

## КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФОТОСИСТЕМЫ II ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

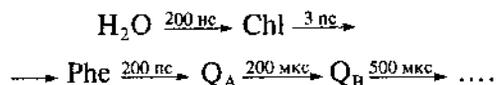
© 2000 г. Г. В. Лебедева\*, Н. Е. Беляева\*, Г. Ю. Ризниченко\*, А. Б. Рубин\*, О. В. Дёмин\*\*

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова**\* Биологический факультет**\*\* Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского*

Поступила в редакцию 26.07.99 г.

На основе новейших физико-химических данных построена детальная кинетическая модель каталитического цикла фотосистемы II (ФСII) высших растений. В соответствии с иерархией времен отдельных фотосинтетических стадий проведена редукция модели с целью описания процессов миллисекундного диапазона. В рамках полученной системы осуществлен теоретический расчет кривых индукции флуоресценции хлорофилла при разных значениях параметров модели. Для расчета интенсивности флуоресценции предложено соотношение, включающее концентрации флуоресцирующих состояний ФС II и их зависимость от компонентов электрохимического потенциала на мембране тилакоида. Показано, что в рамках модели, ограничивающейся рассмотрением процессов в пределах ФС II, не могут быть описаны некоторые экспериментально наблюдаемые паттерны нарастающей части кривой индукции флуоресценции хлорофилла. Найдено, что стационарное значение интенсивности флуоресценции может зависеть от трансмембранного электрического потенциала немонотонным образом.

Согласно современным представлениям, первичные (световые) стадии фотосинтеза зеленых растений представляют собой сложную систему процессов электронного транспорта, происходящих на фотосинтетических мембранах хлоропластов и осуществляемых рядом высокоспециализированных интегральных мембранных белков (фотосистемы I и II, цитохром *b6/f*-комплекс) и подвижных переносчиков электрона. Так, в комплексе фотосистемы II (ФСII) последовательность переноса электрона и характерные времена основных стадий могут быть представлены следующим образом:



От первичного донора ( $\text{H}_2\text{O}$ ) электроны поступают на пигмент реакционного центра P680 (Chl) и далее на феофитин (Phe), первичный и вторичный хиноновые акцепторы электронов ( $\text{Q}_A$  и  $\text{Q}_B$ ). Перенос электрона по электрон-транспортной цепи сопровождается генерацией трансмембранного электрохимического потенциала  $\Delta\mu_{\text{H}}$ , который может расходоваться на синтез АТФ и электрогенные утечки ионов  $\text{H}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и др. через мембрану тилакоида. Для исследования кинетических механизмов регуляции такого рода процессов традиционно применяются методы математического моделирования. К настоящему времени в литературе широко представлены модели, описывающие перенос электрона в отдельных фрагментах сложной системы первичных фото-

синтетических реакций. Так, имеются модели сверхбыстрых ( $10^{-12}$ – $10^{-9}$  с) процессов поглощения света, миграции электронных возбужденных состояний и первичного разделения зарядов [1–3]; модели, описывающие более медленные (миллисекундные) процессы транспорта электрона с участием вторичного хинонного акцептора ФС II ( $\text{Q}_B$ ) [4]. Имеются работы, в которых сделана попытка объединить в одной модели процессы, протекающие в этих двух временных шкалах [5]. Существуют модели, рассматривающие взаимодействие двух фотосистем [6], и модели, описывающие транспорт протонов через мембрану тилакоида [7]. Во всех этих моделях детально описываются фотосинтетические процессы определенного временного диапазона. При описании остальных стадий используются различные упрощения. В большинстве имеющихся моделей не учитывается зависимость отдельных стадий первичных фотосинтетических реакций от трансмембранного электрического потенциала, а также не рассматривается роль ионных потоков ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  и др.) через мембрану тилакоида, которые могут оказывать существенное влияние на параметры первичных фотореакций [2, 8, 9].

Для верификации построенной модели первичных фотосинтетических процессов обычно исследуется ее способность к описанию экспериментально наблюдаемых эффектов. Одним из известных количественных критериев адекватности модели является адекватность описания индукционных эффектов фотосинтеза, в частности, кривой индукции флуоресценции хлорофилла (рис. 1).

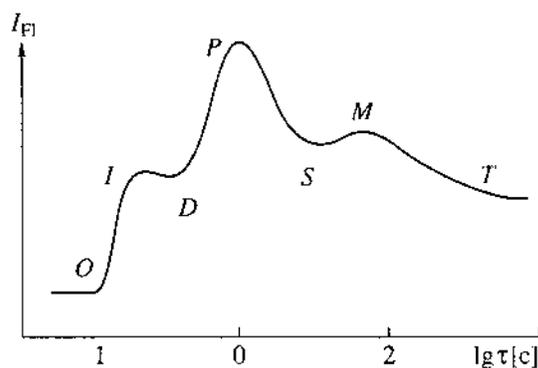
Эта кривая представляет собой изменение интенсивности флуоресценции объекта в ответ на включение освещения после периода темновой адаптации. Наиболее хорошо изученным участком индукционной кривой является так называемая быстрая фаза (*OIDP*-участок) – увеличение выхода флуоресценции до максимального значения за времена порядка нескольких секунд. Согласно современным представлениям, ее отдельные кинетические компоненты соответствуют протеканию различных процессов в фотосинтетическом аппарате растения [8], в частности, увеличению концентрации восстановленного хинонного акцептора  $Q_A$ , возрастанию электрического потенциала на мембране тилакоида, изменению редокс-состояния пластохинонового пула. Моделированию кинетики *OIDP*-участка посвящено большое количество работ [3–6], в рамках которых авторам удалось объяснить двухфазность этого участка индукционной кривой.

Мы предлагаем подход к моделированию первичных фотосинтетических процессов в хлоропластах высших растений, основанный на детальном кинетическом описании каталитических циклов основных пигмент-белковых комплексов, входящих в систему световых реакций фотосинтеза, с учетом зависимости ряда стадий электронного транспорта от разности электрических потенциалов и градиента pH на мембране тилакоида.

В настоящей работе мы представляем один из блоков модели, содержащий описание каталитического цикла ФС II. В нашей модели мы вывели функцию, описывающую зависимость интенсивности флуоресценции хлорофилла от концентрации ряда состояний комплекса ФС II и от компонентов электрохимического потенциала  $\Delta\mu_H$  на мембране тилакоида. В данной модели мы не описывали процесс формирования  $\Delta\mu_H$ , а задавали его компоненты (трансмембранный электрический потенциал  $\Delta\psi$  и протонный градиент  $\Delta pH$ ) в виде параметров. Подобное упрощение позволило изучить внутренние регуляторные свойства комплекса ФС II. Адекватное описание процесса генерации  $\Delta\mu_H$  требует, помимо ФС II, рассмотрения полной системы первичных фотосинтетических процессов. Была исследована форма кривой индукции флуоресценции при разных значениях разности электрического потенциала и градиента pH на мембране тилакоида. Кроме того, была поставлена задача изучения зависимости стационарного значения флуоресценции от  $\Delta\psi$  и  $\Delta pH$ .

## МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

*Полная математическая модель.* В нашей модели мы рассматриваем ФС II как мембранный фермент, который под действием света катализирует восстановление пластохинона до пластохинола, а также создает трансмембранный градиент



**Рис. 1.** Схема типичной кривой индукции флуоресценции хлорофилла высших растений с общепринятыми обозначениями ее кинетических фаз. Участок *OIDP* соответствует так называемой быстрой фазе, *PSMT* – медленной фазе индукционной кривой. По оси ординат показана интенсивность флуоресценции объекта. Стрелкой показан момент включения освещения.

электрохимического потенциала протонов,  $\Delta\bar{\mu}_H$  (рис. 2). Математическая модель, построенная в этой работе, представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений следующего вида:

$$d[\text{PSII}_i]/dt = \sum_j v_{pj} - \sum_k v_{uk}, \quad (1)$$

где  $[\text{PSII}_i]$  – концентрация одного из состояний ФС II,  $v_{pj}$  – скорость производства ФС II в  $j$ -й реакции,  $v_{uk}$  – скорость потребления ФС II в  $k$ -й реакции каталитического цикла ФС II. Здесь  $\text{PSII}_i$  определяется состоянием четырех входящих в ее состав переносчиков электрона, а именно хлорофилла P680, феофитина (Phe), первичного одноэлектронного ковалентно связанного хинонного акцептора ( $Q_A$ ) и центра связывания вторичного акцептора пластохинона ( $Q_B$ ). В рамках нашей модели мы предполагаем, что энергия возбуждения, исходно локализованная на одном из пигментов антенны быстро (за времена порядка пикосекунд) уравнивается по всему пулу молекул пигментов антенны ФС II, включая пигмент реакционного центра P680 [1, 10]. Поэтому в дальнейшем под обозначением Chl мы будем подразумевать весь комплекс этих пигментов.

Согласно современным представлениям о механизмах переноса электрона, каждый из переносчиков, входящих в состав ФС II, может находиться в нескольких различных состояниях: P680 – в трех: восстановленное – Chl, возбужденное – Chl\* и окисленное – Chl<sup>+</sup> (в данной работе мы не учитываем возможность формирования триплетного состояния); феофитин и  $Q_A$  – двух состояниях (окисленное – Phe и  $Q_A$ , восстановленное – Phe

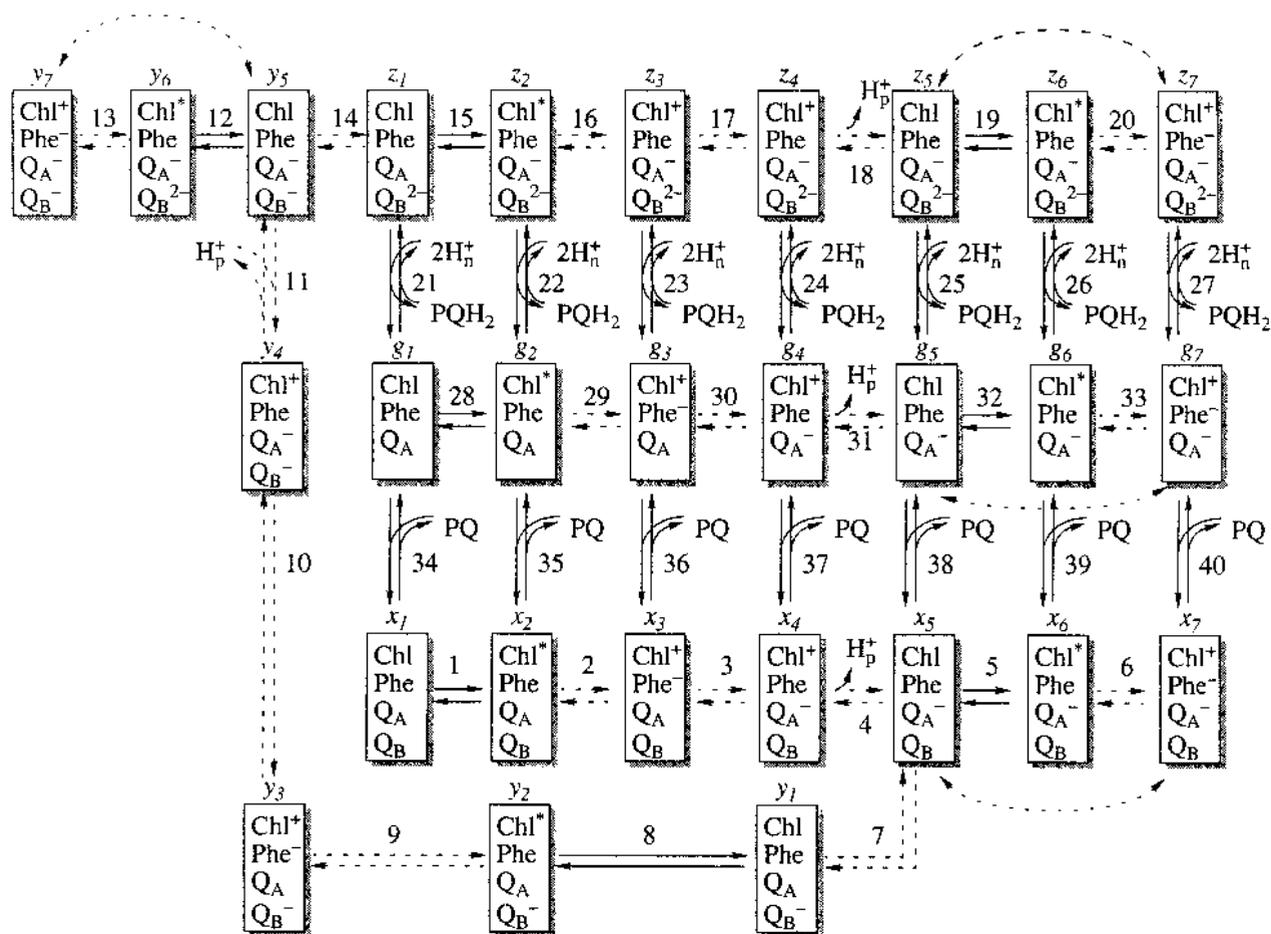


Рис. 2. Схема полного каталитического цикла ФСII. Каждый прямоугольник представляет собой одно из состояний комплекса ФСII, определяемое редокс-состоянием входящих в него переносчиков электронов: Chl – комплекс пигментов антенны ФСII, включая пигмент реакционного центра P680; Phe – первичный акцептор электронов феофитин;  $Q_A$  и  $Q_B$  – первичный и вторичный хинонные акцепторы электронов. Буквы над прямоугольниками ( $x_i, y_i, z_i, g_i, i = 1, \dots, 7$ ) соответствуют обозначениям переменных модели. Пунктирными стрелками показаны быстрые (с характерным временем менее 0.1 нс) стадии цикла, сплошными стрелками – медленные (с характерным временем не менее 1 нс) стадии. Цифры рядом со стрелками соответствуют номерам стадий; PQ – пластохинон,  $QHQ_2$  – пластохинол;  $H_p^+$  – протоны, выделяемые во внутритилакоидное пространство,  $H_n^+$  – протоны, поглощаемые из стромы тилакоида.

и  $Q_A^-$  соответственно); центр связывания пластохинона ( $Q_B$ ) – в четырех состояниях (в комплексе с пластохиноном –  $Q_B$ , с семихиноном –  $Q_B^-$ , с депротонированным пластохинолом –  $Q_B^{2-}$  и незаполненное состояние, когда центр не связан ни с одной из форм  $Q_B$ ). Таким образом, всего в нашей модели должно фигурировать  $3 \times 2 \times 2 \times 4 = 48$  различных кинетических состояний ФСII. Однако, учитывая современные данные о скоростях и последовательности протекания первичных процессов фотосинтеза [10, 11], можно исключить из рассмотрения некоторые из гипотетических возможных состояний комплекса ФСII. Известно [8, 10], что окисленный P680 восстанавливается системой расщепления воды (СРВ) гораздо быст-

рее (20–300 нс), чем происходит перенос электрона с  $Q_A$  на  $Q_B$  (200–400 мкс). Поэтому из модели можно исключить четыре состояния, содержащие фрагмент  $[Chl^+ \cdot Phe \cdot Q_A]$ . Кроме того, электрон, приходящий на феофитин в результате первичного разделения зарядов, не может на нем стабилизироваться и либо возвращается на P680 (репопуляция возбужденного состояния), либо передается на первичный хинонный акцептор  $Q_A$ . Поэтому из рассмотрения можно исключить такие состояния комплекса ФСII, в которых встречаются сочетания  $[Chl \cdot Phe^-]$  и  $[Chl^* \cdot Phe^-]$  – всего 16 состояний. Таким образом, число возможных кинетических состояний ФСII сокращается до 28. Все эти состояния и возможные переходы между ними представлены на схеме полного каталитического цикла ФСII (рис. 2).

После длительной темновой адаптации P680 полностью восстанавливается, а феофитин и  $Q_A$ , напротив, переходят в окисленное состояние. Следовательно, перед началом освещения ФСII может находиться только в двух состояниях ( $x_1$  и  $g_1$ ), между которыми устанавливается равновесие (реакция 34). Равновесные концентрации этих состояний полностью определяются константой связывания и суммарной концентрацией пластохинона (PQ), в мембране. После включения освещения P680 переходит в возбужденное состояние ( $x_2$  и  $g_2$ , реакции 1 и 28 соответственно), с последующей передачей электрона на феофитин (реакции 2 и 29), т.е. происходит первичное разделение зарядов. Так как электрон не может стабилизироваться на феофитине, то происходит его дальнейшая передача на  $Q_A$  (реакции 3 и 30). Далее система расщепления воды (СРВ) донирует электрон окисленному пигменту, приводя его в первоначальное (т.е. восстановленное и невозбужденное) состояние ( $x_5$  и  $g_5$ ). Каждые четыре акта восстановления окисленного P680 системой расщепления воды сопровождаются расщеплением двух молекул  $H_2O$ , выделением одной молекулы молекулярного кислорода и четырех протонов  $H_p^+$  во внутритилакоидное пространство, которое при этом заряжается положительно. В нашей модели мы не рассматривали молекулярный механизм функционирования СРВ, а предположили, что на каждый электрон, переданный от СРВ на окисленный p680, во внутритилакоидное пространство выделяется один протон (реакции 4 и 31).

Таким образом, последовательность стадий (1–4) или (28–31) приводит к образованию так называемых “закрытых” реакционных центров с восстановленным  $Q_A$  (состояния  $x_5$  и  $g_5$ ). Дальнейшее освещение закрытых РЦ может приводить к повторному возбуждению пигмента (реакции 5 и 32) и первичному разделению зарядов (реакции 6 и 33). В результате этих процессов образуются состояния ФСII с окисленным пигментом и восстановленными феофитином и  $Q_A$ , т.е.  $x_7$  и  $g_7$ . В настоящее время существует несколько мнений относительно дальнейшей судьбы этих состояний. Нестабильный заряд на феофитине  $Phe^-$  может рекомбинировать с электронной дыркой на P680<sup>+</sup> двумя способами: либо вновь приводя к заселению возбужденных состояний P680\* (переход состояний с индексом 7 в состояния с индексом 6), либо непосредственно в основное состояние путем безызлучательной рекомбинации первичной пары (переход состояний с индексом 7 в состояния с индексом 5 – изображен на схеме пунктирными стрелками без номера). В любом из состояний  $g_i$  ( $i = 1, \dots, 7$ ) может происходить связывание пластохинона PQ с  $Q_B$  центром ФСII (реакции 34–40) с образованием соответствующих состояний  $x_i$  ( $i = 1, \dots, 7$ ). Связанный пластохинон является

двухэлектронным переносчиком и, следовательно, может последовательно акцептировать два электрона от  $Q_A^-$  (перенос первого электрона с  $Q_A^-$  на  $Q_B$  описывается реакцией 7).

При дальнейшем освещении события развиваются по уже описанному выше сценарию: возбуждение пигмента (реакция 8), первичное разделение зарядов (реакция 9), стабилизация электрона на  $Q_A$  (реакция 10), восстановление окисленного P680 системой расщепления воды (реакция 11), а также возбуждение закрытого РЦ ФСII с восстановленным  $Q_A$  (реакция 12), первичное разделение зарядов (реакция 13) с возможной рекомбинацией первичной радикальной пары (обратная реакция 13 и стадия без номера, обозначенная пунктиром). Реакция 14 соответствует переносу электрона с  $Q_A^-$  на семихинон, расположенный в сайте  $Q_B$ -центре с образованием полностью депротонированного пластохинола  $Q_B^{2-}$ . Далее под действием света в ФСII, в  $Q_B$ -центре которой связан депротонированный пластохинол (соответствующие состояния ФСII обозначены буквами  $z_i$ , ( $i = 1, \dots, 7$ )) может происходить уже дважды описанная выше последовательность событий, приводящая к восстановлению  $Q_A$  (реакции 15–20). Наряду с этим в каждом из состояний  $z_i$ , ( $i = 1, \dots, 7$ ) может происходить высвобождение пластохинола  $PQH_2$  с предварительным поглощением двух протонов  $H_p^+$  из стромы хлоропласта (которая при этом заряжается отрицательно) и образованием первоначальных состояний  $g_i$ , ( $i = 1, \dots, 7$ ) с пустым  $Q_B$  центром (реакции 21–27), что и замыкает каталитический цикл фотосистемы II.

Величины  $x_i$ ,  $y_i$ ,  $z_i$ ,  $g_i$ , ( $i = 1, \dots, 7$ ) являются переменными модели, т.е. определяются системой дифференциальных уравнений типа (1), соответствующей схеме каталитического цикла ФСII, изображенной на рис. 2. Концентрации протонов во внутритилакоидном пространстве ( $H_p^+$ ), строме хлоропласта ( $H_n^+$ ), разность электрических потенциалов на мембране тилакоида ( $\Delta\psi$ ), а также внутримембранные концентрации пластохинона и пластохинола являются параметрами модели. Скорости всех реакций задаются с помощью закона действующих масс и являются функциями переменных и параметров модели. Для полного описания каждой реакции достаточно знать ее константу равновесия и одну из констант скорости – прямой или обратной реакции:

$$K_i = k_i/k_{-i}. \quad (2)$$

Известно, что при освещении вследствие изменения окислительно-восстановительного состояния переносчиков электрона меняется их конформа-

ция и, возможно, константы скорости переноса электрона [12]. В настоящей работе мы этот эффект не учитываем. Константы равновесия окислительно-восстановительных реакций определяются из экспериментально полученных данных по средноточечным редокс-потенциалам:

$$K = \exp\left(\frac{\Delta E_m}{RT/nF}\right). \quad (3)$$

Здесь  $\Delta E_m$  – это разность средноточечных редокс-потенциалов, измеренных относительно стандартного водородного электрода,  $F$  – постоянная Фарадея,  $n$  – число электронов, перенесенных в процессе окислительно-восстановительной реакции.

Стадии 1, 5, 8, 12, 15, 19, 28 и 32 являются световыми и описывают процесс перехода Chl в возбужденное состояние Chl\* (константы  $k_{Li}$ ,  $i = 1, 5, 8, 12, 15, 19, 28, 32$ ) и обратный ему процесс дезактивации возбужденного состояния (константы  $\chi_i$ ,  $i = 1, 5, 8, 12, 15, 19, 28, 32$ ). Константы  $k_{Li}$  пропорциональны интенсивности света [13, 14]:  $k_{Li} \sim I\sigma$ , где  $I$  – интенсивность света,  $\sigma$  – эффективное сечение поглощения ФСII. В частности, при отсутствии освещения все эти константы равны нулю, а при интенсивности света, равной 1000 Вт/м<sup>2</sup> (полный солнечный свет в зените)  $k_{Li} \sim 10^3 \text{ c}^{-1}$ .

Дезактивация возбужденных состояний Chl\* с переходом в основное состояние сопровождается излучением флуоресценции (хотя возможны и другие, менее эффективные пути дезактивации Chl\*). В рамках нашей модели функция для расчета интенсивности флуоресценции была представлена в виде суммы концентраций флуоресцирующих состояний ФСII (т.е. состояний с возбужденным Chl\*), умноженных на соответствующие им константы флуоресценции  $\chi_i$ :

$$I_{Fl} = \chi_1 \chi_2 + \chi_8 \chi_2 + \chi_{15} \chi_2 + \chi_{28} \chi_2 + \chi_5 \chi_6 + \chi_{12} \chi_6 + \chi_{19} \chi_6 + \chi_{32} \chi_6. \quad (4)$$

Рассматриваемая кинетическая схема включает в себя циклы, в которых начальное и конечное состояния одинаковы, например цикл ( $z_1 - z_2 - g_2 - g_1 - z_1$ ). Согласно условиям детального баланса [15] произведение констант равновесия вдоль координаты реакций такого цикла должно быть равно 1. Таким образом, существует следующее ограничение на возможные величины констант скорости равновесия входящих в него реакций:

$$\chi_{28} = \frac{k_{L28}}{k_{L15}} \chi_{15} \quad (5)$$

Кинетическая схема (рис. 2) содержит 12 таких циклов. Следовательно, существуют еще 11 соотношений детального баланса.

Любая стадия, включающая перенос электрического заряда через мембрану, продуцирует мембранный потенциал ( $\Delta\Psi$ ), который, в свою

очередь, влияет на константу равновесия и константы скоростей всех электрогенных стадий [16–18]:

$$\begin{aligned} K_{eq}(\Delta\Psi) &= \exp[-\alpha\Delta\Psi/(RT/F)]K_{eq}, \\ k_+(\Delta\Psi) &= \exp[-\delta\alpha\Delta\Psi/(RT/F)]k_+, \\ k_-(\Delta\Psi) &= \exp[(1-\delta)\alpha\Delta\Psi/(RT/F)]k_-. \end{aligned} \quad (6)$$

Здесь  $\alpha\Delta\Psi$  – тот мембранный потенциал, который генерируется рассматриваемой стадией при переносе заряда через мембрану,  $\delta$  – та часть мембранного потенциала ( $\alpha\Delta\Psi$ ), которая влияет на константу скорости прямой реакции.

*Редуцированная математическая модель.* Согласно современным представлениям о скоростях протекания отдельных стадий каталитического цикла ФСII все процессы, изображенные на рис. 1, могут быть условно разделены на быстрые (с характерным временем менее 0.1 мс) и медленные (с характерным временем не менее 1 мс). К медленным реакциям относятся все световые стадии попадания квантов света в Chl и перехода P680 в возбужденное состояние (реакции 1, 5, 8, 12, 15, 19, 28, 32), а также связывание пластохинона (реакции 34–40) и диссоциации пластохинола (реакции 21–27). Все остальные реакции являются быстрыми. Рассматривая в соответствии с теоремой Тихонова [19] все быстрые процессы как квазистационарные, мы редуцировали систему из 28 уравнений, описывающую каталитический цикл фотосистемы II, к системе из 10 уравнений. При проведении редукции мы не учитывали стадии, описывающие безызлучательную рекомбинацию зарядов в первичной радикальной паре (стадии, изображенные на рис. 2 пунктирными стрелками без номера), т.к. предполагали, что их эффективность существенно ниже излучательной рекомбинации.

Переходя к пределу по константам скорости быстрых реакций и делая замену переменных:

$$\begin{aligned} \text{PSII}_0 &= g_1, \quad \text{PSII}_1 = x_1, \quad \text{PSII}_2 = \sum_{i=2}^5 x_i + y_1, \\ \text{PSII}_3 &= \sum_{i=2}^5 y_i + z_1, \quad \text{PSII}_4 = \sum_{i=2}^5 z_i, \\ \text{PSII}_5 &= \sum_{i=2}^5 g_i, \quad \text{PSII}_6 = x_6 + x_7, \end{aligned} \quad (7)$$

$\text{PSII}_7 = y_6 + y_7$ ,  $\text{PSII}_8 = z_6 + z_7$ ,  $\text{PSII}_9 = g_6 + g_7$ , мы приходим к системе уравнений относительно новых переменных  $\text{PSII}_i$  ( $i = 0, \dots, 9$ ), которая соответствует кинетической схеме, изображенной на рис. 3. Эффективные константы скоростей реакций редуцированной модели  $\rho_{ij}$ , ( $i = 1, \dots, 14$ )

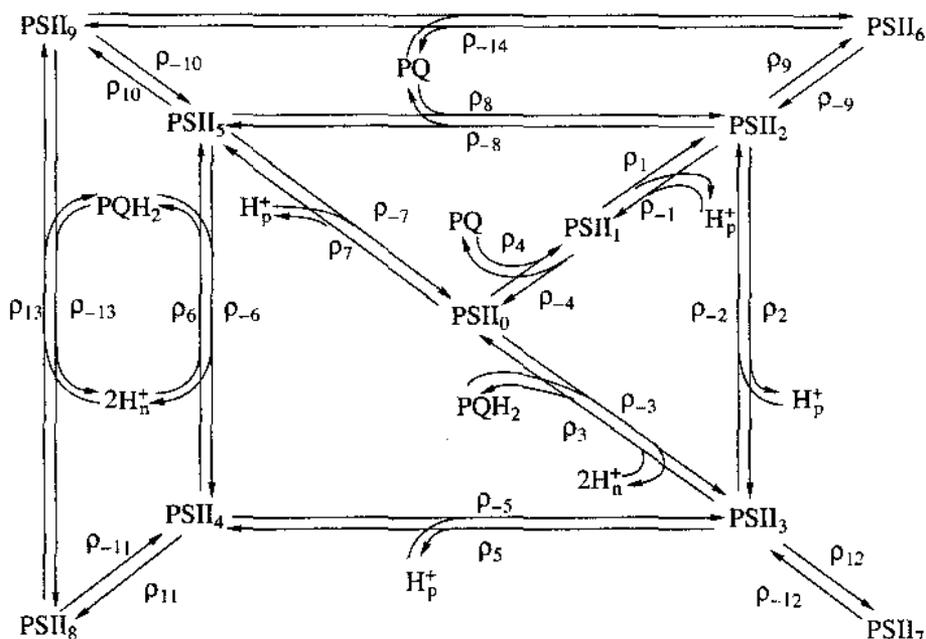


Рис. 3. Редуцированная схема каталитического цикла ФСII. Обозначения PSII<sub>i</sub>, (i = 0, 1, ..., 9) соответствуют переменным модели, полученной из полной модели каталитического цикла ФСII путем редукции быстрых процессов; ρ<sub>±i</sub>, (i = 1, ..., 14) – эффективные константы скорости, являющиеся функциями констант скорости полного каталитического цикла. Выражения для PSII<sub>i</sub> и ρ<sub>±i</sub> приведены в тексте. Остальные обозначения соответствуют таковым на рис. 2.

являются функциями световых констант, констант скорости флуоресценции, присоединения пластохинона, диссоциации пластохинола, констант равновесия быстрых реакций полной модели, разности электрических потенциалов и концентрации протонов внутри тилакоида. Преобразуя выражения для ρ<sub>±i</sub> так, чтобы числитель имел порядок k<sub>L</sub>, и пренебрегая в знаменателе членами меньше 10<sup>-3</sup>, приходим к следующим выражениям:

$$\begin{aligned} \rho_1 &= k_{L1}; \\ \rho_{-1} &= (10^4 \chi_{15} k_{L1} / k_{L15}) / (K_2^0 K_3^0 K_4^0 (K_7 + 1) \times \\ &\quad \times \exp[-(\delta_{II}^1 + \delta_{II}^2 + \delta_{II}^3)\varphi] + \\ &\quad + [H_p^+] \times 10^4 K_2^0 K_3^0 \exp[-(\delta_{II}^1 + \delta_{II}^2)\varphi]), \\ \rho_2 &= k_{L8} / \left( 1 + \frac{1}{K_7} + [H_p^+] \times 10^4 \frac{\exp(\delta_{II}^3 \varphi)}{K_4^0 K_7} \right), \\ \rho_{-2} &= (10^4 \chi_8) / (K_9^0 K_{10}^0 K_{11}^0 (K_{14} + 1) \times \\ &\quad \times \exp[-(\delta_{II}^1 + \delta_{II}^2 + \delta_{II}^3)\varphi] + \\ &\quad + [H_p^+] \times 10^4 K_9^0 K_{10}^0 \exp[-(\delta_{II}^1 + \delta_{II}^2)\varphi]), \\ \rho_3 &= \frac{\chi_H^0 \exp(-\delta_{II}^4 d \varphi)}{1 + 1/K_{14} + [H_p^+] \times 10^4 \exp(\delta_{II}^3 \varphi) / K_{11}^0 K_{14}}, \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \rho_{-3} &= \chi_{-H}^0 \exp[\delta_{II}^4 (1 - d)\varphi], \quad 0 \leq d \leq 1; \\ \rho_4 &= \chi_Q, \quad \rho_{-4} = \chi_{-Q}, \\ \rho_5 &= k_{L15} / \left( 1 + \frac{1}{K_{14}} + [H_p^+] \times 10^4 \frac{\exp(\delta_{II}^3 \varphi)}{K_{11}^0 K_{14}} \right); \\ \rho_{-5} &= (10^4 \chi_{15}) / (K_2^0 K_3^0 K_4^0 (K_7 + 1) \times \\ &\quad \times \exp[-(\delta_{II}^1 + \delta_{II}^2 + \delta_{II}^3)\varphi] + [H_p^+] \times \\ &\quad \times 10^4 K_2^0 K_3^0 \exp[-(\delta_{II}^1 + \delta_{II}^2)\varphi]); \\ \rho_6 &= \chi_H^0 \exp(-\delta_{II}^4 d \varphi), \\ \rho_{-6} &= \chi_{-H}^0 \exp(\delta_{II}^4 (1 - d)\varphi), \quad 0 \leq d \leq 1; \\ \rho_7 &= k_{L28}, \\ \rho_{-7} &= (10^4 \chi_{15} k_{L28} / k_{L15}) / (K_2^0 K_3^0 K_4^0 (K_7 + 1) \times \\ &\quad \times \exp[-(\delta_{II}^1 + \delta_{II}^2 + \delta_{II}^3)\varphi] + \\ &\quad + [H_p^+] \times 10^4 K_2^0 K_3^0 \exp[-(\delta_{II}^1 + \delta_{II}^2)\varphi]); \\ \rho_8 &= \chi_Q, \\ \rho_{-8} &= \frac{\chi_{-Q} [1/K_7 + [H_p^+] \times 10^4 \exp(\delta_{II}^3 \varphi) / K_4^0 K_7]}{1 + 1/K_7 + [H_p^+] \times 10^4 \exp(\delta_{II}^3 \varphi) / K_4^0 K_7}, \end{aligned}$$

$$\rho_9 = \frac{k_{L5}}{1 + K_7 + [H_p^+] \times 10^4 \exp(\delta_{II}^3 \varphi) / K_4^0}$$

$$\rho_{-9} = \frac{\chi_{19} k_{L5} / k_{L19}}{K_6^0 \exp(-\delta_{II}^1 \varphi)}$$

$$\rho_{10} = \frac{k_{L32}}{1 + [H_p^+] \times 10^4 \exp(\delta_{II}^3 \varphi) / K_4^0}$$

$$\rho_{-10} = \frac{\chi_{19} k_{L32} / k_{L19}}{K_6^0 \exp(-\delta_{II}^1 \varphi)}$$

$$\rho_{11} = \frac{k_{L19}}{1 + [H_p^+] \times 10^4 \exp(\delta_{II}^3 \varphi) / K_4^0}$$

$$\rho_{-11} = \frac{\chi_{19}}{K_6^0 \exp(-\delta_{II}^1 \varphi)}$$

$$\rho_{12} = \frac{k_{L12}}{1 + K_{14} + [H_p^+] \times 10^4 \exp(\delta_{II}^3 \varphi) / K_{11}^0}$$

$$\rho_{-12} = \frac{\chi_{12}}{K_{13}^0 \exp(-\delta_{II}^1 \varphi)}$$

$$\rho_{13} = \chi_H^0 \exp(-\delta_{II}^4 d \varphi),$$

$$\rho_{-13} = \chi_{-H}^0 \exp[\delta_{II}^4 (1-d) \varphi];$$

$$\rho_{14} = \chi_Q, \quad \rho_{-14} = \chi_{-Q}$$

Формула для вычисления интенсивности флуоресценции получается при подстановке в (4) соотношений, выражающих старые переменные ( $x_i$ ,  $y_i$ ,  $z_i$ ,  $g_i$ ,  $i = 1, \dots, 6$ ) через новые переменные (PSII,  $i = 2, \dots, 9$ ).

Все представленные в следующем разделе результаты были получены путем численного решения системы уравнений, соответствующей кинетической схеме, изображенной на рис. 3 (редуцированная модель). Эта система описывает кинетическое поведение ФСII, в которой отсутствуют стадии, отвечающие за безызлучательную рекомбинацию зарядов, с миллисекундным разрешением. Для определения стационарных значений переменных модели решалась соответствующая система алгебраических уравнений, полученная приравниванием нулю правых частей каждого уравнения. Численное решение производилось с помощью пакета программ SCAMP.

При оценке параметров модели некоторые из них выбирались в соответствии с известными литературными данными (константы равновесия, константы скорости) [11, 13, 14], другие являлись "свободными" параметрами модели и при расчетах варьировались (световые константы  $k_L$ , кон-

центрация протонов в люмене ( $H_p^+$ ) и в строме ( $H_n^+$ ), разность электрических потенциалов  $\Delta\psi$ ). Полный перечень параметров модели приведен ниже.

Константы равновесия первичного разделения зарядов  $K_2^0 = K_6^0 = K_9^0 = K_{13}^0 = K_{16}^0 = K_{20}^0 = K_{29}^0 = K_{33}^0 = 3 \times 10^6$ ; (здесь и далее номера констант соответствуют номерам стадий на рис. 2); константы равновесия переноса электрона с Phe<sup>-</sup> на Q<sub>A</sub>:  $K_3^0 = K_{10}^0 = K_{17}^0 = K_{30}^0 = 5 \times 10^7$ ; константы равновесия восстановления P680<sup>+</sup> системой расщепления воды:  $K_4^0 = K_{11}^0 = K_{18}^0 = K_{31}^0 = 50$ ; константа равновесия переноса первого электрона с Q<sub>A</sub><sup>-</sup> на Q<sub>B</sub>:  $K_7^0 = 20$ ; константа равновесия переноса второго электрона с Q<sub>A</sub><sup>-</sup> на Q<sub>B</sub><sup>-</sup>:  $K_{14}^0 = 10$ . Константы флуоресценции:  $\chi_i = 10^9 \text{ с}^{-1}$ ,  $i = 1, 5, 8, 12, 15$ , константы связывания пластохинона с Q<sub>B</sub>-центром ФСII (реакции 34–40):  $\chi_{-Q} = 50$ ,  $\chi_Q = 500$ ; константы высвобождения протонированного пластохинона из Q<sub>B</sub>-центра ФСII и константы соответствующих обратных реакций (стадии 21–27):  $\chi_H^0 = 10^{10}$ ,  $\chi_{-H}^0 = 0.4$ ; доли трансмембранного электрического потенциала  $\Delta\psi$ , создаваемые различными стадиями каталитического цикла ФСII: при первичном разделении зарядов  $\delta_{II}^{(1)} = 0.6$ ; при переносе электрона на хиноновый акцептор Q<sub>A</sub> значение  $\delta_{II}^{(2)} = 0.2$ ; при восстановлении пигмента реакционного центра  $\delta_{II}^{(3)} = 0.1$ ; при протонировании вторичного хинонового акцептора Q<sub>B</sub><sup>2-</sup> значение  $\delta_{II}^{(4)} = 0.1$ , часть мембранного потенциала, влияющая на константу скорости прямой реакции:  $d = 0.5$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе, используя экспериментальные данные по характерным временам и средноточечным потенциалам соответствующих окислительно-восстановительных пар отдельных стадий переноса электрона мы построили полную и редуцированную модели функционирования ФСII (т.е. индуцированного светом переноса электрона от системы расщепления воды на пластохинон с восстановлением его до пластохинола). В редуцированной модели ФСII изучались только процессы с характерным временем не менее сотен микросекунд. К медленным реакциям

были отнесены все световые стадии перехода P680 в возбужденное состояние (реакции 1, 5, 8, 12, 15, 19, 28, 32), а также связывание пластохинона (реакции 34–40) и диссоциация пластохинола (реакции 21–27). Все остальные реакции рассматривались как быстрые. При построении модели была учтена зависимость электрогенных стадий (перенос электрона или протона) от электрического потенциала. В то же время, так как в данной работе мы не рассматривали процессы потребления  $\Delta\mu_{\text{H}}$ , компоненты электрохимического потенциала протонов ( $\Delta\psi$  и  $\Delta\text{pH}$ ) полагались параметрами модели, т.е. не изменялись со временем. Такой подход позволил изучить такие регуляторные свойства комплекса ФСII, которые не вызываются изменением  $\Delta\psi$  или  $\Delta\text{pH}$  и поэтому могут быть названы внутренними регуляторными свойствами.

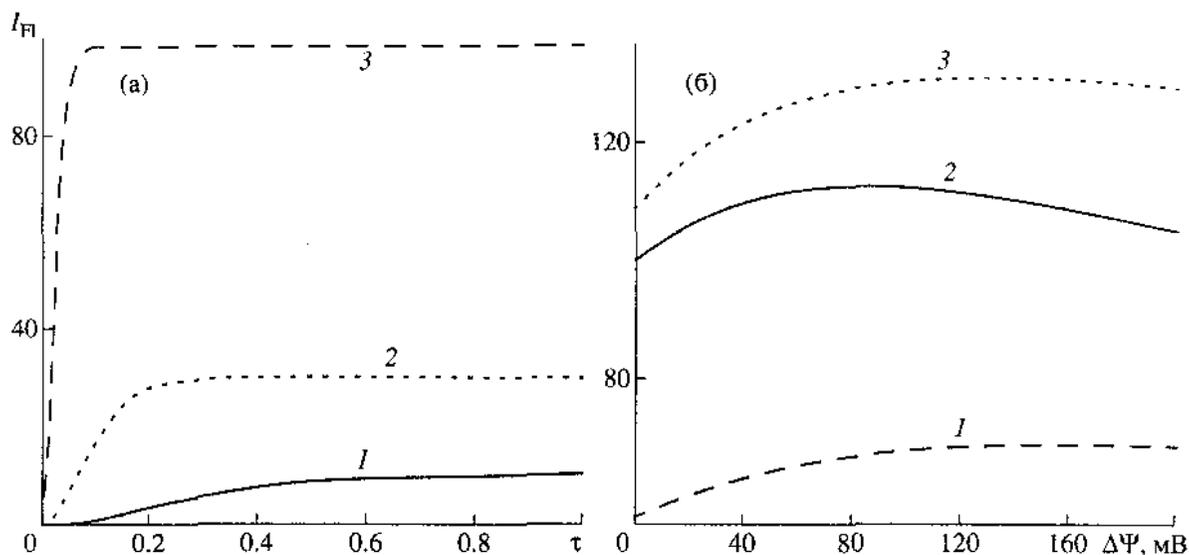
Полная модель, учитывающая как быстрые, так и медленные стадии каталитического цикла ФСII, может быть использована для корректного описания экспериментов по регистрации “быстрой флуоресценции” и предсказания состояния фотосинтетического аппарата при различных видах воздействий на основании исследования параметров такого типа флуоресценции (например,  $F_0$  и  $F_{\text{max}}$ ). Кроме того, полная модель, может быть адаптирована для описания экспериментов по импульсной флуориметрии и изучения кинетических характеристик функционирования ФСII. Редуцированную модель мы применили к описанию одного из широко известных экспериментальных феноменов – быстрой фазы кривой индукции флуоресценции хлорофилла, которая представляет собой увеличение интенсивности флуоресценции объекта в ответ на включение освещения после периода темновой адаптации за времена порядка нескольких секунд (см. рис. 1). Большинство моделей, построенных для описания этого феномена, ограничиваются рассмотрением процессов в ФСII [3–5]. Подобное упрощение авторы аргументируют тем, что флуоресценция, измеряемая при регистрации индукционных кривых, практически полностью происходит из ФСII.

Одной из главных целей нашей работы была проверка гипотезы о том, можно ли объяснить наблюдаемую в экспериментах двухфазность *OIDP*-кинетики, опираясь исключительно на регуляторные свойства самой фотосистемы II. Мы попытались выяснить, может ли кривая индукции флуоресценции, построенная на основе нашей модели, иметь в диапазоне 50–500 мс характерную немонотонность (локальный минимум  $D$  на рис. 1) или, по крайней мере, “плато” *OID*, которые наблюдаются на экспериментально полученных кривых. Для этого мы исследовали модельные кривые индукции флуоресценции

при разных значениях параметров модели. Каждая кривая индукции флуоресценции рассчитывалась как зависимость выхода флуоресценции ФСII (см. формулу (4)) от времени под действием света постоянной интенсивности после темновой адаптации.

Начальные условия задавались исходя из предположения темновой адаптации объекта:  $[\text{PSII}] = 1.612 \text{ мМ}$ ,  $[\text{PSII}_0] = 0.008 \text{ мМ}$ ;  $[\text{PSII}_i] = 0$ ,  $i = 2, 3, \dots, 9$ ; концентрация пластохинона  $[\text{PQ}] = 19 \text{ мМ}$ ; протонированного пластохинола  $\text{PQH}_2$   $1 \text{ мМ}$ , концентрации протонов в люмене и строме, а также разность электрических потенциалов  $\Delta\psi$  варьировались:  $\text{H}_\text{p}^+$  и  $\text{H}_\text{n}^+$  от  $10^{-5}$  до  $10^{-8} \text{ М}$ ;  $\Delta\psi$  – от 0 до 200 мВ.

Результаты моделирования показали, что при различных значениях параметров модели кривая индукции флуоресценции всегда имеет характерную S-образную форму. Двухфазности быстрого возрастания флуоресценции не наблюдается. Варьирование параметров модели ведет лишь к изменению стационарного уровня флуоресценции и, в ряде случаев, к изменению скорости его достижения. Так, увеличение световой константы  $k_L$  увеличивает стационарное значение интенсивности флуоресценции и сокращает время, за которое оно достигается (рис. 4а). Напротив, закисление стромы и внутритилакоидного пространства, которое приводит к отклонению от нормальной разности протонного градиента  $\Delta\text{pH}$ , равного 2 ( $\text{pH}_\text{n} = 8$ ,  $\text{pH}_\text{p} = 6$ ), обуславливает снижение стационарного уровня флуоресценции. Наконец, увеличение электрического потенциала на мембране тилакоида  $\Delta\psi$  дает в результате лишь небольшое изменение стационарного значения флуоресценции. Как следует из рис. 4б, эта зависимость является “колоколообразной”, т.е. при неизменных параметрах модели существует оптимальное значение  $\Delta\psi$ , которое соответствует максимальному значению интенсивности флуоресценции. Отклонение  $\Delta\psi$  от оптимального значения приводит к снижению флуоресценции. Немонотонная зависимость стационарной флуоресценции от  $\Delta\psi$  объясняется тем, что при интенсивностях света, близких к насыщающим ( $10 << k_L < 100$ ), основным источником флуоресценции ФСII является состояние  $z_6$  (см. рис. 2), т.е. состояние с восстановленными  $Q_A$  и пластохинолом в  $Q_B$  центре. Зависимость стационарной концентрации этой формы от  $\Delta\psi$  обуславливается тем, что реакции, ведущие к ее образованию (стадии 16–18), и реакция потребления  $z_6$  (стадия 26) зависят от  $\Delta\psi$ . Так как реакции 16–18 описывают путь заряда практически через всю мембрану, а реакция 26 – всего лишь перенос заряда (протона) из стромы в  $Q_B$ -центр, то процессы производства  $z_6$  более под-



**Рис. 4.** Результаты моделирования индукции флуоресценции хлорофилла с использованием редуцированной модели каталитического цикла ФСII: а – кривые индукции флуоресценции, рассчитанные для различных условий освещения, значение световой константы  $k_L = 10(1)$ ,  $30(2)$  и  $100(3)$ ; б – зависимости стационарного уровня флуоресценции от разности электрических потенциалов на мембране тилакоида, рассчитанные для различных значений трансмембранного градиента протонов  $\Delta pH$ , значения  $pH$  в люмене ( $pH_p = 6(1)$ ,  $2$  и  $6.5(3)$ ) и строме ( $pH_n = 6.5(1)$  и  $8(2, 3)$ ) тилакоида; значения остальных параметров модели приведены в тексте.

вержены влиянию  $\Delta\psi$ . Учитывая тот факт, что эта зависимость экспоненциальна, можно предположить, что малые  $\Delta\psi$  тормозят реакцию 26 больше, чем реакции 16–18 и, наоборот, большие  $\Delta\psi$  ингибируют реакции 16–18 в большей степени. Данные рис. 4б также демонстрируют, что закисление внутритилакоидного пространства (уменьшение  $pH_p$ ) сдвигает максимум флуоресценции влево, а закисление стромы (уменьшение  $pH_n$ ) – вправо.

Монотонность кривых индукции флуоресценции, полученных в рамках представленной выше модели, является следствием сделанных нами упрощений. Действительно, мы не описывали процесс формирования трансмембранного потенциала  $\Delta\mu_H$ , а задавали его компоненты ( $\Delta\psi$  и  $\Delta pH$ ) в виде параметров. Причины немонотонности флуоресценции на участке *O*IDP, по всей видимости, следует искать во взаимодействии ФСII с рядом других первичных процессов фотосинтеза – генерацией электрохимического потенциала на мембране тилакоида и трансмембранными ионными потоками. Имеются данные, что мембранный потенциал может влиять на выход флуоресценции за счет изменения энергетических уровней промежуточных состояний ФСII, что, в свою очередь, приводит к изменению констант скорости быстрых реакций электронного транспорта [2, 20]. Результаты моделирования кинетики генерации трансмембранного электрохимического потенциала и изучение его роли в формировании описанных особенностей начального участка кривой ин-

дукции флуоресценции будут опубликованы в следующей работе.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (коды проектов № 98-04-48868, № 98-07-90097, № 00-04-48919), а также Программы INTAS.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schatz G.H., Brock H., Holzwarth A.R. // *Biophys. J.* 1988. V. 54. P. 397.
2. Leibl W., Breton J., Deprez J., Trissl H.W. // *Photosynth. Res.* 1989. V. 22. P. 257.
3. Trissl H.-W., Gao Y., Wulf K. // *Biophys. J.* 1993. V. 64. P. 974.
4. Renger G., Shulze A. // *Photobiochem. Photobiophys.* 1985. V. 9. P. 79.
5. Baake E., Shloeder J.P. // *Bull. Math. Biol.* 1992. V. 54. P. 999.
6. Кукушкин А.К., Тихонов А.Н. Лекции по биофизике фотосинтеза высших растений. М.: Изд-во МГУ, 1988.
7. Дубинский А.Ю., Тихонов А.Н. // *Биофизика.* 1994. Т. 39. № 4. С. 652.
8. Dau H. // *J. Photochem. Photobiol. B: Biology.* 1994. V. 26. P. 3.
9. Van Kooten O., Snel J.F.H., Vredenberg W.J. // *Photosynth. Res.* 1986. V. 9. P. 211.
10. Dau H. // *Photochem. Photobiol.* 1994. V. 60. P. 1.
11. Hall D.O., Rao K.K. *Photosynthesis. Fifth edition. Studies in Biology.* Cambridge University press, 1994.

12. Рубин А.Б., Кононенко А.А., Шайтан К.В. и др. // Биофизика. 1994. Т. 39. № 2, С. 213.
13. Молекулярные механизмы трансформации энергии в первичных процессах фотосинтеза // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1987. Т. 20.
14. Принципы регуляции и модельные системы первичных процессов фотосинтеза // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1987. Т. 22.
15. *Westerhoff H.V., Van Dam K.* Thermodynamics and Control of Biological Free-Energy Transduction. Amsterdam: Elsevier, 1987.
16. *Скулачѳв В.П., Козлов И.А.* Протонные аденозинтрифосфатазы: молекулярные биологические генераторы тока. М.: Наука, 1977.
17. *Reynolds I.A., Johnson E.A., Tanford C.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985. V. 82. P. 6869.
18. *Демин О.В., Вестерхофф Х.В., Холоденко В.Н.* // Биохимия. 1998. Т. 63. С. 755.
19. *Тихонов А.Н.* // Мат. сб. 1952. Т. 31. № 3, С. 575.
20. *Dau H., Windecker R., Hansen U.P.* // Biochim. Biophys. Acta. 1991. V. 1057. P. 337.