

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ ФОТОСИСТЕМЫ II ДЛЯ АНАЛИЗА ИНДУКЦИОННОЙ КРИВОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, ВЫЗВАННОЙ НАСЫЩАЮЩИМ СВЕТОВЫМ ИМПУЛЬСОМ, ВО ВРЕМЕННОМ ДИАПАЗОНЕ 100 нс – 10 с

© 2006 г. Н.Е. Беляева, В.З. Пашенко, Г. Ренгер*, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119992, Москва, Воробьевы горы,
E-mail: natalmurav@yandex.ru;

*Max-Valmer-Institute, Technical University, Berlin, Germany

Поступила в редакцию 01.02.06

Получены и проанализированы с помощью математической модели процессов в фотосистеме II данные по измерению сигнала флуоресценции, возбуждаемой насыщающим импульсом длительностью 10 нс с помощью специального протокола освещения на препаратах термофильного штамма одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick (нативных и с диуроном) в диапазоне времени от 100 нс до 10 с. Анализ результатов моделирования показал, что в условиях короткого светового воздействия важен детальный учет процессов рекомбинации, в том числе безызлучательной в фотосистеме II, а дальнейший перенос зарядов в электрон-транспортной цепи тилакоидной мембраны можно описывать одной реакцией повторного окисления хинолов. Включение в модель фотосистемы II реакции ингибирования диуроном электронного транспорта в акцепторной части фотосистемы II позволило описать кривые индукции флуоресценции, регистрируемые в присутствии диурана. Определены параметры модели (рН стромы, константы скоростей реакций безызлучательной рекомбинации, начальная восстановленность пула хинонов), при которых адекватно описаны наблюдаемые в эксперименте соотношения максимального и начального уровней флуоресценции (F_m/F_0).

Ключевые слова: индукция флуоресценции, импульсная флуорометрия, электронный транспорт, фотосистема II, модельные расчеты.

Интенсивность флуоресценции хлорофилла фотосинтезирующих объектов определяется как совокупностью процессов в антенных комплексах, так и процессами электронного транспорта и другими, более медленными реакциями в фотосинтетической мембране. Изменение интенсивности флуоресценции можно наблюдать в широком временном интервале – от единиц пикосекунд до десятков секунд. При этом используются специальные протоколы измерений, включая возбуждение постоянным светом, а также насыщающими импульсами разной длительности на фоне постоянно действующего света разной интенсивности.

Математическое моделирование процессов в тилакоидной мембране позволяет формализовать представления о процессах различной природы, происходящих в фотосинтетической мембране, наблюдать на модели кинетику перемешанных, не регистрируемых экспериментально, и затем путем идентификации параметров модели оценивать значения констант скоростей отдельных реакций. Заключение об адекватности модели делается на основании сопоставления соответствующих модельных переменных с экспериментально наблюдаемыми кривыми.

При возбуждении образца светом постоянной интенсивности индукционные кривые флуоресценции (ИФ) обычно регистрируют во временном диапазоне 50 мкс – 100 с [1–9]. Для описания и анализа кривых ИФ используют математические модели разной степени детализации [6, 10–23]. Индукционная кривая флуоресценции (Фл), регистрируемая при постоянном свете, на временах от миллисекунд до секунд отражает как процессы электронного транспорта, так и генерацию электрического потенциала

Сокращения: ИФ – индукция флуоресценции; Фл – флуоресценция; РЦ – реакционный центр; ФС II – фотосистема II; P680 – хлорофилл РЦ ФСII; Phe – феофитин; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хиноновые акцепторы ФС II; КВК – кислородовыделяющий комплекс; Y₂ – тирозин; Chl – хлорофиллы антенны и РЦ; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; H₁⁺ – протоны в люмене; H₂⁺ – протоны в строме; ОПН – обратимая радикальная пара.

на мембране [12,22–27]. На более длительных временах форма кривой ИФ зависит также от процессов формирования электрохимического потенциала и связана с метаболическими цепями, для которых система первичных процессов фотосинтеза является донором энергии в виде АТФ и НАДФ [2,21,22,28].

Количественные показатели флуоресценции (Фл), в первую очередь относительный выход Фл, часто применяют для характеристики физиологического состояния фотосинтезирующих объектов, при этом широко используются методы импульсной флуориметрии [6,29].

Наиболее быстрые из процессов, связанных с флуоресценцией – с характерными временами до 1 нс, происходят в светособирающей антенне и в пределах ближайшего окружения реакционного центра (РЦ). Для описания кинетики флуоресценции в условиях возбуждения образца слабыми лазерными вспышками используется модель обратимой радикальной пары (ОРП) [4–6]. В рамках этой модели проанализирована кинетика распада быстрой (prompt) флуоресценции на временах до 1 нс и кинетика заполнения состояний фотосистемы II (ФС II), формируемых переносчиками хлорофилла РЦ ФС II (P680), феофетина (Phe), Q_A [10,30–36].

На временах больше 1 нс для анализа вкладов отдельных состояний РЦ ФС II в регистрируемый сигнал как быстрой, так и рекомбинантной или замедленной (delayed) флуоресценции требуется более детальное рассмотрение процессов переноса электрона в пигмент-белковом комплексе ФС II, связанных с восстановлением P680+ или повторным окислением Q_A^- [37–39]. В препаратах ФС II с интактным кислородвыделяющим комплексом (КВК) фотоактивный пигмент P680+ восстанавливается непосредственно от донорного компонента тирозина (Y_Z) с характерным временем, равным десяткам наносекунд [39]. Возникшие состояния $Y_Z^{OX}P680Q_A^-$ будут преобладать в течение нескольких микросекунд после актиничной вспышки в связи с малыми скоростями рекомбинации Y_Z^{OX} с Q_A^- (~ 100 мкс) [3] и переноса электрона на Q_B (~ 200 мкс) [39]. При этом восстановление Y_Z^{OX} происходит за времена порядка микросекунд, определяемые характерными временами жизни S_1 -состояний цикла КВК [39].

Для анализа процессов срабатывания первого цикла КВК в ответ на короткую вспышку требуется применение для возбуждения образца мощного насыщающего импульса, который способен окислить P680+ одновременно во всех комплексах ФС II образца. Разработанная в [37] система регистрации позволила исследовать

замедленную флуоресценцию во временном диапазоне от 100 нс до 5 мкс. В последующих модификациях прибора временной диапазон регистрации расширен вплоть до 10 с.

Для детального анализа комплекса процессов переноса и рекомбинации зарядов в ФС II необходима математическая модель, с достаточной полнотой описывающая кинетику процессов как на донорной, так и на акцепторной сторонах ФС II. Изменяя параметры модели, можно имитировать воздействие реагентов на перенос электрона ФС II и анализировать результаты по регистрации замедленной флуоресценции в условиях воздействия на образец ингибиторов, в частности DCMU.

В данной работе проведено теоретическое и экспериментальное исследование процессов переноса электрона в ФС II. Экспериментальные данные по измерению сигнала Фл, возбуждаемой насыщающим импульсом длительностью 10 нс, получены на нативных препаратах и в присутствии диурона в диапазоне от 100 нс до 10 с помощью специальной детекторной системы, разработанной в лаборатории профессора Ренгера [30]. Данные эксперимента проанализированы с помощью математической модели процессов в ФС II. Модель ФС II представляет собой детализированный вариант блока ФС II обобщенной модели первичных процессов фотосинтеза (модель тилакоида), разработанной ранее на кафедре биофизики Биологического ф-та МГУ [19–23]. Модель тилакоида включает комплекс процессов переноса зарядов в тилакоидной мембране и адекватно описывает полную кинетическую кривую индукции Фл с характерными особенностями, как нарастания, так и спада величины сигнала флуоресценции (O-J-I-P-S-M-T-кинетика), наблюдаемыми [5] в условиях непрерывного освещения в диапазоне от 40 мкс до 10 с как при высоких, так и при низких интенсивностях света [22].

В настоящей работе в рамках детализированной модели ФС II проведен анализ вклада отдельных состояний ФС II в кинетику флуоресценции после наносекундного импульса. Показано, что для моделирования кинетики индукции Фл после короткого светового воздействия важен детальный учет рекомбинационных процессов, в том числе безызлучательной рекомбинации в ФС II, а дальнейшие процессы переноса зарядов в электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) тилакоидной мембраны можно не учитывать подробно, задав их одной реакцией повторного окисления хинолов. Данная версия модели ФС II включила моделирование конкурентного ингибирования диуроном электронного транспорта в акцепторной части ФС II, что позволило описать кинетические кривые,

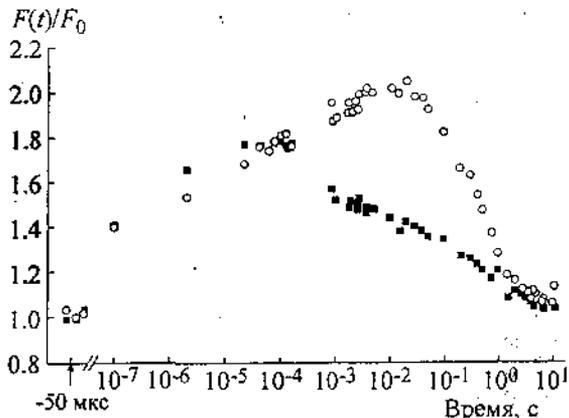


Рис. 1. Экспериментальные данные по регистрации кривых ИФ для культуры клеток зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick, термофильный штамм CALU-175 S-39 нативного образца (квадраты) и в среде с диуроном (кружки) после измерения F_0 (-50 мкс) уровня Фл и воздействия насыщающего светового импульса длительностью 10 нс в диапазоне времени от 100 нс до 10 с. Квадраты – контроль, кружки – 5 мкМ DCMU.

полученные в эксперименте в присутствии диурина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Регистрация флуоресценции после импульсного возбуждения. В эксперименте использовали культуру одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick, термофильный штамм CALU-175 S-39. Культуру водоросли выращивали на 20% среде Тамия в цилиндрических стеклянных культиваторах при освещении люминисцентными лампами с интенсивностью света 30 Вт/м² на поверхности культиватора при температуре 37°C и постоянной аэрации. Концентрация клеток в эксперименте составляла ~5 млн кл./мл.

Индукционные кривые изменения выхода флуоресценции (рис. 1) регистрировали в диапазоне 100 нс – 10 с на установке, описанной в [38]. Образец в кювете возбуждался актиничным одиночным импульсом света $\lambda_{\text{акт}} = 532$ нм длительностью 10 нс. Энергия актиничного света составляла 0,4 мДж/см², что обеспечивало 100% возбуждение клеток (насыщающий импульс). Временной ход светоиндуцированных актиничным импульсом изменений относительного квантового выхода флуоресценции (индукционная кривая) регистрировался с помощью слабого измерительного света от устройства, содержащего набор светодиодов (Toshiba TLRA 190P), генерирующих периодические импульсы света с $\lambda_{\text{изм}} = 600$ нм. Свечение образца, вызываемое измерительным светом, регистрировали с помощью многоканального фотоум-

ножителя (MCP-PMT) R5916 U-51 (Hamamatsu), время запирания (открывания) которого составляло ~1 нс, а отношение сигналов открытый/закрытый составляло $1,7 \cdot 10^8$. Уровень сигнала F_0 определялся с помощью измерительного света, подаваемого на образец за 50 мкс до возбуждения образца актиничным светом. Светодиодное устройство, генерирующее измерительный свет, включалось и выключалось синхронно с открытием и закрытием фотоумножителя MCP-PMT с помощью импульсного генератора DS-345 (Stanford Research Systems). Данные, полученные до и после каждой актиничной лазерной вспышки, накапливались в компьютере, для увеличения отношения сигнал/шум производилось суммирование до 80 отдельных кинетических кривых. Для избежания фотоповреждения образец непрерывно прокачивался через измерительную кювету.

Описание модели ФС II. Схема состояний РЦ ФС II и переходов между ними, рассмотренная в модели, приведена на рис. 2 [20–22]. Детально проанализированы кинетические состояния, включенные в процессы разделения зарядов (реакции 2, 9, 16, 29), стабилизации заряда (реакции 3, 4, 10, 11, 17, 18, 30, 31), переноса его в пул хинолов (PQH₂) с освобождением Q_B-сайта (реакции 7, 14, 21–27) и заполнения пустого Q_B-сайта окисленными хинонами (PQ) (реакции 34–40). Полагали, что на каждый электрон, переданный от КВК на окисленный P680+ (Chl+) (реакции 4, 11, 18, 31), во внутритилакоидное пространство выделяется один протон.

Переход Chl в возбужденное состояние Chl* задавали световой константой $k_L = k_p$, $i = 1, 5, 8, 12, 15, 19, 28, 32$ (i – номер реакции на схеме ФС II, рис. 2). Количество попаданий квантов света в РЦ в секунду $k_L = 1500 \text{ с}^{-1}$ соответствовало интенсивности света (600 нм) 1000 Вт/м². Обратный процесс распада Chl* происходит с испусканием квантов флуоресценции (константа флуоресценции $k_F = k_{-i}$). Выход флуоресценции вычисляли как произведение суммы концентраций флуоресцирующих состояний ФС II и отношения константы флуоресценции k_F к световой константе k_L :

$$F = \frac{k_F}{k_L} (x_2 + y_2 + z_2 + g_2 + x_6 + y_6 + z_6 + g_6). \quad (1)$$

При описании реакций в модели изолированной ФС II в качестве параметров введены концентрации протонов в строме и люмене ($[H_S^+]$ и $[H_L^+]$) и трансмембранный электрический потенциал $\Delta\psi$. Влияние $\Delta\psi$ учитывали для реакций переноса электрического заряда перпендикулярно плоскости мембраны:

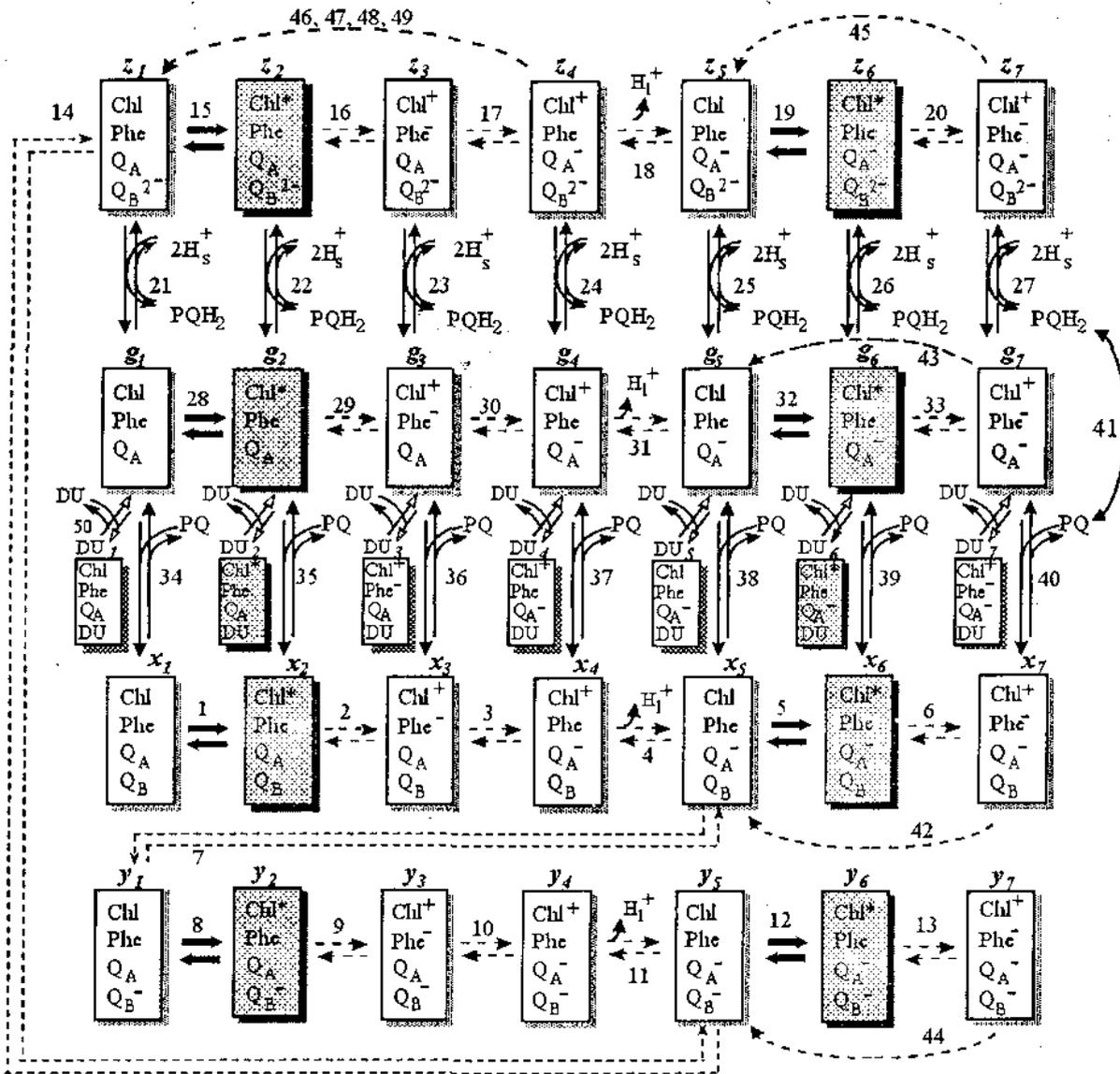


Рис. 2. Схема каталитического цикла фотосистемы II. Каждый прямоугольник представляет собой одно из кинетических состояний ФС II, определяемое редокс-состоянием входящих в него переносчиков электрона. Затененными показаны состояния, способные к испусканию квантов флуоресценции. Chl – весь хлорофилл ФС II, включая пигменты антенны и пигмент реакционного центра P680; Phe – первичный акцептор электронов феофитин; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хиноновые акцепторы. PQ – пластохинон; PQH₂ – пластохинол; H₁⁺ – протоны, выделяемые в люмен, H₂⁺ – протоны, поглощаемые из стромы тилакоида. Пунктирными стрелками показаны быстрые (с характерным временем менее 0,1 мс) стадии цикла, сплошными стрелками – медленные (с характерным временем не менее 1 мс) стадии, жирными стрелками – световые стадии. Цифры рядом со стрелками соответствуют номерам реакций, буквы над прямоугольниками (x_i, y_i, z_i, g_i, du_i, i = 1, ...7) – обозначениям переменных модели. Ряд с переменными du_i (малые прямоугольники) обозначает состояния с Q_B-сайтом, занятым ингибитором. Молекула ингибитора (DU) занимает пустой Q_B-сайт с образованием состояний du_i, не способных к переносу электрона с первичного на вторичный хинон. Пунктирными дугами показаны процессы безызлучательной рекомбинации Phe- с P680⁺ – реакции 42–45, Q_A⁻ с P680⁺ – 46–49.

$$\tilde{K}_{eq} = \exp(nF/RT\Delta E_m - F/RT\alpha_f\Delta\psi), \quad (2)$$

где ΔE_m – разность средноточечных редокс-потенциалов переносчиков [40]. α_f – степень электрогенности – определяет, какая доля от общего значения $\Delta\psi$ влияет на данную реакцию [41]. Отметим, что известные из литературы модели,

подробно описывающие процессы ФС II [13,15], не учитывают зависимость скоростей реакций от $\Delta\psi$.

Повторное окисление подвижного переносчика PQH₂ описывали одной реакцией (V₄₁, рис. 2). Для описания процессов, протекающих в соответствии со схемой ФС II, задавали мат-

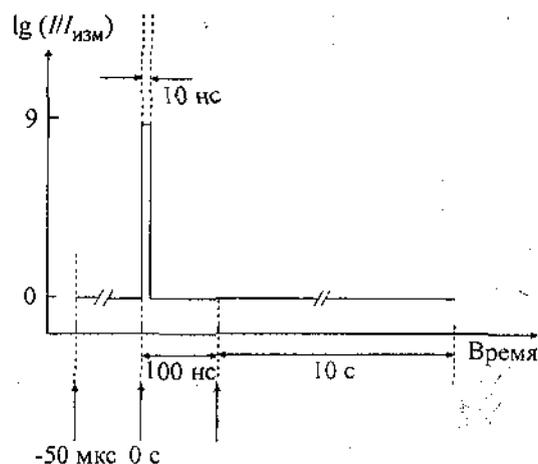


Рис. 3. Схема эксперимента. Режимы освещения объекта, использованные при регистрации флуоресцентных данных, приведенных на рис. 1. На горизонтальной оси показано, в какие моменты времени изменяли способы светового воздействия. По вертикальной оси приведен логарифм соотношения интенсивностей света, задаваемых при моделировании воздействия импульса и измерительного света.

рицу скоростей переходов между состояниями комплекса и получали систему из 30-ти дифференциальных уравнений для концентраций различных редокс-состояний комплекса ФС II и стромальных форм пластохинона (PQH_2 , PQ).

Дифференциальное уравнение для каждого i -го компонента системы имело вид:

$$dX_i/dt = v_{пр}(X_i) - v_{потр}(X_i),$$

где X_i — концентрация i -го компонента системы, мМ; $v_{пр}(X_i)$ и $v_{потр}(X_i)$ — суммарные скорости его производства и потребления, мМ/с. Концентрации различных состояний комплекса ФС II рассчитывались как произведение вероятности данного состояния на общую концентрацию комплекса в системе. Взаимодействие комплекса ФС II с подвижными переносчиками описывалось по закону действующих масс в предположении бимолекулярной реакции [22].

Полагали, что концентрация комплекса ФС II в тилакоидной мембране составляет 1,62 мМ при соотношении концентраций комплекса ФС II и хинонов пула 1:6 [42]. Концентрацию редокс-состояний отдельных переносчиков, входящих в состав РЦ ФС II, рассчитывали как сумму концентраций всех состояний ФС II, содержащих переносчик в данном редокс-состоянии. Например, концентрация состояний ФС II с восстановленным Q_A^- задается формулой:

$$\sum_{i=4}^7 ([x_i] + [g_i] + [y_i] + [z_i]). \quad (3)$$

Термин «формы» использован нами для обозначения типов состояний ФС II. Например, 5-е формы (x_5 , g_5 , y_5 , z_5) — означает набор состояний ФС II, для которых электрон стабилизирован на Q_A^- .

В данный вариант модели ФС II (в отличие от предыдущего [20–22]) включены два типа необратимых реакций для процессов безызлучательной рекомбинации, обозначенные на схеме пунктирными дугами.

Заряд на феофитине рекомбинирует с окисленным хлорофиллом закрытых РЦ. Эти реакции (42–45) включены в модель как переходы из 7-х состояний в 5-е с константой скорости, диапазон изменения которой приведем в обсуждении.

Восстановленный первичный хинон Q_A^- может рекомбинировать с окисленными донорами электронов: хлорофиллом РЦ, тирозином либо состояниями КВК. В модели это переход из 4-х форм в 1-е (реакции 46–49, рекомбинация Q_A^- с $P680^+$) с константой скорости, изменяющейся в диапазоне от 200 до 2000 s^{-1} .

Моделирование блокировки переноса электрона на пул хинонов было нами описано двумя различными способами. В первом варианте уменьшали константы скорости переноса на Q_B , что аналогично подходу, принятому в литературе [13, 15]. Второй вариант позволяет провести расчет для конкретной концентрации реагента с ингибирующим эффектом. Для этого мы вводили дополнительные реакции взаимодействия с диуроном для состояний ФС II с пустым Q_B -сайтом (g_i) (рис. 2). Таким образом, модель ФС II включила дополнительный (горизонтальный) ряд, состоящий из 7-ми состояний (du_i). Предполагали, что для этих состояний, которые содержат молекулу ингибитора в Q_B -сайте, происходят переходы каталитического цикла ФС II, соответствующие обозначенным горизонтальными стрелками в строках схемы рис. 2.

Схема эксперимента. Экспериментальные данные приведены на рис. 1 для точки -50 мкс до включения насыщающего импульса света и затем для точек после воздействия светового импульса от 100 нс до 10 с: квадраты — для контроля, круги — в присутствии диурана. Используемый в эксперименте протокол измерений представлен в виде схемы на рис. 3. Объект освещается слабым измерительным светом в течение 10 с (на рис. не показано). За 50 мкс до вспышки (-50 мкс) измеряется вели-

чина Фл для определения уровня сигнала F_0 . Насыщающая вспышка длительностью 10 нс ($t_1 = 0, t_2 = 10$ нс) переводит все РЦ в возбужденное состояние. Измерения флуоресценции образца после вспышки (индукционная кривая) начинают через 100 нс ($t_3 = 100$ нс) после включения вспышки и проводят в течение 10 с ($t_4 = 10$ с).

РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТОВ

1. Состояние системы при воздействии импульса. Имитацию на модели процессов ФС II, протекающих при различных режимах освещения, проводили поэтапно. В таблице приведены рассчитанные на модели для нативных образцов и в присутствии диурона значения концентраций состояний ФС II для опорных моментов времени – включение измерительного света после темновой адаптации, зондирование системы для определения F_0 (-50 мкс), первое измерение после импульса ($t_3 = 100$ нс).

1.1. Действие измерительного света. Перед включением измерительного света распределение концентраций состояний ФС II определяется условиями темновой адаптации, когда значения световых констант в модели равны нулю. При этом заполнены нейтральные состояния x_1 и g_1 (таблица, 1-й столбец), соотношение концентраций которых определяется параметрами взаимодействия акцепторной части ФС II с подвижными молекулами хинонного пула.

Включение слабого измерительного света моделировали, принимая световую константу $k_L = 0,6 \text{ с}^{-1}$, что соответствует освещенности $0,4 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$. Рассчитывали кинетические кривые ИФ (рис. 4, кривая 1 Фл) и концентрации состояний ФС II с открытыми РЦ (кривые 3, 5 Q_A). Для сравнения моделировали воздействие актиничного света высокой интенсивности ($k_L = 6000 \text{ с}^{-1}$) – рис. 4, кривые 2 Фл, 4, 6 Q_A .

Для слабого света стационарный уровень ИФ (рис. 4, 1 Фл) на временах > 1 с, превышает исходный на $0,15 \cdot F_0$. Модель ФС II показывает, что при длительном (10 с) воздействии слабого света заполнены состояния с открытыми РЦ (рис. 4, 3, 5 Q_A). При этом 35% заполненных при темновой адаптации состояний ФС II с невозстановленным или пустым Q_B -сайтом ($x_1 + g_1$, рис. 4, 3 $Q_A Q_B$) переходит в состояния открытых РЦ с восстановленным вторичным хиноном ($y_1 + z_1$, рис. 4, 5 $Q_A Q_B^{(2)}$). Соответствующие значения переменных приведены в таблице в столбцах 2 и 3. Мы полагали, что эти величины описывают ФС II образцов, предварительно адаптированных к темноте, в состоянии с начальным уровнем флуоресценции F_0 перед включением импульса для момента

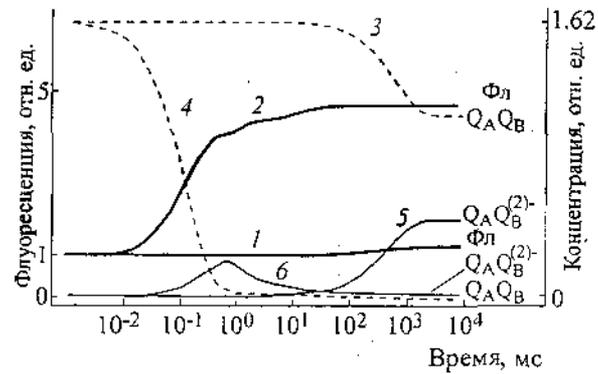


Рис. 4. Моделирование воздействия на образец постоянного света, включаемого после темновой адаптации. Кривые рассчитаны: 1, 3, 5 – для измерительного света слабой интенсивности (световая константа $k_L = 0,6 \text{ с}^{-1}$); 2, 4, 6 – для актиничного света насыщающей интенсивности ($k_L = 6 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$). 1, 2 (Фл) – индукция флуоресценции; 3, 4 ($Q_A Q_B$) – сумма концентраций открытых РЦ без электрона на Q_B (x_1 и g_1); 5, 6 ($Q_A Q_B^{(2)}$) – сумма концентраций открытых РЦ с одним ($y_1, Q_A Q_B$) и двумя ($z_1, Q_A Q_B^{(2)}$) электронами на вторичном хиноне.

времени -50 мкс Для сравнения на рис. 4 приведена классическая кривая ИФ, рассчитанная для описания стадии подъема величины флуоресценции (O-J-I-P-кинетика), регистрируемой после включения света высокой интенсивности (рис. 4, 2 Фл) [5,22], которая показывает, что переменная флуоресценция возрастает от начального уровня (F_0) до максимального за время ~100 мс, концентрация открытых РЦ при этом падает (в 500 раз) (рис. 4, кривые 4, 6 Q_A).

1.2. Действие одиночной световой вспышки. Воздействие насыщающего импульса моделировали, принимая световую константу $k_L = 6 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ для интервала времени от 0 с до 10 нс (интенсивность света $4 \cdot 10^8 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-2}$), и $k_L = 0,6 \text{ с}^{-1}$ для интервала времени от 10 нс до 100 нс. Полученные на модели в результате воздействия мощного светового импульса концентрации состояний ФС II помещены в колонки 4, 5 таблицы. Модель показывает, что через 100 нс после начала насыщающего 10-наносекундного импульса для ФС II преобладают состояния с окисленным хлорофиллом РЦ (P680+), 4-е формы, которые суммарно ($x_4 + g_4 + y_4 + z_4$) заполнены на 71% или на 80% в расчетах, проведенных для нативного образца или в среде с диуроном.

2. Выход флуоресценции после воздействия импульса. Набор значений переменных (таблица, столбцы 4 и 5), полученный для момента времени $t_3 = 100$ нс, корректировали, добиваясь оптимального соответствия теоретических дан-

Концентрации редокс-состояний, рассчитанные при моделировании процессов ФС II для условий контроля и действия диурона концентрацией 5 мкМ (DCMU)

Условия эксперимента, параметры и редокс-состояния модели ФС II	Образец после темновой адаптации ($k_L = 0$) освещают слабым светом ($k_L = 0,6 \text{ с}^{-1}$) для измерения F_0			1-е измерение после импульса: $k_L = 6 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$ от $t_1 = 0 \text{ с}$ до $t_2 = 10 \text{ нс}$, $k_L = 0,6 \text{ с}^{-1}$ до $t_3 = 100 \text{ нс}$		Состояние после импульса – начальное для расчета индукционных кривых $t_3 = 100 \text{ нс}$	
	Темновая адаптация	Слабый свет, 50 мкс перед импульсом		$t_3 = 100 \text{ нс}$ после импульса			
x1	0,82	0,45523	0,79165	0,1015	0,09306	0,1	0,1
x2·10 ⁻⁸	0,0	0,0137	0,02	0,01	0,03	0,0	0,0
x4	0,0	0,00029	0,00089	0,34981	0,69727	0,4	0,68
x5	0,0	0,02739	0,08806	0,03161	0,08824	0,03	0,08
x6·10 ⁻⁸	0,0	0,00393	0,013	0,001	0,0076	0,0	0,0
g1	0,8	0,48957	0,16729	0,10915	0,02003	0,2	0,02
g2·10 ⁻⁸	0,0	0,0147	0,004	0,01	0,007	0,0	0,0
g4	0,0	0,00032	0,00019	0,37618	0,15011	0,38	0,15
g5	0,0	0,02948	0,01861	0,03403	0,01856	0,04	0,019
g6·10 ⁻⁸	0,0	0,00423	0,0027	0,0001	0,0016	0,0	0,0
y1	0	0,54648	0,17608	0,12118	0,02073	0,12	0,033
y2·10 ⁻⁸	0,0	0,0164	0,0046	0,01	0,007	0,0	0,0
y4	0,0	0,00001	0,00004	0,41966	0,15522	0,42	0,15
y5	0,0	0,00624	0,00242	0,03403	0,00228	0,01	0,002
y6·10 ⁻⁸	0,0	0,00089	0,0003	0,0001	0,0002	0,0	0,0
z1	0	0,06119	0,0023	0,01364	0,00026	0,0	0,0
z2·10 ⁻⁸	0,0	0,00184	0,00006	0,0001	0,00009	0,0	0,0
z4	0	0,00004	0,0	0,04702	0,00194	0,0	0,0
z5	0	0,00369	0,0002	0,00406	0,0002	0,0	0,0
z6·10 ⁻⁸	0,0	0,00053	0,00003	0,00001	0,00002	0,0	0,0
Du1	0,0	0	0,33073	0	0,03897	0,0	0,04
Du2·10 ⁻⁸	0,0	0	0,0086	0	0,014	0,0	0,0
Du4	0,0	0,0	0,00041	0,0	0,29202	0,0	0,296
Du5	0,0	0	0,04104	0	0,04111	0,0	0,05
Du6·10 ⁻⁸	0,0	0	0,006	0	0,0035	0,0	0,0
			DCMU		DCMU		DCMU

ных экспериментальным. Итоговый набор значений переменных (столбцы 6 и 7 таблицы) использовали в качестве начальных значений для моделирования изменения величины флуоресценции, регистрируемой после выключения

импульса. Расчеты проводили при световой константе, равной $k_f = 0,6 \text{ с}^{-1}$ (измерительный свет), в интервале от 0 до 10 с. На рис. 5 для диапазона времени от 100 нс до 10 с результаты расчетов сопоставлены с экспериментальными

данными, полученными как на нативных препаратах (контроль), так и в присутствии диурона. Модельные кривые для контрольных препаратов показаны сплошной кривой, для образцов, содержащих диурон в концентрации 5 мкМ – пунктирной кривой. Отметим хорошее соответствие хода экспериментальных данных и кинетических особенностей теоретических кривых.

2.1. Фаза нарастания величины флуоресценции. В контрольных опытах величина флуоресценции достигает максимального значения на временах ~ 50 мкс (сплошная теоретическая кривая и экспериментальные значения (квадраты)). При воздействии диурона нарастание флуоресценции происходит медленнее и максимально на временах ~ 10 мс (пунктирная теоретическая кривая и кружки, эксперимент). Максимальное превышение выхода флуоресценции по отношению к начальному уровню F_0 соответствует экспериментально полученным величинам и составляет: $1,8 \cdot F_0$ – для контроля и $2,1 \cdot F_0$ – в среде с диуроном.

2.2. Фазы спада величины флуоресценции. Для нативного образца термофильной одноклеточной зеленой водоросли *Chlorella pyrenoidosa* Chick в эксперименте после 100 мкс регистрируют три фазы снижения величины флуоресценции к стационарному уровню, близкому по величине к F_0 . На первой фазе, в диапазоне до 1 мс величина сигнала падает на 45%. На второй фазе спада, длящейся до 100 мс, падение составляет $\sim 20\%$ и для третьей фазы падение в диапазоне времени 1 – 10 с составляет 35%. Теоретическая кривая (сплошная) хорошо описывает спад величины флуоресценции для второй и третьей фаз при неполном соответствии на первой фазе.

Спад величины флуоресценции, регистрируемой в среде с диуроном в диапазоне от 100 мс до 1 с, описан однофазной «диуроновой» кривой (пунктирная кривая, рис. 5).

В итоге, предложенная модель ФС II адекватно описывает различие кинетических особенностей кривых ИФ для условий контроля и в среде с диуроном (рис. 1 и 5). Проанализируем, как меняются кинетические характеристики расчетных кривых при изменении параметров модели.

3. Моделирование процессов ФС II для нативного образца (контроль). При моделировании условий контроля адекватный вариант набора параметров модели подбирали, изменяя параметры, характеризующие процессы переноса электрона на донорной и акцепторной сторонах ФС II (рис. 6).

3.1. Скорость восстановления хлорофилла РЦ. Модель ФС II не рассматривает подробно

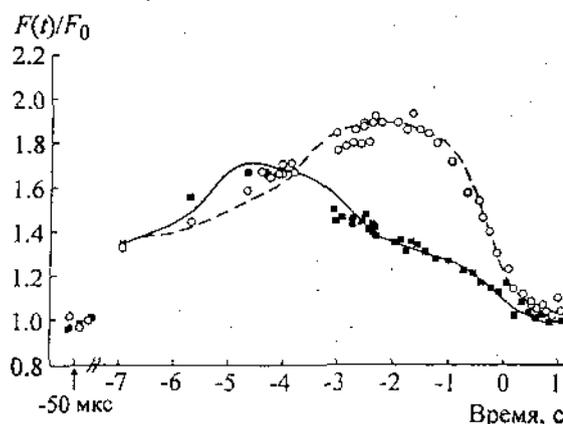
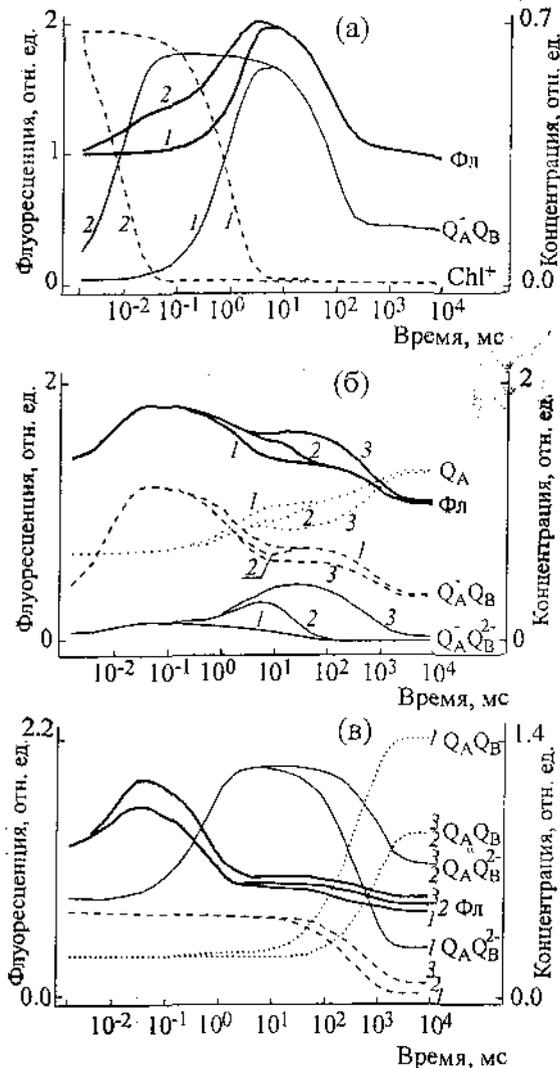


Рис. 5. Теоретические кривые получены для начальных условий, моделирующих воздействие наносекундного импульса высокой интенсивности (световая константа $k_L = 6 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$), включенного после измерительного света ($k_L = 0,6 \text{ с}^{-1}$). Расчет проведен для условий слабого измерительного света ($k_L = 0,6 \text{ с}^{-1}$) и параметров модели, описывающих нативный образец (сплошная линия) и образец в среде с диуроном (пунктирная линия). Результаты расчета сравниваются с экспериментальными данными для нативного (черные квадраты) образца и образца в среде с диуроном (светлые кружки).

функционирование КВК, обеспечивая лишь описание усредненной характеристики срабатывания КВК $k_{\text{ОЕС}} = k_i$ ($i = 4, 11, 18, 31$, рис. 2). Известно, что в зависимости от стадии S_i циклов тирозин восстанавливает хлорофилл РЦ со скоростью в диапазоне $3 \cdot 10^6 \div 10^9 \text{ с}^{-1}$, а комплекс КВК в свою очередь восстанавливает тирозин за $10^3 \div 3 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ [42]. Экспериментальным данным, полученным для нативного образца (квадраты), соответствует на рис. 5 кривая, рассчитанная при $k_{\text{ОЕС}} = 10^7 \text{ с}^{-1}$. Результаты, показанные на рис. 6а, рассчитаны для двух значений $k_{\text{ОЕС}} = 5 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ (кривая 1) и 10^7 с^{-1} (2). На временах до 10 мкс теоретические кривые, рассчитанные при $k_{\text{ОЕС}} = 10^7 \text{ с}^{-1}$, адекватно описывают регистрируемое в эксперименте увеличение выхода флуоресценции. При этом время достижения максимальной величины теоретической кривой составляет менее 40 мкс. В эксперименте максимум регистрируют в интервале $45 \div 100$ мкс (рис. 1, квадраты и [2]). В модели такое время нарастания получено для $k_{\text{ОЕС}} = 100 \div 150 \text{ мс}^{-1}$, что превышает скорость самого быстрого восстановления тирозина в циклах КВК, но меньше скорости восстановления хлорофилла РЦ тирозином.

Состояния ФС II с окисленным хлорофиллом РЦ (4-е формы, Р680+) преобладают на момент времени $t_3 = 100$ нс после начала импульса (столбцы 4, 5 таблицы). Кривые 1, 2 Chl^+ (рис. 6а) показывают, что падение концентрации четырех форм на три порядка на



временах до 1 мкс (100 мкс) для $k_{\text{OEC}} = 5 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ (10^7 с^{-1}) коррелирует с увеличением до максимального значения концентрации пятых форм с восстановленным хлорофиллом РЦ (сумма $x_5 + g_5$, кривые 1, 2 $Q_A^- Q_B^-$, рис. 6а).

Увеличение числа состояний с электроном, стабилизированным на Q_A^- , соответствует нарастанию величины флуоресценции до максимальной. Таким образом, увеличение скорости процессов на донорной стороне ФС II ведет к более быстрому нарастанию интенсивности Фл и не сказывается на характеристиках спада индукционной кривой (до 10 с).

3.2. Перенос электронов на акцепторной стороне ФС II и в пуле хинонов. Предполагается [4,38], что фазам спада величины флуоресценции соответствуют процессы переноса электронов в пул хинонов. Согласно схеме каталитического цикла ФС II (рис. 2) количество протонов в строме $[H_3^+]$ существенно влияет на реакции освобождения Q_B^- -сайта, заполненного восста-

новленным хиноном Q_B^- (z_i , $i = 1, \dots, 7$). В модели мы исследовали физиологический диапазон значений рН стромы от 7 до 8 и показали, что при увеличении рН стромы характер фаз спада все в большей степени определяется параметрами, описываемыми пул хинонов. На рис. 6б расчеты проведены для концентрации протонов стромы $[H_3^+] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ мМ}$, что соответствует рН стромы 7,3. Начальная восстановленность пула хинонов при моделировании воздействия измерительного света (т.е. для состояния ФС II с начальным уровнем флуоресценции F_0) составляет 0,25%. В расчетах такая величина принималась минимально возможной, и для нее получены кривые 1 на рис. 6б. При увеличении восстановленности пула до 12,5% получены кривые 2 со спадом величины флуоресценции на первой фазе (2, Фл), меньшим регистрируемого в эксперименте. Реакция (41, рис. 2) повторного окисления хинонов описывает в модели комплекс процессов, протекающих в ЭТЦ после переноса электрона в ФС II. Если, не меняя степени восстановленности пула (12,5%), уменьшим константу скорости реакции повторного окисления пластохинонов в 50 раз (от 100 с^{-1} до 2 с^{-1}), то спад Фл на второй фазе не происходит (3 Фл, рис. 6б).

новленным хиноном Q_B^- (z_i , $i = 1, \dots, 7$). В модели мы исследовали физиологический диапазон значений рН стромы от 7 до 8 и показали, что при увеличении рН стромы характер фаз спада все в большей степени определяется параметрами, описываемыми пул хинонов. На рис. 6б расчеты проведены для концентрации протонов стромы $[H_3^+] = 5 \cdot 10^{-5} \text{ мМ}$, что соответствует рН стромы 7,3.

Начальная восстановленность пула хинонов при моделировании воздействия измерительного света (т.е. для состояния ФС II с начальным уровнем флуоресценции F_0) составляет 0,25%. В расчетах такая величина принималась минимально возможной, и для нее получены кривые 1 на рис. 6б. При увеличении восстановленности пула до 12,5% получены кривые 2 со спадом величины флуоресценции на первой фазе (2, Фл), меньшим регистрируемого в эксперименте.

Реакция (41, рис. 2) повторного окисления хинонов описывает в модели комплекс процессов, протекающих в ЭТЦ после переноса электрона в ФС II. Если, не меняя степени восстановленности пула (12,5%), уменьшим константу скорости реакции повторного окисления пластохинонов в 50 раз (от 100 с^{-1} до 2 с^{-1}), то спад Фл на второй фазе не происходит (3 Фл, рис. 6б).

Кинетические особенности кривых флуоресценции определяются вкладами состояний ФС II, которые приведены на рис. 6б: открытые состояния $(x_1 + g_1 + y_1 + z_1) - Q_A^-$, закрытые для $(x_5 + g_5) - Q_A^- Q_B^-$ и для $(y_5 + z_5) - Q_A^- Q_B^{(2)-}$. Независимо от выбираемых параметров максимальная величина флуоресценции определяется вкладом закрытых состояний с не восстановленным Q_B^- ($Q_A^- Q_B^-$, $x_5 + g_5$). Как увеличение восстановленности пула хинонов (переход от кривых 1 к 2), так и замедление повторного окисления пластохинолов (переход к кривым 3) приводят к увеличению концентрации закрытых состояний (кривые $Q_A^- Q_B^{(2)-}$).

Анализ результатов моделирования позволил оценить величину восстановленности пула, характерную для начального уровня Фл (0,25%). Найдены параметры, для которых теоретические кривые на фазах спада оптимально соответствуют экспериментальным данным, а именно, рН стромы равно 7,3, а повторное окисление хинолов характеризуется константой скорости в диапазоне от 10 до 100 s^{-1} .

3.3. Процессы безызлучательной рекомбинации. Величины уровней флуоресценции как максимального, так и конечного, достигаемого к 10 с после импульса и близкого к F_0 , при расчетах в модели существенно зависят от параметров процессов безызлучательной рекомбинации (рис. 6в).

В случае, когда скорость рекомбинации Q_A^- с окисленными переносчиками донорной стороны (с P680+, реакции 46–49) сравнима (для кривых 1) со скоростями переноса с Q_A^- на Q_B^- (сотни микросекунд), перенос электрона на акцепторную сторону (на Q_B^-) уже ко времени 1 мс не компенсирует удаление электронов из пула хинолов, происходящее при его повторном окислении (кривая 1 PQH₂, рис. 6в). Соответственно, при переходе ФС II на третьей фазе к состоянию с начальным уровнем Фл для открытых РЦ преобладают первые формы с невосстановленным Q_B^- (кривая 1 $Q_A^- Q_B^-$ для суммы $x_1 + g_1$). В случае, когда константа скорости рекомбинации k_i ($i = 46–49$) меньше, чем константа скорости переноса электрона на Q_B^- , акцепторная сторона заполняется электронами (кривая 2, $Q_A^- Q_B^{(2)-}$). В итоге, при переходе от кривых 1 к 2 на третьей фазе, на секундных временах уровень Фл увеличен (2, Фл), а пул более восстановлен (2, PQH₂).

На рис. 6в переход от кинетических кривых 2 к кривым 3 осуществляли уменьшением константы скорости рекомбинации Phe- с P680+ k_i ($i = 42, 43, 44, 45$) от 10^5 до $10^4 s^{-1}$. В результате выход флуоресценции (3, Фл) уве-

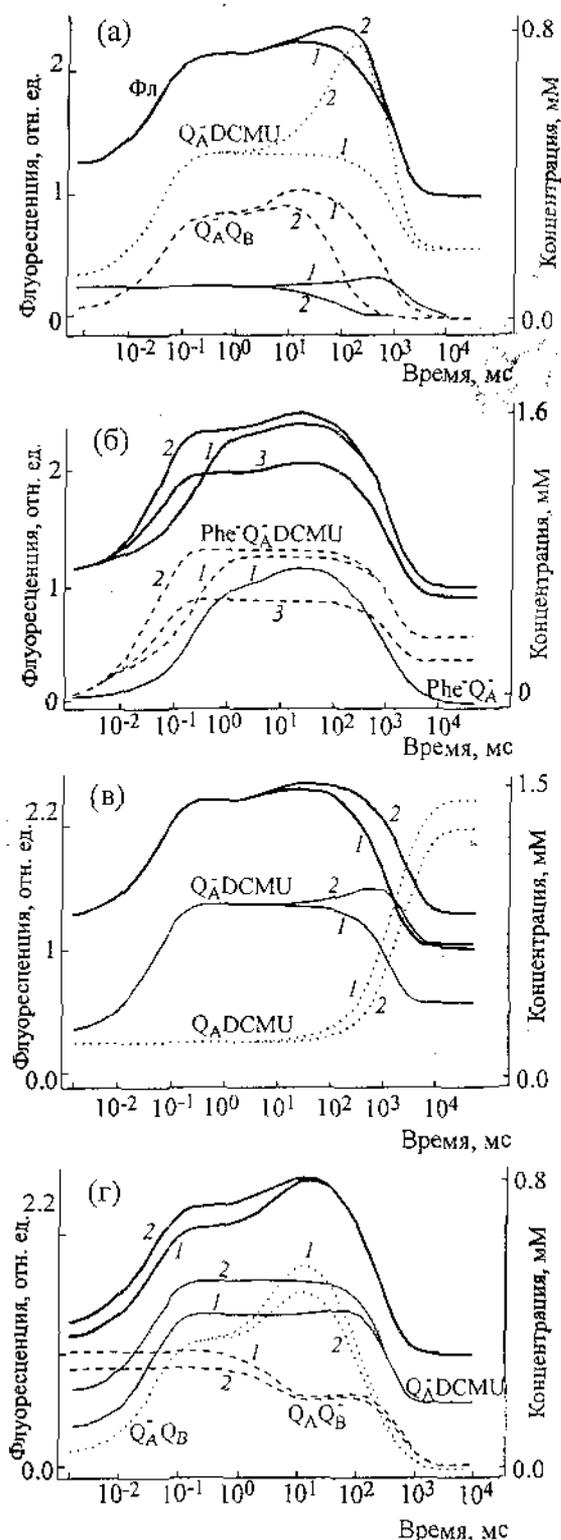
личивается на всех фазах подъема и спада, кроме начального и конечного уровней. Модель показывает, что это происходит за счет увеличения заселенности дважды восстановленных состояний с электронами на феофитине и первичном хиноне (7-й столбец рис. 2), кинетические кривые для которых повторяют временной ход интенсивности Фл (кривые 2, 3 Фл, рис. 6в). От концентрации (заселенности) как пятых, так и седьмых закрытых форм зависит количество возбужденных закрытых РЦ ФС II (шестые формы), излучение которых определяет превышение выхода флуоресценции над начальным уровнем.

Таким образом, модель показывает, что процессы безызлучательной рекомбинации определяют как максимальную величину Фл, так и уровень F_0 , достигаемый при выходе к стационарному состоянию. Увеличение скорости безызлучательной рекомбинации феофитина в закрытых РЦ уменьшает заселенность дважды восстановленных состояний с электронами на феофитине и первичном хиноне (седьмое состояние, рис. 2). Процесс переноса электрона в пул при этом не изменяется – кинетика восстановления пула (кривые 2–3, PQH₂) одинакова для вариантов расчета 2 и 3.

4. Моделирование процессов ФС II для образца в среде с диуроном. Варианты расчетов на рис. 7 показывают, каким образом изменение параметров модели ФС II с описанием посадки молекулы диурана в пустой Q_B^- -сайт позволяет оптимально приблизить теоретические результаты к экспериментальным данным, регистрируемым в среде с диуроном (рис. 1, кружки).

На рис. 7а при увеличении концентрации диурана (от 5 до 50 мкМ) время нарастания флуоресценции до максимального значения и сама эта величина становятся больше (от 1 к 2 Фл), что связано с увеличением концентрации кинетических состояний ФС II, для которых Q_B^- -сайт занят молекулой ингибитора (от 1 к 2 $Q_A^- DCMU$). Вклад закрытых и открытых состояний ФС II с не восстановленным Q_B^- ($Q_A^- Q_B^-$ и $Q_A^- Q_B^{(2)-}$) существенен лишь для пикового значения флуоресценции, становясь при выходе на стационар на четыре-пять порядков меньше по величине по сравнению со вкладом состояний, где Q_B^- -сайт занят ингибитором (кривые $Q_A^- DCMU$). Вклад состояний ФС II с восстановленным Q_B^- вследствие его малой величины можно не учитывать.

Результаты, показанные на рис. 7в для двух значений константы скорости безызлучательной рекомбинации Q_A^- с P680+, показывают, что характеристики многофазного спада «диуронового» кривой ИФ определяются процессами ре-



комбинации состояний ФС II с Q_B -сайтом, занятым молекулой ингибитора ($Q_A^- DCMU$). Усиление рекомбинации Q_A с $P680^+$ (от 200 до 400 с^{-1}) приводит к снижению стационарного уровня флуоресценции (от 2 к 1 Фл).

Рис. 7. Теоретические кривые, полученные для начальных условий, моделирующих воздействие наносекундного импульса высокой интенсивности (световая константа $k_L = 6 \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$) на фоне изменяющегося света ($k_I = 0.6 \text{ с}^{-1}$) при воздействии ингибитора $[DCMU] = 5 \text{ мкМ}$. Фл – индукция флуоресценции. Концентрации открытых РЦ: $Q_A Q_B$ – сумма x_1 и g_1 ; закрытых РЦ: $Q_A^- Q_B$ – сумма x_5 и g_5 ; $Q_A^- DCMU$ – Q_B -сайт занят молекулой ингибитора, $Q_A^- Phe^-$ – 7-е состояние с восстановленным феофитином. (а) – Кинетические кривые для двух значений концентрации DCMU 5 и 50 мкМ. (б) – Величину константы скорости восстановления хлорофилла РЦ увеличивали от $5 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ (кривые 1) до $25 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ (кривые 2). Затем константу скорости реакции безызлучательной рекомбинации Phe^- с $P680^+$ увеличили от $2 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$ (кривые 1,2) до 10^5 с^{-1} (кривые 3). (в) – Кинетические кривые для двух значений константы скорости реакции безызлучательной рекомбинации Q_A^- с $P680^+$ 400 с^{-1} (кривые 1) и 200 с^{-1} (кривые 2). (г) – Начальная концентрация состояний ФС II с восстановленным Q_A^- , увеличена на 0,1 мМ за счет уменьшения концентрации состояния, содержащего восстановленный Q_B , при переходе от кривых 1 к кривым 2 с начальным уровнем флуоресценции, увеличенным на 12,5%.

Как для «диуроновой» кривой ИФ, так и для «контрольной», параметрами, влияющими на скорость нарастания интенсивности свечения, являются константы скорости восстановления хлорофилла РЦ и безызлучательной рекомбинации Phe^- с $P680^+$ закрытых РЦ (рис. 7б). Увеличение скорости рекомбинации Phe^- уменьшает наклон кривой нарастания выхода флуоресценции на временах до 100 мкс (от кривой 2 к 3). При уменьшении константы скорости донирования от КВК, например до $k_{OEC} = 5000 \text{ с}^{-1}$, нарастание происходит без выраженной первой фазы (кривая 1). Для адекватного описания диуроновой кривой константу рекомбинации Phe^- выбирали равной 10^4 с^{-1} , задавая константу скорости донирования k_{OEC} от 5000 до 25000 с^{-1} . Тем самым показано, что модель ФС II адекватно описывает нарастание как контрольной, так и диуроновой кривых, если допустить уменьшение константы скорости донирования от КВК (как минимум, в четыре раза) при воздействии диурона.

Экспериментальные результаты по соотношению начальных уровней флуоресценции для образцов с диуроном и без диурона противоречивы. В работе [8] такое различие не отмечено. Результат, когда начальный уровень в среде с диуроном повышен на 11% по сравнению с контролем, получен в эксперименте и описан в модели Вреденбергом [27]. Такое же различие величины начального уровня получено в модели Лазара [15] в предположении о том, что диурон сдвигает равновесие реакции

переноса электрона с Q_A^- на Q_B в сторону большей обратимости этой реакции. В нашей модели это означает, что в среде с диуроном состояния с восстановленным Q_B^- перейдут в состояния с восстановленным Q_A^- . В результате при повышении начальной концентрации форм с восстановленным Q_A^- за счет уменьшения форм с Q_B^- получается повышение начального уровня флуоресценции F_0 (кривые 1,2, рис. 7г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ МОДЕЛИРОВАНИЯ

Эксперименты с одиночной наносекундной вспышкой света и имитация воздействия одиночного насыщающего импульса в модели ФС II позволяют последовательно проследить, каким образом начальная энергия, поступившая в систему переносчиков ФС II от импульса, используется в процессах переноса электронов в пул и в сопутствующих диссипативных процессах.

В данном исследовании мы использовали то обстоятельство, что в отличие от эксперимента с воздействием постоянного актиничного света наносекундный импульс на фоне слабого измерительного света незначительно изменит характеристики компартментов хлоропласта. Тогда процессы переноса электрона в ФС II можно полагать протекающими при неизменных рН люмена, стромы и постоянном потенциале на мембране. Следовательно, для описания воздействия одиночного импульса необходимо включить в модель более узкий круг процессов (перенос электронов на донорной и акцепторной сторонах ФС) по сравнению с комплексом процессов, происходящих при воздействии постоянного света на длительных временах в тилакоидной мембране.

Нами найдены параметры, характеризующие компартменты тилакоида (рН люмена, стромы, потенциал, начальная восстановленность пула хинонов), для которых теоретические кривые на фазах спада оптимально соответствуют экспериментальным данным (пункт 3.2, Результаты).

Модельный анализ воздействия импульса позволил также провести оценку констант, характеризующих процессы в окружении РЦ ФС II, которые не могут быть достаточно точно оценены при имитации процессов, индуцированных постоянным светом и протекающих в условиях изменения характеристик компартментов тилакоида.

При воздействии измерительного света возбуждение РЦ ФС II происходит гораздо медленнее, чем процессы переноса электрона от

КВК на тирозин и затем на окисленный хлорофилл РЦ. Поэтому после одновременного окисления хлорофилла всех РЦ образца насыщающей вспышкой восстановление Р680+ происходит от тирозина на временах до микросекунды, после чего время восстановления Р680+ будет определяться процессами переноса электрона от КВК. Модель отражает эффект замедления средней скорости восстановления Р680+ (рис. 6а). Найденная средняя константа скорости восстановления Р680+ меньше скорости донирования электрона от тирозина ($3 \cdot 10^6 \div 10^9 \text{ с}^{-1}$), но превышает скорость самого быстрого восстановления тирозина в цикле КВК ($10^3 \div 3 \cdot 10^4 \text{ с}^{-1}$). В этом интервале величина k_{OEC} не влияет на фазы спада кривой ИФ, особенности которых определяются более медленными процессами переноса электронов в пул.

В результате воздействия импульса на временах десятки микросекунд после его начала возникают «избыточные» закрытые РЦ. Те из них, которые имеют восстановленный вторичный хинон (Q_B^{2-}), сразу передают электроны в пул. Закрытые РЦ с невосстановленным вторичным хиноном ($Q_A^- Q_B$) расходуются на временах сотни микросекунд в процессе переноса электрона на акцепторную сторону ФС II, где формируются открытые и закрытые РЦ с восстановленным вторичным хиноном (Q_B^{2-}) (рис. 6б,в). Таким образом, в модели прослеживается перераспределение заполненности состояний ФС II от неравновесного состояния возбуждения, вызванного импульсом, к состоянию, характеризующему процессы переноса, происходящие при воздействии слабого измерительного света.

Перенос в пул хинонов начального запаса энергии при возбуждении слабым светом сопровождается процессами потерь: излучением Фл и диссипацией при безызлучательной рекомбинации отрицательных зарядов акцепторов (Phe^- , Q_A^-) с положительными зарядами хлорофилла РЦ (Р680+). Модель показала, что характеристики диссипативных процессов сильно влияют на максимальный (F_m) и начальный (F_0) уровни кривой ИФ. Это влияние определяется константами скоростей реакций безызлучательной рекомбинации (k_{Phe^-} , $k_{Q_A^-}$) и исследовано в модели при имитации режимов возбуждения импульсом и слабым светом. Показано, что процессы диссипации при двух моделируемых режимах возбуждения происходят с принципиально различными скоростями. Для реакций $42 \div 46$ (k_{Phe^-}) и $46 \div 50$ ($k_{Q_A^-}$) при моделировании режима импульса получены ве-

личины 10^{10} с^{-1} и 10^3 с^{-1} , позволяющие рассчитать определенный набор величин концентраций редокс-состояний ФС II, принимаемый как начальный при моделировании воздействия слабого света. Для такого начального набора в модели получено оптимальное соответствие теоретических кривых ИФ экспериментальным, регистрируемым после воздействия импульса. При этом, количественное соответствие наблюдаемому в эксперименте превышению максимального уровня F_m над уровнем F_0 получено, когда реакции безызлучательной рекомбинации с P680+ характеризовали константами скоростей $k_{\text{Phe}^-} = 10^5 \text{ с}^{-1}$ и $k_{Q_A^-} = 200 \text{ с}^{-1}$.

Наша модель позволяет оценить константы скоростей безызлучательной рекомбинации, обеспечивающие наблюдаемые в эксперименте соотношения уровней F_m/F_0 . Сравним этот результат с литературными данными. Отметим, что модель ФС II [13] не описывает уровень F_0 . Самая детальная из известных в литературе моделей ФС II [15] способна описать уровень F_0 и подробно рассматривает диссипативные процессы, давая описание O-J-P-кинетики, наблюдаемой при постоянном освещении для препаратов ФС II мембран [9]. Однако в модели [15] недостаточно подробно рассмотрены процессы освобождения Q_B -сайта с выходом пластохинола в фазу мембраны, с чем может быть связано отсутствие описания стадий J-I-P-кинетики ИФ и физиологически оправданного соотношения уровней F_0 и F_m .

В модели ФС II мы показали, что значения констант скоростей безызлучательной рекомбинации Phe- с P680+ закрытых РЦ на несколько порядков выше при моделировании воздействия насыщающего импульса (составляя 10^{10} с^{-1}) по сравнению с измерительным светом. Таким образом, модель подтверждает предположения, высказанные в работе [4]. Рекомбинантная Фл тушится преимущественно в процессе безызлучательных потерь энергии на уровне первичной радикальной пары, причем скорость этих процессов возрастает при повышении интенсивности света до насыщающей и становится сравнимой со скоростью обратной рекомбинации в возбужденное состояние. Модель показала также, что интенсивность безызлучательной рекомбинации Phe- с P680+ не влияет на начальный и конечный уровни ИФ (F_0), но оказывает влияние на величину F_m .

Общепринятой является точка зрения, что в среде с диуроном по сравнению с нативным образом скорость восстановления хлорофилла РЦ понижена. Параметры кинетической кривой выхода флуоресценции, получаемые в эксперименте в среде с диуроном, могут быть описаны в рамках модели ФС II без включения в нее

реакций взаимодействия вещества с Q_B -сайтом (данные не приводим) аналогично принятому в литературе подходу [13,15,27]. Однако выбранный нами вариант с включением в модель ингибирующего вещества позволяет без привлечения дополнительных представлений о модификации параметров модели провести расчет для конкретной концентрации реагента с ингибирующим эффектом. Такой подход позволил проводить расчеты, моделируя воздействие определенной концентрации диурона, и впервые использован в нашей работе. Механизм действия диурона на процессы переноса ФС II при этом моделируется реакцией (необратимой) посадки в пустой сайт.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Кинетическая модель ФС II описывает последовательность переходов между состояниями и кинетику окислительно-восстановительных превращений переносчиков ФС II при различных режимах освещения, происходящих согласно принятому протоколу. Начальные величины заселенности редокс-состояний ФС II определяются предысторией системы – темновая адаптация либо предварительное освещение. Сопоставлены теоретические кривые ИФ, рассчитанные при имитации последствий импульсного воздействия, и экспериментальные, полученные при использовании протокола измерений с возбуждением образца мощным световым импульсом.

Проверены и подтверждены существующие [38] гипотезы о механизме воздействия импульса на образец (нативный и в среде с диуроном). При разработке протокола освещения в [38] предполагали, что воздействие насыщающего импульса приведет к накоплению редокс-состояний P680+ и Q_A^- в РЦ ФС II, а дальнейшие реакции восстановления P680+ и окисления Q_A^- могут быть исследованы по нарастанию и, соответственно, спаду относительного выхода флуоресценции. При этом, фазы спада будут определяться процессами рекомбинации Q_A^- с окисленными переносчиками донорной стороны и переносом электрона на Q_B [39]. Имитация воздействия насыщающего светового импульса в модели ФС II позволила анализировать и объяснить перечисленные процессы переноса электрона в ФС II.

В модели фазам кривой ИФ соответствовала определенная смена заселенности редокс-состояний комплекса переносчиков ФС II. Особенности использованного протокола измерений – кратковременность воздействия импульса с последующей регистрацией ИФ в длительном временном диапазоне – позволили найти «опор-

ные точки» при отладке модели. Концентрации редокс-состояний ФС II, получаемые при моделировании режима освещения на определенном интервале времени, принимали начальными для моделирования последующего режима освещения. Количественные характеристики системы – усредненная скорость срабатывания КВК, скорости реакций безызлучательной рекомбинации, начальная восстановленность пула хинонов и рН стромы и др. – подобраны в модели таким образом, чтобы оптимально описать величины и длительности отдельных фаз кинетической кривой, минимальный и максимальный уровни (F_0 , F_m) флуоресценции, регистрируемой для термофильных зеленых водорослей.

Сравнение результатов по наблюдению флуоресцентного сигнала на различных образцах с использованием их модельного анализа позволит определить характеристики (константы скоростей и равновесия процессов, количественные характеристики компартментов хлоропласта) процессов переноса, протекающих в различных фотосинтезирующих организмах.

Авторы благодарны к.ф.-м.н. О.В. Демину и к.б.н. Г.В. Лебедевой за обсуждение результатов, д.б.н. Ю.К. Чемерису за подготовку культуры клеток хлореллы, Dr. R. Steffen (TU, Berlin) за измерение индукционных кривых, проф. А.А. Булычеву за полезные дискуссии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 05-04-48606, 05-04-48912, 04-07-90278, 03-04-49048).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Delosme R.* // Biochim. Biophys. Acta. 1967. V. 143. P. 1088.
2. *Ireland C.R., Long S.P., Baker N.R.* // Planta. 1984. V. 160 P. 550.
3. *Neubauer C., Schreiber U.* // Z. Naturforsch. 1987. V. 42 c. P. 1246.
4. *Schreiber U., Krieger A.* // FEBS Letters. 1996. V. 397. P. 131.
5. *Strasser R.J., Srivastava A., Govindjee* // Photochem. Photobiol. 1995. V. 61. P. 32.
6. *Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Srivastava A.* // Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis / Eds. G.C. Papageorgiou and Govindjee. 2005.
7. *Bukhov N., Egorova E., Krendeleva T., Rubin A., Wiese K., Heber U.* // Photosynth. Res. 2001. V. 70. P. 155.
8. *Schansker G., Srivastava A., Govindjee, Strasser R.J.* // Functional Plant Biology. 2003. V. 30. P. 785.
9. *Paspil P., Dau H.* // Photosynth. Res. 2000. V. 65. P. 41.
10. *Laible P.D., Zipfel W., Owens T.G.* // Biophys. J. 1994. V. 66. P. 844.
11. *Renger G., Schulze A.* // Photobiochem. Photobiophys. 1985. V. 9. P. 79.
12. *Van Kooten O., Snel J.F.H., Vredenberg W.J.* // Photosynth. Res. 1986. V. 9. P. 211.
13. *Stirbel A., Govindjee, Strasser B.J., Strasser R.J.* // J. Theor. Biol. 1998. V. 193. P. 131.
14. *Lazar D.* // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1412. P. 1–28.
15. *Lazar D.* // J. Theor. Biol. 2003. V. 220. P. 69.
16. *Бухов Н.Г., Дамиров Х.Г., Джигладзе Т.Г., Караетян Н.В., Рубин А.Б.* // Биол. науки. 1988. № 4. P. 28–37.
17. *Караваяев В.А., Кукушкин А.К.* // Биофизика. 1993. Т. 38. С. 958.
18. *Дубинский А.Ю., Тихонов А.Н.* // Биофизика. 1997. Т. 42. С. 644.
19. *Riznichenko G.Yu., Lebedeva G.V., Demin O.V., Belyaeva N.E., Rubin A.B.* // J. Biol. Phys. 1999. V. 25. P. 177.
20. *Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б., Демин О.В.* // Физ. химия. 2000. Т. 74. С. 1897.
21. *Беляева Н.Е.* // Дисс.... канд. физ.-мат. наук. М.: Биологический ф-т МГУ, 2004.
22. *Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Демин О.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б.* // Биофизика. 2002. Т. 47. С. 1044.
23. *Беляева Н.Е., Лебедева Г.В., Ризниченко Г.Ю.* // Математика. Компьютер. Образование. М., 2003. Вып. 10. С. 263.
24. *Булычев А.А., Нязова М.М., Рубин А.Б.* // Биол. мембраны. 1987. Т. 4. С. 262.
25. *Bulychev A.A., Vredenberg W.J.* // Bioelectrochemistry. 2001. V. 54. P. 157.
26. *Vredenberg W.J., Bulychev A.A.* // Bioelectrochemistry. 2003. V. 60. P. 87.
27. *Vredenberg W. J.* // Chlorophyll Fluorescence: A Signature of Photosynthesis / By eds. G.C. Papageorgiou, Govindjee. 2005.
28. *Кузнецова С.А.* // Дисс.... канд. физ.-мат. наук. М.: Физический ф-т МГУ, 2000.
29. *Schreiber U., Schliwa U., Bilger W.* // Photosynth. Res. 1986. V. 10. P. 51.
30. *Schatz G.H., Brock H., Holzwarth A.R.* // Biophys. J. 1988. V. 54. P. 397.
31. *Leibl W., Breton J., Deprez J., Trissl H.-W.* // Photosynth. Res. 1989. V. 22. P. 257.
32. *Roelofs T.A., Lee C.-H., Holzwarth A.R.* // Biophys. J. 1992. V. 61. P. 1147.
33. *Dau H., Sauer K.* // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1102. P. 91.
34. *Dau H.* // Photochem. Photobiol. 1994. V. 60. P. 1–23.
35. *Gibasiewicz K., Dobek A., Breton J., Leibl W.* // Biophys. J. 2001. V. 80. P. 1617.
36. *Lavergne J., Trissl H.W.* // Biophys. J. 1995. V. 68. P. 2474.
37. *Christen G., Steffen R., Renger G.* // FEBS Lett. 2000. V. 475. P. 105.
38. *Steffen R., Christen G., Renger G.* // Biochemistry. 2001. V. 40. P. 173.

39. Christen G., Seeliger A., Renger G. // *Biochemistry*. 1999, V. 38, P. 6082.
40. Laisk A., Walker D.A. // *Proc. Roy. Soc. Lond.* 1989, V. B237, P. 417.
41. Reynolds I.A., Johnson E.A., Tanford C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985, V. 82, P. 6869.
42. Hope A.B., Huilgol R.R., Panizza M., Thompson M., Matthews D.B. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1992, V. 1100, P. 15.

The Application of PS II Model for the Analysis of Fluorescence Yield Transients Induced by Actinic Single Turnover Flash in the Time Range from 100 ns to 10 s

N.E. Belyaeva*, V.Z. Paschenko*, G. Renger**, G.Yu. Rznichenko*, and A.B. Rubin*

**Biological Department, Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119992 Russia*

***Max-Planck-Institute, Technical University, Berlin, Germany*

Changes in flash-induced fluorescence yield in preparations of thermophilic *Chlorella pyrenoidosa* Chick cells (native and in the presence of DCMU) were investigated in the time range from 100 ns to 10 s using a new measuring system. The results were analyzed by mathematical modeling of processes in photosystem II. It was shown that the detailed description of recombination (including nonradiative) processes in photosystem II is important to simulate the fluorescence yield transients induced by an actinic single turnover flash. The model photosystem II parameters were modified to describe the light-induced effects in the presence of DCMU. By comparing the theoretical fluorescence curves with experimental ones, we obtained the values of relative fluorescence yield and the F_M/F_0 ratio, which is typical for experimental data. As a result of simulation, the values of the model parameters (rate constants of electron transfers at the donor and acceptor sites of photosystem II, pH in stroma, initial redox state of the plastoquinone pool, the rate of plastoquinol oxidation, and the rate constants of nonradiative recombination processes) were determined.

Key words: fluorescence induction, pulse fluorometry, electron transfer, photosystem II, model calculations