friedrich T. & Allakhverdiev, S. I. (2014). Effects of polyaromatic hydrocarbons on photosystem II activity in pea leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, *81*, 135-142.
171. Krieger-Liszka, A., & Feilke, K. (2015). The dual role of the plastid terminal oxidase PTOX: between a protective and a pro-oxidant function. *Frontiers in plant science*, *6*, 1147.
172. Kruk, J., Jemiola-Rzeminska, M., Burda, K., Schmid, G. H., & Strzalka, K. (2003). Scavenging of superoxide generated in photosystem I by plastoquinol and other prenyllipids in thylakoid membranes. *Biochemistry*, *42*(28), 8501-8505.
173. Kruk, J., & Trebst, A. (2008). Plastoquinol as a singlet oxygen scavenger in photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1777*(2), 154-162.
174. Kruk, J., Szymańska, R., Nowicka, B., & Dłużewska, J. (2016). Function of isoprenoid quinones and chromanols during oxidative stress in plants. *New biotechnology*.
175. Kuntz, M. (2004). Plastid terminal oxidase and its biological significance. *Planta*, *218*(6), 896-899.
176. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L., & Cramer, W. A. (2003). Structure of the cytochrome b₆f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*, *302*(5647), 1009-1014
177. Kyle, D. J., Staehelin, L. A., & Arntzen, C. J. (1983). Lateral mobility of the light-harvesting complex in chloroplast membranes controls excitation energy distribution in higher plants. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *222*(2), 527-541.

178. Laisk, A., Oja, V., & Eichelmann, H. (2016). Kinetics of plastoquinol oxidation by the Q-cycle in leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1857(6), 819-830.
179. Lemaire, C., Girard-Bascou, J., Wollman, F. A., & Bennoun, P. (1986). Studies on the cytochrome b 6/f complex. I. Characterization of the complex subunits in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 851(2), 229-238.
180. Lemeille, S., Willig, A., Depege, N. J., Delessert, C., Bassi, R., & Rochaix, J. D. (2009). Analysis of the Chloroplast Protein Kinase Stt7 during State Transitions. *PLOS Biology*, 7(3), 0664-0675.
181. Lemeille, S., and Rochaix, J. D. (2010). State transitions at the crossroad of thylakoid signalling pathways. *Photosynthesis Research*, 106(1-2), 33-46.
182. Leoni, C., Pietrzykowska, M., Kiss, A. Z., Suorsa, M., Ceci, L. R., Aro, E. M., & Jansson, S. (2013). Very rapid phosphorylation kinetics suggest a unique role for Lhcb2 during state transitions in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 76(2), 236-246.
183. Lepetit, B., Sturm, S., Rogato, A., Gruber, A., Sachse, M., Falciatore, A., & Lavaud, J. (2013). High light acclimation in the secondary plastids containing diatom *Phaeodactylum tricorutum* is triggered by the redox state of the plastoquinone pool. *Plant Physiology*, 161(2), 853-865.
184. Li, X. P., Gilmore, A. M., Caffarri, S., Bassi, R., Golan, T., Kramer, D., & Niyogi, K. K. (2004). Regulation of photosynthetic light harvesting involves intrathylakoid lumen pH sensing by the PsbS protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(22), 22866-22874.
185. Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., Döll, M., Fietz, H. J., Bach, T., Kozel, U., Meier, D., and Rahmsdorf, U. (1981). Photosynthetic activity, chloroplast ultrastructure, and leaf characteristics of high-light and low-light plants and of sun and shade leaves. *Photosynthesis research*, 2(2), 115-141.
186. Lichtenthaler, H. K., Buschmann, C., & Knapp, M. (2005). How to correctly determine the different chlorophyll fluorescence parameters and the chlorophyll fluorescence decrease ratio Rfd of leaves with the PAM fluorometer. *Photosynthetica*, 43(3), 379-393.
187. Lichtenthaler, H. K. (2007). Biosynthesis, accumulation and emission of carotenoids, α -tocopherol, plastoquinone, and isoprene in leaves under high photosynthetic irradiance. *Photosynthesis Research*, 92(2), 163-179.
188. Lichtenthaler, H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 350-382.
189. Lindahl, M., Yang, D. H., & Andersson, B. (1995). Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll a/b protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymic system. *European journal of biochemistry*, 231(2), 503-509.

190. Liu, Z., Yan, H., Wang, K., Kuang, T., Zhang, J., Gui, L., An, X., and Chang, W. (2004). Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution. *Nature*, 428(6980), 287-292.
191. Livingston, A. K., Cruz, J. A., Kohzuma, K., Dhingra, A., & Kramer, D. M. (2010). An Arabidopsis mutant with high cyclic electron flow around photosystem I (hcef) involving the NADPH dehydrogenase complex. *The Plant Cell*, 22(1), 221-233.
192. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., & Biesiadka, J. (2005). Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II. *Nature*, 438(7070), 1040-1044.
193. Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., Foyer, C. H., & Scott, I. M. (1998). Induction of thermotolerance in potato microplants by acetylsalicylic acid and H₂O₂. *Journal of Experimental Botany*, 49(321), 713-720.
194. Lunde, C., Jensen, P. E., Haldrup, A., Knoetzel, J., & Scheller, H. V. (2000). The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature*, 408(6812), 613-615.
195. Marchal, D., Boireau, W., Laval, J. M., Moiroux, J., & Bourdillon, C. (1998). Electrochemical measurement of lateral diffusion coefficients of ubiquinones and plastoquinones of various isoprenoid chain lengths incorporated in model bilayers. *Biophysical journal*, 74(4), 1937-1948.
196. Martinez, G. R., Loureiro, A. P. M., Marques, S. A., Miyamoto, S., Yamaguchi, L. F., Onuki, J., & Di Mascio, P. (2003). Oxidative and alkylating damage in DNA. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 544(2), 115-127.
197. Mazor, Y., Borovikova, A., & Nelson, N. (2015). The structure of plant photosystem I super-complex at 2.8 Å resolution. *Elife*, 4, e07433.
198. McDonald A. E., Ivanov A. G., Bode R., Maxwell D. P., Rodermel S. R., Hüner N. P. (2011). Flexibility in photosynthetic electron transport: the physiological role of plastoquinol terminaloxidase (PTOX). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8), 954-967.
199. Mehler, A. H. (1951). Studies on reactions of illuminated chloroplasts: I. Mechanism of the reduction of oxygen and other hill reagents. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 33(1), 65-77.
200. Mekala, N. R., Suorsa, M., Rantala, M., Aro, E. M., & Tikkanen, M. (2015). Plants actively avoid state transitions upon changes in light intensity: role of light-harvesting complex II protein dephosphorylation in high light. *Plant physiology*, 168(2), 721-734
201. Menz, R. I., Walker, J. E., & Leslie, A. G. (2001). Structure of bovine mitochondrial F₁-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis. *Cell*, 106(3), 331-341.

202. Miller, K. R., & Staehelin, L. A. (1976). Analysis of the thylakoid outer surface. Coupling factor is limited to unstacked membrane regions. *The Journal of Cell Biology*, 68(1), 30-47.
203. Minagawa, J. (2011). State transitions—the molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1807(8), 897-905.
204. Misra, H. P., & Fridovich, I. (1971). The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. *Journal of Biological Chemistry*, 246(22), 6886-6890.
205. Miyake, C., Schreiber, U., Hormann, H., Sano, S., & Kozi, A. (1998). The FAD-enzyme monodehydroascorbate radical reductase mediates photoproduction of superoxide radicals in spinach thylakoid membranes. *Plant and cell physiology*, 39(8), 821-829.
206. Morelli, R., Russo-Volpe, S., Bruno, N., & Lo Scalzo, R. (2003). Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7418-7425.
207. Morosinotto, T., Baronio, R., & Bassi, R. (2002). Dynamics of chromophore binding to Lhc proteins in vivo and in vitro during operation of the xanthophyll cycle. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 36913-36920.
208. Morosinotto, T., Bassi, R., Frigerio, S., Finazzi, G., Morris, E., & Barber, J. (2006). Biochemical and structural analyses of a higher plant photosystem II supercomplex of a photosystem I-less mutant of barley. *Febs Journal*, 273(20), 4616-4630.
209. Mubarakshina, M., Khorobrykh, S., & Ivanov, B. (2006). Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(11), 1496-1503.
210. Mubarakshina, M. M., Ivanov, B. N., Naydov, I. A., Hillier, W., Badger, M. R., & Krieger-Liszkay, A. (2010). Production and diffusion of chloroplastic H₂O₂ and its implication to signalling. *Journal of Experimental Botany*, 61(13), 3577-3587.
211. Mubarakshina, M. M., & Ivanov, B. N. (2010). The production and scavenging of reactive oxygen species in the plastoquinone pool of chloroplast thylakoid membranes. *Physiologia plantarum*, 140(2), 103-110.
212. Munekage, Y., Hojo, M., Meurer, J., Endo, T., Tasaka, M., & Shikanai, T. (2002). PGR5 is involved in cyclic electron flow around photosystem I and is essential for photoprotection in *Arabidopsis*. *Cell*, 110(3), 361-371.
213. Munné-Bosch, S., & Alegre, L. (2002). Interplay between ascorbic acid and lipophilic antioxidant defences in chloroplasts of water-stressed *Arabidopsis* plants. *FEBS letters*, 524(1-3), 145-148.

214. Nagy, G., Ünneper, R., Zsiros, O., Tokutsu, R., Takizawa, K., Porcar, L., Moyet, L., Petroustos, D., Garab, G., Finazzi, G., & Minagawa, J. (2014). Chloroplast remodeling during state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii* as revealed by noninvasive techniques in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(13), 5042-5047.
215. Naver, H., Haldrup, A., & Scheller, H. V. (1999). Cosuppression of Photosystem I Subunit PSI-H in *Arabidopsis thaliana* efficient electron transfer and stability of photosystem i is dependent upon the psi-h subunit. *Journal of Biological Chemistry*, *274*(16), 10784-10789.
216. Nilkens, M., Kress, E., Lambrev, P., Miloslavina, Y., Müller, M., Holzwarth, A. R., & Jahns, P. (2010). Identification of a slowly inducible zeaxanthin-dependent component of non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence generated under steady-state conditions in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1797*(4), 466-475.
217. Oba, M., Tanaka, K., Nishiyama, K., & Ando, W. (2011). Aerobic oxidation of thiols to disulfides catalyzed by diaryl tellurides under photosensitized conditions. *The Journal of organic chemistry*, *76*(10), 4173-4177.
218. Overmyer, K., Brosché, M., & Kangasjärvi, J. (2003). Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in plant science*, *8*(7), 335-342.
219. Pan, X., Li, M., Wan, T., Wang, L., Jia, C., Hou, Z., Zhao, X., Zhang, J. and Chang, W. (2011). Structural insights into energy regulation of light-harvesting complex CP29 from spinach. *Nature structural & molecular biology*, *18*(3), 309-315.
220. Pandini, V., Aliverti, A., & Zanetti, G. (1999). Interaction of the soluble recombinant Psad subunit of spinach photosystem I with ferredoxin I. *Biochemistry*, *38*(33), 10707-10713.
221. Peltier, G., & Cournac, L. (2002). Chlororespiration. *Annual review of plant biology*, *53*(1), 523-550.
222. Pesaresi, P., Hertle, A., Pribil, M., Kleine, T., Wagner, R., Strissel, H., Ihnatowicz, A., Bonardi, V., Scharfenberg, M., Schneider, A., & Pfannschmidt, T. (2009). *Arabidopsis* STN7 kinase provides a link between short-and long-term photosynthetic acclimation. *The Plant Cell*, *21*(8), 2402-2423.
223. Pesaresi, P., Pribil, M., Wunder, T., & Leister, D. (2011). Dynamics of reversible protein phosphorylation in thylakoids of flowering plants: the roles of STN7, STN8 and TAP38. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1807*(8), 887-896.
224. Pfannschmidt, T., Nilsson, A., & Allen, J. F. (1999). Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature*, *397*(6720), 625-628.
225. Pfannschmidt, T., Schütze, K., Brost, M., & Oelmüller, R. (2001). A novel mechanism of nuclear photosynthesis gene regulation by redox signals from the chloroplast during photosystem stoichiometry adjustment. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(39), 36125-36130.

226. Pietrzykowska, M., Suorsa, M., Semchonok, D. A., Tikkanen, M., Boekema, E. J., Aro, E. M., & Jansson, S. (2014). The light-harvesting chlorophyll a/b binding proteins Lhcb1 and Lhcb2 play complementary roles during state transitions in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 26(9), 3646-3660.
227. Pospíšil, P. (2012). Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(1), 218-231.
228. Prasad, T. K., Anderson, M. D., Martin, B. A., & Stewart, C. R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *The Plant Cell*, 6(1), 65-74.
229. Pribil, M., Pesaresi, P., Hertle, A., Barbato, R., & Leister, D. (2010). Role of plastid protein phosphatase TAP38 in LHCII dephosphorylation and thylakoid electron flow. *PLoS Biology*, 8(1), e1000288.
230. Putarjunan, A., Liu, X., Nolan, T., Yu, F., & Rodermel, S. (2013). Understanding chloroplast biogenesis using second-site suppressors of immutans and var2. *Photosynthesis research*, 116(2-3), 437-453.
231. Puthiyaveetil, S., Kavanagh, T. A., Cain, P., Sullivan, J. A., Newell, C. A., Gray, J. C., Robinson C., Giezen M., Rogers M. B. & Allen, J. F. (2008). The ancestral symbiont sensor kinase CSK links photosynthesis with gene expression in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(29), 10061-10066.
232. Puthiyaveetil, S. (2011). A mechanism for regulation of chloroplast LHC II kinase by plastoquinol and thioredoxin. *Febs Letters*, 585(12), 1717-1721.
233. Puthiyaveetil, S., Ibrahim, I. M., & Allen, J. F. (2012). Oxidation–reduction signalling components in regulatory pathways of state transitions and photosystem stoichiometry adjustment in chloroplasts. *Plant, cell & environment*, 35(2), 347-359.
234. Richter, A. S., & Grimm, B. (2012). Thiol-based redox control of enzymes involved in the tetrapyrrole biosynthesis pathway in plants. *Frontiers in plant science*, 4, 371-371.
235. Rintamäki, E., Martinsuo, P., Pursiheimo, S., & Aro, E. M. (2000). Cooperative regulation of light-harvesting complex II phosphorylation via the plastoquinol and ferredoxin-thioredoxin system in chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(21), 11644-11649.
236. Roach, T., Na, C. S., & Krieger-Liszkay, A. (2015). High light-induced hydrogen peroxide production in *Chlamydomonas reinhardtii* is increased by high CO₂ availability. *The Plant Journal*, 81(5), 759-766.

237. Robinson, J. M. (1988). Spinach Leaf Chloroplast CO₂ and NO₂⁻ Photoassimilations Do Not Compete for Photogenerated Reductant Manipulation of Reductant Levels by Quantum Flux Density Titrations. *Plant physiology*, 88(4), 1373-1380.
238. Rodday, S. M., Webber, A. N., Bingham, S. E., & Biggins, J. (1995). Evidence that the FX domain in photosystem I interacts with the subunit PsaC: site-directed changes in PsaB destabilize the subunit interaction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*, 34(19), 6328-6334.
239. Ruban, A. V., Johnson, M. P., & Duffy, C. D. (2012). The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(1), 167-181.
240. Rumeau, D., Peltier, G., & Cournac, L. (2007). Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant, Cell & Environment*, 30(9), 1041-1051.
241. Schmid, V. H., Cammarata, K. V., Bruns, B. U., & Schmidt, G. W. (1997). In vitro reconstitution of the photosystem I light-harvesting complex LHCI-730: heterodimerization is required for antenna pigment organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(14), 7667-7672.
242. Schmid, V. H., Potthast, S., Wiener, M., Bergauer, V., Paulsen, H., & Storf, S. (2002). Pigment binding of photosystem I light-harvesting proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37307-37314.
243. Shapiguzov, A., Ingelsson, B., Samol, I., Andres, C., Kessler, F., Rochaix, J. D., Vener, A., and Goldschmidt-Clermont, M. (2010). The PPH1 phosphatase is specifically involved in LHCII dephosphorylation and state transitions in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(10), 4782-4787.
244. Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379.
245. Scheller, H. V., Jensen, P. E., Haldrup, A., Lunde, C., & Knoetzel, J. (2001). Role of subunits in eukaryotic Photosystem I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1507(1), 41-60.
246. Shevela, D. N., Khorobrykh, A. A., & Klimov, V. V. (2006). Effect of bicarbonate on the water-oxidizing complex of photosystem II in the super-reduced S-states. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1757(4), 253-261.
247. Sies, H., & Menck, C. F. (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 275(3-6), 367-375.

248. Ślesak, I., Libik, M., & Miszalski, Z. (2003). Superoxide dismutase activity in callus from the C3-CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 75(1), 49-55.
249. Slesak, I., Libik, M., Karpinska, B., Karpinski, S., & Miszalski, Z. (2007). The role of hydrogen peroxide in regulation of plant metabolism and cellular signalling in response to environmental stresses. *Acta biochimica polonica-english edition*, 54(1), 39.
250. Šnyrychová, I., Pospíšil, P., & Nauš, J. (2006). Reaction pathways involved in the production of hydroxyl radicals in thylakoid membrane: EPR spin-trapping study. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 5(5), 472-476.
251. Strand, D. D., Fisher, N., & Kramer, D. M. (2016). The Higher Plant Plastid Complex I (NDH) is a Reversible Proton Pump that increases ATP production by Cyclic Electron Flow Around Photosystem I. *bioRxiv*, 049759.
252. Standfuss, J., van Scheltinga, A. C. T., Lamborghini, M., & Kühlbrandt, W. (2005). Mechanisms of photoprotection and nonphotochemical quenching in pea light-harvesting complex at 2.5 Å resolution. *The EMBO Journal*, 24(5), 919-928.
253. Steinbrenner, J., & Linden, H. (2003). Light induction of carotenoid biosynthesis genes in the green alga *Haematococcus pluvialis*: regulation by photosynthetic redox control. *Plant molecular biology*, 52(2), 343-356.
254. Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H., & Shen, J. R. (2015). Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature*, 517(7532), 99-103.
255. Sun, X., & Wen, T. (2011). Physiological roles of plastid terminal oxidase in plant stress responses. *Journal of biosciences*, 36(5), 951-956.
256. Takahashi, M., & Asada, K. (1988). Superoxide production in aprotic interior of chloroplast thylakoids. *Archives of biochemistry and biophysics*, 267(2), 714-722.
257. Tevini, M., & Steinmüller, D. (1985). Composition and function of plastoglobuli. *Planta*, 163(1), 91-96.
258. Tikkanen, M., Piippo, M., Suorsa, M., Sirpiö, S., Mulo, P., Vainonen, J., Vener, A. V., Allahverdiyeva, Y. & Aro, E. M. (2006). State transitions revisited-A buffering system for dynamic low light acclimation of *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 62(4), 779-793.
259. Tikkanen, M., Nurmi, M., Suorsa, M., Danielsson, R., Mamedov, F., Styring, S., & Aro, E. M. (2008). Phosphorylation-dependent regulation of excitation energy distribution between the two photosystems in higher plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1777(5), 425-432.

260. Tikkanen, M., Grieco, M., Kangasjärvi, S., & Aro, E. M. (2010). Thylakoid protein phosphorylation in higher plant chloroplasts optimizes electron transfer under fluctuating light. *Plant Physiology*, *152*(2), 723-735.
261. Tremmel, I. G., Kirchhoff, H., Weis, E., & Farquhar, G. D. (2003). Dependence of plastoquinol diffusion on the shape, size, and density of integral thylakoid proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1607*(2), 97-109.
262. Trouillard, M., Shahbazi, M., Moyet, L., Rappaport, F., Joliot, P., Kuntz, M., & Finazzi, G. (2012). Kinetic properties and physiological role of the plastoquinone terminal oxidase (PTOX) in a vascular plant. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1817*(12), 2140-2148.
263. Tullberg, A., Alexciev, K., Pfannschmidt, T., & Allen, J. F. (2000). Photosynthetic electron flow regulates transcription of the *psaB* gene in pea (*Pisum sativum* L.) chloroplasts through the redox state of the plastoquinone pool. *Plant and Cell Physiology*, *41*(9), 1045-1054.
264. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., & Kamiya, N. (2011). Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, *473*(7345), 55-60.
265. Vanderauwera, S., Zimmermann, P., Rombauts, S., Vandenabeele, S., Langebartels, C., Grisse, W., Inze, D., & Van Breusegem, F. (2005). Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis. *Plant Physiology*, *139*(2), 806-821.
266. Varco-Merth, B., Fromme, R., Wang, M., & Fromme, P. (2008). Crystallization of the c 14-rotor of the chloroplast ATP synthase reveals that it contains pigments. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1777*(7), 605-612.
267. Varotto, C., Pesaresi, P., Meurer, J., Oelmüller, R., Steiner-Lange, S., Salamini, F., & Leister, D. (2000). Disruption of the *Arabidopsis* photosystem I gene *psaE1* affects photosynthesis and impairs growth. *The Plant Journal*, *22*(2), 115-124.
268. Vener, A. V., Van Kan, P. J., Rich, P. R., Ohad, I., & Andersson, B. (1997). Plastoquinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome *bf* mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(4), 1585-1590.
269. Vener, A. V., Ohad, I., & Andersson, B. (1998). Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids. *Current opinion in plant biology*, *1*(3), 217-223.
270. Vetoshkina, D. V., Borisova-Mubarakshina, M. M., Naydov, I. A., Kozuleva, M. A., & Ivanov, B. N. (2015). Impact of high light on reactive oxygen species production within photosynthetic biological membranes. *Journal of Biology and Life Science*, *6*(2), 50-60.

271. Vico, G., Manzoni, S., Palmroth, S., Weih, M., & Katul, G. (2013). A perspective on optimal leaf stomatal conductance under CO₂ and light co-limitations. *Agricultural and forest meteorology*, 182, 191-199.
272. Wagner, R., Dietzel, L., Bräutigam, K., Fischer, W., & Pfannschmidt, T. (2008). The long-term response to fluctuating light quality is an important and distinct light acclimation mechanism that supports survival of *Arabidopsis thaliana* under low light conditions. *Planta*, 228(4), 573-587.
273. Walters, R. G., Shephard, F., Rogers, J. J., Rolfe, S. A., & Horton, P. (2003). Identification of mutants of *Arabidopsis* defective in acclimation of photosynthesis to the light environment. *Plant Physiology*, 131(2), 472-481.
274. Webber, A. N., Gibbs, P. B., Ward, J. B., & Bingham, S. E. (1993). Site-directed mutagenesis of the photosystem I reaction center in chloroplasts. The proline-cysteine motif. *Journal of Biological Chemistry*, 268(17), 12990-12995.
275. Weber, J., & Senior, A. E. (2003). ATP synthesis driven by proton transport in F₁F₀-ATP synthase. *Febs Letters*, 545(1), 61-70.
276. Wei, X., Su, X., Cao, P., Liu, X., Chang, W., Li, M., Zhang, X., & Liu, Z. (2016). Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution. *Nature*, 534(7605), 69-74.
277. Wientjes, E., van Amerongen, H., & Croce, R. (2013a). LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1827(3), 420-426.
278. Wientjes, E., Drop, B., Kouřil, R., Boekema, E. J., & Croce, R. (2013b). During state 1 to state 2 transition in *Arabidopsis thaliana*, the photosystem II supercomplex gets phosphorylated but does not disassemble. *Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 32821-32826.
279. Wientjes, E., van Amerongen, H., & Croce, R. (2013c). Quantum yield of charge separation in photosystem II: functional effect of changes in the antenna size upon light acclimation. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(38), 11200-11208.
280. Wollman, F. A., & Lemaire, C. (1988). Studies on kinase-controlled state transitions in photosystem II and b6f mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* which lack quinone-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 933(1), 85-94.
281. Wunder, T., Xu, W., Liu, Q., Wanner, G., Leister, D., & Pribil, M. (2007). The major thylakoid protein kinases STN7 and STN8 revisited: effects of altered STN8 levels and regulatory specificities of the STN kinases. *Current challenges in photosynthesis: From natural to artificial*, 64, 417.
282. Xu, Y. H., Liu, R., Yan, L., Liu, Z. Q., Jiang, S. C., Shen, Y. Y., Wang X.-F. & Zhang, D. P. (2012). Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins are required for stomatal response to abscisic acid in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany*, 63(3), 1095-1106.

283. Yakushevskaya, A. E., Jensen, P. E., Keegstra, W., van Roon, H., Scheller, H. V., Boekema, E. J., & Dekker, J. P. (2001). Supermolecular organization of photosystem II and its associated light-harvesting antenna in *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*, 268(23), 6020-6028.
284. Yakushevskaya, A. E., Keegstra, W., Boekema, E. J., Dekker, J. P., Andersson, J., Jansson, S., Ruban, A., & Horton, P. (2003). The structure of photosystem II in *Arabidopsis*: localization of the CP26 and CP29 antenna complexes. *Biochemistry*, 42(3), 608-613.
285. Yamashita, E., Zhang, H., & Cramer, W. A. (2007). Structure of the cytochrome b6/f complex: quinone analogue inhibitors as ligands of heme c. *Journal of molecular biology*, 370(1), 39-52.
286. Yan, J., Kurisu, G., & Cramer, W. A. (2006). Structure of the cytochrome b6/f complex: Binding site and intraprotein transfer of the quinone analogue inhibitor 2, 5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl-p-benzoquinone. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 103, 67-74
287. Yang, D. H., Andersson, B., Aro, E. M., & Ohad, I. (2001). The redox state of the plastoquinone pool controls the level of the light-harvesting chlorophyll a/b binding protein complex II (LHC II) during photoacclimation. *Photosynthesis Research*, 68(2), 163-174.
288. Yokono, M., Takabayashi, A., Akimoto, S., & Tanaka, A. (2014). A megacomplex composed of both photosystem reaction centres in higher plants. *Nature communications*, 6, 6675-6675.
289. Zer, H., & Ohad, I. (2003). Light, redox state, thylakoid-protein phosphorylation and signaling gene expression. *Trends in biochemical sciences*, 28(9), 467-470.
290. Zhang, S., & Klessig, D. F. (2000). Pathogen-induced MAP kinases in tobacco. In *MAP Kinases in Plant Signal Transduction*, 65-84. Springer Berlin Heidelberg.
291. Zharmukhamedov, S. K., Allakhverdiev, S. I., Smolova, T. N., & Klimov, V. V. (2013). Bicarbonate stimulates the electron donation from Mn²⁺ to in isolated D1/D2/cytochrome b559 complex. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 129, 87-92.
292. Zito, F., Finazzi, G., Delosme, R., Nitschke, W., Picot, D., & Wollman, F. A. (1999). The Qo site of cytochrome b6/f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *The EMBO journal*, 18(11), 2961-2969.
293. Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., & Orth, P. (2001). Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution. *Nature*, 409(6821), 739-743.
294. Ананьев, Г. М., & Климов, В. В. (1988). Фотообразование связанной перекиси водорода на донорной стороне фотосистемы 2. *Доклады Академии Наук СССР*, 298, 1007-1011.
295. Иванов, Б.Н., Редько, Т. П., Шмелева, В. Л., & Мухин, Е. Н. (1980). Участие ферредоксина в псевдоциклическом электронном транспорте в изолированных хлоропластах гороха. *Биохимия*, 45(2), 1425.

296. Иванов, Б. Н. (2008). Кооперация фотосистемы 1 и пула пластохинона в восстановлении кислорода в хлоропластах высших растений. *Биохимия*, 73(1), 137-144.
297. Козулева, М. А., Найдов, И. А., Мубаракшина, М. М., & Иванов, Б. Н. (2007). Участие ферредоксина в восстановлении кислорода в фотосинтетической электрон-транспортной цепи. *Биофизика*, 52(4), 650-656.
298. Мальян, А.Н., (2014). *Современные проблемы фотосинтеза*, т.2, 101-113.
299. Мубаракшина, М. М., Хоробрых, С. А., Козулева, М. А., & Иванов, Б. Н. (2006). Внутримембранное образование пероксида водорода при восстановлении кислорода в тилакоидах высших растений. *Доклады Академии наук*, 408(1), 118-121.
300. Остерман, Л. А. (1981). Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультра-центрифугирование. «Наука», Москва.
301. Полесская, О. Г. (2007). Растительная клетка и активные формы кислорода. «КДУ», Москва.
302. Хоробрых, С. А., Хоробрых, А. А., Климов, В. В., & Иванов, Б. Н. (2002). Фотопоглощение кислорода в препаратах фотосистемы 2 при повреждении водоокисляющего комплекса. *Биохимия*, 67, 823-829.
303. Шувалов, В. А., & Красновский, А. А. (1975). Изучение фотовосстановления кислорода хлоропластами методом хемилюминесценции люминола и хлорофилла. *Биохимия*, 40(2), 358-367.