

ПРЯМОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО ТРАНСПОРТА ЭЛЕКТРОНОВ ВОКРУГ ФОТОСИСТЕМЫ 1

**Коваленко И.Б., Устинин Д.М., Грачев Н.Е., Грачев Е.А.,
Ризниченко Г.Ю.**

(Москва)

Построена многочастичная модель циклического Fd-зависимого электронного транспорта вокруг PSI, дающая возможность «прямого» моделирования процессов переноса электрона в мультиферментных комплексах и ограниченной диффузии подвижных переносчиков в отдельных компартментах системы (строма, люмен, внутримембранное пространство). Результаты прямого моделирования указывают на важную роль пространственной организации системы в формировании кинетики редокс-превращений P700.

DIRECT MODELING OF CYCLIC ELECTRON TRANSPORT AROUND PHOTOSYSTEM 1

**Kovalenko I.B., Ustinin* D.M., Grachev* N.E., Grachev* E.A.,
Riznichenko G.Yu.**

(Moscow)

A multi-particle model of ferredoxin-dependent cyclic electron transport around PSI, which gives the possibility of “direct” modeling of electron transfer processes in multi-protein complexes and limited diffusion processes in different compartments of the system (stroma, lumen, intermembrane space), is created. The results of the direct model reveal the important role of spatial organization of the system in forming kinetics of redox turnover of P700.

Циклический транспорт электронов – это процесс, в котором ФС1 под действием света катализирует окисление пластоцианина на люменальной поверхности мембраны тилакоида и восста-

новление ферредоксина на стромальной стороне мембраны. Для понимания процесса необходимо знать участников, возможные пути электронного транспорта и характеристики взаимодействий переносчиков на отдельных стадиях процесса.

Результаты последних исследований методами рентгеноструктурного анализа, электронной и атомно-силовой микроскопии [1] дают подробные данные о структуре компонентов ЦТЭ. Спектральные методы позволяют наблюдать кинетику окислительно-восстановительных превращений отдельных переносчиков. Интеграция структурных и кинетических данных возможна в виде математической модели. До настоящего времени большинство моделей, описывающих первичные процессы фотосинтеза представляли собой системы дифференциальных уравнений, переменными в которых выступали вероятности состояний мультиферментных комплексов или концентрации подвижных переносчиков электрона [2-5]. В этих моделях в той или иной форме используется закон действующих масс, предполагающий свободную диффузию и случайный характер взаимодействий подвижных переносчиков с компонентами мультиферментных комплексов.

Метод моделирования первичных процессов с помощью кинетических моделей имеет ряд недостатков. Главный из них – трудность учета пространственной структурной неоднородности системы. В нативной тилакоидной мембране взаимодействия мультиферментных комплексов с подвижными переносчиками осуществляются в разных компартментах системы (в строми – с Fd, в липидном слое мембраны – с PQ, в люмене – с Pс) (см. рис. 1). По крайней мере в двух из этих компартментов – внутримембранном пространстве и люмене в силу сравнимости их геометрических размеров и размеров встроенных в них белковых комплексов далеко не обеспечиваются возможности свободной диффузии. Последние данные [6, 7] показывают, что фотосинтетические реакционные центры в тилакоидной мембране расположены настолько близко друг к другу, что ни о какой свободной диффузии компонентов не может быть и речи, необходимо рассматривать ограничения движения реагентов. Нельзя априори считать диффузию свободной и в стромальном пространстве. В самом деле, хотя стромальное пространство и дос-

таточно обширно, однако вблизи мембраны в силу наличия мембранных белковых комплексов диффузию уже нельзя считать свободной.

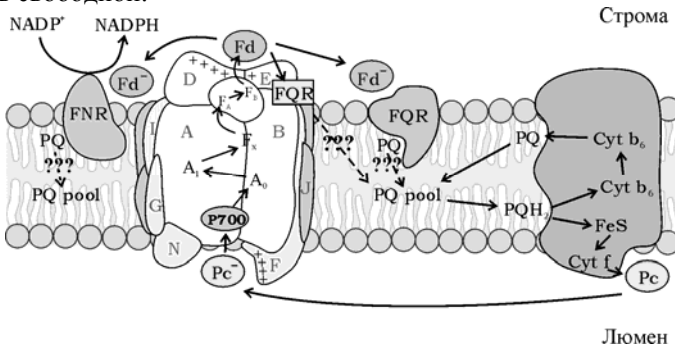


Рис. 1. Организация циклического транспорта электронов в хлоропластах. Показаны мембрана тилакоида и компоненты цепи ЦЭТ: комплексы PSI, FQR, FNR и комплекс цитохромов b_6/f , а также подвижные переносчики электрона Pc, Fd и Q. Знаки вопроса отмечают вероятные пути переноса электронов, где механизм транспорта не установлен.

При кинетическом подходе к моделированию представляют трудности моделирование докинга, то есть образования комплекса подвижной молекулы, например, Pc, с мультиферментным комплексом, например, комплексов реакционного центра фотосистемы 1. Процесс «заякоривания» молекулы определяется не только вероятностью столкновения с донорной частью комплекса, но и тем, насколько близко окажутся при этом активные центры, то есть необходимо рассматривать, какие части реагирующих макромолекул сближаются.

При описании системы с помощью дифференциальных уравнений естественным образом затруднено моделирование конформационных переходов и других процессов, связанных с пространственной структурой и особенностями функционирования как самих реагентов, так и их окружения. Все эти особенности могут быть воспроизведены при использовании метода «прямого» или многочастичного моделирования.

В нашей работе построена многочастичная модель функционирования циклического транспорта вокруг PSI с участием всех представленных на рис. 1 компонентов.

Модель представляет собой трехмерную сцену (рис. 2), в ко-

тую включены: мембрана тилакоида, внутритилакоидное пространство, люменальное пространство. На сцене находятся фиксированные в данной версии модели мультиферментные комплексы (PSI, цитохромный комплекс, FQR) и подвижные переносчики электрона (Pc, Fd, PQ).

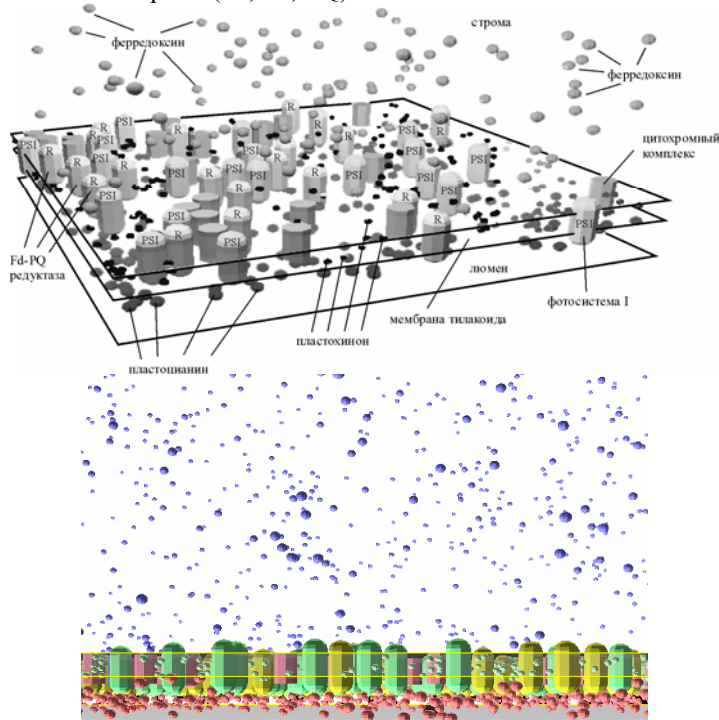


Рис. 2. Визуализация трехмерной сцены «прямой» модели циклического транспорта электронов. Показаны часть мембраны тилакоида, люменальное и стромальное пространства. Вверху: вид сверху под углом. Внизу: вид сбоку, в плоскости тилакоидной мембраны.

Для моделирования движения Pc, Fd, PQ в пространствах соответствующих компартментов использовался математический аппарат описания броуновского движения, с учётом геометрических ограничений, налагаемых сформированной модельной сценой. Предполагается, что движение частицы происходит в

вязкой среде под действием случайной силы, возникающей из-за столкновений с молекулами среды. Как показано в [8], для описания такого процесса можно использовать уравнение Ланжевена, описывающее изменение каждой координаты со временем под действием случайной силы: $\xi \frac{dx}{dt} = f(t)$, где ξ – коэффициент трения, $f(t)$ – случайная сила. Случайная сила распределена нормально с нулевым средним и дисперсией, равной $2kT\xi$. Здесь k – постоянная Больцмана, T – температура. Коэффициент трения для сферической частицы определяется по формуле $\xi = 6\pi\eta a$, где η – вязкость среды, a – радиус частицы. Это уравнение решается численно, причем шаг по времени dt подбирается таким, чтобы корень из дисперсии перемещения частицы на каждом шаге (среднее перемещение частицы на каждом шаге) был порядка одной десятой диаметра мобильного переносчика. Такой выбор шага обеспечивает приемлемую точность вычислений и время расчета. На боковых границах области моделирования были использованы тороидальные (периодические) граничные условия, также учитывалось отражение частиц от физических поверхностей, включая мембрану и белковые комплексы. Каждый из участников движения мог переносить или не переносить электрон, что при визуализации динамики системы в виде «мультифильма» изображалось условным изменением цвета частицы.

Состояния комплексов, механизмы взаимодействия комплексов и переносчиков, законы движения переносчиков задаются с помощью определенных правил. На использованном нами уровне детализации это выглядит следующим образом (рис. 2). Внутренняя часть тилакоида ограничена мембраной. Внутри тилакоида (в люмене) движутся частицы P_c , которые могут нести на себе электрон. Снаружи (в строме) движутся частицы F_d , которые тоже могут нести на себе электрон. Мембрану пронизывают комплексы PSI , цитохромные комплексы, белковые комплексы FQR . Концентрации и размеры комплексов выбирали в соответствии с литературными данными [1, 6, 9]. Комплексы PSI могут принять электрон от P_c , под действием света перенести его на другую сторону мембраны и передать ферредокси-

ну. В темноте этот механизм не работает. Освещенность в модели задается вероятностью переноса электрона с P700 на A, пропорциональной интенсивности света. Дальнейший циклический транспорт включает процесс окисления Fd (локализован в строме) и восстановления PQ (локализован внутри мембраны) с участием комплекса FQR. Окисление PQ и восстановление Pс (локализован в люмене) происходит с участием цитохромного трансмембранного комплекса по механизму Q-цикла. В свою очередь, Pс является донором для фотоактивного пигмента P700 (донорная часть комплекса PSI). Таким образом, цикл замыкается.

Механизм передачи электрона следующий: если частица подвижного переносчика в результате хаотического броуновского движения приближается к белковому комплексу на расстояние, меньшее некоторого эффективного радиуса взаимодействия между ними, то с некоторой вероятностью происходит посадка переносчика на комплекс. Эффективный радиус взаимодействия – это параметр модели, характеризующий максимальное расстояние, при котором возможен докинг. Эффективные радиусы взаимодействия выбирали равными размерам взаимодействующих белков, т.е. докинг происходил, когда переносчик сталкивался с комплексом. Вероятность посадки на комплекс также является параметром модели. Оценить эффективные радиусы взаимодействия и вероятности посадки подвижных переносчиков на комплексы можно, исследуя влияние этих величин на кинетические константы взаимодействия, например, Pс и PSI. Так, зная (из эксперимента) константу восстановления P700 (взаимодействия P700 с Pс), мы можем подобрать эффективный радиус и вероятность докинга таким образом, чтобы частота актов восстановления P700 в модели находилась в согласии с экспериментальным значением кинетической константы (характерным временем) восстановления P700. После докинга проходит некоторое время dt (параметр модели), характеризующее скорость последующих конформационных изменений комплекса PS и Pс. Затем происходит собственно передача электрона, после чего комплекс распадается, и окислившийся пластоцианин возобновляет броуновское движение.

Построенная прямая модель позволяет моделировать наблю-

даемые в эксперименте кинетические кривые восстановления фотоокисленного P700 и изучать кинетику других переменных модели. Кроме того, прямое моделирование дает возможность изучать зависимость характеристик системы от пространственных особенностей распределений пигмент-белковых комплексов в мембране, геометрических параметров мембраны и внутритилакоидного пространства, геометрических размеров и формы переносчиков, особенностей докинга подвижных переносчиков на молекулярных комплексах и других характеристик системы.

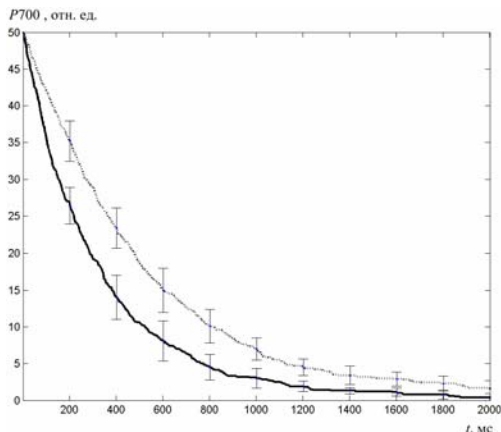


Рис. 3. Кинетика восстановления фотоокисленного P700⁺ для случая равномерного распределения комплексов PSI, цит b₆/f и FQR на мембране тилакоида (пунктирная линия) и случая, когда PSI и цит b₆/f образуют комплекс (сплошная линия). Изображены кинетические кривые, усредненные по десяти реализациям вычислительного эксперимента.

В качестве примера на рис. 3 представлены две кривые темнового восстановления P700⁺, полученные на прямой модели. Пунктирная линия соответствует равномерному распределению комплексов PSI, цит b₆/f и FQR на мембране тилакоида. Сплошная линия соответствует случаю, когда комплексы PSI и цит b₆/f расположены близко друг от друга и образуют единый комплекс (суперкомплекс). В обоих случаях кинетические кривые хорошо аппроксимируются одной экспоненциальной кривой. В случае, когда PSI и цит b₆/f образуют суперкомплекс, характерное время восстановления уменьшается. Это объясняется тем, что P_c не

требуется диффундировать от цитохрома к PSI, и, таким образом, перенос электрона происходит значительно быстрее. Возможность существования такого суперкомплекса обсуждалась в работе [10]. Отметим, что если комплексы PSI и FQR расположены близко друг к другу, а цитохромные комплексы расположены случайно, то кинетика темнового восстановления $P700^+$ не меняется по сравнению со случайным распределением всех трех типов комплексов. По видимому, это связано с тем, что лимитирующей стадией является перенос электрона с PQ на Pс через цитохромный b_6/f комплекс.

ОБСУЖДЕНИЕ

При моделировании процессов переноса электрона при фотосинтезе традиционно используется кинетический подход. Для описания переноса электрона в мультиферментных комплексах используют уравнения для вероятностей состояний этих комплексов, взаимодействие с подвижными переносчиками описывают с помощью уравнений действующих масс [11, 12]. Моделирование переноса электрона в выделенных фрагментах PSI в присутствии искусственных доноров и акцепторов электрона и идентификация параметров системы были выполнены в работах [12-14]. Применение закона действующих масс для описания редокс реакций добавленных подвижных переносчиков с комплексами фотосинтетических реакционных центров здесь в большой мере оправдано тем, что взаимодействие свободно диффундирующих комплексов с экзогенными донорами и акцепторами происходит в растворе. В то же время в нативных мембранах тилакоидов структурная организация процессов такова, что приближение свободной диффузии представляется далеким от реальности.

В последние годы получено большое количество данных о структуре и регуляции фотосинтетических процессов, которые требуют осмысления в рамках единой функциональной схемы. Принципиальную возможность интеграции структурных и кинетических представлений дают современные методы объектно-ориентированного программирования и доступность многократно возросших вычислительных ресурсов. В связи с этим представляется весьма перспективным метод прямого моделирования, первая попытка применить который для описания цик-

лического переноса электронов вокруг PSI в стромальной части тилакоида предпринята в данной работе.

Прямое моделирование позволяет уточнить правомерность подходов, используемых при кинетическом моделировании и выяснить пределы его применимости. Возникает возможность выяснить на прямой модели, какое влияние оказывают структурные особенности отдельных компонентов и всей системы в целом на величины констант скоростей реакций и другие параметры, используемые в кинетической модели. Прояснить роль пространственной неоднородности системы, например, типа распределений мультиферментных комплексов в мембране тилакоида. Все эти вопросы, а также роль и влияние электрических и электрохимических потенциалов, которые не рассматривались в предложенной в данной статье модели, представляют предмет дальнейшего исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №03-04-49048, №01-07-90131).

Литература.

1. Malkin, R. and K. Niyogi, *Photosynthesis*, in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, R. Jones, Editor. 2000, American Society of Plant Physiologists.
2. Лебедева Г.В. Беляева Н.Е., Ризниченко Г.Ю., Демин О.В., 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.
3. Лебедева Г.В. Беляева Н.Е., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б., Демин О.В. *Кинетическая модель фотосистемы II высших растений.* Журнал физ. химии, 2000. 74(10): С. 1874-1883.
4. Stirbet, A., Govindjee, Strasser, B.J., Strasser, R.J. *Chlorophyll a fluorescence induction in higher plants: modelling and numerical simulation.* J. Theor. Biol., 1998. 193: p. 131-151.
5. Riznichenko, G.Yu., Lebedeva, G.V., Demin, O.V., Belyaeva, N.E., Rubin, A.B. *Kinetic mechanisms of biological regulation in photosynthetic organisms.* J. Biol. Phys., 1999. 25: p. 177-192.
6. Albertsson, P.-A., *A quantitative model of the domain structure*

- of the photosynthetic membrane*. TRENDS in Plant Science, 2001. 6(8): p. 349-354.
7. Hope, A.B., *Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms*. Biochimica et Biophysica Acta, 2000. 1456: p. 5-26.
 8. Дой, Эдвардс. Динамическая теория полимеров. М.: Мир, 1999.
 9. Albertsson, P.-A., *The domain structure and function of the thylakoid membrane*. Recent Res. Devel. Bioener., 2000. 1: p. 143-171.
 10. Bendall, D.S. and R.S. Manasse, *Cyclic photophosphorylation and electron transport*. Biochimica et Biophysica Acta, 1995. 1229: p. 23-38.
 11. Рубин, А.Б. *Биофизика*. 2 ed. Т. 2. 2000, Москва: Книжный дом "Университет".
 12. Ризниченко, Г.Ю. *Математические модели первичных процессов фотосинтеза*. ВИНТИ, 1991. 31.
 13. Riznichenko, G.Y., Vorobjeva, T.N., Chrabrova, E.N., Rubin, A.B. *Identification of kinetic parameters of plastocyanin and P700 interactions in chloroplasts and pigment-protein complexes of photosystem I*. Photosynthetica, 1990. 24(3): p. 37-51.
 14. Воробьева Т.Н., Кренделева Т.Е., Ризниченко Г.Ю., Шайтан К.В., Рубин А.Б. *Функциональная роль пластоцианина в электронном транспорте во фрагментах фотосистемы I. Математическая модель и физические параметры*. Молекулярная биология, 1983. 17: С. 82-91.