

ПРИМЕНЕНИЕ МОДЕЛИ ФС2 ДЛЯ АНАЛИЗА НАРАСТАНИЯ ВЫХОДА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ПОСТОЯННЫМ СВЕТОМ

Беляева Н. Е., Булычев А. А., Ризниченко Г. Ю.

(Россия, Москва)

При расчетах в модели ФС 2 фитированы экспериментальные кривые ИФ, вызываемые в листе гороха светом интенсивности 10% и 40% от максимальной при снятии ионофорами светоиндуцированных $\Delta\Psi$ и ΔpH . Определены константы скоростей реакций переноса электрона и диссипативных потерь в антенне ФС 2. Предложена методика анализа результатов «ОЛР тестирования» фотосинтезирующих объектов.

Введение. Кривые индукции флуоресценции (ИФ) регистрируют, освещая образец мгновенно включенным светом постоянной интенсивности [1-3]. Для нативного фотосинтезирующего объекта характерны кривые ИФ, когда увеличение выхода (фаза нарастания) ФЛ проходит ОЛР стадии, (рис 1). С помощью разработанной нами обобщенной модели первичных процессов фотосинтеза (модель тилакоида) изучается роль отдельных процессов в формировании кривой ИФ: процессов в светособирающей антенне, электронного транспорта, генерации электрохимического потенциала тилакоидной мембраны [4-11].

Модель [4-6,9] включает большое число процессов и, соответственно, большое число параметров, которые подлежат идентификации. Для более точной оценки параметров представляют интерес ситуации, в которых количество имеющих место процессов и, соответственно, параметров ограничено путем создания специальных экспериментальных условий. Например, при рассмотрении процессов ФЛ после короткой лазерной вспышки

можно проводить расчеты в отдельно взятом изолированном блоке модели ФС 2, включающем процессы переноса электрона в пределах пигмент белкового комплекса ФС 2 [10,11]. Наносекундный актиничный импульс создает неравновесное состояние в комплексе переносчиков ФС 2. Последующую релаксацию к равновесному состоянию можно рассматривать как протекающую при постоянных рН стромы, люмена и электрическом потенциале ($\Delta\psi$) тилакоидной мембраны, а перенос электрона после ФС 2 описывать одной реакцией. Тем самым, мы уменьшаем размерность исследуемой системы процессов.

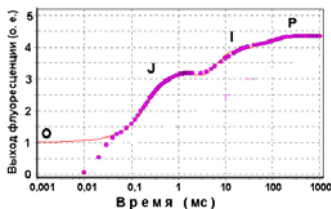


Рис.1. Фаза нарастания ИФ для нативного образца. Обозначены ОЛР стадии. Экспериментальные данные – круги, Расчет в модели ФС2 – фицирующая кривая.

В данной работе мы изучаем систему в условиях постоянного освещения, но с помощью ионофоров уменьшаем величину светоиндуцированного электро-химического потенциала – разности рН (ΔpH) и электрического потенциала ($\Delta\psi$). Для идентификации параметров разработанной нами модели ФС 2 получены данные по измерению выхода ФЛ, вызываемой постоянным светом в листе гороха, предварительно выдержанном в среде с ионофорами (валиномицин + моненсин). В этих условиях, в отличие от нативных, при описании реакций переноса электрона на донорной и акцепторной сторонах ФС 2 будем полагать величину рН постоянной, а трансмембранный $\Delta\psi$ равным нулю.

В использованной нами модели, в отличие от предыдущих [4-9], детально рассмотрены процессы диссипации энергии. Расчеты на модели ФС 2 позволили фитировать ОЛР стадии нарастания выхода ФЛ (кривой ИФ), регистрируемой при освещении по-

стоянным светом. В результате работы определены параметры, характеризующие как фотохимические процессы, индуцированные светом, так и сопряженные с ними процессы потерь поглощенной световой энергии.

Регистрация флуоресценции.

Использовали листья 14-ти дневных проростков гороха *Pisum sativum*. Перед измерениями листья гороха отрезали и выдерживали в темноте в течение 2-х часов в среде, содержащей валиномицин и моненсин, взятые в номинальной концентрации по 40 μM . Флуоресценцию Хл *a* регистрировали на РЕА флуорометре (PEA-Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, длина волны 650-нм в пике спектра, максимальная интенсивность света 3000 $\mu\text{моль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$). На лист, прошедший темновую адаптацию в среде с ионофорами, воздействовали постоянным светом длительностью 1 с при интенсивностях 10% или 40% от максимальной.

Описание модели ФС2. Схема состояний ФС2 и переходов между ними изображена на рис.2. В модели рассмотрены редокс-состояния переносчиков ФС2 (хлорофилла антенны и РЦ (P680) – Chl, феофитин – Phe, первичный хинон – Q_A , вторичный хиноновый акцептор – Q_B) и переходы между ними согласно схеме, приведенной на рис. 2 [4-6]. Детально проанализированы процессы разделения зарядов (реакции 2,9,16,29), стабилизации заряда (3,4,10,11,17,18,30,31), переноса его в пул хинолов (PQH_2) с освобождением Q_B -сайта (7,14,21-27) и заполнения пустого Q_B -сайта окисленными хинонами (PQ) (34-40). Полагали, что на каждый электрон, переданный (4,11,18,31) от водо-окисляющего комплекса (ВОК) на окисленный $P680^+$ (на схеме Chl^+), во внутритилакоидное пространство выделяется один протон.

Переход Chl в возбужденное состояние Chl^* задавали световой константой $kL=k_i$, $i=1, 5, 8, 12, 15, 19, 28, 32$ (i - номер реакции на рис. 2). Количество попаданий квантов света в РЦ в секунду $kL=1500 \text{ с}^{-1}$ соответствовало интенсивности света (600 нм) 1000 Вт/м^2 ($3000 \mu\text{моль квантов}\cdot\text{м}^{-2}\cdot\text{с}^{-1}$). Потери на излучение возбужденного Chl^* приводят к испусканию квантов ФЛ (константа

флуоресценции $k_F=k_{-i}$). Для вычисления выхода ФЛ сумму концентраций флуоресцирующих состояний ФС2 умножали на отношение константы флуоресценции k_F к световой константе kL :

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

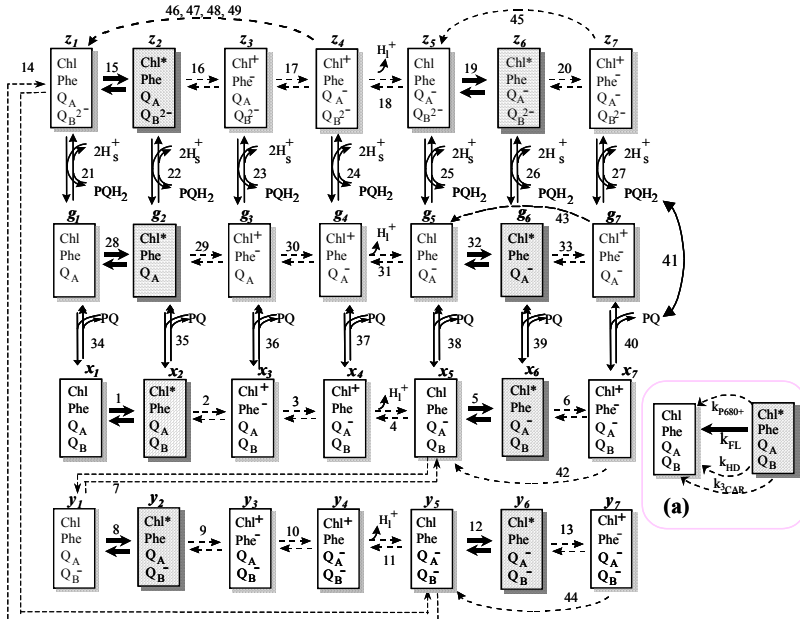


Рис. 2. Схема каталитического цикла фотосистемы 2. Прямоугольники – кинетические состояния ФС2, определяемые редокс состоянием переносчиков электрона. Затенены состояния, способные к испусканию квантов ФЛ. Chl – весь хлорофилл ФС2, включая пигменты антенны и пигмент РЦ Р680; Phe – первичный акцептор электронов феофитин; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хиноновые акцепторы. PQ – пластохинон; PQH_2 – пластохинол; H_1^+ и H_S^+ – протоны, выделяемые в люмен и поглощаемые из стромы тилакоида. Пунктирными стрелками показаны быстрые (менее 0.1 мс) стадии цикла, сплошными – медленные (не менее 1 мс), жирными – световые стадии. Цифры над стрелками – номера реакций, над прямоугольниками обозначены переменные модели ($x_i, y_i, z_i, g_i, i=1, \dots, 7$). Пунктирные дуги – реакции безизлучательной рекомбинации Phe^- с $P680^+$ (42-45), Q_A^- с $P680^+$ (46-49). Рис2.а. Пути распада возбужденных состояний: k_{P680^+} , – тушение радикалом Р680⁺, k_{Car} – перенос на триплетные состояния каротиноидов, k_D – диссипация в тепло.

При описании процесса распада Chl^* рассмотрели различные виды потерь энергии, конкурирующие с испусканием квантов ФЛ, как показано на рис. 2а. Диссипативным путем энергия теряется вследствие тушения возбужденных состояний катион радикалом P680^+ (k_{P680^+}), в ходе быстрого переноса на триплетные состояния каротиноидов (k_{Car}) и вследствие тепловой диссипации (k_{D}).

Концентрации протонов в строме и люмене ($[\text{H}_\text{S}^+]$ и $[\text{H}_\text{L}^+]$) и трансмембранный электрический потенциал $\Delta\Psi$ [5,9-11] являются параметрами модели. Повторное окисление подвижного переносчика PQH_2 описывали одной реакцией (V_{41} , рис. 2, k_{ETC}).

Два типа необратимых реакций безизлучательной рекомбинации разделенных зарядов обозначены на схеме пунктирными дугами. Заряд на Phe^- рекомбинирует с окисленным хлорофиллом закрытых РЦ. Эти реакции (42-45) включены в модель как переходы из 7-х состояний в 5-е. Q_A^- может рекомбинировать с окисленными донорами электронов: хлорофиллом РЦ (P680^+), тирозином (Y_Z^+) либо состояниями ВОК. В модели это реакции (46-49) рекомбинации Q_A^- с Chl^+ (переход 4-х форм в 1-е).

Результаты фитирования. Перед включением света распределение концентраций состояний ФС2 определяется условиями темновой адаптации, когда значения световых констант в модели равны нулю. При этом заполнены нейтральные состояния x_1 и g_1 согласно параметрам взаимодействия акцепторной части ФС2 с подвижными молекулами хинонного пула.

На рис. 3а приведены результаты измерения (овалы) выхода ФЛ, возбуждаемой в листе гороха постоянным светом, интенсивность которого относительно максимально возможной (3000 мкмоль кв/(м²·с)) составила 40% (1200 мкмоль кв/(м²·с), точки 1) и 10% (точки 2, 300 мкмоль кв/(м²·с)). Для имитации световых воздействий значения световых констант принимали $kL=600 \text{ с}^{-1}$ и $kL=150 \text{ с}^{-1}$, соответственно. В таблице 1 приведены значения констант скоростей, полученные на модели при фитировании кривых ФЛ, регистрируемых в эксперименте при освещении светом 10% и 40% интенсивности.

Отметим увеличение константы скорости ($k_{\text{ВОК}}$) восстановления P680^+ при переходе от $kL=600 \text{ с}^{-1}$ к $kL=150 \text{ с}^{-1}$. Процессы светоиндуцированного переноса электрона при уменьшении интенсивности света приводят к более позднему по времени восстановлению переносчиков ФС 2 и, следовательно, более медленному нарастанию интенсивности ФЛ по сравнению со светом более высокой интенсивности.

Таблица 1. Параметры модели ФС 2, определенные при фитировании кривых ИФ, регистрируемых для 10% и 40% интенсивности света.

$k_i \text{ (с}^{-1}\text{)}, i - \text{ номер реакции на схеме рис. 1.}$			k_D
1,8,15,28,5,12,19,32 (kL)	4,11,18,31 ($k_{\text{ВОК}}$)	41 ($k_{\text{ЭТЦ}}$)	
600	$2.5 \cdot 10^7$	4	10^5
150	$4 \cdot 10^4$	2	0

Ранее было показано [10,11], что на временах больших 100 мкс процесс донирования электрона на P680^+ замедляется, так как исходно восстановленный в образце, прошедшем темновую адаптацию, тирозин окисляется, донируя электрон на P680^+ с характерными временами десятки-сотни наносекунд. Последующее восстановление тирозина, а, следовательно, P680^+ происходит более медленно на временах от десятков микросекунд до миллисекунды, в зависимости от цикла срабатывания ВОК. Тем самым, более позднее по времени восстановление переносчиков ФС 2 будет происходить в условиях более медленного донирования электрона на P680^+ , что объясняет полученный нами результат.

Как видно из таблицы 1, при переходе от $kL=600 \text{ с}^{-1}$ к $kL=150 \text{ с}^{-1}$, получена меньшая величина константы скорости ($k_{\text{ЭТЦ}}$) повторного окисления хинолов. Это может быть связано с замедлением процессов переноса заряда в электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) после ФС 2. Уменьшение потока световых квантов, индуцирующих процессы переноса электрона, обуславливает также снижение до нулевого уровня тепловых потерь (k_D), происходящих в возбужденных молекулах Хл. В итоге, модельные кривые, рассчитанные для двух значений kL , совпадают с экспери-

ментальными данными по изменению выхода ФЛ на фазе нарастания от начального уровня (стадия О) F_0 до стадий Л, и до максимального уровня F_m (стадия Р). При большей интенсивности света на всех ОЛР стадиях увеличение выхода ФЛ происходит на более ранних временах, как в эксперименте, так и для модельных кривых.

Расчет кривой 3 (рис. 3а) проведен при $kL=1200 \text{ с}^{-1}$, что имитирует 80%-ную интенсивность света. Задавая тепловые потери в диапазоне $k_D \sim 10^7 \div 10^8 \text{ с}^{-1}$, получаем модельные кривые (для кривой 3, рис 3а, $k_D=10^7 \text{ с}^{-1}$), для которых отношение F_m / F_0 достигает 5, т. е. максимальных величин, регистрируемых в образце.

Кинетические фазы ИФ при модификации параметров.

В модели получено описание временных характеристик наблюдаемых кинетических стадий нарастания выхода ФЛ путем подбора величин параметров, описывающих реакции как на донорной, так и на акцепторной сторонах ФС 2. Исследуем, каким образом меняются амплитуда и время достижения фаз кривой ИФ при некоторых изменениях параметров модели ФС 2. Результаты показаны на рис 3. и объединены на диаграмме рис. 4. В таблице 2 приведены параметры для всех модельных кривых рис. 3. Если параметр не меняли, то его значение одинаково для группы кривых в верхней строке таблицы 2. Изменения амплитуд О-Л, Л-И, И-Р стадий модельных кривых (рис. 3) сравним с результатом фитирования при интенсивности света 40% (кривая 1, рис. 3а, в гд).

Наибольшие изменения О-Л амплитуды (кривые 4,5,6, 12,13) получены для уменьшения констант скоростей восстановления $P680^+$, переноса на Q_B , увеличения восстановленности пула хинонов и увеличения размера пула хинонов.

Модель показывает, что воздействие процессов безизлучательной рекомбинации на величину выхода ФЛ различно для реакции 42÷45 и 46÷50. Изменение скорости рекомбинации Phe^- с $P680^+$, а именно, увеличение $k_{Phe}=k_i$, ($i= 42÷45$) влияет на все кинетические стадии кривой ИФ (кривая 9, рис. 3г). Влияние рекомбинации Q_A^- с окисленными переносчиками донорной стороны (с

P680⁺) проявляется только на поздних J-I-P стадиях (кривая 8, рис. 3г, уменьшение $k_{QA}=k_i$, $i=46\div 50$).

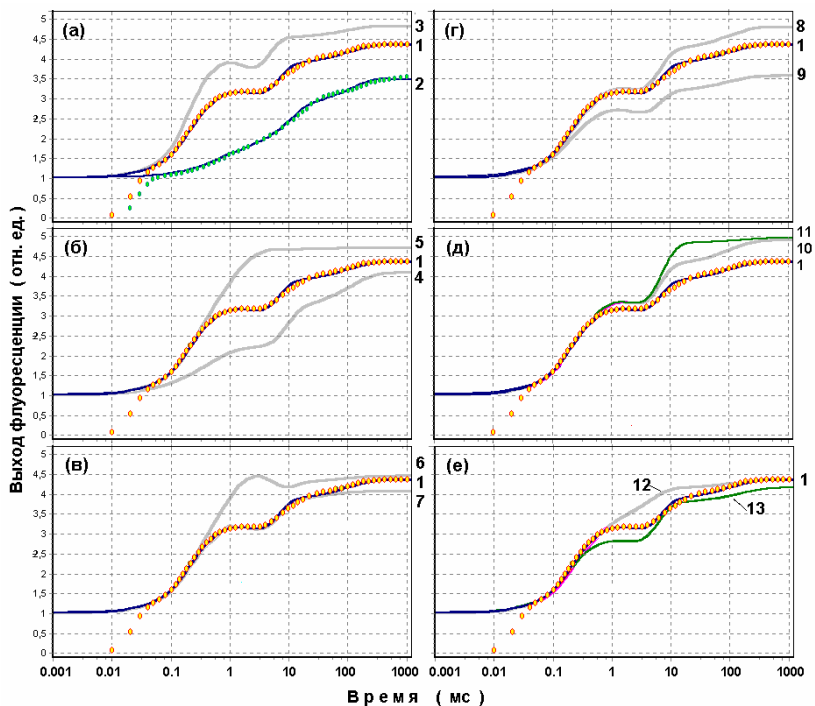


Рис. 3. Данные по регистрации кривых ИФ листьев гороха *Pisum sativum* в среде с ионофорами (серые овалы) для интенсивности света 10% (а, 2) и 40% (а,б,в,г,д,е, 1). Теоретические кривые (черные, сплошные) рассчитаны для световой константы $kL=150\text{ с}^{-1}$ (а, 2) и $kL=600\text{ с}^{-1}$ (а,б,в,г,д,е, 1,4-13). Кривые 1,2 (а) фитируют данные, полученные для 40% и 10% интенсивности света. Кривая 3 (а) рассчитана при имитации 80%-ной интенсивности света (см. текст). Параметры, при которых рассчитаны кривые с 4-ой по 13-ую (б,в,г,д,е), даны в таблице 2.

Таблица 2. Изменения параметров модели ФС 2 при расчетах кривых на рис. 3.

k_i (с^{-1}), i -тая реакция, рис.2	Модельные кривые на рис. 3.										
	1	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
4,11,18,31	$2.5 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^4$	$2.5 \cdot 10^7$								
7, (K_{Eq}) 14	3500, (20) 1750, (10)	0.5 (1) 0.5 (1)	0.5 (20) 0.5 (10)	3500, (20) 1750, (10)							
41	4			40		4					
4649	6000			4000		6000					
42-45	$1.2 \cdot 10^8$				$2.4 \cdot 10^8$		$1.2 \cdot 10^8$				
$[\text{H}_L^+]$, (мМ)	$5.5 \cdot 10^{-4}$						$7 \cdot 10^{-4}$		$5.5 \cdot 10^{-4}$		
$[\text{H}_S^+]$, (мМ)	10^{-4}							$6 \cdot 10^{-5}$		10^{-4}	
PQ, (мМ) PQH ₂ ,	9.7 0.02						4.7 5.02			32.2 0.2	
<p>1. Результат фитирования при интенсивности света 40%. 4. Уменьшение константы скорости восстановления P680⁺. 5. Блокировка переноса на Q_B. 6. Замедление переноса на Q_B. 7. Увеличение константы скорости повторного окисления хинолов. 8. Замедление рекомбинации Q_A⁻ с P680⁺. 9. Усиление рекомбинации Phe⁻ с P680⁺. 10. Увеличение рН люмена. 11. Увеличение рН стромы. 12. Увеличение восстановленности пула хинонов. 13. Увеличение размера пула хинонов.</p>											

Изменения амплитуд J-I и I-P стадий можно анализировать с помощью диаграммы рис. 4. Полная высота столбика дает суммарную амплитуду фазы нарастания кривой ИФ до максимального уровня F_m (до стадии P). Отметим некоторые варианты, показывающие «чувствительность» стадий к изменению параметров. Так увеличение J-I и I-P амплитуд кривой 4 происходит за счет уменьшения амплитуды O-J стадии, в то время как для кривых 5 и 6 увеличение O-J стадии приводит к исчезновению J-I стадии.

Главный максимум кривой ИФ (суммарная амплитуда ОЛР стадий) не изменяется только в двух из рассмотренных случаев: для кривых 6 и 12, то есть, соответственно, при замедлении переноса на Q_B и увеличении восстановленности пула хинонов.

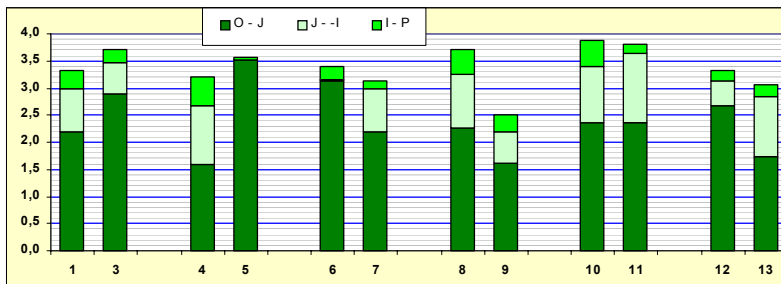


Рис.4. Амплитуды ОЛР стадии кривых ИФ, рассчитанных для параметров, данных в таблице 2. Стадии показаны: черным – O-J; серым – J-I; темно-серым – I-P.

Заключение. Получены модельные кривые, фитирующие экспериментальные кривые ИФ для 10% и 40% (от максимальной) интенсивности света. Для условий, имитирующих освещение листа гороха постоянным светом в отсутствие светоиндуцированного электрического потенциала $\Delta\psi$ и при постоянных pH, определены константы скоростей реакций как переноса электрона так и диссипативных потерь в антенне ФС 2. Для pH стромы и люмена получены значения в диапазонах $6.2 \div 6.4$ и $7.0 \div 7.1$. Предложенная методика может быть использована для анализа результатов «ОЛР тестирования» различных образцов (лист, хлоропласты, тилакоиды) фотосинтезирующих объектов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 07-04-00375).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Stirbet A., Govindjee, Strasser B.J., Strasser R.J. Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: modeling and numerical simulation. // J. Theor. Biol. 1998. V. 193. P. 131-151.

2. 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. // J. Theor. Biol. 2003. V. 220, P. 469-503.
3. Schreiber U., Krieger A. Two fundamentally different types of variable chlorophyll fluorescence in vivo. // FEBS Letters. 1996. V. 397. P. 131-135.
4. Лебедева Г.В., Н.Е. Беляева, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин, О.В. Дёмин Кинетическая модель фотосистемы II высших растений. // Физ. химия. 2000. Т. 74. С. 1874-1883.
5. Беляева Н.Е. Обобщенная модель первичных процессов фотосинтеза. // Дисс. к-та физ.-мат. наук. М.: Биологический ф-т МГУ. 2004.
6. Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Дёмин О.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Кинетическая модель первичных процессов фотосинтеза в хлоропластах. Описание быстрой фазы индукции флуоресценции хлорофилла при различной интенсивности света. // Биофизика. 2002. Т. 47, вып.6, с.1044-1058.
7. Беляева Н.Е., Лебедева Г.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б., Дёмин О.В. Кинетическое моделирование индукции флуоресценции высших растений. В сб. «Математика. Компьютер. Образование.» Вып.7, М., 2000, 606-614.
8. Беляева Н.Е., Дёмин О.В., Лебедева Г.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Кинетическая модель первичных процессов фотосинтеза в хлоропласте зеленых растений. В сб. «Математика. Компьютер. Образование.» вып.8, 2001, 587-595.
9. Беляева Н.Е., Лебедева Г.В., Ризниченко Г.Ю. Кинетическая модель первичных процессов фотосинтеза в хлоропласте зеленых растений. Моделирование электрического потенциала тилакоидной мембраны. // В сб. "Математика. Компьютер. Образование." М. 2003. вып.10. С. 263-276.
10. Н.Е. Беляева, В.З. Пашенко, Г. Ренгер, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин Использование модели ФС2 для анализа индукционной кривой флуоресценции, вызванной насыщающим световым импульсом, во временном диапазоне 100 нс - 10 с. // Биофи-

зика, 2006, т.51, вып. 6, с.976-988.

11. Беляева Н.Е., Пашенко В.З., Ренгер Г., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Использование модели процессов ФС 2 для анализа индукционной кривой флуоресценции после насыщающего импульса. В сб. «Математика. Компьютер. Образование.» вып.13,. 2006, с.333-344.

PS II MODEL APPLICATION FOR ANALYSIS OF FLUORESCENCE YIELD RISE INDUCED BY CONTINUOUS ILLUMINATION

Belyaeva N. E., Bulychev A. A., Riznichenko G. Yu.

(Russia, Moscow)

The PS II model [6,10] was applied to fit the fluorescence yield transients induced in Pisum sativum leaves by continuous actinic light with intensities 10% or 40% from the maximal one when $\Delta\Psi$ and ΔpH were diminished by ionofores. We evaluated the PS II rate constants of electron transfer as well as rate constants of energy losses in excited antennae Chl and in the forms with separated charges. Developed PS II model can be used to analyze the "OJIP"-test results.