УДК 577.3

МНОГОЧАСТИЧНОЕ КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В МЕМБРАНЕ ТИЛАКОИДА

© 2007 г. И.Б. Коваленко, А.М. Абатурова, Д.М. Устинин, Г.Ю. Ризниченко, Е.А. Грачев*, А.Б. Рубин

Биологический и физический (*) факультеты

Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы Поступила в редакцию 03.11.06 г.

Работа посвящена разработке метода многочастичного компьютерного моделирования процессов фотосинтетического электронного транспорта в тилакоидной мембране, основы которого описаны в нашей предыдущей работе. Метод использован для описания процессов циклического транспорта электронов вокруг фотосистемы І. Изучены влияние размеров и формы реакционного объема на кинетические характеристики процесса взаимодействия подвижного переносчика и комплекса и ограниченная диффузия реагентов. Показано, что кинетические параметры системы первичных процессов фотосинтеза зависят от характера распределения комплексов на фотосинтетической мембране. Показано, что несвободный характер диффузии молекул пластохинона в мембране приводит к уменьшению эффективного коэффициента диффузии на порядок. Показано, что наличие двух фаз процесса темнового восстановления фотоокисленного Р700⁺ определяется пространственной неоднородностью системы первичных процессов электронного транспорта в мембране тилакоида.

Ключевые слова: фотосистема I, циклический электронный транспорт, многочастичная компьютерная модель, латеральная диффузия.

ГЕТЕРОГЕННЫЙ ХАРАКТЕР ПРОЦЕССОВ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ

Попадание кванта света в фотосинтетический реакционный центр зеленых растений и водорослей инициирует разделение зарядов и последующий транспорт электрона по цепи переносчиков. Система электронного транспорта включает принципиально разные стадии: перенос электрона внутри мультиферментных комплексов фотосистемы I (ФС I), фотосистемы II (ФС II) и цитохромного bf-комплекса, перенос электрона подвижными переносчиками Pc, Fd и PQ, а также взаимодействие комплексов и подвижных переносчиков. Комплексы встроены в мембрану тилакоида и распределены в мембране неоднородно. Тилакоидная мембрана имеет сложную пространственную организацию. Часть мембран формируют стопки (граны), в них находятся комплексы ФС II. ФС I

встречается в выдающихся в строму участках тилакоидной мембраны. Цитохромный bf-комплекс распределен в мембране однородно (рис. 1). В работе [1] предложена модель пространственной организации тилакоидной мембраны хлоропласта, согласно которой сворачивание одной длинной тилакоидной везикулы с единым интратилакоидным пространством (люменом) приводит к образованию гранальных стопок.

Каждый из подвижных переносчиков может перемещаться в своем компартменте тилакоида



Рис. 1. Организация мембраны тилакоида в хлоропласте.

Сокращения: ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II, суг $b_6 f$ – цитохромный $b_6 f$ -комплекс, суг f – цитохром f, РЦ – реакционный центр, Рс – пластоцианин, Fd – ферредоксин, РQ – пластохинон, Р700 – хлорофилл РЦ PSI, FQR – Fd-PQ-оксидо-редуктаза.

(Pc – в люмене, Fd – в строме и PQ – в липидном слое мембраны). Молекулы пластоцианина окисляют цитохромный bf-комплекс и восстанавливают реакционный центр ФСІ, диффундируя в люминальном пространстве на довольно большие расстояния (сотни нанометров) и перенося электроны между гранальными и стромальными областями в тилакоидах [2-4]. Изменение отношения концентрации Рс в гранальной и стромальной областях во время перехода свет-темнота было интерпретировано как подтверждение диффузии пластоцианина между этими компартментами [5]. В нативном хлоропласте толщина люмена (4 – 10 нм [6]) сравнима с размерами пластоцианина, а люмен заполнен выступающими частями трансмембранных мультиферментных комплексов [7], концентрация которых в тилакоидной мембране очень высока [8]. Поэтому в люмене не обеспечиваются возможности свободной диффузии пластоцианина.

Пластохинон диффундирует внутри мембраны, более 50% объема которой занято трансмембранными белками [9]. В работе [10] проанализировано движение молекулы PQ в мембране, однородно заполненной комплексами, и сделано предположение о существовании белковых диффузионных микродоменов в тилакоидной мембране. В пределах одного такого микродомена пластохинон диффундирует с высокой скоростью, но для перехода в другие домены требуется значительно большее время. Несмотря на то, что молекулы ферредоксина диффундируют в водной фазе (строме), вблизи тилакоидной мембраны диффузия ферредоксина также может быть затруднена выступающими частями белковых комплексов.

Таким образом, для всех подвижных переносчиков описание переноса электрона с помощью уравнений химической кинетики является весьма приближенным и не соответствует современным представлениям о гетерогенном характере мембраны. Необходимо рассматривать броуновское движение подвижных переносчиков в неоднородной среде.

Общепринятыми в настоящее время являются кинетические модели, базирующиеся на аппарате обыкновенных дифференциальных уравнений и использующие закон действующих масс для описания реакции подвижного переносчика и комплекса и уравнения вероятности состояний комплекса для описания переноса электрона внутри комплекса [11–14]. При этом сам процесс диффузии подвижного переносчика непосредственно не рассматривется. Такие модели не позволяют учесть сложную пространственную организацию мембраны тилакоида и неоднородное распределение комплексов на

БИОФИЗИКА том 52 вып.3 2007

мембране. В работе [15] построена математическая модель функционирования тилакоида как пространственно-неоднородной системы с распределением электроннеравномерным транспортных и АТФ-синтазных комплексов в латеральном направлении тилакоидной мембраны. Однако эта модель не позволяет описать локальные флуктуации концентраций подвижных переносчиков и протонов, а также затрудненную диффузию подвижных переносчиков в люмене и мембране. Модели, основанные на методе броуновской динамики, позволяют подробно описать диффузию одного подвижного переносчика и его связывание с мультиферментным комплексом [16-20]. Однако для описания процессов, происходящих в мембране, где присутствует множество комплексов, подвижных переносчиков и препятствий для диффузии, этот метод уже не применим.

Необходимость учета деталей пространственной и функциональной организации требует поиска новых подходов к моделированию субклеточных процессов, в частности первичных процессов фотосинтеза в тилакоидной мембране, где физические и биологические представления о механизмах отдельных процессов могут быть объединены в общую картину в рамках компьютерной модели. Такой подход мы называем «прямым моделированием» субклеточных процессов [21,22]. Такого рода прямая (многочастичная, имитационная) модель может включать в себя различные формализмы описания отдельных стадий процессов, отличающихся кинетическими механизмами.

В предыдущих работах [21,22] был описан метод прямого многочастичного моделирования электронного транспорта в мембране тилакоида. Настоящая статья посвящена развитию этого метода, изучению влияния размеров и формы реакционного объема на кинетические характеристики процесса взаимодействия подвижного переносчика и комплекса, ограниченной диффузии реагентов. Модель использована для описания процессов циклического транспорта электронов вокруг ФС I.

ОПИСАНИЕ ПРЯМОЙ МОДЕЛИ

Многочастичная модель является компартментальной и представляет собой трехмерную сцену (рис. 2), в которую включены мембраны тилакоида, люминальное и стромальное пространства. Описание алгоритма генерации трехмерной модельной сцены приведено в [23]. Для моделирования движения подвижных переносчиков Рс, Fd и PQ в пространствах соответствующих компартментов в построенной многочастичной модели используется математический аппарат описания броуновского движения с уче-



Рис. 2. Визуализация прямой модели электронного транспорта.

том геометрических ограничений, налагаемых сформированной модельной сценой [1]. На каждом шаге направление движения молекулы меняется произвольно, а величина скорости подчиняется нормальному распределению. Электростатическое взаимодействие играет важную роль в процессах взаимодействия комплексов и подвижных переносчиков электрона и более подробно описано нами в работе [24].

Мы рассматриваем три стадии переноса электрона подвижным переносчиком: (1) броуновскую диффузию подвижного переносчика в пространстве соответствующего компартмента; (2) сближение с мультиферментным комплексом за счет действия электростатических сил притяжения между молекулами, взаимную ориентацию молекул в пространстве и образование комплекса, в котором возможен транспорт электрона; (3) перенос электрона в комплексе.

Механизм взаимодействия подвижного переносчика и комплекса и передачи электрона следующий: если частица подвижного переносчика в результате хаотического броуновского движения приближается к белковому комплексу



Рис. 3. Модельная реализация взаимодействия подвижного переносчика и комплекса.

на расстояние, меньшее некоторого эффективного радиуса взаимодействия между ними, то с некоторой вероятностью происходит посадка переносчика на комплекс (рис. 3). Построенная многочастичная модель позволяет учесть прямые и обратные реакции образования и распада комплекса и электронного транспорта внутри комплекса.

ПАРАМЕТРЫ ПРЯМОЙ МОДЕЛИ

Поведение прямой модели задается набором параметров: коэффициентами диффузии подвижных переносчиков, вероятностями связывания подвижных переносчиков и комплексов, эффективными радиусами взаимодействия молекул, характерными временами переноса электрона в комплексах. В результате прямого моделирования окислительно-восстановительного процесса мы получаем кривую зависимости редокс-состояния для каждого типа переносчика от времени, т.е. кинетическую кривую. Изменение параметров прямой модели приводит к изменению получаемых кинетических кривых.

Степень адекватности математического описания проверяется сравнением получаемой в прямой модели кинетической кривой с экспериментальными кривыми. Как правило, экспериментальные кинетические кривые принято интерпретировать в рамках кинетических моделей, т.е. характеризовать их набором кинетических параметров: амплитуд и констант скоростей. Поэтому кинетические кривые, получаемые в прямой модели, мы характеризовали



Рис. 4. Визуализация траектории движения молекулы пластохинона в мембране, заполненной комплексами ФС I и суt bf.

набором кинетических параметров, т.е. амплитудами и константами скорости.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ РАЗМЕРОВ И ФОРМЫ РЕАКЦИОННОГО ОБЪЕМА НА КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПОДВИЖНОГО ПЕРЕНОСЧИКА И КОМПЛЕКСА

На прямой модели исследовали зависимость кинетических характеристик бимолекулярной реакции взаимодействия подвижного переносчика Рс и комплекса ФС I в растворе от параметров прямой модели – радиуса взаимодействия и вероятности связывания. Изучаемая система имела кубическую форму объемом 125:10⁶ нм³, количество молекул пластоцианина и молекул ФС I было одинаково и равно 500, в начальный момент весь пластоцианин восстановлен, а Р700 окислен (рис. 4).

Кинетические характеристики исследуемой реакции $Pc^{I} + P_{700}^{+} \xrightarrow{k} Pc^{II} + P_{700}$ интерпретировались в рамках кинетической модели, т.е. полученная на прямой модели кривая восстановления P700 (рис. 5) характеризовалась константой скорости реакции k. Математически (в кинетическом подходе) исследуемая реакция описывается обыкновенным дифференциальным уравнением:

$$\frac{d[P_{700}^+]}{dt} = -k[Pc^1][P_{700}^+].$$

Если в начальный момент времени весь пластоцианин восстановлен, а Р700 окислен, и количество пластоцианина и Р700 одинаково, то решение этого уравнения:

БИОФИЗИКА том 52 вып.3 2007





$$[P_{700}^{+}](t) = \frac{Pc_0^{1}}{kPc_0^{1}t + 1} \tag{1}$$

где Pc_0^1 — начальная концентрация пластоцианина. Для нахождения константы скорости второго порядка *k* получаемые на многочастичной модели кинетические кривые восстановления P700 фитировали по формуле (1).

При исследовании зависимости константы скорости бимолекулярной реакции от эффективного радиуса взаимодействия вероятность докинга выбирали равной единице, т.е. молекулы реагировали между собой при каждом столкновении. Процесс переноса электрона считали быстрым по сравнению с процессами диффузии.

Результат моделирования приведен на рис. 6. Видно, что скорость бимолекулярной реакции линейно зависит от расстояния взаимодействия. Это находится в согласии с формулой Смолуховского, с помощью которой можно теоретически определить стационарную скорость диффузионно-контролируемой реакции [25]. Формула Смолуховского для скорости рассматриваемой реакции имеет вид:

$$v = 4\pi N_{\rm A} r (D_{\rm Pc} + D_{\rm P700}) c_{\rm Pc} c_{\rm P700}, \qquad (2)$$

где N_A – число Авогадро, r – расстояние, на котором происходит взаимодействие частиц (эффективный радиус взаимодействия), $c_{\rm Pc}$ и $c_{\rm P700}$ – концентрации веществ Рс и Р700. Формула Смолуховского выражает закон действующих масс: скорость бимолекулярной реакции (реакции второго порядка) в растворе линейно зависит от



Рис. 6. Зависимость константы скорости второго порядка реакции Рс и Р700 от эффективного расстояния взаимодействия при вероятности взаимодействия p = 1. Константа вычислена аппроксимацией кривой, полученной на прямой модели, по формуле (1).

произведения концентраций соответствующих веществ. Величина $k = 4\pi N_A r (D_{Pc} + D_{P700})$ является константой скорости реакции второго порядка. Заметим, что константа скорости пропорциональна радиусу взаимодействия частиц.

Значения константы скорости реакции второго порядка k, вычисленные по формуле $k = 4\pi N_A r(D_{Pc} + D_{P700})$, примерно совпадают со значениями, полученными в численном эксперименте на прямой модели. Несовпадение появляется из-за того, что при выводе формулы Смолуховского (2) делается предположение о малости расстояния взаимодействия по сравнению со средним расстоянием между молекулами, что не реализуется полностью в многочастичной модели. Из результатов многочастичного моделирования также следует, что скорость реакции пропорциональна концентрациям Рс и Р700, что и должно наблюдаться при наблюдении реакции второго порядка, происходящей в объеме, в соответствии с законом действующих масс.

При исследовании зависимости константы скорости от формы реакционного объема в прямой модели изменяли размеры системы при постоянном объеме, при этом геометрически система представляла собой прямоугольный параллелепипед с квадратным основанием (рис. 7). Расстояние взаимодействия выбрали равным 3 Å. Вычислительный эксперимент показал, что если вероятность образования комплекса близка к единице и средний путь, который частица проходит до реакции с комплексом в результате броуновского движения, сравним с расстоянием между комплексами, то закон действующих масс (формула Смолуховского (2)) перестает



Рис. 7. Визуализация модели взаимодействия подвижных переносчиков и комплексов на выделенных частицах в растворе (пример: ФС I (PSI) и Pc, не в масштабе).

точно описывать кинетику реакции. Так, если система имеет кубическую форму 500 × 500 × 500 нм, то кривая восстановления Р700 при вероятности докинга p = 1 хорошо аппроксимируется формулой (1), при этом константа скорости реакции второго порядка $k = 1,14\cdot10^8$ $M^{-1}c^{-1}$ (рис. 8, нижняя кривая). Форма кривой и вычисленная константа скорости остаются неизменными при уменьшении высоты системы



Рис. 8. Кинетика восстановления Р700⁺ после вспышки, полученная на прямой модели. Нижняя кривая – для кубического объема (константа вычислена аппроксимацией по формуле 1), верхняя – для параллелепипеда с соотношением высота/ширина порядка 1:100 (представление модельной кривой темнового восстановления Р700⁺ в виде суммы двух убывающих экспонент: $A(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$, где A_1 , A_2 – амплитуды и τ_1 , τ_2 – характерные времена быстрого и медленного компонентов соответственно).

БИОФИЗИКА том 52 вып.3 2007

k, 10⁷ M

60

при постоянном объеме вплоть до 100 нм. При дальнейшем уменьшении высоты параллелепипеда наблюдаются расхождения между вычисленной по формуле (2) и модельной кривой восстановления Р700⁺. Например, при размерах системы 2235 × 2235 × 25 нм вычисленная по формуле (2) и модельная кривые не совпадают ни при каком значении константы k. Аппроксимация модельной кривой функцией суммы двух экспонент показывает, что кривая является двухкомпонентной (рис. 8, верхняя кривая). Компоненты имеют характерные времена τ_1 = 67 мкс и т₂ = 577 мкс. Такое поведение модельной системы можно объяснить тем, что формула Смолуховского (закон действующих масс) выведены для случая реакции в объеме, а модельная система приближается к двумерному случаю. Кинетика взаимодействия белков в мембране отличается от обычной кинетики реакций в объеме [26].

На прямой модели мы также исследовали зависимость константы скорости бимолекулярной реакции от вероятности докинга при равномерном распределении комплексов ФС I и подвижных переносчиков Рс в пространстве и отсутствии других типов комплексов и подвижных переносчиков (рис. 7). Характерное расстояние взаимодействия Рс и Р700 приняли равным 4 нм, коэффициент диффузии Рс равным 0,137 нм²/нс, концентрации Р700 и пластоцианина равными 0,2 мкМ. Результат представлен на рис. 9.

Зависимость имеет вид кривой с насыщением. В области высоких вероятностей докинга, когда вероятность близка к единице, константа скорости слабо зависит от вероятности взаимодействия. Это может быть объяснено тем, что характерное время докинга (время, за которое частица связывается с комплексом, находясь внутри сферы с радиусом взаимодействия; это время определяется вероятностью докинга) меньше среднего времени, проводимого частицами внутри сферы с радиусом взаимодействия. Среднее время, проводимое частицами внутри сферы с радиусом взаимодействия, зависит от коэффициента диффузии частиц и радиуса взаимодействия. При быстрой диффузии это время незначительно, и частица может покинуть сферу с радиусом взаимодействия, так и не связавшись с комплексом. В области низких вероятностей докинга (р << 1) константа скорости оказывается пропорциональной вероятности докинга.



Рис. 9. Зависимость константы скорости второго порядка реакции Рс и Р700 от вероятности взаимодействия при расстоянии взаимодействия r = 4нм. Константа вычислена аппроксимацией кривой, полученной на прямой модели, по формуле (1).

ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФФУЗИИ ЧАСТИЦ С УЧЕТОМ ГЕОМЕТРИЧЕСКИХ ОГРАНИЧЕНИЙ, НАЛАГАЕМЫХ МОДЕЛЬНОЙ СЦЕНОЙ

На построенной многочастичной модели мы сравнивали коэффициент свободной диффузии пластохинона, т.е. вычисленный в предположении свободного трехмерного или двумерного движения, и эффективный коэффициент диффузии в мембране, заполненной комплексами ФС І и суt b₆/f. Оказывается, что если около 1/3 площади мембраны занято комплексами, то усредненный по всем частицам коэффициент диффузии на порядок меньше теоретического коэффициента свободной диффузии, что соответствует известным экспериментальным фактам (Blackwell, Gibas et al. 1994). Визуализация траекторий движения молекул пластохинона показывает, что в мембране образуются домены диффузии пластохинона (перколяционные кластеры, рис. 4). Возможность существования таких кластеров в гранальных областях тилакоидной мембраны обсуждается в [9].

ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ПРЯМОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ВЫДЕЛЕННЫХ ЧАСТИЦ В РАСТВОРЕ

Важную проблему прямого моделирования представляет оценка параметров прямой модели из экспериментальных данных, которые традиционно принято интерпретировать в рамках кинетических моделей. Некоторые из параметров, например, концентрацию или характер распределения комплексов на мембране, можно оценить, исходя непосредственно из экспериментальных данных (электронной и атомно-си-

8БИОФИЗИКА том 52 вып.3 2007

Значения параметров прямой модели для реакции Рс и Р700 (p – вероятность, т – характерное время процесса). Верхними индексами I и II обозначен восстановленный и окисленный Рс, знаком + обозначена ФС I с окисленным Р700

p _{on} ^I	pon ^{1,+}	p _{on} ¹¹	Pon ^{II,+}	т _{off} ^I ,мкс	т _{off} ^{I,+} мкс	τ _{off} ^{II} ,мкс	$\tau_{off}^{II,+}$,мкс	τ _{et} ,мкс	τ _{bet} , мкс
0,09	0,09	0,009	0,009	420	420	150	90	17	220

ловой микроскопии). Другие параметры, например, вероятности посадки подвижных переносчиков на комплексы, эффективные расстояния взаимодействия, можно оценить, исследуя влияние этих величин на кинетические константы взаимодействия комплексов и подвижных переносчиков. Процессы взаимодействия подвижного переносчика и комплекса и оценки параметров прямой модели для такого взаимодействия рассмотрим на примере подвижного переносчика пластоцианина и мультиферментного комплекса фотосистемы I.

Ряд работ [7,27,28] посвящен исследованию взаимодействия подвижного переносчика Рс и реакционного центра фотосистемы І Р700, образованию комплекса между ними и переносу электрона в этом комплексе. В работах [7,28] исследовался перенос электрона между подвижным переносчиком пластоцианином и комплексом ФС І не в нативной тилакоидной мембране, а на выделенных частицах в реакционном объеме. Мы для этой цели построили многочастичную модель выделенных частиц в реакционном объеме и на основании сравнения мо-



Рис. 10. Серая толстая линия – кривая восстановления Р700, полученная на прямой модели. Значения параметров прямой модели приведены в тексте. Черная линия – представление модельной кривой темнового восстановления фотоокисленного Р700⁺ в виде суммы двух убывающих экспонент: $A(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$, где A_1, A_2 – амплитуды и τ_1, τ_2 – характерные времена быстрого и медленного компонентов соответственно. дельных и экспериментальных кинетических кривых определяли параметры прямой модели. При этом моделируемый реакционный объем выбирали кубической формы, комплексы и подвижные переносчики распределяли в реакционном объеме равномерно, в соответствии с использованными в эксперименте концентрациями [7,28], (рис. 7). Представляя модельную кинетическую кривую изменения редокс-состояния подвижного переносчика или комплекса в виде суммы двух убывающих экспонент, мы сравнивали характеристики модельной и экспериментальной кривых. Изменяя параметры прямой модели (вероятность связывания подвижного переносчика с комплексом, эффективное расстояние взаимодействия, характерное время переноса электрона), мы добивались совпадения экспериментальной и модельной кривых изменения редокс-состояний подвижного переносчика и комплекса.

Для моделирования экспериментальной ситуации, описанной в работе [28], были приняты следующие значения параметров прямой модели: моделируемый объем – куб 1 × 1 × 1 мкм, частицы ФС I и Рс распределены в объеме равномерно; начальное состояние – [Pc¹] = 10 мкМ, [P700⁺] = 0,1 мкМ, Рс восстановлен, P700 окислен; радиус ФС I – 50 Å, радиус Рс – 15 Å; коэффициент диффузии пластоцианина D = 10⁻¹⁰ м²/с; шаг интегрирования – 10 нс; эффективное расстояние взаимодействия ФС I и Рс r = 4 нм. Значения вероятностей и характерных времен представлены в таблице. Модельная кинетическая кривая восстановления Р700⁺ пластоцианином приведена на рис. 10.

Кинетические кривые, полученные на прямой модели, мы представляли в виде суммы двух убывающих экспонент. Зная значения параметров экспонент, приближенно вычисляли кинетические константы и времена реакции Рс и Р700. Мы получили значения кинетических констант и времен реакций, очень близкие к экспериментальным значениям, приведенным в работе [28].

ОПИСАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ С ПОМОЩЬЮ МНОГОЧАСТИЧНОЙ МОДЕЛИ

При кинетическом моделировании процессов, происходящих в разных компартментах



Рис. 11. Организация циклического транспорта электронов в хлоропластах. Показаны мембрана тилакоида и компоненты цепи ЦЭТ: комплексы PSI, FQR, FNR и комплекс цитохромов $b_{t/f}$, а также подвижные переносчики электрона Pc, Fd и Q. Знаки вопроса отмечают вероятные пути переноса электронов, где механизм транспорта не установлен.

системы, нередко встречаются ситуации, когда в эксперименте наблюдается многостадийная кинетика изменения состояний реагентов, при этом характерное время медленных компонентов намного превышает характерные времена элементарных реакций, входящих в изучаемый процесс. В кинетических моделях такие медленные компоненты не могут быть описаны без привлечения дополнительных гипотез об организации исследуемой системы. Однако, как мы покажем ниже на примере циклического транспорта электронов вокруг фотосистемы I, в основе медленных компонент могут лежать процессы диффузии реагентов, которые зачастую являются лимитирующими по скорости.

При циклическом транспорте электронов вокруг фотосистемы І процесс восстановления Р700 имеет две фазы – быструю с характерным временем около 0,2 с и медленную с характерным временем несколько секунд [29,30]. В [29] высказано предположение, что медленный компонент может представлять собой «довосстановление» Р700 от неспецифических доноров электронов, поскольку Р700 является сильным окислителем. Однако природа предполагаемого пула неспецифических доноров и акцепторов остается неясной. Как мы покажем ниже, природа быстрого и медленного компонентов сигнала восстановления Р700⁺ может быть объяснена с помощью метода прямого многочастичного моделирования процессов циклического транспорта электронов вокруг ФС I без привлечения дополнительных гипотез о существовании пулов неспецифических доноров и акцепторов.

Схема циклического транспорта электронов вокруг ФС I приведена на рис. 11. Комплекс ФС I под действием света катализирует окисление Рс на люменальной поверхности мембраны тилакоида и восстановление Fd на стромальной стороне мембраны, причем дальнейшее окисление Fd и восстановление пула PQ является участком, не совпадающим с линейным транспортом (циклический транспорт). Поскольку молекулы Fd локализованы в строме, а PQ является гидрофобным переносчиком и сосредоточен в липидном слое мембраны, вероятно, этот процесс происходит посредством мембранного экспонированного в строму белка, обладающего активностью Fd-PQ-оксидоредуктазы. Последующее окисление PQ приводит к восстановлению Рс (локализован в люмене), процесс происходит с участием цитохромного b,/f-комплекса в соответствии со схемой Q-цикла Митчелла.

На многочастичной модели исследовали процесс темнового восстановления фотоокисленного P700⁺. Временной шаг положили равным 100 нс. Концентрации и размеры комплексов выбирали в соответствии с литературными данными, вероятности посадки подвижных переносчиков на комплексы оценивали, исходя из значений констант скоростей соответствующих реакций (как описано выше). В начальный момент времени электроны находились на Р700, пластоцианине и частично в пуле пластохинонов. В численном эксперименте систему в течение 1,5 с освещали (насыщающее освещение), затем наблюдали кинетику темнового восстановления Р700⁺. В результате освещения наблюдалось изменение редокс-состояний участников электронного транспорта: восстановление пула пластохинонов и окисление пластоцианина и Р700, система достигала стационарного состояния. За время освещения восстановленный пластохинон равномерно распределялся в стромальных и гранальных областях мембраны.



Рис. 12. Толстая черная линия – кривая восстановления Р700 при наличии двух областей мембраны (стромальной и гранальной) при распределении комплексов в этих областях в соответствии с данными электронной микроскопии. Тонкая черная линия – представление модельной кривой темнового восстановления фотоокисленного Р700⁺ в виде суммы двух убывающих экспонент: $A(t) = A_1 \exp(-t/\tau_1) + A_2 \exp(-t/\tau_2)$, где A_1, A_2 – амплитуды и τ_1, τ_2 – характерные времена быстрого и медленного компонентов соответственно. Пунктирная линия – кривая восстановления Р700 при однородном распределении всех комплексов на мембране.

После выключения света электроны из пула пластохинонов продолжали поступать на пластоцианин через цитохромный комплекс. Это наблюдалось в обеих областях мембраны, стромальной и гранальной, т.к. цитохромный комплекс распределен в мембране однородно. В стромальной области восстановленный пластоцианин сравнительно быстро восстанавливает пигмент реакционного центра фотосистемы I Р700 (характерное время 200 мс), поскольку в стромальной области среднее расстояние между ΦC I и суt b_0/f невелико и составляет 20 нм [5]. Этот процесс соответствует быстрой фазе восстановления Р700⁺. Как в эксперименте, так и в модели быстрое восстановление Р700+ происходит не полностью, остается фракция окисленных Р700⁺. Многочастичная модель показывает, что причина этого в том, что часть электронов находится на пластохиноне и пластоцианине в гранальных областях мембраны, в которых отсутствует ФС I.

Модель показывает, что при дальнейшей диффузии молекул PQ и Pc электроны постепенно возвращаются в стромальную область мембраны и происходит дальнейшее восстановление P700⁺. Время этой фазы определяется геометрией и размерами мембраны и составляет от 1 до 10 с. Таким образом, результирующая кривая восстановления фотоокисленного Р700 приближенно представляет собой сумму двух экспонент (рис. 12). Многочастичная модель естественно объясняет наличие двух фаз темнового восстановления Р700 пространственной гетерогенностью системы. В рамках многочастичной модели нет необходимости в дополнительных предположениях о существовании пула неспецифических доноров и акцепторов.

Амплитуда и вклад быстрой компоненты, как показало моделирование редокс-превращений Р700, зависит от концентрации добавленного Fd. В эксперименте реакционную смесь освещали в течение 30 с интенсивным белым светом для образования пула восстановленного Fd, необходимого для функционирования циклического транспорта электронов [30]. Если степень восстановленности добавляемого Fd задана, общее число электронов в системе будет увеличиваться с увеличением концентрации Fd, в условиях, когда диурон блокирует приток электронов от ФС II и естественного донора электронов – системы разложения воды. Увеличение общего числа электронов в системе циклического транспорта приводит к увеличению амплитуды быстрой фазы восстановления Р700 и ее вклада, однако не влияет на ее скорость, которая определяется скоростями переноса электрона на отдельных стадиях циклического транспорта, остающимися неизменными.

Таким образом, кинетика темнового восстановления Р700⁺ определяется не только концентрациями и редокс-состояниями реагентов, но также пространственным распределением молекул реагирующих веществ, геометрией и размерами системы и особенностями процессов диффузии подвижных переносчиков. На многочастичной модели показано, что медленная фаза кривой восстановления фотоокисленного Р700+ при циклическом транспорте электронов вокруг ФС І является диффузионно-контролируемой стадией и определяется процессами диффузии восстановленных молекул пластохинона и пластоцианина из гранальной в стромальную области тилакоидной мембраны, а быстрая фаза представляет циклический транспорт с участием ферредоксина.

Результаты, полученные на прямой модели, соответствуют факту, что в темноте пластоцианин в основном сосредоточен в стромальных областях мембран, в межгранных тилакоидах, и при освещении перемещается в латеральном направлении из стромальных в гранальные области [5].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Классическим подходом к моделированию процессов фотосинтетического электронного и юнного транспорта является использование истем обыкновенных дифференциальных уравнений. При моделировании взаимодействия выцеленных фрагментов с экзогенными донорами и акцепторами в растворе применение классинеского кинетического подхода, не учитываюцего структурных особенностей изучаемой сисгемы, оправдано относительной гомогенностью системы. Однако система гранальных и строиальных ламелл в хлоропласте является компартментальной, существенно неоднородной системой, с гетерогенным распределением мульгиферментных комплексов на мембранах и «уз-«ими» пространствами для диффузии отдельных белков – подвижных переносчиков.

Описать пространственную структуру мем-5раны можно, используя метод прямого многочастичного компьютерного моделирования. С помощью этого метода могут быть воспроизведены такие особенности, как локальная пространственная неоднородность системы и «несвободность» диффузии подвижных переносиков в узких пространствах, заполненных белками.

В описанном методе моделирования учитызается латеральная гетерогенность распределения комплексов и подвижных переносчиков в мембране тилакоида, однако явно не учитывается сложная форма взаимодействующих белков и электростатические взаимодействия. В работе [24] нами была построена компьютерная модель взаимодействия пластоцианина и цитохрома f одного из компонентов цитохромного комплекса) в растворе. Эта модель достаточно подробно описывает форму белков и их электростатические взаимодействия. В дальнейшей работе планируется построить модель переноса электрона пластоцианином в люмене, которая, с одной стороны, учитывает сложную геометрию люминального пространства и гетерогенный характер распределения комплексов в мембране тилакоида, а с другой стороны, подробно описывает электростатические взаимодействия и форму белков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. P.-O. Arvidsson and C. Sundby, Aust. J. Plant Physiol. 26, 687 (1999).
- 2. А. Т. Мокроносов и В. Ф. Гавриленко, Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. (Изд-во МГУ, М., 1992).
- 3. A. B. Hope, Biochim. Biophys. Acta 1143, 1 (1993).

 E. L. Gross, in Oxygenic photosynthesis: the light reactions, Ed. by D. R. Ort, C. F. Yocum (Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996). Vol. 4, pp. 413-429.

501

- 5. W. Haehnel, R. Ratajczak, and H. Robenek, J. Cell Biol. 108, 1397 (1989).
- 6. M. Mehta, V. Sarafis, and C. Critchley, Aust. J. Plant Physiol. 26, 709 (1999).
- 7. A. B. Hope, Biochim. Biophys. Acta. 1456, 5 (2000).
- P.-A. Albertsson, TRENDS in Plant Science 6 (8), 349 (2001).
- 9. H. Kirchhoff, S. Horstmann, and E. Weis, Biochim. Biophys. Acta 1459, 148 (2000).
- 10. H. Kirchhoff, U. Mukherjee, and H.-J. Galla, Biochemistry 41, 4872 (2002)
- 11. Г. Ю. Ризниченко, Математические модели первичных процессов фотосинтеза, ВИНИТИ, № 31 (1991).
- A. Stirbet, Govindjee, B. J. Strasser, and R. J. Strasser, J. Theor. Biol. 193, 131 (1998).
- Г. В. Лебедева, Н. Е. Беляева, Г. Ю. Ризниченко и др., Журн. физ. химии 74 (10), 1874 (2000).
- Г. В. Лебедева, Н. Е. Беляева, О. В. Дёмин и др., Биофизика 47 (6), 1044 (2002).
- 15. А. В. Вершубский, В. И. Приклонский и А. Н. Тихонов, Биофизика 46 (3), 471 (2001).
- G. M. Ullmann, E.-W. Knapp, and N. M. Kostic, J. Am. Chem. Soc. 119, 42 (1997).
- D. C. Pearson, Jr. and E. L. Gross, Biophys. J. 75, 2698 (1998).
- 18. M. Ubbink, M. Ejdebeck, B. G. Karlsson, and D. S. Bendall, Structure 6, 323 (1998).
- F. Rienzo, R. Gabdoulline, M. Menziani, et al., Biophys. J. 81, 3090 (2001).
- E. L. Gross and D. C. Pearson, Jr., Biophys. J. 85, 2055 (2003)
- 21. И. Б. Коваленко, Д. М. Устинин, Н. Е. Грачев и др., Биофизика 48 (4), 656 (2003).
- И. Б. Коваленко, Д. М. Устинин, Н. Е. Грачев и др., Математика. Компьютер. Образование. 3, 243 (2003).
- И. Б. Коваленко, Д. М. Устинин, М. В. Сердобольская и др., В сб. научн. тр. VIII Междунар. конфер. из серии «Нелинейный мир». (ИПЦ «Факел», Астрахань, 2004). сс. 223–229.
- 24. I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, P. A. Gromov, et al., Phys. Biol. 3, 121 (2006).
- 25. А. Эйнштейн и М. Смолуховский, Броуновское движение (ОНТИ, Л., 1934).
- 26. А. Б. Рубин, Биофизика (Книжный дом «Университет», М., 2000).
- W. Haehnel, T. Jansen, K. Gause, et al., EMBO J. 13, 1028 (1994).
- F. Drepper, M. Hippler, W. Nitschke, and W. Haehnel, Biochemistry 35, 1282 (1996).
- 29. H. V. Scheller, Plant Physiol. 110, 187 (1996).
- 30. Т. Е. Кренделева, Г. П. Кукарских, К. Н. Тимофеев и др., Докл. АН 379 (5), 1 (2001).

Multiparticle Computer Simulation of Photosynthetic Electron Transport in a Thylakoid Membrane

I.B. Kovalenko*, A.M. Abaturova*, D.M. Ustinin*, G.Yu. Riznichenko*, E.A. Grachev**, and A.B. Rubin*

Biological (*) and Physical (**) Departments, Lomonosov Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119992 Russia

A method for multiparticle computer simulation of photosynthetic electron transport in a thylakoid membrane has been developed. The basic principles of this method were described previously [1]. The method is used to describe the cyclic electron flow around photosystem I. The effects of size and shape of the reaction volume on the kinetics of interaction of a mobile carrier with a protein complex and the limited diffusion of reactants were studied. It was shown that the kinetic parameters of photosynthetic electron transport processes depend on the distribution of protein complexes in the membrane. It was shown that the limited nature of diffusion coefficient. It was shown that the occurrence of two phases of dark reduction of photosxidized P700⁺ is due to a heterogeneous spatial organization of the thylakoid membrane of a chloroplast.

Key words: photosystem I, cyclic electron transport, multiparticle computer model, lateral diffusion