

УДК: 51-76, 576

Математическое моделирование электрон-транспортной цепи в тилакоидной мембране с учетом пространственной гетерогенности мембраны

©2012 С.С. Макаров^{1*}, Е.А. Грачев¹, Т.К. Антал²

¹Россия 119991, Москва, Ленинские горы 1, корп. 2, МГУ, Физический факультет, кафедра компьютерных методов физики

²Россия 119991, Москва, Ленинские горы 1, корп. 12, МГУ, Биологический факультет, кафедра биофизики

Аннотация. В данной работе предложена новая математическая модель фотосинтетического аппарата в мембране тилакоида. Основной чертой модели является совместное рассмотрение процессов электронного транспорта, включающих в себя перенос электрона внутри реакционных центров белковых комплексов и диффузию подвижных электронных переносчиков. Модель учитывает основные реакции линейного и циклического электронного транспорта, а также пространственную гетерогенность тилакоидной мембраны. С помощью модели рассчитаны теоретические кривые зависимости выхода флуоресценции хлорофилла *a* и интенсивности сигнала $\Delta 820$ от времени в течение первой секунды после освещения адаптированных к темноте образцов. Рассчитанные кривые показали хорошую корреляцию с экспериментальными данными, в том числе полученными в присутствии фотосинтетических ингибиторов и акцепторов электронов. Полученные результаты свидетельствуют о том, что три стадии роста выхода флуоресценции на кинетической кривой отражают последовательное восстановление акцепторной стороны фотосистемы 2, пула пластохинонов, а также дальних переносчиков электронов, включая фотосистему 1 и ферредоксин. В работе предложен новый подход для описания пространственной структуры тилакоидной мембраны, в рамках которого моделируемая система представляется в виде одномерного отрезка с асимметрично распределенными на нем компонентами фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

Ключевые слова: математическое моделирование, электрон-транспортная цепь, флуоресценция хлорофилла

1. Введение

Процессы, протекающие в тилакоидной мембране во время световой фазы фотосинтеза, активно изучались в течение последних десятилетий и в настоящее время хорошо исследованы (см., например, [1]). Известно, что выделение НАДФ и АТФ, являющихся конечными продуктами световой фазы фотосинтеза, происходит в результате процессов электронного и протонного транспорта. Электрон-транспортная цепь (ЭТЦ) в тилакоидной мембране начинается со светоиндуцированного разделения

* sergejsmakarov@gmail.com

зарядов в реакционном центре (РЦ) фотосистемы 2 (ФС2) и включает в себя цепочки переноса электронов внутри белковых комплексов – ФС2, цитохромный b_6f комплекс (цит b_6f), фотосистема 1 (ФС1) – и перенос электронов между белковыми комплексами с помощью подвижных переносчиков: пластохинона (ПХ), пластоцианина (Пц) и ферредоксина (Фд).

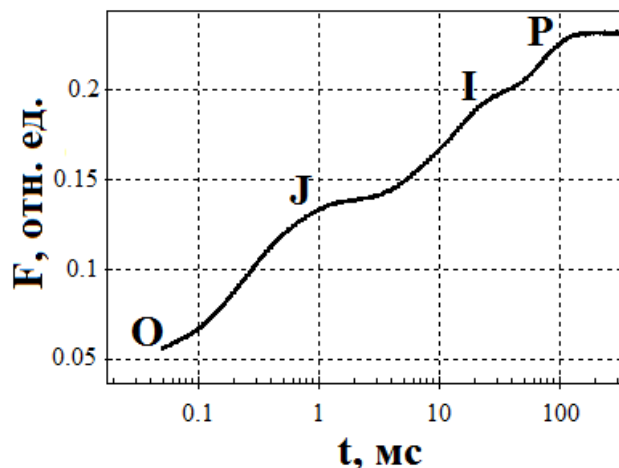


Рис. 1. Характерный вид ОЛР кривой (получен при интенсивном освещении адаптированных к темноте листьев фасоли, см. п. 3)

Одним из наиболее распространенных экспериментальных способов исследования механизмов функционирования фотосинтетического аппарата является измерение индукционной кривой флуоресценции (ИКФ) хлорофилла a , возникающей, главным образом, в ФС2 [2]. Известно, что ИКФ, индуцированные интенсивным светом ($\sim 3000 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) в адаптированных к темноте листьях растений или клетках водорослей обычно характеризуются тремя фазами роста от уровня O (наблюдаемого спустя 20–50 мкс после начала освещения) до максимального P (200–500 мс) через промежуточные точки перегиба J (1–3 мс) и I (30–50 мс) (т.н. ОЛР кривая) [2,3]. Характерный вид кривой представлен на рис. 1. Наблюдаемый рост выхода флуоресценции хлорофилла (ФХ) обычно связывают с переходом ФС2 из открытого состояния с окисленным первичным хинонным акцептором Q_A в закрытое состояние с восстановленным Q_A [4]. В закрытых центрах ФС2 энергия возбуждения не может быть дезактивирована фотохимическим путем, поэтому она либо диссипирует в тепло, либо высвечивается в виде флуоресценции, выход которой оказывается выше, чем в открытых центрах. Кроме редокс состояния Q_A , заметное влияние на ФХ оказывает редокс состояние пластохинона (ПХ). Так, известно, что ПХ пул в окисленном состоянии тушит флуоресценцию, снижая ее максимальный выход почти на 25% [5].

Методы математического моделирования широко используются при изучении первичных процессов фотосинтеза, в том числе механизмов световой индукции ФХ [4,6–12]. В основе большинства существующих моделей ОЛР кривых лежит представление о том, что характер ИКФ определяется быстрыми фотохимическими процессами в ФС2, а также реакциями переноса электронов с донорной стороны ФС2 в ПХ пул. При этом предполагается, что реакции фотосинтетического транспорта электронов с ПХ пула к ФС1 и далее на НАДФ слабо влияют на состояние ФС2 и, соответственно, на выход ФХ в течение первой секунды освещения. Таким образом, указанные модели в основном рассматривают процессы, протекающие в РЦ ФС2.

Механизм передачи электрона внутри РЦ хорошо описывается с помощью методов химической кинетики. Поэтому модели, описывающие ИКФ, как правило представляют собой систему нелинейных обыкновенных дифференциальных уравнений, где переменными выступают вероятности нахождения ФС2 в состояниях с различным редокс-состоянием переносчиков электронов в РЦ.

Результаты, полученные в рамках упомянутых моделей, свидетельствуют о том, что рост ФХ во время начальной стадии ОЈ отражает, главным образом, восстановление Q_A , пока последующие акцепторы электронов находятся в окисленном состоянии. В свою очередь, фазы Л и IP обусловлены снижением скорости ре-окисления Q_A^- в результате накопления восстановленных форм Q_B : Q_B^- и Q_B^{2-} . Также моделирование показало, что восстановление ПХ пула представляет собой одностадийный процесс, совпадающий по времени с самой медленной фазой IP [9]. Из этого можно заключить, что светоиндуцированные изменения редокс состояния пластохинонов влияют, в основном, на самую медленную фазу на ОЈР кривой. К недостаткам некоторых из указанных моделей относится то, что рассчитанные на их основе теоретические кривые обычно характеризуются более быстрым достижением промежуточного пика I и максимума P по сравнению с экспериментальными данными (см., например, сравнение кривых в [9]). Кроме того, в рамках данного подхода сложно объяснить действие хорошо известного фотосинтетического ингибитора дибромотимохинона (ДБТХ) на ОЈР кривую. Так, известно, что обработка фотосинтетических образцов ДБТХ, который блокирует сайт связывания пластохинола (P_{XH_2}) с цит b_6f , приводит к росту выхода ФХ в точке I до максимального уровня P [13]. Этот результат указывает на возможность полного восстановления ПХ пула уже на стадии I при условии ингибирования его ре-окисления цит b_6f .

Ранее мы предположили, что светоиндуцированное восстановление ПХ пула может протекать в два этапа, соответствующих стадиям Л и IP на ОЈР кривой [14]. Первый этап, на котором происходит частичное восстановление пула, обусловлен установлением квазиравновесного состояния между процессами поступления электронов в пул с ФС2 и их оттоком к цит b_6f . Второй этап полного восстановления пула связан со снижением скорости его ре-окисления в результате перехода переносчиков электронов, расположенных в цепи за цит b_6f , в восстановленное состояние. Этот процесс полного восстановления фотосинтетической электрон-транспортной цепи может быть связан с неактивным состоянием фермента ферредоксин-НАДФ-редуктазы (ФНР) в адаптированных к темноте образцах, активация которого обычно требует более чем одной секунды пребывания на свету [15,16]. Наши предположения подтверждаются рядом экспериментальных данных. Например, известно, что первая фаза светоиндуцированного окисления P_{700} , первичного донора электронов в ФС1, совпадает по времени со стадией Л на ИКФ, в то время как последующая фаза восстановления P_{700}^+ – со стадией IP [17]. Таким образом, рост выхода ФХ во время медленной стадии IP может отражать восстановление ФС1 и, соответственно, полное восстановление фотосинтетической ЭТЦ. В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что на ИКФ, измеренных в присутствии метилвиологена – акцептора электронов, окисляющего ФС1 и ферредоксин (Фд), полностью отсутствует фаза IP [13].

Построение математической модели, позволяющей проверить сделанные предположения, требует полного учета всех компонентов ЭТЦ. Использование моделей химической кинетики в этом случае сталкивается с трудностями, связанными с описанием движения электронных переносчиков в пространстве. Как правило, для такого описания используются коэффициенты, характеризующие временную задержку между восстановлением и окислением подвижных переносчиков [8]. Такого рода замена пространственных характеристик системы временными хорошо подходит для гомогенных систем, однако описание поведения пространственно-неоднородных

систем в рамках такого подхода проблематично. Вместе с тем, фотосинтетические мембраны высших растений и зеленых водорослей гетерогенны по своей структуре и составу [18]. Так, полностью функциональные суперкомплексы ФС2 расположены главным образом в области стекинга гран, в то время как центры ФС1 – в области ламелл [19]. При моделировании электронного транспорта в тилакоидной мембране от ФС2 к ФС1 необходимо учитывать диффузию наиболее мобильных переносчиков электронов, таких как пластохиноны и пластоцианины, поскольку этот процесс может влиять на динамические свойства системы.

Пример модели, рассматривающей диффузию подвижных электронных переносчиков, может быть найден в работах [20,21]. В указанных моделях тилакоид рассматривается как цилиндр, на поверхности которого задано неоднородное распределение белковых комплексов. Движение подвижных переносчиков описывается с помощью уравнения диффузии. Авторы работ получили ряд результатов, иллюстрирующих влияние коэффициента диффузии на формирование неоднородных профилей рН в люмене, а также получили кривые окисления P_{700}^+ в широком временном диапазоне, хорошо описывающие экспериментальные данные. Вместе с тем, авторы этих работ практически не интересовались кривой индукции флуоресценции, возникающей в ФС2.

В настоящей работе мы делаем предположение о том, что структура тилакоидной мембраны может быть изображена в математической модели с помощью одномерного отрезка, с учетом того, что асимметрия строения тилакоидной мембраны выражена главным образом вдоль единственного направления от гранальной части мембраны к стромальной. Методы построения математических моделей на минимальных графах, изображающих структуру системы, были предложены Е. А. Грачёвым, М. Е. Грачёвой и Д. В. Мельниковым пять лет назад.

Таким образом, в настоящей работе мы предлагаем математическую модель фотосинтетической мембраны, которая описывает динамику изменения состояний отдельных звеньев фотосинтетической ЭТЦ от ФС2 до Фд. Несмотря на достаточно упрощенный подход к описанию фотосинтетических процессов (в модели рассматриваются только наиболее важные участники ЭТЦ), модель демонстрирует поведение, хорошо соответствующее основным экспериментальным данным, связанным с измерениями ИКФ, в том числе в присутствии ДБТХ и метилвиологена, а также сигнала $\Delta 820$, характеризующего редокс-состояние P_{700} и пластоцианина.

2. Описание модели

2.1. Основные положения

Целью данной работы является одновременное описание функционирования пространственно разделенных участков ЭТЦ в мембране тилакоида. Математические модели каждого из участков ЭТЦ по отдельности широко представлены в научной литературе и характеризуются различной степенью подробности. В настоящей работе мы делаем акцент на сопряжение процессов, протекающих в различных областях пространства. В то же время описание процессов электронного транспорта внутри белковых комплексов проведено в упрощенном виде. В модели также не рассматривается процесс изменения трансмембранного протонного градиента, возникающего в связи с сопряжением между электронным транспортом и реакциями синтеза АТФ, поскольку характерное время активации АТФазы превышает промежуток времени, рассматриваемый в настоящей работе [22].

Блок-схема модели представлена на рис. 2. Система состоит из трёх основных блоков – ФС2, Цит b_6f и ФС1, описывающих функционирование соответствующих белковых комплексов, а также двух блоков – ФНР и ферредоксин-хинонной редуктазы

(ФХР) – описывающих работу ферментов, катализирующих реокисление ферредоксина. Реакции в каждом блоке происходят независимо от других блоков. Связь между блоками осуществляется посредством описания диффузии подвижных электронных переносчиков (ПХ, Пц, Фд). Список всех переменных модели приведен в таблице 1. Полный список всех реакций и их констант скоростей приведен в таблице 2.

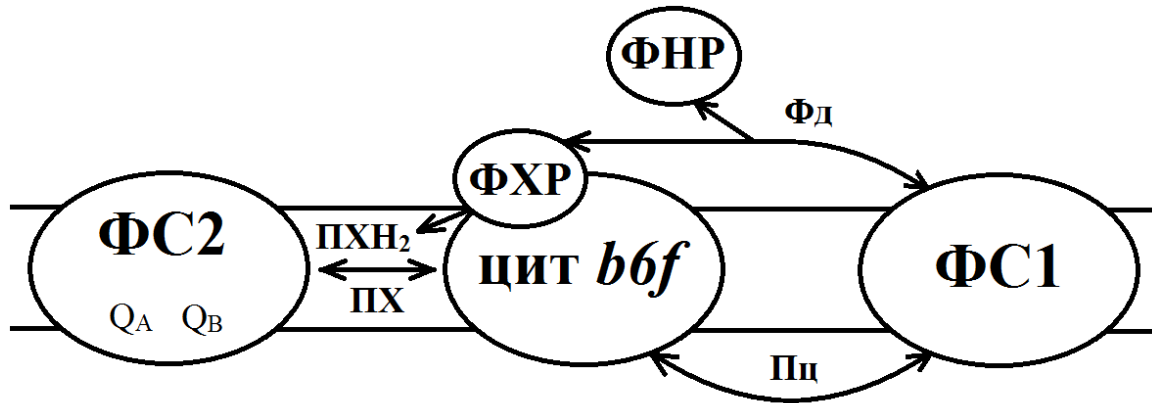


Рис 2. Блок-схема модели тилакоидной мембраны. Описание см. в тексте.

2.2. Фотосистема 2

Предполагается, что в обычных условиях скорость восстановления Q_A под действием интенсивного света не лимитируется реакциями на донорной стороне ФС2. Поэтому состояние ФС2 описывается редокс состояниями хинонных акцепторов Q_A и Q_B . В начальный момент времени Q_A и Q_B находятся в окисленном состоянии, что соответствует адаптированным к темноте образцам. Под действием интенсивного света Q_A переходит в восстановленное состояние. Описание переноса электрона в РЦ ФС2 включает в себя следующие реакции:

- Светоиндуцированное восстановление Q_A , сопряженное с окислением воды в ФС2. В действительности эта реакция протекает в несколько этапов. В результате возбуждения хлорофиллов светособирающего комплекса первичный донор электронов (P_{680}) в ФС2 переходит в возбуждённое состояние, после чего происходит первичное разделение зарядов с участием феофитина Pheo ($P_{680}^*Pheo \rightarrow P_{680}^+Pheo^-$) и последующий перенос электрона на Q_A . Последующее восстановление P_{680}^+ связано с поэтапным окислением воды в КВК. Поскольку реакция первичного разделения зарядов очень быстра, а в нормальных условиях перенос электрона на Q_A не лимитируется реакциями в КВК, то мы описываем восстановление Q_A одной эффективной реакцией первого порядка, константа скорости которой (K_L) пропорциональна плотности потока квантов излучения. В нашей модели величина K_L соответствует интенсивности света $3000 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ [4].

- Перенос электрона с Q_A на двухэлектронный акцептор Q_B . Скорость этой реакции зависит от редокс состояния Q_B . Так, константа k_{AB} скорости переноса электрона с Q_A на окисленный Q_B больше константы k_{AB2} скорости переноса электрона с Q_A на Q_B^- .

- Взаимодействие ФС2 с ПХ пулом. В действительности эта реакция происходит в три этапа, включающих: а) протонирование Q_B^{2-} из стромы, б) разрыв связи между молекулой Q_BH_2 и Q_B -связывающим сайтом в ФС2 с последующей диссоциацией в мембранный липидный слой, и в) связывание с ФС2 окисленной молекулы пластохинона. В модели эти три этапа описываются одной эффективной реакцией

второго порядка с константой скорости k_{Qb-PX} , субстратами которой являются состояния ФС2 с Q_B^{2-} и ПХ, а продуктами – состояния ФС2 с Q_B и PXH_2 .

Кроме того, ФС2 в модели характеризуются функциональной гетерогенностью по своей способности донировать электроны в ПХ пул. В нашей модели допускается, что 20% центров ФС2 не способны к восстановлению ПХ (это т. н. Q_B^- невосстанавливающие центры) (см. ссылки в [4]).

Совокупность указанных реакций описывается системой уравнений химической кинетики, заданных относительно концентраций ФС2 с различными редокс-состояниями хинонных акцепторов:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{d[Q_A Q_B]}{dt} = k_{Qb-PX} [Q_A Q_B^{2-}] [PX] - K_L [Q_A Q_B], \\ \frac{d[Q_A^- Q_B]}{dt} = K_L [Q_A Q_B] + k_{Qb-PX} [Q_A^- Q_B^{2-}] [PX] - k_{AB} [Q_A^- Q_B], \\ \frac{d[Q_A Q_B^-]}{dt} = k_{AB} [Q_A^- Q_B] - K_L [Q_A Q_B^-], \\ \frac{d[Q_A^- Q_B^-]}{dt} = K_L [Q_A Q_B^-] - k_{AB2} [Q_A^- Q_B^-], \\ \frac{d[Q_A Q_B^{2-}]}{dt} = k_{AB2} [Q_A^- Q_B^-] - K_L [Q_A Q_B^{2-}] - k_{Qb-PX} [Q_A Q_B^{2-}] [PX], \\ \frac{d[Q_A^- Q_B^{2-}]}{dt} = K_L [Q_A Q_B^{2-}] - k_{Qb-PX} [Q_A^- Q_B^{2-}] [PX], \\ \frac{d[Q_A]_{нв}}{dt} = -K_L [Q_A]_{нв}, \\ \frac{d[Q_A^-]_{нв}}{dt} = K_L [Q_A]_{нв}, \end{array} \right. \quad (1)$$

где квадратные скобки означают концентрацию ФС2 с данными состояниями хинонных акцепторов, индекс «нв» соответствует Q_B -невосстанавливающим центрам, $[PX]$ – концентрация пластохинона.

2.3. Цитохромный b_6f комплекс

В модели предполагается, что скорость переноса электрона между донорной и акцепторной стороной цит b_6f достаточно высока, поэтому рассматриваются только два состояния цит b_6f : окисленное и восстановленное. Изменения редокс-состояния цит b_6f происходят вследствие взаимодействия с подвижными электронными переносчиками. В модели рассматриваются две реакции, протекающие с участием цит b_6f :

– Реокисление PXH_2 . Известно, что эта реакция является лимитирующей в фотосинтетической ЭТЦ (см., например, [23]). Поскольку только один из двух поступающих на цит b_6f электронов используется для последующего восстановления молекулы Пц, а второй возвращается обратно в пул [24], то, в целом, взаимодействие ПХ с цит b_6f рассматривается как две последовательные одноэлектронные реакции второго порядка с суммарной константой скорости $k_{цит-PX}$.

– Восстановление Пц. Эта реакция рассматривается как окислительно-восстановительная реакция второго порядка с константой скорости $k_{цит-Пц}$, в которой субстратами являются восстановленный цит b_6f и окисленный Пц, а продуктами – окисленный цит b_6f и восстановленный Пц.

Изменения редокс-состояния цит b_6f описываются уравнениями химической кинетики с учетом сохранения общей концентрации цит b_6f :

$$\begin{cases} \frac{d[Цит_{восст}]}{dt} = k_{Цит-ПХ}[Цит_{ок}][ПХH_2] - k_{Цит-Пц}[Цит_{восст}][Пц_{ок}], \\ [Цит_{ок}] = [Цит]_0 - [Цит]_{восст} \end{cases} \quad (2)$$

где $[ПХH_2]$, $[Пц_{ок}]$ – концентрации восстановленного пластохинона и окисленного пластоцианина соответственно, $[Цит]_0$ – общая концентрация цит b_6f , равная сумме начальных значений $[Цит_{восст}]$ и $[Цит_{ок}]$.

2.4. Фотосистема 1

Так же, как и для ФС 2, мы допускаем, что перенос электрона от донорной к акцепторной стороне ФС1 происходит быстрее, чем генерация возбужденного состояния P_{700} . Поэтому в нашей модели количество состояний ФС1 ограничено двумя, соответствующими окисленному и нейтральному состоянию первичного донора электронов P_{700} . В модели рассматриваются две реакции, протекающие с участием ФС1:

- Реокисление пластоцианина первичным донором электронов P_{700}^+ в ФС1. Реакция рассматривается как реакция второго порядка с константой скорости $k_{P_{700}-Пц}$, субстратами которой являются восстановленный Пц и окисленное состояние P_{700} , а продуктами – окисленный Пц и нейтральное состояние P_{700} .

- Восстановление Фд фотосистемой 1. Эта реакция определяется скоростью генерации возбужденных состояний в ФС1, которая является лимитирующей в цепи переноса электронов с донорной стороны ФС1 на Фд. Реакция также рассматривается как реакция второго порядка, субстратами которой являются возбужденное состояние P_{700} (P_{700}^*) в ФС1 и окисленный Фд, а продуктами – P_{700}^+ и восстановленный Фд. При этом константа скорости реакции $k_{P_{700}-Фд}$ пропорциональна интенсивности освещения.

Динамика изменения состояний ФС1 описывается уравнениями химической кинетики с учетом сохранения суммарной концентрации ФС1:

$$\begin{cases} \frac{d[P_{700}]}{dt} = k_{P_{700}-Пц}[P_{700}^+][Пц_{восст}] - k_{P_{700}-Фд}[P_{700}][Фд_{ок}], \\ [P_{700}^+] = [P_{700}]_0 - [P_{700}], \end{cases} \quad (3)$$

где $[Пц_{восст}]$ и $[Фд_{ок}]$ – концентрации восстановленного пластоцианина и окисленного ферредоксина, соответственно, а $[P_{700}]_0$ – сумма начальных значений $[P_{700}]$ и $[P_{700}^+]$.

2.5. ФНР и ФХР

ФНР и ФХР катализируют перенос электронов с Фд на НАДФ⁺ или ПХ, соответственно. Предполагается, что в адаптированных к темноте образцах ФНР неактивна и активация требует нескольких секунд освещения [16]. Поэтому ФНР не оказывает влияния на быструю стадию ИКФ в адаптированных к темноте образцах. ФХР в модели также считается неактивной по умолчанию, хотя известно, что катализируемый этим ферментом циклический транспорт электронов вокруг ФС 1 активен в течение нескольких секунд после начала освещения адаптированного к темноте образца [25]. В нашей работе исследуется возможное влияние активности этих ферментов на ИКФ.

2.6. Концентрации компонент фотосинтетической ЭТЦ

В Таблице 1 приведены данные по относительной концентрации различных компонент ЭТЦ в начальный момент времени, соответствующий адаптированному к темноте состоянию. Количество белковых комплексов ФС2, цит b_6f и ФС1 в мембране считается одинаковым. Количество подвижных переносчиков взято из расчета 6 ПХ на ФС2 [26], 3 Пц и 5 Фд на ФС1 [27]. Считается, что переносчики в ФС2, ФС1 и цит b_6f , а также ПХ и Фд в начальный момент времени находятся в нейтральном состоянии (в таблице обозначено как окисленное состояние), в то время как молекулы Пц, обладающие самым высоким редокс потенциалом в фотосинтетической цепи переноса, находятся в восстановленном состоянии.

Таблица 1. Входные параметры моделирования с указанием начальных концентраций, области расположения и коэффициентов диффузии мобильных переносчиков электронов фотосинтетической ЭТЦ. Данные по концентрации и локализации компонент взяты из [19, 26, 27]. Данные по коэффициентам диффузии определены по работам [21, 28–31]

Состояния компонент модели	Начальная концентрация в адаптированном к темноте состоянии, отн.ед. (^{1,2})	Расположение (стромальная или гранальная часть тилакоида)	Коэффициент диффузии, $\text{нм}^2/\text{с}$
$Q_A Q_B$	1.6	Граны	0
Q_A (Q_B -невосст.)	0.4		0
$Q_A Q_B^-$, $Q_A Q_B^{2-}$, $Q_A^- Q_B$, $Q_A^- Q_B^-$, $Q_A^- Q_B^{2-}$, Q_A^- (Q_B^- -невосст.)	0		0
ПХ	12	Граны и строма	$2 \cdot 10^6$
ПХН ₂	0		$2 \cdot 10^6$
Цит $b_6f_{\text{ок}}$	2		0
Цит $b_6f_{\text{восст}}$	0		0
Пц _{ок}	0		$2 \cdot 10^6$ (³)
Пц _{восст}	6		$2 \cdot 10^6$ (³)
P_{700}^+ (ФС1)	0	Строма	0
P_{700} (ФС1)	2		0
Ф _{Док}	10		$2 \cdot 10^6$
Ф _{Двосст}	0		$2 \cdot 10^6$
ФНР	0.4		0
ФХР	0.4		0

¹ – одна относительная единица соответствует 20 мкМ концентрации данного компонента.

² – приведена средняя концентрация вдоль мембраны.

³ – в [31] указывается значение $3 \cdot 10^6$ $\text{нм}^2/\text{с}$. Для одномерной модели коэффициент диффузии должен быть уменьшен от $\sqrt{2}$ до $\sqrt{3}$ раз, что даёт значение около $2 \cdot 10^6$ $\text{нм}^2/\text{с}$.

Таблица 2. Реакции модели и величины констант скоростей реакций

Блок	Реакция	Константа скорости реакции (константа скорости обратной реакции)	Значение в литературе (ссылки)
ФС2	$Q_A \xrightarrow{light} Q_A^-$	5000 с^{-1}	$4000 - 5500 \text{ с}^{-1}$ [4]
	$Q_A^- Q_B \leftrightarrow Q_A Q_B^-$	2500 с^{-1} (150 с^{-1})	$2500 - 5000 \text{ с}^{-1}$ ($125 - 250 \text{ с}^{-1}$) [4]
	$Q_A^- Q_B^- \leftrightarrow Q_A Q_B^{2-}$	1250 с^{-1} (35 с^{-1})	$1250 - 3330 \text{ с}^{-1}$ ($25 - 67 \text{ с}^{-1}$) [4]
	$Q_A Q_B^{2-} + ПХ \xrightarrow{2H^+} Q_A Q_B + ПХН_2$	$100 \text{ отн.ед.}^{-1} \text{ с}^{-1}$	800 с^{-1} [9] (¹)
	$Q_A^- Q_B^- + ПХ \xrightarrow{2H^+} Q_A^- Q_B + ПХН_2$	$100 \text{ отн.ед.}^{-1} \text{ с}^{-1}$	800 с^{-1} [9] (¹)
Цит b ₆ f	$\frac{1}{2} ПХН_2 + Цит_{ок} \rightarrow \frac{1}{2} ПХ + Цит_{восст}^{(2)}$	$7.5 \text{ отн.ед.}^{-1} \text{ с}^{-1}$ (³)	$10 - 17 \text{ с}^{-1}$ (⁴) [4]
	$Цит_{восст} + Пу_{ок} \rightarrow Цит_{ок} + Пу_{восст}$	$1000 \text{ отн.ед.}^{-1} \text{ с}^{-1}$ (⁵)	$4 \cdot 20 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [32]
ФС1	$Пу_{восст} + P_{700}^+ \rightarrow Пу_{ок} + P_{700}$	$1000 \text{ отн.ед.}^{-1} \text{ с}^{-1}$	$3 \cdot 5 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [32]
	$P_{700} + \Phi\delta_{ок} \xrightarrow{light} P_{700}^+ + \Phi\delta_{восст}$	$100 \text{ отн.ед.}^{-1} \text{ с}^{-1}$ (⁶)	$1.5 \cdot 2 \cdot 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ [33]
ФНР	$\Phi\delta_{восст} \xrightarrow{\text{ФНР, НАДФ}^+, H^+} \Phi\delta_{ок}$	0 с^{-1} (⁷)	$2.3 \cdot 3.1 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ (⁶) [34]
ФХР	$2\Phi\delta_{восст} + ПХ \xrightarrow{\text{ФХР, } 2H^+} 2\Phi\delta_{ок} + ПХН_2$	$0 \text{ отн.ед.}^{-1} \text{ с}^{-1}$	нет данных

¹ – для перевода указанной константы в единицы измерения, принятые в настоящей модели, надо разделить константу на концентрацию ПХ.

² – взаимодействие ПХН₂ и цит b₆f рассматривается как две последовательные реакции переноса электрона. ФХР

³ – для переноса двух электронов - $15 \text{ отн. ед.}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

⁴ – в указанной работе константа рассматривается как скорость реокисления пластохинона. Для перевода в единицы измерения, принятые в настоящей модели, надо разделить эту константу на концентрацию цит b₆f.

⁵ – 1 относительная единица соответствует 20 мкМ.

⁶ – константа реакции лимитирована скоростью генерации возбужденных состояний в ФС1.

⁷ – реакция активируется спустя несколько секунд после освещения адаптированных к темноте образцов.

2.7. Пространственная гетерогенность системы

В данной работе мы исследовали влияние пространственной гетерогенности тилакоидных мембран на фотосинтетический электронный транспорт. Известно, что тилакоидные мембраны высших растений и зеленых водорослей гетерогенны по своей структуре и представлены гранальной и стромальной частью [18]. При этом наблюдается асимметрия в расположении белковых комплексов в фотосинтетической мембране, которая условно выражена вдоль латерального направления от стромальной к гранальной области [18]. Так, комплексы ФС 2 расположены, главным образом, в области гран, в то время как ФС1 – в ламеллах. В соответствии с методом моделирования пространственно-неоднородных систем, предложенным Е.А. Грачёвым, М.Е. Грачёвой и Д.В. Мельниковым, в нашей модели тилакоидная мембрана изображена как одномерный отрезок, левая половина которого соответствует гранальной части мембраны, а правая – стромальной (рис. 3). Распределение звеньев ЭТЦ вдоль отрезка приведено в Таблице 2. Фотосистемы 2 равномерно распределены вдоль левой половины отрезка, а в правой половине отсутствуют. Комплексы ФС1, а также молекулы ФНР и ФХР, наоборот, равномерно распределены вдоль правой

половины и отсутствуют в левой. Цит b_6f равномерно распределен по всей длине отрезка. В нашем приближении допускается, что подвижные переносчики электронов, такие как пластохинон и пластоцианин также равномерно распределены по всей длине отрезка в начальный момент времени и могут свободно диффундировать вдоль него. Ферредоксин свободно диффундирует вдоль стромальной части отрезка. Длина отрезка соответствует среднему диаметру межгранного тилакоида в хлоропластах высших растений, которая составляет приблизительно 500 нм [18].

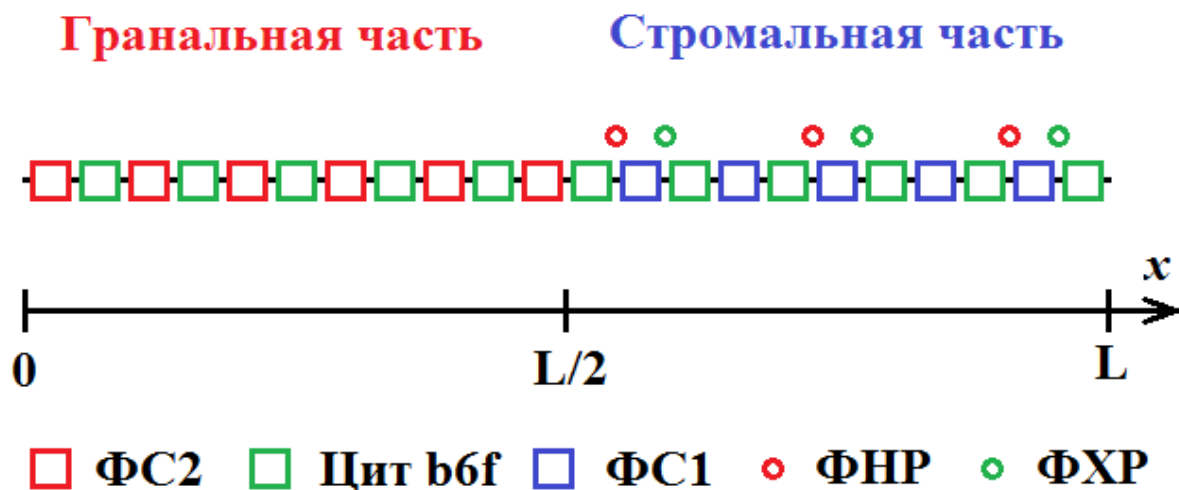


Рис. 3. Схематическое представление пространственно-распределенной модели тилакоида в хлоропласте. Описание см. в тексте.

2.8. Подвижные переносчики

В модели предполагается, что движение пластохинонов во внутримембранном пространстве, пластоцианинов в люмене и ферредоксинов в строме может быть описано с помощью уравнения диффузии.

Уравнения, описывающие изменения концентрации восстановленного ПХ вдоль отрезка, изображающего тилакоид, включают в себя уравнение в частных производных, описывающее диффузию пластохинола вдоль отрезка, с функцией источника, описывающей восстановление ПХ фотосистемой 2 и окисление ПХ цитохромным комплексом, а также граничные условия второго рода, определяющие отсутствие потока ПХ через границы моделируемой системы:

$$\left\{ \begin{array}{l} \frac{\partial [ПХH_2]}{\partial t}(x,t) = D_{ПХ} \frac{\partial^2 [ПХH_2]}{\partial x^2}(x,t) + k_{Qb-ПХ} ([Q_A Q_B^{2-}](x,t) + [Q_A^- Q_B^{2-}](x,t)) [ПХ](x,t) \\ \quad - k_{Цит-ПХ} [Цит_{ок}](x,t) [ПХH_2](x,t), \quad 0 < x < L, \\ \frac{\partial [ПХH_2]}{\partial x}(0,t) = 0, \\ \frac{\partial [ПХH_2]}{\partial x}(L,t) = 0, \end{array} \right. \quad (4)$$

где $D_{ПХ}$ – коэффициент диффузии пластохинона во внутримембранном пространстве, $L=500$ нм соответствует длине тилакоида. Концентрация окисленного ПХ находится из

предположения, что общая концентрация пластохинона в любой точке отрезка не изменяется со временем, оставаясь равной $[ПХ]_0$:

$$[ПХ](x, t) = [ПХ]_0 - [ПХН_2](x, t), \quad 0 \leq x \leq L. \quad (5)$$

Похожая система уравнений описывает изменение редокс-состояния Пц вдоль отрезка. Функция источника в уравнении диффузии восстановленных Пц описывает процессы восстановления Пц цит b_6f и окисление Пц фотосистемой 1 (P_{700}^+):

$$\begin{cases} \frac{\partial [Пц_{восст}]}{\partial t}(x, t) = D_{Пц} \frac{\partial^2 [Пц_{восст}]}{\partial x^2}(x, t) + k_{Цит-Пц} [Цит_{восст}](x, t) [Пц_{ок}](x, t) - \\ - k_{P_{700}-Пц} [P_{700}^+](x, t) [Пц_{восст}](x, t), \quad 0 < x < L, \\ \frac{\partial [Пц_{восст}]}{\partial x}(0, t) = 0, \\ \frac{\partial [Пц_{восст}]}{\partial x}(L, t) = 0, \end{cases} \quad (6)$$

где $D_{Пц}$ – коэффициент диффузии пластоцианина в люмене. Концентрация окисленных Пц находится из уравнения

$$[Пц_{ок}](x, t) = [Пц]_0 - [Пц_{восст}](x, t), \quad 0 \leq x \leq L, \quad (7)$$

где $[Пц]_0$ – концентрация начальных значений $[Пц_{ок}]$ и $[Пц_{восст}]$ в точке x .

Уравнение диффузии Фд задано для правой половины отрезка, изображающего тилакоид, соответствующего стромальной части. Функция источника в уравнении диффузии Фд описывает восстановление Фд фотосистемой 1.

$$\begin{cases} \frac{\partial [Фд_{восст}]}{\partial t}(x, t) = D_{Фд} \frac{\partial^2 [Фд_{восст}]}{\partial x^2}(x, t) + k_{P_{700}-Фд} [P_{700}](x, t) [Фд_{ок}](x, t), \quad L/2 < x < L, \\ \frac{\partial [Фд_{восст}]}{\partial x}(L/2, t) = 0, \\ \frac{\partial [Фд_{восст}]}{\partial x}(L, t) = 0, \end{cases} \quad (8)$$

где $D_{Фд}$ – коэффициент диффузии ферредоксина в строме. Общая концентрация $Фд$ в каждой точке пространства также считается постоянной и равной $[Фд]_0$, поэтому

$$[Фд_{ок}](x, t) = [Фд]_0 - [Фд_{восст}](x, t), \quad L/2 < x < L. \quad (9)$$

2.8. Реализация модели

Численное решение уравнений переноса (4),(6),(8) проводили с помощью явной трехточечной разностной схемы с шагом по координате $dx=5$ нм и шагом по времени $dt=10$ мкс. Кинетические уравнения (1)–(3) решали с помощью метода Эйлера с тем же шагом по времени. Для численного решения системы уравнений (1)–(9) была написана программа в среде Lazarus IDE v0.9.30.2.

2.9. Сравнение с экспериментальными данными

С помощью модели описывали кинетические кривые световой индукции флуоресценции хлорофилла a , а также кривые изменения поглощения света на длине волны 820 нм (сигнал $\Delta 820$).

Изменения выхода ФХ отражают, главным образом, изменения редокс состояния акцепторов электронов Q_A и ПХ, с которыми связаны процессы фотохимического и

нефотохимического тушения флуоресценции, соответственно [9]. Для описания зависимости между выходом флуоресценции и редокс состояниями данных переносчиков электронов использовали формулу, предложенную ранее в работе [9]:

$$F(t) = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_q [P_X](t) + k_p [Q_A](t)},$$

в которой k_f , k_d , k_q и k_p – константы скоростей дезактивации энергии возбуждения путем излучения (флуоресценции), тепловых потерь в антенне, тепловой диссипации из-за взаимодействия антенных комплексов ФС2 с окисленной формой ПХ, а также в результате фотохимической реакции соответственно. Значения для констант k_f и k_d ($k_f = 3 \cdot 10^7 \text{ с}^{-1}$ и $k_d = 10^8 \text{ с}^{-1}$) были взяты из работ [35,36]. Константу $k_p = 2.5 \cdot 10^6 \text{ отн.ед}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ определили, исходя из того, что максимальный выход ФХ, который наблюдается, когда все центры ФС2 находятся в закрытом состоянии (с восстановленным Q_A), превышает минимальный выход ФХ, соответствующий состоянию с полностью открытыми центрами ФС2, в 5 раз [3].

Константу $k_q = 2 \cdot 10^4 \text{ отн. ед.}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ рассчитали, принимая во внимание тот факт, что величина F_M в условиях, когда ПХ пул полностью восстановлен, возрастает на 25% по сравнению с полностью окисленным состоянием ПХ [5]. $[P_X]$ и $[Q_A]$ – концентрации окисленных состояний соответствующих переносчиков электронов.

Интенсивность сигнала $\Delta 820$ в фотосинтетическом образце отражает, главным образом, редокс состояние P_{700} и Пц в фотосинтетическом образце. В модели предполагается, что вклад Пц в сигнал составляет примерно 25% [25], поэтому относительная интенсивность $I(t)$ сигнала $\Delta 820$ определяется по формуле

$$I(t) = \frac{3}{4} \cdot \frac{[P_{700}](t)}{[P_{700}](t) + [P_{700}^+](t)} + \frac{1}{4} \cdot \frac{[Pu_{восст}](t)}{[Pu_{ок}](t) + [Pu_{восст}](t)}.$$

3. Методы и материалы

Проростки фасоли (*Phaseolus vulgaris* L. cv *Saxa*) выращивали методом гидропоники на жидкой среде [37] как описано в [38]. Для измерений использовали листья 7-дневных растений. Индукционные кривые ОЛР и светоиндуцированные изменения редокс состояния первичного донора электронов P_{700} в ФС1 измеряли с помощью прибора М-РЕА2 (Multi-Functional Plant Efficiency Analyzer, Hansatech-Instruments, England). В приборе редокс состояние P_{700} оценивается по изменению сигнала поглощения модулированного света на длине волны 820 и 870 нм (сигнал $\Delta 820$). Плотность потока фотонов фотосинтетически активного актиничного света составляла $3000 \text{ мкЕ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Перед измерениями листья адаптировали к темноте в течение 5 мин.

4. Результаты и обсуждение

На рис. 3 (А, Б) приведены данные по ИКФ и изменениям амплитуды сигнала $\Delta 820$, полученные на листе фасоли с использованием прибора М-РЕА. Как видно из рисунка, минимум сигнала $\Delta 820$, соответствующий максимально окисленному состоянию P_{700} и Пц, приходился на фазу II, а последующий рост соответствовал фазе IP, что согласуется с имеющимися в литературе данными [17]. Теоретическую кривую ОЛР рассчитывали на основе представленной в данной работе модели электронного транспорта с учетом пространственной гетерогенности тилакоидной мембраны (рис. 3В). Симуляция ИКФ обнаружила хорошее соответствие с экспериментальной кривой на всех стадиях роста выхода ФХ. Так, в обоих случаях выход на первый промежуточный уровень J происходит через 3 мс после начала освещения, а амплитуда

ОJ составляет примерно 45% от амплитуды ОР. Второй промежуточный уровень I наблюдается на временах около 40 мс и составляет по амплитуде 85% от величины ОР. Наконец, в эксперименте и модели выход флуоресценции достигает максимального уровня Р примерно после 200 мс освещения. Степень соответствия между теоретической и экспериментальной кривой отражена на вставке к рисунку. Как упомянуто выше, изменения величины $\Delta 820$ в фотосинтетическом образце отражают, главным образом, редокс переходы P_{700} и Пц в фотосинтетическом образце, причем вклад Пц в сигнал составляет примерно 25%. На рис.3Г приведена теоретическая кривая изменений $\Delta 820$, рассчитанная на основе кинетических кривых редокс переходов P_{700} и Пц, усредненных в соотношении 0.75 к 0.25. Кривая также обнаружила хорошее соответствие с экспериментальными данными. Амплитуда сигнала в обоих случаях снижается с началом освещения, достигая минимума за время около 20 мс, а затем возрастает, выходя на плато при 100 мс. Таким образом, приведенные на рис. 3 В и Г симуляции ОJР и $\Delta 820$ кривых хорошо коррелируют с экспериментальными данными, свидетельствуя в пользу представленной модели. Ниже приводятся расчетные данные по редокс состояниям отдельных компонент фотосинтетической ЭТЦ и анализируется их связь с отдельными участками ИКФ.

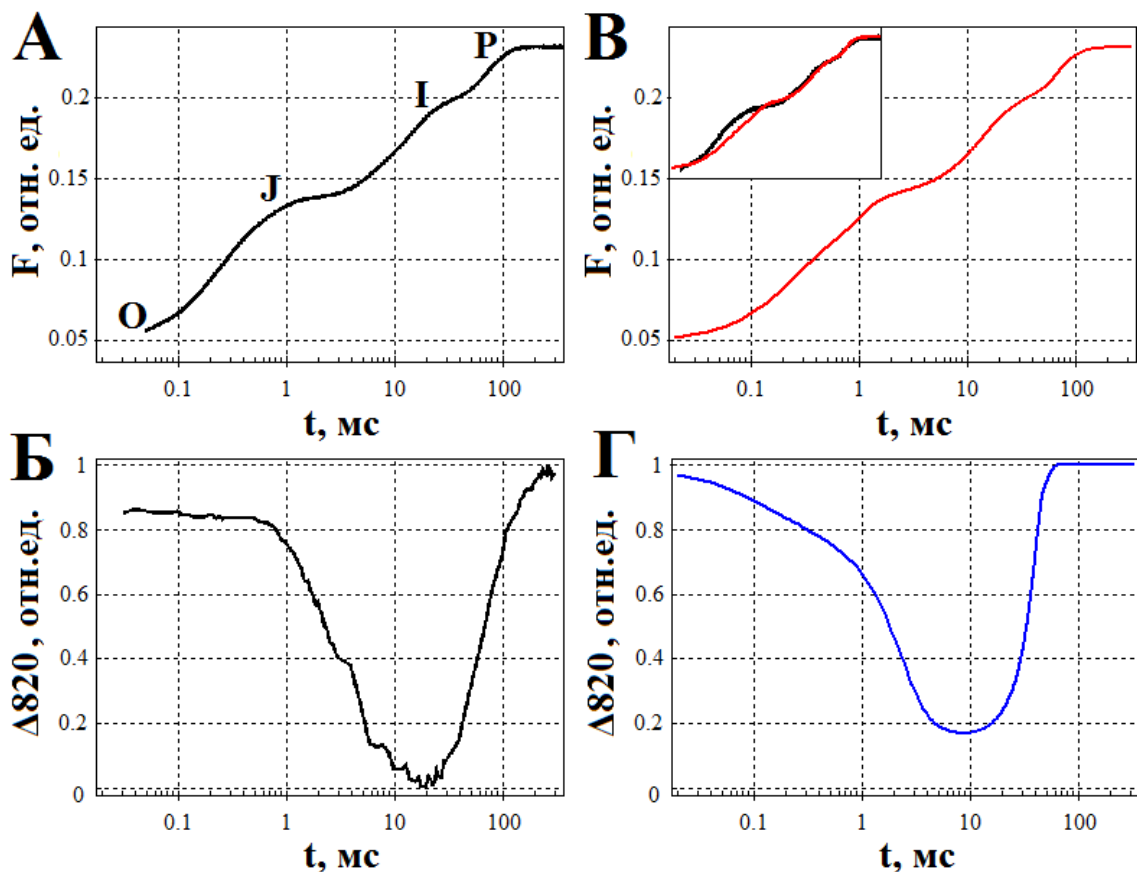


Рис. 3. Зависимости интенсивности ФХ (А, В) и амплитуды сигнала $\Delta 820$ (Б, Г) от времени освещения. (А, Б) – экспериментальные данные, (В, Г) – кривые, рассчитанные на основе предложенной модели. Интенсивность света составляла $3000 \text{ мкЕ м}^{-2} \text{ с}^{-1}$. На вставке к рисунку В показано соответствие между экспериментальной и теоретической ИКФ.

Динамические изменения различных состояний акцепторной стороны ФС2 приведены на рис. 4А. В адаптированном к темноте состоянии Q_A и Q_B находятся в полностью окисленном состоянии. Под действием света высокой интенсивности большая часть ФС2 переходит в состояние $Q_A^- Q_B$, максимальное содержание которого

приходится на время 0.3 мс после начала освещения. В это же время Q_B^- не восстанавливающие ФС2 переходят в состояние с восстановленным Q_A , которое сохраняется при дальнейшем освещении. Последующее снижение количества фотосистем в состоянии $Q_A^-Q_B$ обусловлено переносом электрона с Q_A на Q_B , то есть накоплением состояния $Q_AQ_B^-$ с максимальной концентрацией при 0.5 мс после начала освещения. Однако вклад данного состояния незначителен, поскольку Q_A быстро восстанавливается на свету, приводя к образованию $Q_A^-Q_B^-$ состояния, максимальное содержание которого достигается примерно через 1 мс после начала освещения. Вследствие переноса второго электрона с Q_A на Q_B^- наблюдается также незначительное увеличение содержания центров в состоянии $Q_AQ_B^{2-}$ и значительное - в состоянии $Q_A^-Q_B^{2-}$. Примерно через 3 мс после начала освещения происходит замедление роста содержания $Q_A^-Q_B^{2-}$ состояния из-за начала обмена полностью восстановленного Q_B на окисленный пластохинон из пула. При этом система переходит в квазиравновесное состояние, при котором в течение нескольких миллисекунд поддерживается определенное соотношение между различными редокс состояниями на акцепторной стороне ФС2. Это приводит к замедлению роста ФХ и появлению промежуточного уровня насыщения J на ИКФ.

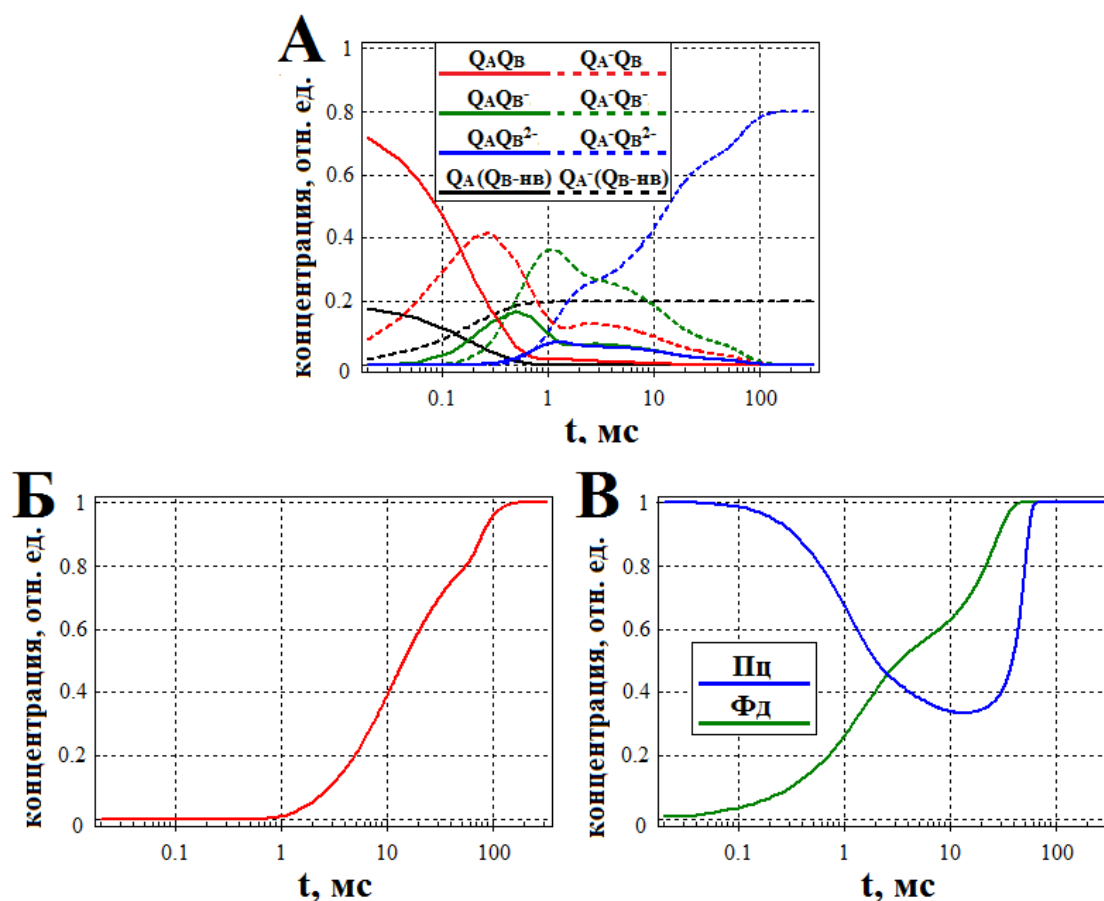


Рис. 4. Зависимость относительной концентрации различных редокс состояний ФС2 (А), ПХ (Б), Пц и Фд (В) от времени освещения. Обозначение « Q_B^- нв» соответствует нефункциональным (Q_B^- невосстанавливающим) центрам ФС2.

Дальнейший рост содержания ФС2 в состоянии $Q_A^-Q_B^{2-}$ отражает постепенное восстановление ПХ пула, поскольку акцепторная сторона ФС2 находится в равновесии с последним. Действительно, восстановление ПХ пула носит двухфазный характер (рис. 4Б). Предполагается, что в темноте и на свету в течение начальной стадии ОJ

пластохиноны находятся преимущественно в окисленном состоянии. Согласно нашей модели, степень восстановленности ПХ пула возрастает во время последующей стадии II в результате донирования электронов с ФС2. Процесс восстановления пластохинонов продолжается до тех пор, пока скорость поступления электронов в пул не сравняется со скоростью их оттока к цит b_6f . В этот момент редокс состояние пластохинонов и акцепторной стороны ФС2 достигает квазиравновесного состояния, которое сопровождается выходом ИКФ на второй промежуточный уровень насыщения I.

Описанное квазиравновесное состояние I нарушается, когда скорость ре-окисления ПХ пула снижается из-за постепенного восстановления переносчиков электронов на участке между цит b_6f и Фд. Как упоминалось выше, этот процесс связан с неактивным состоянием ФНР в адаптированных к темноте образцах, предполагаемым в нашей модели. Восстановление фотосинтетической ЭТЦ начинается с перехода Фд пула в восстановленное состояние, которое носит двухфазный характер (рис. 4В). Быстрый этап связан с донированием электронов с переносчиков ФС1 на начальной стадии освещения, в то время как второй – с поступлением электронов от ФС2 к ФС1. Полное восстановление Фд пула приводит к последовательному восстановлению предшествующих переносчиков электронов, таких как ФС1 (P_{700}) и пластоцианины (рис. 4В), приводя к блокировке реакции ре-окисления пластохинонов и их практически полному восстановлению примерно через 200 мс после начала освещения (Рис. 4В). Поскольку акцепторная сторона ФС2 находится в редокс равновесии с ПХ пулом, она также полностью переходит в восстановленное состояние $Q_A^-Q_B^{2-}$. На этом этапе ни Q_A , ни ПХ не могут тушить флуоресценцию, и ее выход достигает максимального уровня Р.

Эти выводы согласуются с результатами симуляции ИКФ, измеренных в присутствии ингибитора электронного транспорта ДБТХ и акцептора электронов метилвиологена. Известно, что ДБТХ ингибирует ре-окисление пластохинола (PQH_2), связываясь с Q_O -сайтом цитохромного комплекса b_6f [39]. В его присутствии трехфазная кинетическая кривая ОЛР преобразуется в двухфазную ОЛ кривую, при этом максимальный выход ФХ (Р) достигается на более ранних временах, соответствующих точке I (20–30 мс) [13]. Наиболее вероятная интерпретация данного эффекта предполагает, что ингибирование ре-окисления ПХ пула приводит к тому, что пластохиноны восстанавливаются полностью в течение фазы II, индуцируя переход всех центров ФС2 в закрытое состояние. На Рис. 5 (А) приведены симуляции ИКФ, рассчитанные с учетом электронного транспорта через цит b_6f (контроль) и при инактивированном состоянии цит b_6f , имитирующем действие ДБТХ. Как видно из рисунка, ингибирование ре-окисления ПХ пула приводит к подавлению стадии IP и росту амплитуды фазы II до максимального уровня Р, что хорошо согласуется с экспериментальными данными. Данный эффект на ИКФ связан с тем, что ПХ пул полностью восстанавливается уже во время стадии II (Рис. 5Б). Данные результаты указывают на важную роль редокс состояния пластохинонов в формировании стадии II на ИКФ.

Как известно, метилвиологен является эффективным окислителем железо-серных кластеров в ФС1 и Фд, восстанавливая, в свою очередь, молекулярный кислород до супероксид аниона и генерируя таким образом пероксид водорода [40]. Ранее было показано, что добавление этого редокс агента к фотосинтетическим образцам приводит к снижению амплитуды самой медленной фазы IP на ИКФ, свидетельствуя о важной роли редокс состояния переносчиков ФС1 и Фд в формировании этой фазы [13, 41]. На рис. 5 (В) представлены теоретические ИКФ, рассчитанные для стандартных условий и с учетом имитации действия метилвиологена. Присутствие метилвиологена моделировалось посредством введения дополнительной реакции ре-окисления ФС1, которую характеризовали константой скорости $10 \text{ отн.ед.}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$. На рисунке видно, что искусственное ре-окисление переносчиков электронов в ФС1 приводит к подавлению

стадии IP и, таким образом, к снижению максимального выхода флуоресценции с уровня P до уровня I, что хорошо согласуется с экспериментальными данными по действию метилвиологена. Полученный результат обусловлен тем фактом, что полное восстановление ПХ пула становится невозможным при окисленном состоянии последующих переносчиков электронов (рис. 5Г), включая Пц, ФС1 и Фд, что указывает значительную роль последних в формировании стадии IP. Необходимо отметить, что имитация активности ФНР и, соответственно, линейного транспорта электронов в модели приводит к такому же эффекту на теоретическую ОЛР кривую, который наблюдается при действии метилвиологена, то есть к снижению амплитуды IP фазы (данные не приведены). Этот результат соответствует экспериментальным данным, полученным на образцах, которые были недостаточно долго адаптированы к темноте и в которых ФНР сохраняет активность [15].

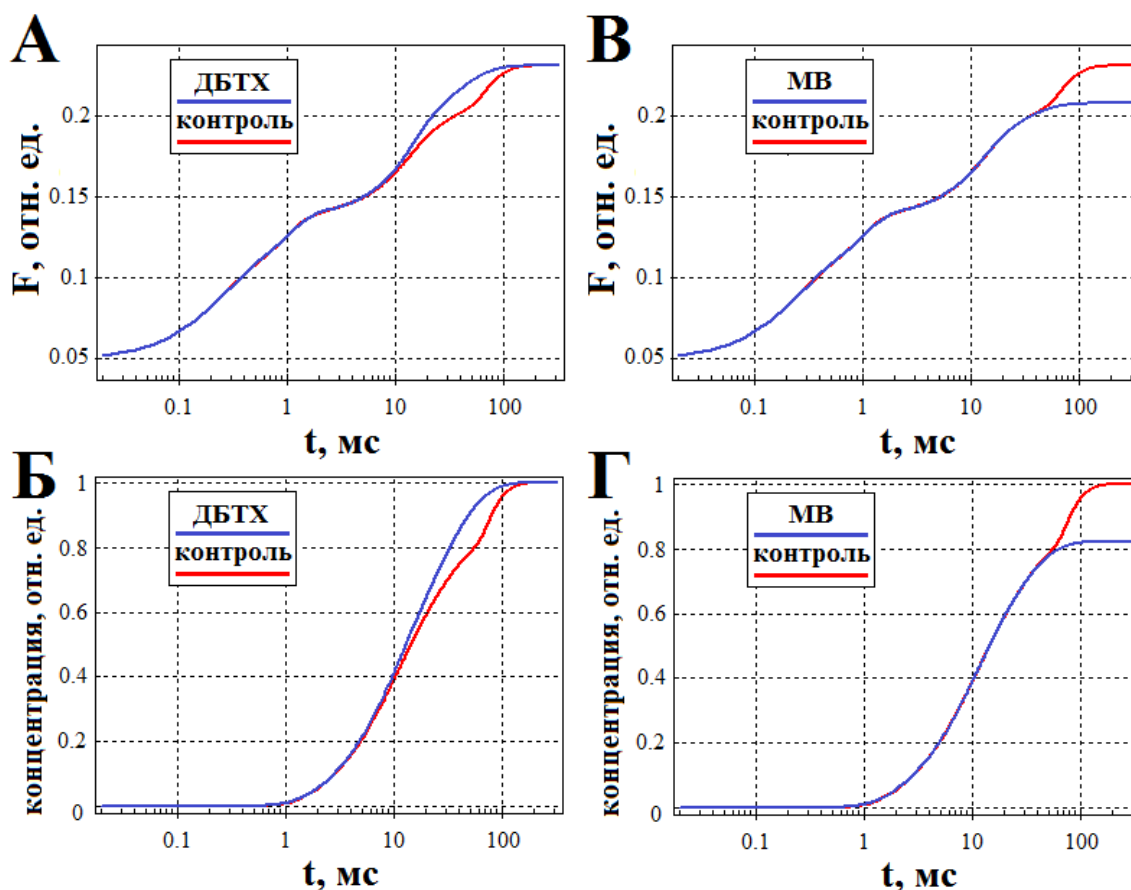


Рис. 5. Теоретические кривые ИКФ, симулирующие действие ДБТХ (А) и метилвиологена (В), а также изменения редокс состояния пластохинонов в присутствии ДБТХ (Б) и метилвиологена (Г).

Как упоминалось выше, ФНР находится в инактивированном состоянии в адаптированных к темноте фотосинтетических образцах и, поэтому, транспорт электронов с Фд на НАДФ⁺ отсутствует в течение нескольких секунд освещения. В этих условиях активируются альтернативные пути транспорта электронов в хлоропласте, в первую очередь циклический транспорт вокруг ФС1, катализируемый ФХР [25]. Цикл приводит к ре-окислению ФС1, снижая вероятность образования реактивных форм кислорода в результате взаимодействия молекулярного кислорода с восстановленной акцепторной стороной ФС1. В нашей модели мы не учитывали циклический транспорт электронов по умолчанию, однако исследовали его возможное влияние на ИКФ. На рис. 6 представлены ОЛР кривые, рассчитанные без учета и с учетом активности ФХР. При активном состоянии данного фермента происходит

изменение соотношения между амплитудами и временем выхода на насыщение фаз Л и Р в пользу первой. Этот результат объясняется тем, что активация ФХР влияет на кинетику восстановления ПХ пула на стадии Л. Так, восстановление ПХ пула при активном цикле оказывается связанным не только с поступлением электронов с ФС2, но и с их транспортом от Фд, что изменяет окислительно-восстановительный баланс. Полученные результаты свидетельствуют о том, что активация циклического транспорта электронов может оказывать влияние, главным образом, на стадию Л ИКФ.

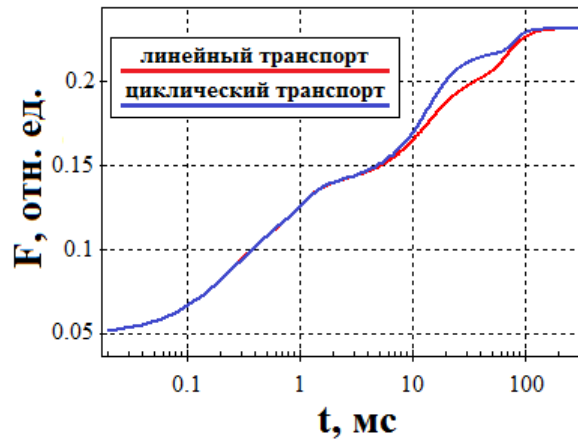


Рис. 6. Симуляция ИКФ в условиях активного циклического транспорта электронов вокруг ФС1.

Известно, что у высших растений и зеленых водорослей комплексы ФС2 и 1 расположены преимущественно в разных компартментах фотосинтетических мембран, что обусловлено спецификой регуляции распределения энергии между фотосистемами [42]. Перенос электронов между фотосистемами обусловлен пластохинонами и пластоцианинами – небольшими подвижными переносчиками электронов внутри мембран и со стороны люмена, соответственно. Очевидно, что динамика электронного транспорта должна зависеть от мобильности данных переносчиков, то есть от скорости их диффузии вдоль тилакоида. Кроме того, диффузия Фд со стороны стромы может влиять на процесс ре-окисления ФС1. В данной работе мы исследовали влияние диффузии фотосинтетических переносчиков электронов на свойства ИКФ. На рис. 7 приведены теоретические кривые ОЛР, рассчитанные при разных возможных коэффициентах диффузии ПХ, Пц и Фд. В нашей работе по умолчанию использовали коэффициент диффузии $2 \cdot 10^6 \text{ нм}^2 \cdot \text{с}^{-1}$ [31] (обозначен как D_0 на рисунке). Как видно из рисунка, одновременное снижение коэффициента диффузии для всех переносчиков в три раза приводит к росту амплитуды фазы Л, что отражает большую восстановленность ПХ пула в точке I в результате изменения равновесия между процессами притока электронов от ФС2 и их оттока на цит b_6f . Более того, на кривой наблюдается значительное снижение скорости роста ФХ во время фазы Р, которое отражает медленное восстановление фотосинтетической ЭТЦ в условиях низкой скорости диффузии. Увеличение коэффициента диффузии в три раза приводит к снижению наклона фазы Л из-за роста скорости ре-окисления пластохинонов цит b_6f . В случае, когда перенос электронов не лимитируется диффузионными процессами (коэффициент диффузии стремится к бесконечности) модель соответствует системе, сосредоточенной в одной точке, то есть модели химической кинетики. В этих условиях наклон фазы Л ещё больше снижается, а стадия Р наоборот происходит значительно быстрее, чем в модели с учетом диффузии, и выходит на максимальный уровень Р при временах около 100 мс. Полученные результаты свидетельствуют о том, что процессы диффузии мобильных переносчиков электронов в тилакоидной мембране могут играть существенную роль в

восстановлении фотосинтетической ЭТЦ, замедляя реакции переноса электронов на отдельных участках.

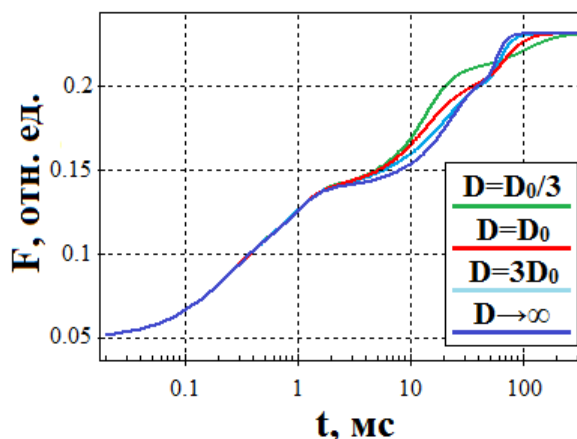


Рис. 7. Теоретические ИКФ, рассчитанные при различных значениях коэффициента диффузии D подвижных переносчиков электронов. Величина D₀ (D₀=2·10⁶ нм²/с) соответствует значению, использованному в модели.

5. Заключение

В данной работе предложена модель электрон-транспортной цепи в тилакоидной мембране, учитывающая пространственную гетерогенность мембраны. С помощью модели посчитаны теоретические кривые зависимости выхода флуоресценции хлорофилла и сигнала $\Delta 820$ от времени освещения адаптированных к темноте образцов. Результаты моделирования хорошо согласуются с имеющимися экспериментальными данными по действию ДБТХ и метилвиологена на ИКФ. Исследование редокс переходов на отдельных участках фотосинтетической ЭТЦ показало, что стадии роста OJ, JI и IP отражают, главным образом, последовательное восстановление акцепторной стороны ФС2, ПХ пула и ФС1, соответственно. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости учета всех основных фотосинтетических реакций в тилакоидной мембране, включая циклический транспорт электронов вокруг ФС1, а также диффузионных процессов при моделировании OJIP кривой.

Авторы выражают благодарность сотрудникам кафедры биофизики биологического факультета им. М.В. Ломоносова: Г.Ю. Ризниченко, Т.Е. Кренделевой, Т.Ю. Плюсниковой, И.Б. Коваленко и А.Б. Рубину за полезные замечания по поводу настоящей работы. Исследования были финансированы фондом РФФИ (10-04-00864-а) (Т.К.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рубин А.Б. *Биофизика*. Том 2. М.: Высшая школа, 2000. 461 с.
2. Govindje E. Sixty-three years since Kautsky: Chlorophyll a Fluorescence. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1995. V. 22. P. 131–160.
3. Strasser R.J., Srivastava A., Govindjee. Polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology*. 1995. V. 61. P. 32–42.
4. Lazar D. Chlorophyll a fluorescence rise induced by high light illumination of dark-adapted plant tissue studied by means of a model of photosystem II and considering photosystem II heterogeneity. *Journal of Theoretical Biology*. 2003. V. 220. P. 469–503.

5. Vernotte C., Etienne A.L., Briantais J.M. Quenching of the system II chlorophyll fluorescence by the plastoquinone pool. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1979. V. 545. P. 519–527.
6. Stirbet A., Govindjee, Strasser B.J., Strasser R. Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: modelling and numerical simulation. *Journal of Theoretical Biology*. 1998. V. 193. P. 131–151.
7. Riznichenko G.Yu., Lebedeva G.V., Demin O.V., Rubin A.B. Kinetic mechanisms of biological regulation in photosynthetic organisms. *Journal of Biological Physics*. 1999. V. 25. P. 177–192.
8. Lebedeva G.V., Belyaeva N.E., Demin O.V., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Kinetic model of primary photosynthetic processes in chloroplasts description of the fast phase of chlorophyll fluorescence induction under different light intensities. *Biophysics*. 2002. V. 47. P. 968–980.
9. Zhu X.-G., Govindjee, Baker N.R., DeSturler E., Ort D.R., Long S.P. Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II. *Planta*. 2005. V. 223. P. 114–133.
10. Jablonsky J., Lazar D. Evidence for intermediate S-States as initial phase in the process of oxygen-evolving complex oxidation. *Biophysical Journal*. 2008. V. 94. P. 2725–2736.
11. Riznichenko G.Yu., Belyaeva N.E., Kovalenko I.B., Rubin A.B. Mathematical and computer modeling of primary photosynthetic processes. *Biophysics*. 2009. V. 54. P. 10–22.
12. Belyaeva N.E., Schmitt B.-J., Paschenko V.Z., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B., Renger G. PS II model based analysis of transient fluorescence yield measured on whole leaves of *Arabidopsis thaliana* after excitation with light flashes of different energies. *BioSystems*. 2011. V. 103. P. 188–195.
13. Schansker G., Toth S.Z., Strasser R.J. Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl a fluorescence rise OJIP. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005. V. 1706. P. 250–261.
14. Antal T., Rubin A. In vivo analysis of chlorophyll a fluorescence induction. *Photosynthesis Research*. 2008. V. 96. № 3. P. 217–226.
15. Schansker G., Tóth S.Z., Strasser R.J. Dark recovery of the Chl a fluorescence transient (OJIP) after light adaptation: The qT-component of non-photochemical quenching is related to an activated photosystem I acceptor side. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006. V. 1757. P. 787–797.
16. Talts E., Oja V., Rämme H., Rasulov B., Anijalg A., Laisk A. Dark inactivation of ferredoxin-NADP reductase and cyclic electron flow under far-red light in sunflower leaves. *Photosynthesis Research*. 2007. V. 94. P. 109–120.
17. Schansker G., Srivastava A., Govindjee, Strasser R.J. Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll a fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. *Functional Plant Biology*. 2003. V. 30. P. 785–796.
18. Staehelin L.A. Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes. *Photosynthesis Research*. 2003. V. 76. P. 185–196.
19. Albertsson P.A. A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane. *TRIENDS in Plant Science*. 2001. V. 6. № 8. P. 349–355.
20. Вершубский А.В., Приклонский В.И., Тихонов А.Н. Математическая модель электронного и протонного транспорта в фотосинтетических системах оксигенного типа. *Российский химический журнал*. 2007 Т. LI. С. 59–69.

21. Vershubskii A.V., Kuvykin I.V., Priklonskii V.I., Tikhonov A.N. Functional and topological aspects of pH-dependent regulation of electron and proton transport in chloroplasts in silico. *BioSystems*. 2011. V. 103. P. 164–179.
22. Shahak Y. Activation and deactivation of H⁺-ATPase in intact chloroplasts. *Plant Physiology*. 1982. V. 70. P. 87–91.
23. Тихонов А.Н. Регуляция световых и темновых стадий фотосинтеза. *Соросовский образовательный журнал*. 1999. № 11. С. 8–15.
24. Cramer W.A., Zhang H., Yan J., Kurisu G. and Smith J.L. Trans-membrane traffic in the cytochrome b6f complex. *Annual Review of Biochem.* 2006. V. 75. P. 769–790.
25. Joliot P., Joliot A. Quantification of cyclic and linear flows in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005. V. 102. P. 4913–4918.
26. Aoki M., Katoh S. Size of the Plastoquinone Pool Functioning in Photosynthetic and Respiratory Electron Transport of *Synechococcus* sp. *Plant & Cell Physiology*. 1983. V. 24. № 8. P. 1379–1386.
27. Bohme H. Quantitative determination of ferredoxin. Ferredoxin-NADP-reductase and plastocyanin in spinach chloroplasts. *European Journal of Biochemistry*. 1978. V. 83. P. 137–141.
28. Mitchell R., Spillmann A., Haehnel W. *Plastoquinol diffusion in linear photosynthetic electron transport*. *Biophysical Journal*. 1990. V. 58. P. 1011–1024.
29. Sanderson D.G., Anderson L.B., Gross E.L. Determination of the redox potential and diffusion coefficient of the protein plastocyanin using optically transparent filar electrodes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1986. V. 852. P. 269–278.
30. Takano M., Takahashi M.-A., Asada K. Reduction of photosystem I reaction center, P-700, by plastocyanin in stroma thylakoids from spinach: lateral diffusion of plastocyanin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1982. V. 218. P. 369–375.
31. Nobel P.S. *Physicochemical and environmental plant physiology*. 2nd edition. San Diego: Academic Press, 2009. 540 p.
32. Hope A.B. Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochimica et Biophysica*. 2002. V. 1456. P. 5–26.
33. Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Computer simulation of interaction of photosystem 1 with plastocyanin and ferredoxin. *BioSystems*. 2011. V. 103. P. 180–187.
34. Kovalenko I.B., Diakonova A.M., Abaturova A.M., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Direct computer simulation of ferredoxin and FNR complex formation in solution. *Phys. Biol.* 2010. V. 7. № 2. P. 026001.
35. Trissl H.W., Lavergne J. Fluorescence induction from photosystem II - analytical equations for the yields of photochemistry and fluorescence derived from analysis of a model including exciton-radical pair equilibrium and restricted energytransfer between photosynthetic units. *Australian Journal of Plant Physiology*. 1995. V. 22. P. 183–193.
36. Lavergne J., Trissl H.W. Theory of fluorescence induction in photosystem II - derivation of analytical expressions in a model including exciton-radical-pair equilibrium and restricted energy transfer between photosynthetic units. *Biophysical Journal*. 1995. V. 68. P. 2474–2492.
37. Hoagland D.R., Arnon D.I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural Experiment Station Circular*. 1950. V. 347. P. 1–32.
38. Antal T., Mattila H., Hakala-Yatkin M., Tyystjarvi T., Tyystjarvi E. Acclimation of photosynthesis to nitrogen deficiency in *Phaseolus vulgaris*. *Planta*. 2010. V. 232. № 4. P. 887–898.

39. Rich P.R., Madwick S.A., Moss D.A. The interactions of duroquinol, DBMIB and NQNO with the chloroplast cytochrome bf complex. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991. V. 1058. P. 312.
40. Allen J.F. Induction of a Mehler reaction in chloroplast preparations by methyl viologen and by ferredoxin: effects on photosynthesis by intact chloroplasts. *Plant Science Letters*. 1978. V. 12. P. 161–167.
41. Bukhov N., Egorova E., Krendeleva T., Rubin A., Wiese C., Heber U. Relaxation of variable chlorophyll fluorescence after illumination of dark-adapted barley leaves as influenced by the redox states of electron carriers. *Photosynthesis Research*. 2001. V. 70. P. 155–166.
42. Rochaix J.-D. Reprint of: Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2011. V. 1807. P. 878–886.

Материал поступил в редакцию 27.06.2012, опубликован 31.08.2012.