

1.1.

Миграция энергии в антенных комплексах и фотохимический захват в РЦ фотосистем 1, 2. Индукция флуоресценции.

Возможные пути переноса возбуждения, полученного внешними 1.1/ антенными комплексами ФС2, к пигментам РЦ (к центральным кофакторам P680) включают хлорофиллы *a* (Chl_{D1}, Chl_{D2}) внутреннего антенного комплекса (в субъединицах CP43, CP47). Стабилизация энергии возбуждения, распределенной в антенной системе пигментов, сопровождается повторным испусканием квантов света в дальнем красном диапазоне (флуоресценция). Этот процесс радиационных потерь весьма информативен при изучении первичных стадий разделения заряда в ФС2.

Перечень заголовков

Моделирование механизмов распределения возбуждения в антенных системах. Концепция быстрого экситонного уравнивания (БЭУ).

Индукция флуоресценции.

Модели: 1.1 мод.1., 1.1 мод.2.

([83]Zouni *et al.* 2001; [48]Kamiya, Shen 2003), ([51]Krauss *et al.* 1993; [53]Kuhlbrandt, Wang 1991), (van Grondelle 1985), (Dau 1994b), (Пирлстейн 1987), (Holzwarth, Roelofs 1992), (Laible *et al.* 1994) (Owens *et al.* 1989) (Delosme 1967). (Lazar 1999) (Капапетян 1980; Dau 1994a) (Malkin 1966; Forbush, Kok 1968; Munday, Govindjee 1969), (Strasser *et al.* 1995). (Ireland *et al.* 1984) (Neubauer, Schreiber 1987; Schreiber, Neubauer 1987)

Моделирование механизмов распределения возбуждения в антенных системах. Концепция быстрого экситонного уравнивания (БЭУ).

Исследования по рентгеноструктурному анализу кристаллов комплексов ФС2, сохраняющих активность КВК (Zouni *et al.* 2001; Kamiya, Shen 2003), также, как и более ранние исследования кристаллов комплексов ФС1 (Krauss *et al.* 1993; Kuhlbrandt, Wang 1991), показали, что расстояние между центрами порфириновых колец ближайших друг к другу молекул хлорофилла РЦ, составляет 1 нм. Перенос возбуждения (экситона) от антенной системы ССК на первичный донор РЦ предположительно происходит через хлорофиллы, расположенные на расстояниях $\cong 2 \div 3$ нм друг от друга. Полученный в эксперименте порядок величин межпигментных расстояний подтверждает теоретические представления

(van Grondelle 1985) о локализации светового возбуждения на отдельной молекуле хлорофилла антенны.

1.1.мод.1. Можно определить (Dau 1994b) зависимую от времени вероятность $p_i(t)$, пребывания индивидуального пигмента P_i в возбужденном состоянии. При физиологических условиях (отсутствие возбуждения интенсивными лазерными импульсами) вероятность попадания 2-х экситонов на один и тот же хлорофилл антенны крайне мала. Тогда вероятности пребывания в возбужденных состояниях p_i могут быть описаны линейными относительно вероятностей уравнениями (уравнения Паули):

$$dp_i/dt = \sum_j (k_{ji}p_j - k_{ij}p_i) - k_{d,i}p_i + L_i(t) \quad (1.1)$$

$L_i(t)$ – описывает возбуждение пигмента P_i при поглощении света; k_{ij} – константа скорости транспорта энергии возбуждения от P_i к P_j ; $k_{d,i}$ – константа скорости затухания возбужденного состояния путем эмиссии флуоресценции (k_F) и потерь ($k_{loss} = k_{iC} + k_T$) в процессах внутренней конверсии и переходов в триплетные состояния. Константа скорости затухания возбужденного состояния ($k_{d,i}$) при попадании в пигмент РЦ будет содержать константу скорости k_{Phot} , характеризующую процесс фотохимического захвата: $k_{d,RC} = k_F + k_{loss} + k_{Phot}$.

Для правильной двумерной решетки пигментов $k_{ij} = k_{ji} = k_H$. Вероятность перескока k_H задается скоростью переноса Ферстера (van Grondelle 1985; Пирлстейн 1987), а время жизни возбуждения в антенне фотосистемы РЦ, представляемой решеткой сильно связанных пигментов с малыми потерями на диссипацию, определяется процессами диффузии в антенне и захватом в РЦ:

$$\tau_{life} = \tau_{diff} + \tau_{trap}, \text{ где } \tau_{diff} \sim N \cdot k_H^{-1}, \tau_{trap} = N \cdot k_{Phot}^{-1}. \quad (1.2)$$

N - предполагаемое количество хлорофилла для одной фотосистемы РЦ.

Экспериментально получено (Holzwarth, Roelofs 1992), что время жизни возбужденного состояния гетерогенной антенной системы ФС2 или ФС1 (τ_{life}) пропорционально обратной константе скорости первичного разделения зарядов:

$$\tau_{life} = Const \times k_{Phot}^{-1}. \quad (1.3)$$

Следовательно, понятие **лимитирование захватом**, когда $\tau_{diff} \ll \tau_{trap}$, можно применить к описанию динамики экситонов ФС2 и ФС1, полагая справедливой концепцию быстрого экситонного уравнивания (БЭУ) возбуждения **по всему пулу кинетически неразличимых пигментов** (Dau 1994b). Применение этой концепции существенно упрощает моделирование процессов в ФС2 и ФС1, поэтому важно рассмотреть критерии возможности использования понятия БЭУ.

1.1.мод.2. В (Laible *et al.* 1994) предложена трехмерная модель для изучения динамики возбужденных состояний ФС1 и ФС2 с использованием уравнений

Паули (1.1) для вероятностей переноса в матрице N сильно сопряженных пигментов. Величины скоростей Форстера определяли, принимая среднее расстояние между соседними парами пигментов равным $10 \div 15 \text{ \AA}$ (Kuhlbrandt, Wang 1991). Быстрое достижение в (Laible *et al.* 1994) квазиравновесного распределения при распаде возбуждения хорошо согласуется с описанием динамики возбуждения, лимитированной захватом как для ФС1, так и для ФС2. Экспериментальные данные для хлорофиллов ФС1 и ФС2 (Owens *et al.* 1989) показывают, что время от начала возбуждения до перехода к квазиравновесному состоянию (t_e) составляет малую часть времени полного распада возбуждения в антенне $t_e \leq 0.3 \cdot \tau_p$, где τ_p - время жизни возбужденных состояний, ограниченное фотохимическим захватом.

В модели динамики экситонов фотосинтетических антенн (Laible *et al.* 1994) подчеркивается роль повторного захвата в достижении теплового равновесия, зависимость равновесия от быстрого (≈ 1 пс) переноса между пигментами антенны и очень плотной упаковки пигментов хлорофилла *in vivo*.

Индукция флуоресценции.

На шкале времени $\sim 10^{-11} \div 10^{-9}$ с энергия возбуждения, распределенная в антенной системе пигментов, может израсходоваться конкурирующими путями: фотозахват, ведущий к стабилизации энергии возбуждения (характерное время разделения зарядов в пигменте РЦ ≈ 3 пс) и радиационные потери - флуоресценция. Формирование триплетных состояний (интеркомбинационная конверсия) пока обсуждаться не будет.

Характеристики излучения флуоресценции молекул хлорофилла различны в растворе и фотосинтезирующих образцах. При изменении освещенности выход флуоресценции Хл *a* в растворе не меняется, будучи равным $20 \div 35$ %, с временем жизни $6 \div 20$ нс. В фотосинтезирующих организмах, содержащих Хл *a*, изменения интенсивности актиничного света сопровождаются сложными изменениями во времени выхода флуоресценции, происходящими во временных шкалах от наносекунд до часов, вариации в выходе могут составлять $2\% \div 10\%$ с временем жизни около ~ 300 пс (открытые РЦ ФС2) и ~ 1.6 нс (закрытые РЦ ФС2) (Lazar 1999). Выход флуоресценции фотосинтезирующих образцов определяется процессами потребления энергии в антенне ССК, т. е. временем жизни возбужденного состояния τ_{life} (1.2), и вероятностью распада путем испускания флуоресценции (τ_0):

$$\Phi_F = k_F \tau_{life} = \tau_{life} / \tau_0. \quad (1.4)$$

Время жизни возбуждения в антенне τ_{life} в комплексе ФС2 зависит от особенностей реакций переноса электронов. Существование процесса флуоресценции, конкурирующего с фотозахватом, предоставляет

возможность по изменению выхода флуоресценции X_{la} получить в эксперименте информацию о процессах в тилакоидной мембране, влияющих на τ_{life} .

График изменения интенсивности флуоресценции, измеряемой как функция времени при мгновенном переходе от темноты к постоянному свету, называется кривой **индукции флуоресценции** (ИФ). Явление ИФ (Dau 1994a) одно из комплекса переходных процессов энергетической активации тилакоидной мембраны (изменение редокс-состояний переносчиков, генерация электрохимического потенциала, активация ферментов и т. д.), сопутствующих кратковременной (секунды) адаптации (выходу к стационарному уровню потоков энергии) при изменении условий освещения. Особенность флуоресцентных методов – это возможность их применения без разрушения фотосинтезирующего образца.

В таблице 1.1 приведены основные примеры экспериментальных исследований ИФ (Карапетян 1980; Dau 1994a). Работы расположены в хронологическом порядке, отмечена природа исследуемых тилакоидных мембран, способ светового возбуждения, воздействия на образец.

В ранних работах сделаны попытки связать форму кривой ИФ с характером воздействия на объект (Malkin 1966; Forbush, Kok 1968; Munday, Govindjee 1969). Было отмечено, что времена появления и амплитуда уровней-фаз на кривой ИФ зависят от интенсивности света. (Delosme 1967).

Интенсивность флуоресценции можно определить как

$$F_{tot} = \Phi_F \cdot c_A \cdot I_L, \quad (1.5)$$

где I_L – интенсивность светового источника, c_A – коэффициент поглощения, который задан таким образом, чтобы произведение $c_A \cdot I_L$ определяло число поглощенных фотонов за одну секунду. Φ_F – выход флуоресценции. При нарастании интенсивности света в 1000 раз может происходить 4-кратное нарастание выхода флуоресценции. Метод, предложенный в 1986 году (Schreiber *et al.* 1986), позволяет использовать актиничный свет исключительно высокой интенсивности при очень низком уровне измеряющего света, который сам по себе не вызывает переменной флуоресценции. Селективный модуляционный флуориметр (РАМ-флуорометр) дал возможность изучать ИФ в широком диапазоне световых интенсивностей.

В работах (Neubauer, Schreiber 1987; Schreiber, Neubauer 1987), проведенных на РАМ- флуорометре, была впервые получена общая картина появления уровней ИФ в полном диапазоне световых интенсивностей, включающем физиологический диапазон ФАР. Было также проанализировано воздействие реагентов как на донорной, так и на акцепторной сторонах ФС2.

Таблица 1.1. Хронология исследований ИФ.

Сопоставление полифазных изменений флуоресценции, получаемых для световых интенсивностей от низких до высоких во временном диапазоне от 40 мс до 120 с (рис.1.1а) проведено в работе (Strasser *et al.* 1995). Подтверждены результаты, полученные в (Neubauer, Schreiber 1987), и дана классификация типов полифазности ИФ для световых интенсивностей – низких, средних, высоких. Доказана равноценность обозначений паттернов $O-I_1-D-I_2-P$ в (Neubauer, Schreiber 1987) и принятых к настоящему времени, $O-J-D-I-P$. Результаты (Strasser *et al.* 1995) на рис.1.1а демонстрирует особенности немонотонной $O-J-D-I-P-M-S-T$ кинетики ИФ образца, прошедшего темновую адаптацию. Принято выделять следующие основные фазы и параметры индукции флуоресценции хлорофилла: быстрая фаза – возрастание интенсивности флуоресценции от начального O -уровня (F_0) до максимального P -уровня (F_P) за времена порядка 1 или нескольких секунд, и медленная фаза – релаксация интенсивности флуоресценции к некоторому стационарному T -уровню (F_T) за времена порядка десятков секунд. Характер быстрой фазы (подъем ИФ) зависит от интенсивности освещения. При низкой интенсивности света обычно наблюдается одна промежуточная фаза ($O-I-P$ кинетика).

При высокой интенсивности наблюдают не менее двух фаз ($O-J-I-P$ кинетика), а P -уровень достигает максимально возможной величины (F_M). Отмечено (Strasser *et al.* 1995), что $O-J-D-I-P$ паттерн быстрой, до времени 1 сек ИФ, получаемый на высокой интенсивности света, характерен для образцов различной природы: листья, водоросли, цианобактерии, интактные хлоропласты, тилакоидные мембраны (разрушенные хлоропласты). На рис.1.1б, полученном в работе (Stirbet *et al.* 1998), экспериментальные кинетики подъема ИФ листьев гороха в обычных условиях (кривые 1 и 2 для низкой и высокой световых интенсивностей) дополнены кинетической кривой 3 с двумя кинетическими $O-J \equiv P$ -стадиями, полученной при добавлении ингибитора электронного транспорта – диурона.

Приведенные результаты показывают, что в эксперименте произошел переход от качественного представления об особенностях ИФ к четкому выявлению типа полифазного ответа. Многочисленные исследования по использованию ИФ в качестве информативного индикатора фотосинтетического электронного транспорта в интактных листьях, водорослях, изолированных хлоропластах (Schreiber *et al.* 1994) показали необходимость введения количественных представлений, характеризующих взаимосвязь процессов флуоресценции и биохимических реакций транспорта электронов.

Так в работе (Ireland *et al.* 1984) показано, что скорость фотосинтетической ассимиляции углерода при всех условиях опыта

начинает возрастать лишь после достижения P пика, коррелируя с $M-S$ фазами спада ИФ к стационарному T -уровню (рис.1.1в). Быстрая $O-I-D-P$ фаза ИФ не может быть информативной по отношению к неинициированным на **лаг** фазе процессам ассимиляции углерода.

С целью теоретического описания ИФ проведены работы по моделированию первичных процессов фотосинтеза, начиная от описания различных механизмов переноса возбуждения в ССК на пикосекундных временных шкалах (Bernhardt, Trissl 1999). При переходе к более длительным временным шкалам модели должны учесть распределение поглощенной световой энергии по все большему количеству структур тилакоидной мембраны.

1.2.

Стабилизация разделения зарядов в РЦ фотосистемы 2.

1/2/ 1.2.1. 1.2.2. 1.2.3. 1.2.4. Реакционный центр (РЦ) ФС2 образован субъединицами D1 и D2. Возбуждение от антенного комплекса мигрирует на первичный донор P680 РЦ, (хлорофилл a , локализованный на люменальной стороне мембраны). При формировании катион радикала $P680^{\bullet+}$ электрон переносится на первичный акцептор феофитин (Phe). Существует возможность возвращения возбуждения в антенный комплекс при рекомбинации этой первичной радикальной пары. Возможен также дальнейший перенос электрона (стабилизация) на акцептор Q_A (пластохинон), связанный на стромальной стороне мембраны в субъединице D2. После каждой из 4-х светоиндуцированных стадий разделения зарядов катион $P680^{\bullet+}$ получает один электрон от марганцевого кластера (предположительно содержащего 4 иона марганца) посредством редокс активного остатка тирозина Tyr_Z.

Перечень заголовков

Модели: 1.2.мод.1.

(Butler, Strasser 1977), (Schatz *et al.* 1988; Leibl *et al.* 1989; Roelofs *et al.* 1992; Dau, Sauer 1992; Gibasiewicz *et al.* 2001), (Klimov, Krasnovsky 1981; Klimov *et al.* 1985), (Пирлстейн 1987; van Grondelle 1985), (Owens *et al.* 1989), (Wasielewski *et al.* 1989), (Dau 1994a), (Dau, Sauer 1991b), (Trissl, Leibl 1989) (Dau, Sauer 1991) (Trissl *et al.* 1993) (Lavergne, Trissl 1995)

Концепция энергетических пулов Батлера .

В концепции Батлера (Butler, Strasser 1977) **пул** объединяет пигменты ССК и РЦ в состояниях: основном, возбужденном либо с разделенными зарядами, а энергетические потоки между **пулами** антенны и РЦ рассматриваются как обратимые реакции с константами скоростей первого порядка. Концепция Батлера помогала понять закономерности распределения энергии в фотосинтетическом аппарате: между антенной и реакционным центром ФС2, между ФС2 и ФС1. Так двухчастная модель Батлера, широко использованная в фотосинтетических исследованиях и физиологии растений, рассматривает только два пигментных пула: (1) пигменты антенны, (2) пигменты РЦ - P680.

В дальнейшем концепция динамического описания фотосинтетического аппарата Батлера, была дополнена обратным переносом возбуждения от РЦ в антенну, благодаря работам Климова (Klimov, Krasnovsky 1981; Klimov *et al.* 1985), который ввел представления о рекомбинация первичного бирадикала ($P_{680}^+Phe^-$), ведущей к возбужденному состоянию первичного донора (P_{680}^*), что впоследствии позволило математически описать (Schatz *et al.* 1988) переменную флуоресценцию Хл *a* в опытах с импульсным возбуждением.

1.2.мод.1. Модель обратимой радикальной пары (ОРП) Шатца.

Данные измерений (пикосекундного) поглощения и флуоресценции на изолированных кислородовыделяющих частицах ФС2 термофильных цианобактерий *Synechococcus sp.* были интерпретированы (Schatz *et al.* 1988) в детальной кинетической модели, описывающей процессы захвата экситона, разделения, рекомбинации и стабилизации заряда в ФС2.

В модели принимается предположении, что равновесное возбужденное состояние Chl^* и P_{680}^* устанавливается в процессе переноса возбуждения за время, сравнимое или меньше, чем временное разрешение эксперимента (пикосекунды):



Стадия первичного разделения зарядов из возбужденного состояния **В** до состояния **С** с анионом феофитина (рис.1.2) предполагается обратимой, а дальнейшая стабилизация заряда до состояния **Д** ($Z^+P_{680}PheQ_A^-$) - необратимой. Перенос до состояния **Е** рассматривали с целью наблюдения процесса повторного восстановления P_{680}^+ .

Константы скоростей, вычисленные по результатам пикосекундных измерений для открытых (в состоянии F_0) и закрытых (в состоянии F_M) РЦ частиц ФС2 *Synechococcus sp.*, содержащих $\sim 80 Chl / P_{680}$, показывают

ряд интересных особенностей. Так, константа скорости k_A изменяется в незначительной степени при восстановлении Q_A : $k_A=0.9 \text{ нс}^{-1}$ (открытые РЦ), 1.1 нс^{-1} (закрытые РЦ). Следовательно, восстановление Q_A не влияет на процессы дезактивации в антенном Chl^* . Перенос электрона с феофитина на Q_A имеет характерное время 500 пс в открытых РЦ, процесс этот прекращается в закрытых РЦ. Константа скорости разделения зарядов k_1 (k_1^{Ant}) уменьшается в 6 раз в закрытых РЦ ($k_1=1.5 \text{ нс}^{-1}$) по сравнению с открытыми ($k_1=9.3 \text{ нс}^{-1}$). При переходе от открытых к закрытым РЦ отношение k_1/k_{-1} падает в 7.5 раз (от 4.6 до 0.6), что указывает на сдвиг равновесия стадии в сторону возбужденного состояния антенного хлорофилла.

Для N одинаковых хлорофиллов антенны, сопряженных с P_{680} , кажущаяся константа скорости разделения зарядов (k_1^{Ant}) связана с внутренней (k_1^{in}) через константы скорости попадания в ловушку и ухода из нее в реакции (1.6):

$$k_1^{in} = k_1^{Ant} \cdot N \frac{k_{-t}}{k_t} \quad (1.7)$$

Равновесное состояние пигментов антенны и РЦ описывают распределением Больцмана:

$$\frac{k_{-t}}{k_t} = \frac{[Chl^* \cdot P]}{[Chl \cdot P^*]} = \exp[-hc / kT(\lambda_{Chl}^{-1} - \lambda_P^{-1})], \quad (1.8)$$

Принимая максимальные длины волн поглощения хлорофилла антенны и РЦ равными $\lambda_{Chl}=673 \text{ нм}$, $\lambda_P=680 \text{ нм}$, и $N=80$, для полученной величины $k_1^{Ant}=9.3 \text{ нс}^{-1}$ (107.5 пс) вычислили $k_1^{in}=9.3 \text{ нс}^{-1} \cdot 80 \cdot 1/2 \approx 370 \text{ нс}^{-1}$, что соответствует характерному времени $\sim 2.7 \text{ пс}$. Такое значение очень близко к величине 2.8 пс, измеренной на препаратах реакционных центров ФС2 (Wasielewski *et al.* 1989)

О применимости термодинамических представлений в модели ОРЦ.

Как отмечено в (Schatz *et al.* 1988), теоретические (Пирлстейн 1987; van Grondelle 1985) и экспериментальные (Owens *et al.* 1989) результаты приводят к оценкам, определяющим лимитированный захватом характер случайных блужданий возбуждения в антенне. Время элементарного скачка возбуждения составляет $50 \div 200 \text{ фс}$ (энергия межмолекулярного сопряжения молекул хлорофилла в антенне порядка 100 см^{-1}), и количество посещений РЦ зависит от времени жизни возбуждения в антенне (τ_{life}), пропорционального количеству пигментов в ней (формулы (1.2), (1.3)). Поскольку тепловое равновесие между возбужденными состояниями Chl^* и P_{680}^* и решеткой (антенной) наступает через 5 пс (энергия тепловой релаксации молекул хлорофилла порядка 1 см^{-1}), то для достаточно

большого количества пигментов в антенне за время $\tau_{life} \gg 5$ пс достижимо тепловое равновесие и в антенной системе и в реакционном центре.

Следовательно, согласно термодинамическим соотношениям, разность стандартной свободной энергии между состоянием радикальной пары $P_{680}^+ Phe^-$ и возбужденным состоянием антенны может быть вычислена по формуле:

$$\Delta G^0 = -k_B T \ln(k_1^{Ant} / k_{-1}), \quad (1.9)$$

где k_B - константа Больцмана, T - абсолютная температура. Переход от наблюдаемой константы к внутренней, согласно (1.7) и (1.8) принимает вид:

$$k_1^{Ant} = k_1^{in} / N^{eff}, \quad (1.10)$$

где $N^{eff} = N / c_e$ - эффективное число хлорофиллов, на которых уравнивается возбуждение (если все пигменты изоэнергитичны, то N^{eff} равно реальному размеру антенны). Тогда можно записать уменьшение стандартной свободной энергии антенны относительно состояния радикальной пары по сравнению со стандартной свободной энергией хлорофилла РЦ:

$$\Delta G^0 = \Delta G^{0,in} - k_B T \ln(1 / N^{eff}). \quad (1.11)$$

Согласно экспериментальным данным (Schatz *et al.* 1988) для ФС2 частиц с 80-ю хлорофиллами, открытые РЦ: $k_1^{Ant} / k_{-1} = 4.6$. Тогда при температуре $T=288^\circ\text{K}$:

$$\Delta G^{0,in} |_{откр. РЦ} = \Delta G^0 + k_B T \ln(1 / N^{eff}) = (-38-112) \text{ мЭв} = -150 \text{ мЭв}$$

Таким образом, модель (Schatz *et al.* 1988) подчеркивает роль антенных структур в стабилизации захвата энергии за счет количества пигментов. Большая антенна ССК: (а) увеличивает сечение поглощения фотонов; (б) способствует согласованию быстрой и обратимой стадии разделения зарядов с более медленной последующей стадией стабилизации заряда; (в) приводит к разделению зарядов при низких промежуточных концентрациях $P_{680}^+ Phe^-$, уменьшая изменение свободной энергии, связанное с разделением зарядов.

Учет воздействия электрического поля в модели ОРЦ.

Светоиндуцированные реакции (Dau 1994a) переноса электрона между донором и акцептором в РЦ приводят к появлению радикалов катионов и анионов, фиксированных в относительно жестком с низкой диэлектрической проницаемостью белковом матриксе, который также разделяет ионы-радикалы от свободных ионов водных фаз. Поэтому реакции фотосинтетического разделения зарядов связаны с возникновением значительных электростатических сил. Разность свободной энергии реакции переноса электрона внутри протеина

определяется не только редокс потенциалами донора и акцептора электрона, но и разницей электростатической потенциальной энергии между начальными и конечными состояниями радикальной пары.

На пикосекундной шкале времени происходит светоиндуцированный перенос заряда поперек тилакоидной мембраны: разделение заряда от P_{680}^* к Phe^- , затем стабилизация от Phe^- к Q_A^- . Эти электрогенные, то есть, создающие мембранный потенциал, стадии конкурируют с обратным переносом энергии возбуждения в антенну с последующим высвечиванием флуоресценции.

В работе (Schatz *et al.* 1988) авторы предложили гипотезу, что локальные электрические поля могут быть ответственны за нарастание флуоресценции, наблюдаемое при восстановлении Q_A , то есть за так называемую переменную флуоресценцию. Оценка увеличения электрической энергии диполя $P_{680}^+ Phe^-$ при учете отрицательного заряда Q_A^- в данной работе составила $\Delta G_0 = 120$ мЭВ. Как указано в (Dau 1994a), реальные величины могут быть ниже по причине экранирования отрицательного заряда на Q_A^- ионами окружающей фазы и протонированными аминокислотными остатками.

В работе (Leibl *et al.* 1989) исследованы пикосекундные электрогенные, то есть, создающие мембранный потенциал (фотонапряжение) стадии. Обработанные трипсином, мембраны (ВВУ-*membranes*), содержащие кислородо-выделяющие частицы ФС2 гороха, облучали импульсами длительностью 30 пс или 12 нс. Показано, что свойства фаз распада флуоресценции и фотонапряжения хорошо объяснимы в рамках обратимой модели ОРП для гомогенной популяции ФС2. Найдено, что при восстановлении Q_A происходит уменьшение константы скорости захвата (k_1 , рис.1.2) таким образом, что $k_1^{OX}/k_1^{RED} = 3.2$. Изменение свободной энергии при разделении зарядов, вычисленное в (Leibl *et al.* 1989), составило $\Delta G_{откр. РЦ}^0 = -39$ мЭВ и $\Delta G_{закр. РЦ}^0 = 38$ мЭВ. Следовательно, восстановление Q_A поднимает энергию состояния с радикальной парой на ≈ 77 мЭВ. Такой сдвиг отличается от найденного в работе (Schatz *et al.* 1988). Проверено предположение, что на величины констант скоростей обратимой схемы (k_1 и k_2) влияет мембранный потенциал, изменяемый независимо от электрогенного переноса.

Точную величину локальных полей в тилакоидной мембране оценить трудно. Кроме того, трансмембранный потенциал на больших временных интервалах (миллисекунды, секунды) определяется процессами транспорта протонов, сопряженного с переносом электронов не только в ФС2, но и в других комплексах тилакоидной мембраны, а также процессами ионного транспорта.

В эксперименте (Dau, Sauer 1991b) исследовали воздействие произвольного трансмембранного потенциала на величину флуоресценции. Использовали метод «солевого удара» (salt jump), полагая, что при высокой начальной концентрации калия и высокой калиевой проводимости после перемешивания препарата тилакоидных мембран (листья шпината) в растворе с определенной концентрацией хлорида калия, величина созданного диффузионного потенциала на тилакоидной мембране определяется уравнением Нернста :

$$V = 59 \text{ mV} \log([K^+]^{\text{Out}}/[K^+]_0), \quad (1.12)$$

где $[K^+]_0$ - начальная концентрация калия, $[K^+]^{\text{Out}}$ - результирующая концентрация калия в среде после смешивания. Получена линейная зависимость относительного изменения флуоресценции от потенциала на тилакоидной мембране в диапазоне значений от -70 мВ до +50 мВ с нарастанием от 7% до 11% на каждые 100 мВ напряжения на мембране тилакоида. Однако, анализ стационарной флуоресценции не может ответить на вопрос, как влияет электрическое поле на кинетику реакции разделения заряда ФС2.

Пикосекундные измерения флуоресценции тилакоидов шпината получены (Dau, Sauer 1992) после воздействия лазерных импульсов низкой интенсивности (50 Вт/м^2) для нулевого значения потенциала и положительного потенциала, индуцированного солевым ударом. Все измерения проводились в состоянии с открытыми реакционными центрами ФС2 (F_0 -состояние). Экспериментальная кривая распада сопоставлена с теоретическими кривыми, полученными на модели ОРП. При отрицательном внутри тилакоида напряжении распад флуоресценции происходил быстрее, чем при положительном. Среднее время жизни, вычисленное из амплитуд и констант времени трех экспоненциальных компонент, возрастает линейно на величину $11 \pm 0.6\%$ на 100 мВ нарастания напряжения на мембране тилакоида. Это очень хорошо согласуется с ранее наблюдаемым нарастанием стационарного испускания флуоресценции (Dau, Sauer 1991b).

В работе (Gibasiewicz *et al.* 2001) проведены эксперименты с **включением, выключением локального поля и расчеты по модели ОРП** с целью получения параметров первичных реакций в РЦ. Кинетические сигналы флуоресценции и фотонапряжения измеряли на расстыкованных (трипсин) фрагментах ФС2 мембран шпината. Препараты предварительно обрабатывали для создания в них трех различных редокс-состояний Q_A : окисленного, единично восстановленного (дитионит натрия или диурон), дважды восстановленного (дитионит натрия+освещение).

Измерения фотонапряжения с высоким временным разрешением позволили прямо детектировать образование и распад радикальной пары (электрогенных состояний $P_{680}^+ Phe^-$ и $P_{680}^+ Q_A^-$). Авторы (Gibasiewicz *et al.* 2001) отмечают, что из-за относительно низкой диэлектрической

постоянной в фазе тилакоидной мембраны кулоновское взаимодействие может иметь величину ~ 100 мэВ для расстояния порядка 15 \AA . Внутренняя модуляция ΔG^0 переноса на Phe^- для состояний Q_A , Q_A^- или $Q_A H_2$ аналогична приложению внешнего электрического поля, с тем преимуществом, что экспериментально это более легкий способ. В состоянии $Q_A H_2$ (с заблокированным прямым переносом электронов) полученная константа стабилизации k_2 (схема рис.1.2) меньше, чем 0.2 нс^{-1} . Эта величина может служить верхним пределом оценки скорости рекомбинации первичной радикальной пары в открытых РЦ либо прямо либо через триплетное состояние P_{680} в **основное** состояние.

Результаты применения модели ОРП.

Модель ОРП была использована в качестве инструмента расчетов для обработки экспериментальных данных (Schatz *et al.* 1988; Leibl *et al.* 1989; Roelofs *et al.* 1992; Dau, Sauer 1992; Gibasiewicz *et al.* 2001). Математическая формулировка модели ОРП, схематически показанной на рис.1.2, приводит к линейным дифференциальным уравнениям Паули (1.1) с p_1 , соответствующим возбужденному состоянию антенны (рис.1.2 состояние **B**) и p_2 – состоянию первичной радикальной пары (состояние **C**):

$$\begin{aligned} dB/dt &= -(k_1 + k_A) \cdot B + k_{-1} \cdot C \\ dC/dt &= -(k_{-1} + k_2) \cdot C + k_1 \cdot B \end{aligned} \quad (1.13)$$

Возбуждение в виде дельта- импульса задается начальным условием : $B(t=0)=B_0$, $C(t=0)=0$. Состояния с возбужденным хлорофиллом определяют эмиссию флуоресценции: $k_F \cdot B(t)$. Зависимость мембранного потенциала (Leibl *et al.* 1989) от времени определяется заполненностью форм с разделенными зарядами ($C(t)$ – заряд на феофитине, $(D(t)+E(t))$ - заряд на хиноне на схеме рис.1.2 и степенью электрогенности каждой из стадий переноса (A_1, A_2):

$$V(t) = A_1 \cdot C(t) + (A_1 + A_2) \cdot (D(t) + E(t)). \quad (1.14)$$

Найденная в работе (Leibl *et al.* 1989), относительная электрогенность ФС2 (принято, что $A_1=1$) составляет $A_2=0.8 \div 0.9$ аналогично величинам в работе (Trissl, Leibl 1989). Полученный результат означает, что электрогенные расстояния между парами переносчиков P_{680} - Phe и Phe - Q_A почти равны. Для пурпурных бактерий подобная величина составляет $1.5 \div 1.6$.

Электрогенные расстояния ФС2, полученные в (Leibl *et al.* 1989), были использованы (Dau, Sauer 1991) для количественной оценки влияния электрического поля на флуоресценцию ФС2. Из отношения тилакоидного напряжения V_{thyl} к расстоянию d_{thyl} , разделяющему водные фазы, в предположении гомогенности диэлектрической проницаемости

пространства тилакоидной мембраны можно получить величину свободной энергии диполя, возникающего при восстановлении феофитина или Q_A :

$$\Delta\Delta G = (d_{dipole} / d_{thyl}) \cdot e \cdot V_{thyl} . \quad (1.15)$$

По аналогии с бактериальными РЦ (Dau, Sauer 1991) полагали, что расстояние $d_{P680-Pheo}$ составляет около 1 нм. Согласно результатам (Leibl *et al.* 1989) диэлектрически взвешенное расстояние между Q_A и P680 вдвое больше расстояния между феофитином и P680, тогда $d_{P680-Q} = 2 \cdot d_{P680-Pheo}$. Принимая расстояние между объемными фазами равным 5 нм и используя уравнение (1.15), (Dau, Sauer 1991) оценили (рис.1.3) воздействие электростатического поля на изменение уровней свободной энергии первичных акцепторов ФС2. При варьировании средствами «солевого удара» тилакоидного напряжения от -70мВ до +165мВ разность свободной энергии первичной реакции разделения-рекомбинации меняется согласно рис.1.3 на $\Delta\Delta G = 47$ мэВ. Оценка отношения старых констант скоростей реакции к новым, вычисленная по формуле:

$$(k_1 / k_{-1}) / (k_1^* / k_{-1}^*) = e^{-\Delta G/kT} / e^{-\Delta G^*/kT} = e^{-\Delta\Delta G/kT} . \quad (1.16)$$

дает уменьшение константы равновесия первичной реакции разделения-рекомбинации заряда в 6 раз.

Область применения модели ОРП.

Временные шкалы в модели ОРП, ограничены наносекундами от момента включения света. Следовательно, в таких же временных рамках возможно с помощью модели ОРП моделировать процессы преобразования энергии в тилакоидной мембране.

Так в работе (Trissl *et al.* 1993) разработан вариант модели ОРП для моделирования кривой ИФ ФС2, блокированной диуроном, при возбуждении постоянным светом. В дальнейшем (Lavergne, Trissl 1995) удалось показать, что минимальная F_0 и максимальная F_{MAX} флуоресценция являются функциями только параметров системы РЦ ФС2, но не зависят от переноса энергии возбуждения между фотосинтетическими единицами. Проведено фиттирование экспериментальных кривых ИФ для быстрой диуроновой кинетики и получен сигмоидный ход ИФ. Однако, авторы указывают на многочисленность факторов, влияющих на выход флуоресценции. Среди них перечисляются: степень сближения тилакоидных мембран (degree of stacking), мембранный потенциал, энергизация мембраны, дивалентные катионы, pH , S -состояния водорасщепляющего комплекса, редокс-состояние негемового железа, α - β -гетерогенность. Очевидно, что ни один из этих факторов не может быть учтен в модели ОРП.

Значение модели ОРП и выводы.

Модель ОРП является инструментом для обработки экспериментальных данных о быстрых пикосекундных процессах фотосинтеза высших растений. Концепции и результаты модели ОРП положены в основу последующих, в том числе и нашей, разработок моделей первичных процессов фотосинтеза.

1. Вероятности (заполненность) состояний макромолекулярного комплекса вычисляются с помощью системы дифференциальных уравнений, линейных относительно резидентных вероятностей возбужденных состояний или редокс-состояний радикальных пар (уравнения Паули),

2. Концепция быстрого экситонного уравнивания (БЭУ) дает возможность объединять в пул кинетически неразличимых пигментов хлорофиллы антенны и реакционного центра.

3. Рассмотрение реакций первичного разделения и стабилизации заряда как обратимых позволяет моделировать переменную флуоресценцию и воздействие на выход флуоресценции электрических полей.

4. В рамках ОРП доказана применимость представлений о достижении теплового равновесия на стадиях переноса возбуждения в антенне и первичного разделения заряда в РЦ. Принципы равновесной термодинамики будут применены для описания переноса зарядов по цепи редокс-переносчиков с различными энергетическими уровнями.

5. Численные величины молекулярных констант скоростей для ФС2, содержащих либо открытые либо закрытые РЦ (Q_A или Q_A^- соответственно), полученные флуоресцентными методами, абсорбционной спектроскопией и измерением фотонапряжения с использованием модели ОРП, могут быть основой модельного описания первичных процессов фотосинтеза.,

6. Детальный механизменный подход, использованный при описании процессов переноса возбуждения в модели ОРП, может быть применен при описании процессов в тилакоиде на более длительных интервалах времени.

1.3.

Акцепторная и донорная сторона ФС2.

Разделение зарядов на тилакоидной мембране инициируется удалением электрона из возбужденного первичного донора P680 с переносом электрона на первичный акцептор феофитин (Phe). После каждой из 4-х светоиндуцированных стадий разделения зарядов катион $P680^{\bullet+}$ получает один электрон от марганцевого кластера (предположительно содержащего 4 иона марганца) посредством редокс активного остатка тирозина Tyr_Z. Четыре положительных заряда, накопленные в марганцевом кластере, окисляют две молекулы воды, что сопряжено с освобождением одной молекулы кислорода (O_2) и 4-х протонов (H^+). Стабилизация электрона

происходит на акцепторе Q_A (пластохинон), который связан на стромальной стороне мембраны в субъединице D2. Q_A^- последовательно дважды восстанавливает подвижную молекулу Q_B , находящуюся в стромальном сайте мембраны (в субъединице D1). Присоединив два протона, пластохинол Q_BH_2 , высвобождается в подвижный пул в мембране и замещается из пула на новый подвижный хинон (Q_B). Таким образом, происходят последовательные циклы (обороты) восстановления и освобождения.

Подробно (с перечнем заголовков).

Модели: 1.3.мод.1., 1.3.мод.2., 1.3.мод.3., 1.3.мод.4., 1.3.мод.5.,

(Crofts, Wraight 1983), (Laisk, Walker 1989), (Hope 2000), (Krieger *et al.* 1995; Johnson *et al.* 1995), (Van Gorkom 1985) (Eckert-*et al.* 1988), (Klimov *et al.* 1979), (Tielen, Van Gorkom 1981). (Bowes, Crofts 1980) (Auslander, Junge 1974; Renger *et al.* 1979), (Xu *et al.* 1991), (Golbeck, Kok 1979), (Diner, Babcock 1996), (Renger, Shulze 1985), (Baake, Shloeder 1992), (Бухов Н.Г. и др. 1988), (Stirbet *et al.* 1998) (Vredenberg 2000), (Lazar 2003)

Энергетика переноса электронов.

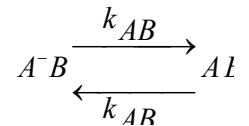
Рассматривая энергетическое состояние электрона, получившего запас энергии от светового кванта, реакционные центры ФС2 и ФС1 можно полагать низкопотенциальными источниками (стабилизированный заряд на первичном хиноне Q_A^- и на ферредоксине Fd^-) и высокопотенциальными приемниками (окисленные пигменты РЦ) для восстанавливающих эквивалентов (Crofts, Wraight 1983). При этом можно рассмотреть общий энергетический баланс подобно (Laisk, Walker 1989). Из энергии 680 нм фотона, равной 1.8 эВ, только 1 эВ используется для увеличения энергии электрона от уровней редокс состояний пигментов РЦ: P_{680}^+ / P_{680} (P_{700}^+ / P_{700}) до уровней состояний со стабилизированным зарядом Q_A / Q_A^- (Fd / Fd^-). Остаток энергии (~0.8 эВ) расходуется на проведение реакций переноса в ФС2 (ФС1). !!!ЙЙЙ здесь Z-схема!!!!

Процессы переноса зарядов подвижными переносчиками (Hope 2000) вместе с процессами потребления энергии (синтез АТФ и ионный транспорт) включают межмолекулярные взаимодействия и диффузионные стадии в фазах мембран либо растворов, будучи очень чувствительны к параметрам метаболического окружения, таким, как pH , ионная сила, концентрация лигандов и электрохимический потенциал. Тем не менее, возможно (Crofts, Wraight 1983) биоэнергетическое рассмотрение процессов переноса зарядов не только в макромолекулярных комплексах, но и в компартментах люмена, стромы, мембраны тилакоида, если для количественной характеристики реакций переноса использовать результирующие изменения свободной энергии (ΔG), характерные для переходов между состояниями белковых комплексов.

Для экспериментального определения ΔG пользуются описанием энергетики переноса заряда в изотермической окислительно-восстановительной реакции :

$$\Delta G^0 = -n \cdot F \cdot \Delta E_m^0, \quad (1.17)$$

где ΔE_m^0 - разность потенциалов окислительно-восстановительной пары при заданных pH , температуре и концентрациях окислительно-восстановительных пар, n – число молей электронов, перенесенных в реакции на моль субстрата, F – число Фарадея. Энергетические и кинетические характеристики процесса переноса электрона :



рассматривают в состоянии равновесия. Тогда процесс характеризуется константой равновесия, K_{EQ} , эквивалентной разности ΔE_m , и справедливы выражения :

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln K_{EQ} \quad (1.18)$$

и

$$k_{BA} = k_{AB} \cdot e^{-\Delta G / kT}. \quad (1.19)$$

Экспериментальное определение редокс-потенциалов первичных акцепторов ФС 2.

Так как понимание биоэнергетики электронного переноса требует знания изменений свободной энергии, происходящих на каждом шагу переноса электрона, то много усилий направлено на измерение среднеточечных потенциалов (E_m) активных редокс-компонент белковых комплексов.

В работе (Krieger *et al.* 1995) дано обобщение работ по определению среднеточечного редокс - потенциала первичного хинонного акцептора ФС2. Существующий в литературе разброс значений $E_{m,7}$ для Q_A таков, что найденные величины $E_{m,7}$ попадают в диапазоны (Crofts, Wraight 1983) от $\approx -250 \div -300$ мВ (Q_L - форма) до $\approx +60 \div -40$ мВ (Q_H - форма).

Для тилакоидов из клеток зеленой водоросли *Scenedesmus obliquus* в работах (Krieger *et al.* 1995; Johnson *et al.* 1995) по флуоресцентным кривым титрования найдено, что в активных центрах величина $E_m(Q_A / Q_A^-) = -81$ мВ, не проявляя зависимости от pH в диапазоне от pH 5.5 до pH 7.5 (область стабильности O_2 выделяющего энзима). Показано, что ингибирование выделения кислорода приводит к необратимому переходу Q_A из низко-потенциальной формы в высоко-потенциальную форму. Среднеточечный редокс- потенциал, измеряемый в неактивных ФС2, на 150 мВ более положителен, чем в активных центрах и составляет +65 мВ.

Проблему сильного разброса данных об энергетических характеристиках первичных и вторичных процессов переноса электронов в

ФС2 (среднеточечные редокс-потенциалы и константы равновесия процессов) авторы (Krieger *et al.* 1995; Johnson *et al.* 1995) рассматривают с двух точек зрения.

Физиологическое значение различий редокс-форм акцепторов.

Наблюдаемые в определенных условиях эксперимента сдвиги значений редокс-потенциалов (высоко- либо низко-потенциальных формы) могут иметь физиологическое значение. Принимая, что $E_{m,7}(Q_A/Q_A^-) = -80$ мВ, а константа равновесия реакции $Q_A^- Q_B \leftrightarrow Q_A Q_B^-$ (см. далее) предполагается равной 20 (Crofts, Wraight 1983), величину $E_{m,7}(Q_B/Q_B^-)$ можно принять близкой к 0 мВ. В отсутствие фотоактивации (выращивание в темноте и отсутствие КВК) рекомбинация зарядов $Tyr_Z^+ Q_A^-$ по причине положительного сдвига $E_{m,7}(Q_A/Q_A^-)$ будет конкурировать с прямым переносом электронов. Это может служить защитным механизмом для ФС2 с неактивированными РЦ, так как при многократном фотохимическом разделении зарядов в отсутствие водорасщепляющего комплекса накапливались бы долго живущие сильно окисляющие компоненты, особенно, $P680^+$.

Достоверность численных оценок редокс-потенциалов.

Как отмечено в (Johnson *et al.* 1995), получаемые в эксперименте величины редокс-потенциалов или констант равновесия могут быть различны для различных применяемых методик эксперимента.

По данным электролюминисцентных измерений (Van Gorkom 1985) разность свободной энергии между состояниями $P680^+ Q_A^-$ и $P680^+ Phe^-$ равна $\Delta G^0 = -330$ мэВ а согласно (Eckert-*et al.* 1988) скорость прямого переноса электрона с Phe^- на Q_A^- определяется характерным временем $t_{1/2} = 300$ пс. Используя соотношения (1.18)÷(1.19) для вычисления константы равновесия и скорости обратного переноса реакции $P680^+ Phe^- \leftrightarrow P680^+ Q_A^-$ в активных ФС2, можно получить $K_{EQ} \approx 4 \cdot 10^5$ и $k_{Back} \approx 5.7 \cdot 10^3 \text{ с}^{-1}$ или $t_{1/2Back} \approx 120 \mu\text{с}$.

Однако, если использовать измеренную (Klimov *et al.* 1979) величину $E_m(Ph/Ph^-) = -610$ мВ, то для оценки разности энергии между состояниями $P_{680}^+ Q_A^-$ и $P_{680}^+ Ph^-$ получим значение $\Delta G^0 = -525$ мэВ слишком большое для существования непрямой обратной рекомбинации даже в активных РЦ ФС2. Обсуждаются возможные причины завышения величины изменения свободной энергии между $P_{680}^+ Ph^-$ и $P_{680}^+ Q_A^-$. (1) Значение $E_m(Ph/Ph^-) = -610$ мВ было получено редокс-титрованием при высоких pH в РЦ, модифицированных двойным восстановлением Q_A (Klimov *et al.* 1979). (2) В $P_{680}^+ Ph^-$ радикальной паре присутствие P_{680}^+ может эффективно увеличивать $E_m(Ph/Ph^-)$.

1.3.1.

Вторичный акцептор электронов ФС2.

Исследования, обзор которых приведен в (Crofts, Wraight 1983), привели к представлению о сопряжении процесса стабилизации электрона на Q_A^- с последующими стадиями 2-х электронного переноса. Получая по одному электрону от Q_A^- , вторичные хиноны Q_B накапливают восстанавливающие эквиваленты парами и пополняют пул хинонов в липидной фазе.

В (Bowes, Crofts 1980) по распаду флуоресценции хлоропластов шпината после серии насыщающих лазерных вспышек исследовали повторное окисление первичного акцептора ФС2 в условиях различных редокс- потенциалов среды. Измерения выхода флуоресценции проводили для времени от 50 мкс до 10 мс. Анализ кинетических данных дает характерные времена $t_{1/2} \approx 100 \div 200 \mu\text{s}$ для переноса первого электрона: $Q_A^- \rightarrow Q_A Q_B^-$ и $t_{1/2} \approx 300 \div 500 \mu\text{s}$ для переноса второго электрона $Q_A^- Q_B^- \rightarrow Q_A Q_B H_2$.

По данным (Auslander, Junge 1974; Renger *et al.* 1979) связывание протонов H^+ из компартмента стромы кинетически ограничено белковым барьером и поэтому не дает информации о механизме электронного переноса. Оценки констант равновесия для реакций между Q_A и Q_B и пластохиноновым пулом показали, что величина $K_{EQ}(Q_A^- \rightarrow Q_B^-)$, эквивалентна разности редокс- потенциалов $\approx 80 \text{ мВ}$ между редокс- парами (Q_A / Q_A^-) и (Q_B / Q_B^-). Неоднозначность определения константы равновесия переноса второго электрона на Q_B^- ($K_{EQ}(Q_A^- \rightarrow Q_B^{2-}) \approx 1$ или ≈ 50) может быть связана с протонированием восстановленного вторичного хинона (Diner 1977).

В (Crofts, Wraight 1983) отмечено, что для пластохинонного пула функциональное значение $E_{m,7}(PQ / PQH_2) \approx 120 \text{ мВ}$ (Golbeck, Kok 1979) и уменьшается на 59 мВ при возрастании pH на единицу. Другая оценка E_m для пластохинона составляет +30 мВ при pH 8.3 в работе (Tielen, Van Gorkom 1981).

Колебания скорости повторного окисления Q_A^- , связанные с замедлением кинетики для нечетных вспышек, привели к гипотезе о том, что Q_B является непостоянно связанным компонентом, формируемым взаимодействием столкновением хинона из пула с комплексом ФС2 согласно схеме:



Двухфазная природа кинетики переноса электрона после одиночного импульса может быть понята (Crofts, Wraight 1983) в рамках модели двухэлектронных ворот, включающей освобождение Q_B -сайта с выходом

пластохинона в фазу мембраны. Такая же модель применена для изучения кинетики и термодинамики связывания ингибиторов в Q_B -сайте в тилакоидах шпината (Xu *et al.* 1991). В присутствии ингибитора (например, DCMU) Q_B освобождает Q_B - сайт с образованием PQ не более, чем за 10 мс (Golbeck, Kok 1979), и такая оценка сходна с оценкой скорости переноса электрона от Q_B^{2-} на PQH_2 - пул, предполагая, что это происходит с освобождением Q_B - сайта в отсутствие ингибитора.

1.3.2. Особенности переноса электронов в ФС2.

В начальные события разделения зарядов во всех типах реакционных центров включены хлориновые структуры в качестве первичных акцепторов электронов (хлорофиллы или феофитины). Но в последующие процессы переноса зарядов в РЦ включены вторичные акцепторы принципиально различной природы. В ФС2 это хиноны - пластохинолы (убихиноны в пурпурных бактериях). В ФС1 и зеленых серных бактериях эту роль выполняют низкопотенциальные железосерные центры.

Выше (пункт 1.2) показано, что выход флуоресценции хлорофилла в хлоропластах и водорослях является мерой редокс- состояния Q_A . По крайней мере частично это связано с тем, что, когда Q_A окислено, ФС2 активна, или открыта, и фотохимия конкурирует с испусканием флуоресценции. Активность ФС1 не отражается на выходе флуоресценции при нормальных условиях. В обзоре (Dau 1994a) отмечено, что для максимального уровня флуоресценции (F_M состояние) вклад флуоресценции ФС1 составляет 1% для 685 нм, и только 6% для длинноволнового (дальний красный) плеча. Возможно, что тушение флуоресценции ФС1 одинаково для открытого (P_{700}) и закрытого (P_{700}^+) состояний РЦ ФС1.

Поглощение кванта света хлорофиллом P_{680} в РЦ ФС2 приводит к быстрому (пикосекунды) образованию столь сильного окислительного эквивалента P_{680}^+ , что редокс- потенциал его до настоящего времени не измерен в эксперименте. Донирование от тирозина (Y_Z) может за десятки наносекунд повторно восстановить P_{680}^+ , делая энергетически возможным протекание очередной одноэлектронной стадии окисления молекулы воды в КВК, происходящей согласно циклу переходов по S_n - состояниям с характерными временами: 30 мкс ($S_0 \rightarrow S_1$), 110 мкс ($S_1 \rightarrow S_2$), 350 мкс ($S_2 \rightarrow S_3$) и 1.3 мс ($S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$). Механизм этого цикла приводит к согласованию одноэлектронного процесса, происходящего при поглощении каждого кванта света, с 4-х электронным окислением воды до молекулярного кислорода. Средний потенциал окисления воды до кислорода для 4-х переходов по S_n - состояниям составляет 810 мВ, (Britt 1996), в то время как согласно теоретическим оценкам $E_m(P_{680}^+/P_{680}) = +1120$ мВ (Diner, Babcock 1996).

1.3.мод.1. Модель двухэлектронных ворот ФС2. Объединение с моделью ОРП.

Схема модели, описывающей реакции электронного транспорта ФС2 по механизму двухэлектронных ворот, приведенная на рис.1.4, предложена в 1985 (Renger, Shulze 1985), и далее в 1992 году объединена (Baake, Shloeder 1992) с предложенной ими расширенной схемой (рис.1.5) первичного разделения зарядов, основанной на результатах (Schatz *et al.* 1988; Leibl *et al.* 1989).

Редукция схемы, описывающей быстрые нано и микросекундные процессы, (рис.1.5), проведенная авторами (Baake, Shloeder 1992) с учетом соотношения констант скоростей $k_i \ll \chi_i$, позволила выразить квазистационарные (на миллисекундной шкале времени) концентрации возбужденных и с разделенными зарядами состояний схемы как функции фракций открытых ($(Chl-P_{680})Ph Q_A$) и закрытых ($(Chl-P_{680})Ph Q_A^-$) РЦ. Скорость восстановления РЦ - $r(t)$, а также выход флуоресценция получены как функции концентрации открытых РЦ ($x_1(t)$). Алгебраическая функция $r(t)$ используется, как переменная скорость стабилизации заряда в системе дифференциальных уравнений, описывающей вторичный перенос электрона на акцепторной стороне ФС2 (рис.1.4).

По индукционным кривым, измеренным в эксперименте для света низкой интенсивности (20 Вт/м^2 , 28 Вт/м^2 , 40 Вт/м^2), (Baake, Shloeder 1992) проводили фиттирование модели. Модель, объединяющая быстрые и медленные процессы ФС2, обеспечивает хорошее приближение индукционной кинетики во временном диапазоне до 500 мс, но не способна удовлетворительно воспроизвести ID- падение, что наиболее заметно для самой низкой интенсивности света. Отмечено, что включение в модель световой реакции ФС1 на стадии повторного окисления пластохинолов (константа скорости k_5 на **рис.1.-5**) не в состоянии улучшить результаты.

1.3.мод.2. Математические модели донорных и акцепторных процессов ФС2.

В модель (Бухов Н.Г. и др. 1988) включены переносчики как акцепторной, так и донорной сторон ФС2. Проведена идентификация параметров модели по экспериментальным кривым переменной и замедленной флуоресценции. Позднее был разработан ряд моделей также полностью включающих процессы ФС2.

1.3.мод.3. Модель, учитывающая процессы КВК.

В математической модели (Stirbet *et al.* 1998) рассмотрена система дифференциальных уравнений, включающая редокс реакции как на акцепторной, так и на донорной сторонах ФС2.

Модель описывает гомогенную популяцию ФС2 (все комплексы ФС2 имеют одинаковые кинетические характеристики и одинаковое количество молекул пула) полагая, что влияние фракции закрытых реакционных центров на относительную переменную флуоресценцию и глобальную скорость восстановления РЦ определяется аналитическими выражениями, содержащими параметр связанности ФСЕ ФС2, таким образом, что при параметре связанности, равном нулю, относительная переменная флуоресценция идентична фракции закрытых реакционных центров.. Воздействие ФС1 и цитохромного комплекса неявно учитывается путем влияния на константу скорости реакции первого порядка окисления PQH_2 до PQ . Предполагается, что переходы между состояниями марганцевого КВК $S_n \rightarrow S_{n+1}$ происходят быстрее либо медленнее переноса электрона с первичного хинона на вторичный для разных состояний n .

Оценка константы скорости восстановления $Q_A (kL_1^0)$ для выбранных экспериментальных условий (интенсивность светового воздействия 600 Вт/м^2 , листья гороха) получена посредством сравнения моделируемой кинетики (в предположении равенства нулю констант скорости восстановления Q_B и Q_B^-) с экспериментальной кинетикой индукции флуоресценции листьев, обработанных *DCMU*. Для оптимально подобранной величины $kL_1^0 = 2000 \text{ с}^{-1}$. были проведены расчеты в интервале до 0.5 сек. Модель дала расчетную кривую индукции флуоресценции, подобную экспериментальной *O-J-I-(D)-P*- кинетике быстрой фазы кривой ИФ, регистрируемой для фотосинтетического аппарата, освещенного светом постоянной высокой интенсивности, а именно, 600 Вт/м^2 . Отмечено, что фиттирование переменной индукции флуоресценции к экспериментальным данным станет возможным только после учета в модели процессов не только ФС2, но и ФС1.

1.3.мод.4 Модель, учитывающая изменение выхода рекомбинации радикальной пары в закрытых РЦ.

В работе (Vredenberg 2000) полифазная кинетика ИФ интактных листьев *Peperomia metallica*, *Chenopodium album* и изолированных из них хлоропластов, получена при воздействии высокой интенсивности света и затем использована для фиттирования модели.

Автор принимает предположение, что интервал времени между квантами возбуждения составляет 100 мс . Получены аналитические выражения, связывающие выходы флуоресценции во временном интервале $0.01 \div 10 \text{ мс}$ на стадиях *O-J-I*- кинетики быстрой фазы кривой ИФ с фотохимическим выходом ФС 2 и выходом рекомбинации радикальной пары РЦ ФС2 . Модель учитывает электростатическое воздействие локальной плотности зарядов вблизи РЦ на скорость рекомбинации радикальной пары. Существенно предположение модели о том, что РЦ может быть в трех различных состояниях : открытом, полу- закрытом,

полностью закрытом. Эти состояния отличаются тем, что являются двух-, одно-, 0-электронными ловушками. Модель показывает, что выход флуоресценции определяется выходом рекомбинации радикальной пары.

1.3.мод.5. Модель, учитывающая процессы КВК и рекомбинации радикальной пары в закрытых РЦ..

Модель (Lazar 2003) дополняет процессы, рассмотренные в работе (Stirbet *et al.* 1998), описанием реакций переноса электрона на феофитин как в открытых (Q_A), так и в закрытых (Q_A^-) РЦ. Такое рассмотрение позволяет: (1) описать *O-J-I-(D)-P*- кинетику быстрой фазы кривой ИФ для различных значений световой константы, задающей высокие световые интенсивности; (2) моделировать минимальный уровень флуоресценции F_0 на временах, начиная от 3 нс и максимальный квантовый выход фотохимии ФС 2, выраженный отношением F_V/F_M .

1.3.3. Выводы о результатах моделирования процессов ФС2.

1) Принято считать, что источником переменной флуоресценции являются антенные комплексы ФС2.

3) Согласно результатам моделирования, особенности кинетики быстрой ИФ при разных световых интенсивностях невозможно объяснить одними только процессами ФС2. Необходима разработка моделей, включающих комплекс механизмов транстилакоидного переноса зарядов.

4) Редукция быстрых (относительно миллисекунд) процессов (Baake, Shloeder 1992) позволяет моделировать ход ИФ только на низких световых интенсивностях. Описание особенностей ИФ на высоких световых интенсивностях, когда частота квантов сравнима со скоростью переноса по механизму 2-х электронных ворот, можно моделировать (Stirbet *et al.* 1998; Lazar 2003) при полном рассмотрении переносов электрона в ФС2.