

## БИОФИЗИКА И МЕДИЦИНСКАЯ ФИЗИКА

**Теоретическое исследование связи между флуоресценцией фотосистемы II и редокс-состоянием цепи электронного транспорта высших растений**Д. В. Киржанов<sup>1,a</sup>, А. К. Кукушкин<sup>2,b</sup><sup>1</sup>Институт машиноведения имени А. А. Благодирова РАН. Россия, 101990, Москва, Малый Харитоньевский пер., д. 4.<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, физический факультет, кафедра биофизики. Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2.E-mail: <sup>a</sup>kirzhanov@gmail.com, <sup>b</sup>kukushkin@phys.msu.ru

Статья поступила 20.07.2009, подписана в печать 27.08.2009

Разработан метод исследования процессов продолжительностью менее 1 мкс в дополнение к предложенной ранее модели для изучения регуляции фотосинтеза, что позволило рассмотреть начальные стадии переходных режимов. Полученные теоретические кинетики индукции флуоресценции фотосистемы II и сигнала ЭПР фотосистемы I качественно соответствуют экспериментальным данным. Модель показывает сложную нелинейную связь между интенсивностью флуоресценции фотосистемы II и состоянием цепи электронного транспорта хлоропласта.

*Ключевые слова:* фотосинтез, модель регуляции, индукция флуоресценции, сигнал ЭПР фотосистемы I, цепь электронного транспорта.

УДК: 577.355, 577.346. PACS: 92.20.ch, 87.80.Vt, 87.64.Hd.

**Введение**

Знание зависимостей концентраций промежуточных соединений фотосинтеза от времени необходимо для изучения его регуляции. Экспериментальное определение многих из них сопряжено с определенными сложностями. В некоторых случаях эти зависимости могут быть определены при помощи математических моделей, построенных на основе имеющихся сведений о строении хлоропласта и экспериментальных данных.

В модели, предложенной в работе [1], была описана индукция быстрой флуоресценции. Похожие модели использовались в [2] для изучения замедленной флуоресценции, в [3] для исследования связи первичных процессов фотосинтеза с оттоком сахарозы из растительных клеток, а в [4] — для исследования температурной зависимости процессов фотосинтеза. Обнаруженные в 1990 г. колебания замедленной люминесценции [5] долго не находили теоретического объяснения, оно было получено с использованием той же модели в 2005 г. Т. А. Карелиной с соавторами [6].

Уравнения модели, предложенной в [1], получены с использованием теоремы Тихонова о малом параметре [7]. В упрощенном виде соответствующие математические преобразования приведены в книге [8]. Введение малых параметров позволило при интегрировании увеличить шаг временной сетки примерно в  $10^8$  раз по сравнению с аналогичной системой уравнений без малых параметров. Для интегрирования уравнений использовался метод «предиктор–корректор» Робертсона [10]. Замена нескольких дифференциальных уравнений алгебраическими в [1] препятствует исследованию быстрых процессов.

В настоящей работе построена и исследована модель, позволяющая изучать быстрые процессы и начальные стадии индукции фотосинтеза.

**1. Формулировка модели**

Процессы и реакции модели изображены на рис. 1. В модели описана работа двух фотосистем (ФС), цепи электронного транспорта и цикла Кальвина–Бенсона. Скорости биохимических реакций, кроме реакции синтеза АТФ (аденозинтрифосфат), определяются законом действующих масс. Скорость синтеза АТФ из АДФ (аденозиндифосфат) складывается из скоростей восстановления окисленных реакционных центров (РЦ) ФС I ( $\bar{\pi}_1^+$ ) переносчиками  $U^-$  (с коэффициентом пропорциональности  $p_{ff1}$ ) и окисленных РЦ ФС II ( $\bar{\pi}_2^+$ ) комплексом разложения воды (с коэффициентом пропорциональности  $p_{ff2}$ ); таким образом, в модели эффективно учитывается влияние градиента протонов на синтез АТФ. Рассматриваемой схеме реакций соответствует система уравнений

$$\dot{y}_1 = a_{2f}(M_2 - y_1) - a_{2b}y_1 + g_{2b}y_2(M_2 - y_1) - g_{2f}y_1(N_2 - y_2 - y_3);$$

$$\dot{y}_2 = g_{2f}y_1(N_2 - y_2 - y_3) - g_{2b}(M_2 - y_1)y_2 + b_{2b}y_3y_4 - b_{2f}y_2(Q_0 - y_4);$$

$$\dot{y}_3 = b_{2f}y_2(Q_0 - y_4) - \omega y_3 - b_{2b}y_3y_4;$$

$$\dot{y}_4 = b_{2f}y_2(Q_0 - y_4) - b_{2b}y_3y_4 + r_b y_9(Q_0 - y_4) - r_f y_4(U_0 - y_9);$$

$$\dot{y}_5 = a_{1f}(M_1 - y_5) - a_{1b}y_5 + g_{1b}y_6(M_1 - y_5) - g_{1f}y_5(N_1 - y_6 - y_7);$$

$$\dot{y}_6 = g_{1f}y_5(N_1 - y_6 - y_7) - g_{1b}y_6(M_1 - y_5) + b_{1b}y_7y_8 - b_{1f}y_6(F_0 - y_8);$$

$$\dot{y}_7 = b_{1f}y_6(F_0 - y_8) - b_{1b}y_7y_8 - p y_7 y_9;$$

$$\dot{y}_8 = b_{1f}y_6(F_0 - y_8) - b_{1b}y_7y_8 - p_1 y_8 y_{10} - p_3 y_8(U_0 - y_9);$$

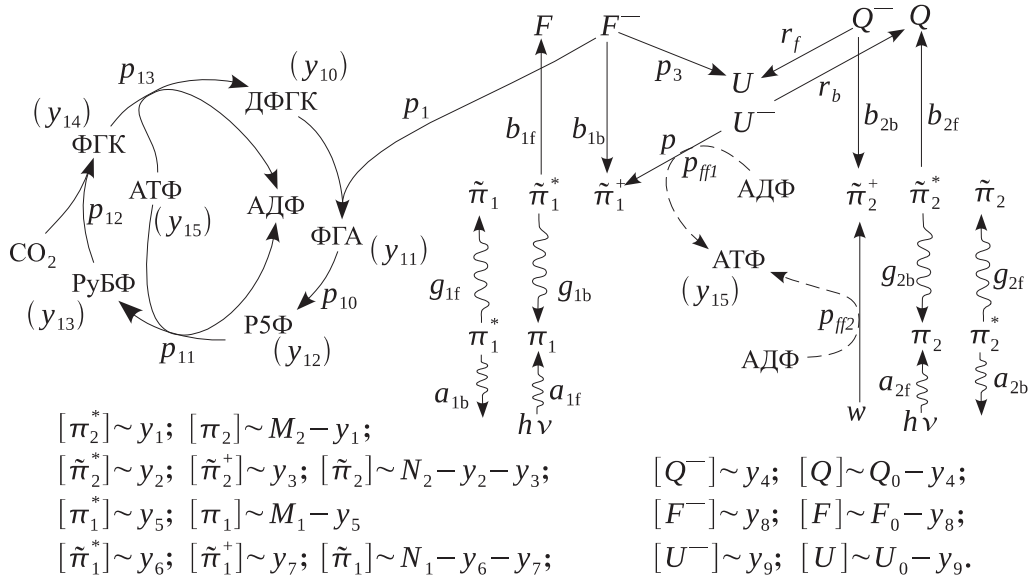


Рис. 1. Схема процессов, исследованных в модели;  $\pi_1, \tilde{\pi}_1, \pi_2$  и  $\tilde{\pi}_2$  — пигменты антенн и РЦ ФС I и ФС II;  $\pi$  и  $\tilde{\pi}$  — пигменты и РЦ в основном состоянии;  $\pi^*$  и  $\tilde{\pi}^*$  — возбужденные пигменты и РЦ;  $\tilde{\pi}^+$  — окисленные РЦ;  $Q/Q^-, U/U^-$  и  $F/F^-$  — окисленные и восстановленные переносчики электронов; ДФГК — 1,3-дифосфоглицерат; ФГА — фосфоглицеральдегид; Р5Ф — рибозо-5-фосфат; РуБФ — рибулозо-1,5-бисфосфат; ФГК — 3-фосфоглицериновая кислота

$$\begin{aligned}
 \dot{y}_9 &= r_f y_4 (U_0 - y_9) - r_b y_9 (Q_0 - y_4) + p_3 y_8 (U_0 - y_9) - p_7 y_7 y_9; \\
 \dot{y}_{10} &= p_{13} y_{14} y_{15} - p_{15} y_8 y_{10}; \\
 \dot{y}_{11} &= p_{15} y_8 y_{10} - 2p_{10} y_{11}^2; \\
 \dot{y}_{12} &= p_{10} y_{11}^2 - p_{11} y_{12} y_{15}; \\
 \dot{y}_{13} &= p_{11} y_{12} y_{15} - p_{12} P[\text{CO}_2] y_{13}; \\
 \dot{y}_{14} &= 2p_{12} P[\text{CO}_2] y_{13} - p_{13} y_{14} y_{15}; \\
 \dot{y}_{15} &= (p_{ff2} \omega y_3 + p_{ff1} p_7 y_9) (A_0 - y_{15}) - (p_{11} y_{12} + p_{13} y_{14}) y_{15}.
 \end{aligned}
 \tag{1}$$

В системе (1) присутствуют переменные, соответствующие часто измеряемым в экспериментах величинам. В их числе интенсивность флуоресценции ФС II (переменная  $y_1$ ) и величина сигнала ЭПР ФС I ( $P_{700}^+$ , переменная  $y_7$ ). Далее будем считать, что переменная  $y_4$  соответствует концентрации первичных акцепторов ФС II ( $[Q^-]$ ), а  $y_9$  — концентрации восстановленных хинонов в цепи транспорта электронов ( $[U^-]$ ). Будем считать, что редокс-состояние цепи электронного транспорта определено концентрациями переносчиков  $Q^-$  и  $U^-$ , т.е. значениями переменных  $y_4$  и  $y_9$ .

Для численного интегрирования системы уравнений (1) использовался метод, основанный на формулах обратного дифференцирования (backward differentiation formulas, BDF) [9]. Интегрирование выполнялось с помощью функции ode15s из пакета математических программ Mathworks Matlab. Некоторые результаты были проверены методом «предиктор-корректор» Робертсона [10] и методом Рунге-Кутты 4-го порядка [11]. Полученные разными методами результаты находятся в согласии друг с другом.

## 2. Численный эксперимент

Параметры системы уравнений выбраны следующим образом:

$$a_{1f} = 0.1, \quad a_{2f} = 0.01, \quad a_{1b} = 10^9, \quad a_{2b} = 2.5 \cdot 10^9,$$

$$\begin{aligned}
 g_{1f} &= 10^{10}, \quad g_{2f} = 1.8 \cdot 10^{10}, \quad g_{1b} = g_{2b} = 10^7, \\
 b_{1f} &= 10^{11}, \quad b_{2f} = 6 \cdot 10^{10}, \quad b_{1b} = 10, \quad b_{2b} = 10^7, \\
 \omega &= 450, r_f = 10, \quad r_b = 1.6, \quad p = 250, \quad p_3 = 6.3, \\
 p_1 &= p_{10} = 10, \quad p_{11} = 0.05, \quad p_{12} = 1, \\
 p_{ff1} &= p_{ff2} = 0.018, \quad N_1 = N_2 = F_0 = P[\text{CO}_2] = 1, \\
 Q_0 &= U_0 = 10, \quad M_1 = M_2 = 100, \quad A_0 = 50.
 \end{aligned}
 \tag{2}$$

Они в основном соответствуют использованным в работах [4] и [6] значениям аналогичных констант. Соответствие между параметрами (2) системы уравнений (1) и аналогичными параметрами системы уравнений из работ [4, 6] определяется приведенными в [12] соотношениями.

Выберем начальное состояние системы соответствующим длительной темновой адаптации зеленого листа [13]. В этом состоянии пигменты светособирающих комплексов и РЦ двух фотосистем находятся в основном состоянии, а переносчики цепи электронного транспорта полностью окислены ( $y_1(0) = \dots = y_9(0) = 0$ ), концентрации ДФГК (1,3-дифосфоглицерат), ФГА (фосфоглицеральдегид) и РуБФ (рибулозо-1,5-бисфосфат) малы, на 2 РЦ ФС I приходится 2 молекулы Р5Ф (рибозо-5-фосфат) и 4 молекулы ФГК (3-фосфоглицериновая кислота) в цикле Кальвина-Бенсона, а также 1 молекула АТФ в строме ( $y_{12}(0) = 1, y_{14}(0) = 2, y_{15}(0) = 0.5, y_{10}(0) = y_{11}(0) = y_{13}(0) = 0$ ).

Интегрирование системы уравнений (1) выполнено на интервале времени от 0 до 10 с при указанных начальных условиях и параметрах (2), а также при начальных условиях и параметрах, близких к ним. В настоящей статье проанализированы полученные таким образом зависимости переменных  $y_1, y_4, y_7$  и  $y_9$  от времени.

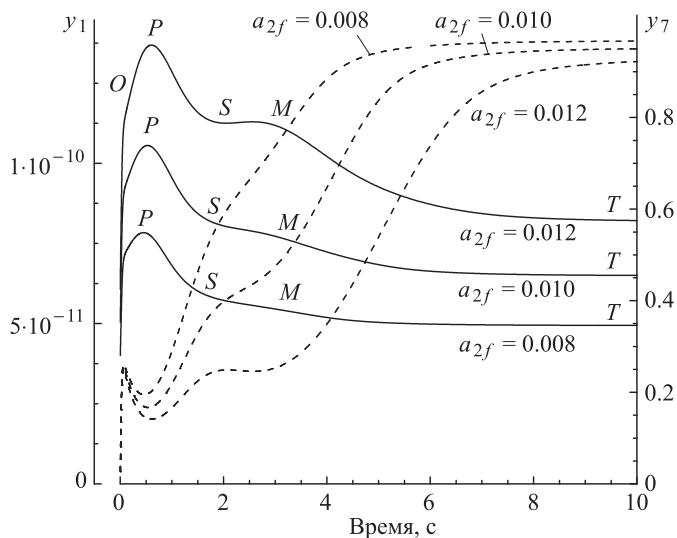


Рис. 2. Зависимости  $y_1(t)$  (непрерывные линии,  $\sim[\pi_2^*]$  и интенсивности флуоресценции ФСII) и  $y_7(t)$  (пунктирные линии,  $\sim[\pi_1^+]$  и величине сигнала ЭПР  $P_{700}^+$ ); параметр  $a_{2f}$  принимает значения 0.008, 0.01 и 0.012, начальные условия и остальные параметры приведены в тексте

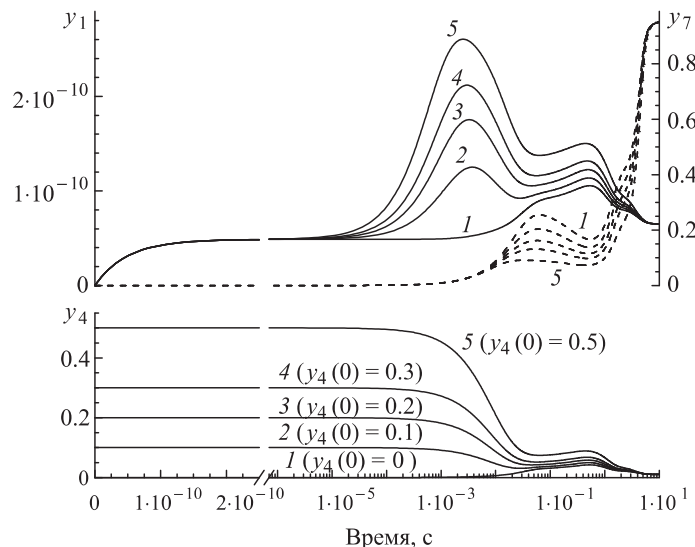


Рис. 3. Зависимости  $y_1(t)$  (непрерывные линии,  $\sim[\pi_2^*]$  и интенсивности флуоресценции ФСII),  $y_7(t)$  (пунктирные линии,  $\sim[\pi_1^+]$  и величине сигнала ЭПР  $P_{700}^+$ ) и  $y_4(t)$  (нижний график,  $\sim[Q^-]$ ), переменная  $y_4$  в начальный момент времени равна 0, 0.1, 0.2, 0.3 или 0.5; параметры модели и остальные начальные условия приведены в тексте, при переходе от линейной шкалы к логарифмической на оси времени имеет место разрыв

На рис. 2 приведены зависимости  $y_1(t)$  и  $y_7(t)$ , полученные при указанных выше начальных условиях. Параметр  $a_{2f}$  принимает значения 0.008, 0.01 и 0.012, остальные параметры заданы соотношениями (2). Зависимости  $y_1(t)$  качественно соответствуют приведенным в [14] кинетикам индукции флуоресценции ФСII. После включения света  $y_1$  достигает начальной величины  $F_0$  на стадии  $O$  [15]. Далее следует максимум  $P$ , достигающийся при наибольшем заполнении цепи электронного транспорта. Следующие за  $P$  стадии на экспериментальных кривых названы, как обычно,  $S$ ,  $M$  и  $T$ . Времена возникновения стадий  $P$  (1 с) и  $T$  (10 с) соответствуют экспериментальным данным [14]. Изменения переменной  $y_7$  качественно соответствуют результату эксперимента по измерению сигнала ЭПР ФСI, выполненного в работе [16]. Эффект от увеличения интенсивности освещения ФСII заключается в увеличении флуоресценции и уменьшении сигнала ЭПР. Стадия  $T$  возникает за счет оттока электронов от ФСI в цикл Кальвина–Бенсона.

Для изучения связи флуоресценции ФСII и состояния цепи электронного транспорта были исследованы приведенные на рис. 3 зависимости  $y_1(t)$ ,  $y_4(t)$  и  $y_7(t)$ . Начальное значение  $y_4$  полагалось равным 0, 0.1, 0.2, 0.3 и 0.5. Остальные начальные условия соответствуют приведенным выше, параметры определяются соотношениями (2), освещение постоянно во времени.

Часто измеряемая в экспериментах начальная величина флуоресценции  $F_0$  показана на теоретических кривых  $y_1$  на участке от 0.2 пс до 1 мкс. Ее можно вычислить путем подстановки  $\dot{y}_1 = 0$  и  $y_2 = y_3 = 0$  в уравнение для  $\dot{y}_1$  системы (1):

$$y_1(F_0) \approx \frac{a_{2f}M_2}{a_{2b} + a_{2f} + g_{2f}N_2}.$$

При  $y_4(0) > 0$  на зависимостях  $y_1(t)$  рис. 3 наблюдается «провал» [15]. Зависимость  $y_7(t)$  при этом не испытывает существенных изменений. На графиках

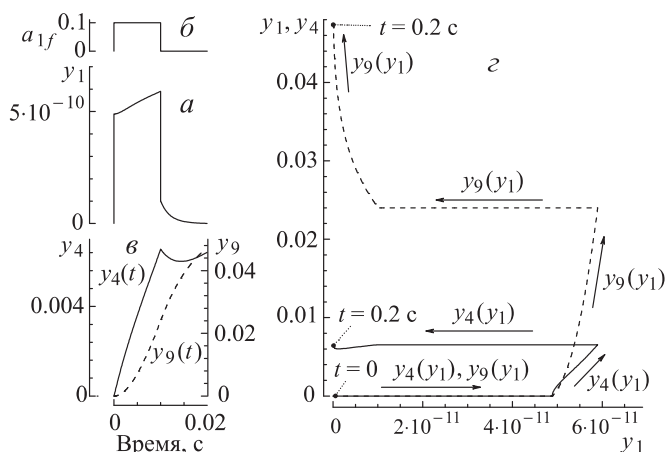


Рис. 4. Зависимости  $y_1(t)$  (график а),  $y_4(t)$  и  $y_9(t)$  (график в) и  $y_4(y_1)$  и  $y_9(y_1)$  (график з); параметры и начальные условия приведены в тексте, на графике б показана зависимость интенсивности света от времени ( $a_{2f} = 0.1 \cdot a_{1f}$ )

рис. 3 видно явное отсутствие пропорциональной связи между переменными  $y_1$  и  $y_4$ .

Это обстоятельство подтверждается численным экспериментом, результаты которого изображены на рис. 4. На графиках а и в приведены зависимости  $y_1(t)$ ,  $y_4(t)$  и  $y_9(t)$ , демонстрирующие отклик системы на однократный импульс света продолжительностью 10 мс (показан на рис. 4, б). Состояние модели перед импульсом соответствует длительной темновой адаптации (условия см. выше), параметры заданы соотношениями (2). На графике з показаны полученные при этих условиях зависимости  $y_4$  и  $y_9$  от  $y_1$ .

На начальной стадии роста флуоресценции (рис. 4, *a, z*) переменные  $y_4$  и  $y_9$  (рис. 4, *b, z*) изменились незначительно. После достижения переменной  $y_1$  величины около  $5 \cdot 10^{-11}$  начался одновременный рост всех трех переменных (рис. 4, *a, b, z*). Он продолжился до момента выключения света. После прекращения потока фотонов в обе фотосистемы концентрация возбужденных пигментов ФСІ ( $y_1$ ) уменьшилась за время около 10 мс почти до нуля по сравнению с максимальным значением (рис. 4, *a, z*). При этом  $y_4$  испытала слабое немономонное изменение в пределах 10% от достигнутого значения, а  $y_9$  увеличилась (рис. 4, *b, z*).

Важно отметить отсутствие линейной зависимости между переменной  $y_1(t)$ , с одной стороны, и переменными  $y_4(t)$  и  $y_9(t)$  — с другой (рис. 4, *z*). Мы считаем это следствием отличия констант скоростей переноса электронов в транспортной цепи на несколько порядков от констант скоростей миграции энергии и разделения зарядов. Поэтому нам кажется, что надо осторожно относиться к определению квантового выхода «разделения» зарядов по индукционным кривым медленной флуоресценции подобно тому, как это сделано в работе [17].

### Заключение

Предложена модель фотосинтеза, учитывающая световые стадии, цепь электронного транспорта и цикл Кальвина–Бенсона и позволяющая исследовать процессы продолжительностью как менее, так и более 1 мкс. Она весьма проста по сравнению с другими известными моделями [18–20] и содержит всего 15 переменных. При том что в ней не учитываются некоторые промежуточные переносчики цепи электронного транспорта, с ее помощью удается получить качественно соответствующие экспериментальным кинетики индукции флуоресценции ФСІІ и сигнала ЭПР ФСІ и объяснить эффект «провала».

Из выполненных численных экспериментов следует сложная связь между интенсивностью флуоресценции ФСІІ и концентрациями восстановленных первичных акцепторов и переносчиков в цепи электронного транспорта. Это означает, что по экспериментальной зависимости интенсивности флуоресценции ФСІІ нельзя судить о состоянии первичных акцепторов или пула переносчиков.

Авторы выражают благодарность Т. А. Карелиной и А. С. Рычковой за интересные идеи и участие в дискуссиях.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 08-04-09377-моб\_з).

### Список литературы

1. Кукушкин А.К., Караваев В.А. // Физическая мысль России. 1995. № 1. С. 17.
2. Кузнецова С.А., Кукушкин А.К. // Биофизика. 2000. **45**, № 4. С. 760.
3. Kuznetsova S.A., Bogracheva T., Hedley C. et al. // Annals of Applied Biology. 2001. **138**, N 1. P. 117.
4. Бадретдинов Д.З., Баранова Е.А., Кузнецова С.А. и др. // Биофизика. 2002. **47**, № 5. С. 872.
5. Дамдинсурэн С. // Биофизика. 1990. **35**, № 4. С. 687.
6. Карелина Т.А., Белов А.А., Кукушкин А.К. // Биофизика. 2005. **50**, № 6. С. 1105.
7. Тихонов А.Н. // Математический сборник. 1952. **31(73)**, № 3. С. 575.
8. Кукушкин А.К., Тихонов А.Н. Лекции по биофизике фотосинтеза высших растений. М., 1988.
9. Radhakrishnan K., Hindmarsh A.C. Description and use of LSODE, the Livermore Solver for Ordinary Differential Equations. Reference publication NASA RP-132. NASA. Washington, DC, 1993.
10. Hull T.E., Creemer A.L. // J. of the Association for Computing Machinery. 1963. **10**. P. 291.
11. Корн Г., Корн Т. Справочник по математике для научных работников и инженеров. М., 1978.
12. Киржанов Д.В. // Сб. трудов VI ежегодной международной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы. Институт биохимической физики им. Н. М. Эмануэля РАН. 24–27 ноября. Москва, 2006.
13. Эдвардс Дж., Уокер Д. Фотосинтез  $C_3$ - и  $C_4$ -растений: механизмы и регуляция. М., 1986.
14. Ireland C.R., Long S.P., Baker N.R. // Planta. 1984. **160**, N 6. P. 550.
15. Chlorophyll fluorescence. A Signature of Photosynthesis // Adv. in Photosynthesis and Respiration Series. Vol. 19 / Ed. by G. C. Papageorgiou and Govindjee. Dordrecht, 2004.
16. Рууге Э.К. Свободнорадикальные парамагнитные центры в тканях животных и листьях высших растений: Дисс. ... докт. физ.-мат. наук. Физ. ф-т МГУ. М., 1980.
17. Genty B., Briantais J.M., Baker N.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1989. **990**, N 1. P. 87.
18. Laisk A.K., Eichelmann H., Oja V. // Photosynthesis Research. 2006. **90**, N 1. P. 45.
19. Беляева Н.Е., Пащенко В.З., Ренгер Г. и др. // Биофизика. 2006. **51**, № 6. С. 976.
20. Zhu X.G., Sturler E. de, Long S.P. // Plant Physiology. 2007. **145**, N 2. P. 513.

**A theoretical study of a relationship between the photosystem II fluorescence and the redox state of the electron transport chain of higher plants****D. V. Kirzhanov**<sup>1,a</sup>, **A. K. Kukushkin**<sup>2,b</sup><sup>1</sup>*A. A. Blagonravov Mechanical Engineering Institute of Russian Academy of Sciences, Small Kharitonjevsky 4, Moscow, 101990, Russia.*<sup>2</sup>*Department of Biophysics, Faculty of Physics, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russia.**E-mail: <sup>a</sup> kirzhanov@gmail.com, <sup>b</sup> kukushkin@phys.msu.su*

A method of analysis of processes of less than 1  $\mu$ s duration was created in addition to a model which was introduced earlier for studying the regulation of photosynthesis. This method made possible consideration of the initial stages of transitional modes. The obtained theoretical kinetics of the induction of photosystem II fluorescence and photosystem I EPR signal qualitatively conformed those observed in experiments. The model demonstrated a complicated nonlinear relationship between the fluorescence of the photosystem II and the redox state of the electron transport chain of chloroplast.

*Keywords:* photosynthesis, a model of regulation, induction of fluorescence, EPR signal of photosystem II, electron transport chain.

PACS: 92.20.ch, 87.80.Vt, 87.64.Hd.

*Received 20 July 2009.*

English version: *Moscow University Physics Bulletin* 6(2009).

**Сведения об авторах**

1. Киржанов Дмитрий Викторович — мл. науч. сотр.; тел.: (499) 135-12-04, e-mail: kirzhanov@gmail.com.

2. Кукушкин Александр Константинович — докт. физ.-мат. наук, профессор; тел.: (495) 939-29-73, e-mail: kukushkin@phys.msu.su.