

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ЦИКЛИЧЕСКОГО ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА ВОКРУГ ФОТОСИСТЕМЫ I

© 2003 г. И.Б. Коваленко, Д.М. Устинин*, Н.Е. Грачев*, Т.Е. Кренделева, Г.П. Кукарских, К.Н. Тимофеев, Г.Ю. Ризниченко, Е.А. Грачев*, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы;

*Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 28.04.03 г.

На изолированных хлоропластах гороха (*Pisum sativum*) проведено экспериментальное исследование кинетики фотоиндуцированного сигнала ЭПР I, отражающего изменение степени восстановленности P700 – фотоактивного пигмента фотосистемы I, при различных концентрациях экзогенного ферредоксина. Предложена кинетическая модель циклического ферредоксинзависимого электронного транспорта вокруг фотосистемы I. Построена многочастичная модель, позволяющая осуществлять «прямое» моделирование процессов переноса электрона в мультиферментных комплексах и ограниченной диффузии подвижных переносчиков в отдельных компартментах системы (stroma, ломен, внутримембранное пространство). Сравнение результатов кинетического и прямого моделирования указывает на важную роль пространственной организации системы в формировании кинетики редокс-превращений P700.

Ключевые слова: фотосистема I, циклический электронный транспорт, кинетическая модель, многочастичная модель, ферредоксин.

Кроме линейного фотосинтетического транспорта электронов от воды на NADPH в хлоропластах высших растений и водорослей существует циклический электронный транспорт, который представляет собой чувствительный к антимицину А перенос заряда с акцепторной стороны фотосистемы I (PS I) в пул хинонов. Физиологический смысл циклического транспорта электронов заключается в генерации дополнительного протонного градиента, а также в предотвращении окислительного стресса при больших интенсивностях света. Результаты проведенных экспериментальных исследований, в том числе ингибиторного анализа, свидетельствуют об участии в циклическом транспорте молекул пластохинона (PQ) и цитохромного b_6/f комплекса (рис. 1) [1–4].

Характеристики циклического транспорта в изолированных хлоропластах в сильной степени зависят от концентрации добавленного ферре-

доксина (Fd), что указывает на участие молекулы этого подвижного переносчика в данном процессе. Однако возникает вопрос о механизме переноса электрона с Fd, который является гидрофильным переносчиком и локализован в строма, на пластохинон, гидрофобные молекулы которого локализованы в тилакоидной мембране (см. рис. 1). В ряде работ [4–7] было предложено несколько схем взаимодействия, в том числе с участием гипотетического мембранного фермента ферредоксин-хинон-редуктазы (FQR) (изображен на рис. 1), который до настоящего времени не идентифицирован. Одно из предположений состоит в том, что в роли белка, обладающего Fd-PQ-редуктазной активностью, может выступать ферредоксин-NADPH-редуктаза (FNR), однако существуют аргументы как за, так и против данного предположения [1,2,5,8].

Нами проведено экспериментальное исследование кинетики фотоиндуцированного сигнала ЭПР I, соответствующего изменению степени восстановленности P700 – фотоактивного пигмента фотосистемы I, при различных концентрациях добавленного ферредоксина, во вре-

Сокращения: PS I – фотосистема I, Fd – ферредоксин, PQ – пластохинон, FQR – ферредоксин-хинон-редуктаза, FNR – ферредоксин-NADPH-редуктаза, Pс – пластоцианин.

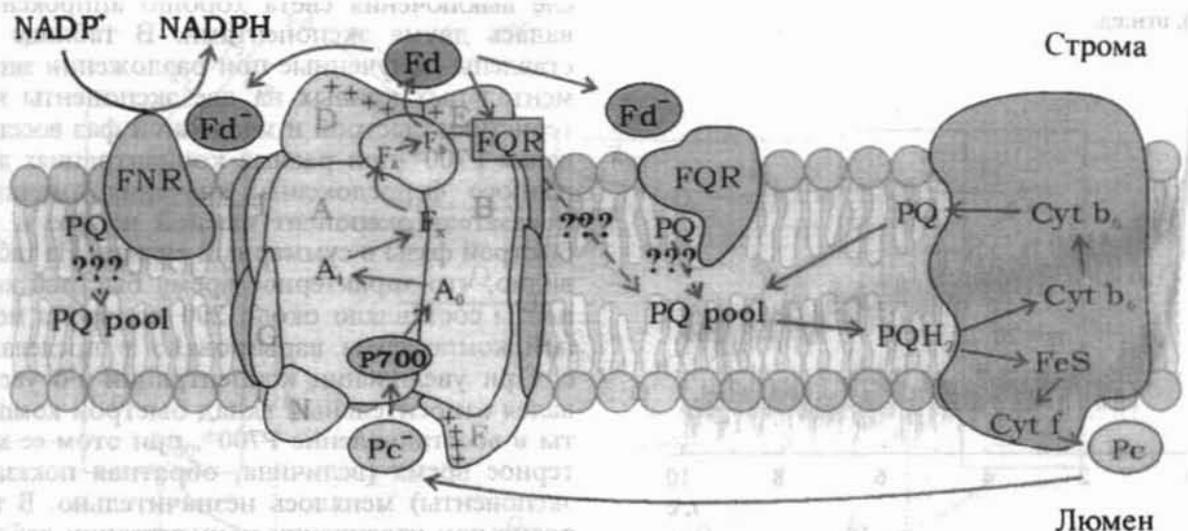


Рис. 1. Организация циклического транспорта электронов в хлоропластах. Показаны мембрана тилакоида и компоненты цепи ЦЭТ: комплексы PSI, FQR, FNR и комплекс цитохромов *b₆f*, а также подвижные переносчики электрона Pc, Fd и Q. Знаки вопроса отмечают вероятные пути переноса электронов, где механизм транспорта не установлен.

менном диапазоне 0,1–10 с. Построен ряд кинетических моделей, моделирующих процессы в этом временном диапазоне и соответствующих различным схемам взаимодействия участников циклического Fd-зависимого транспорта вокруг фотосистемы I с целью выбора адекватной схемы, описывающей совокупность экспериментальных данных. Построена многочастичная модель, которая позволяет осуществлять «прямое» моделирование процессов переноса электрона в мультиферментных комплексах и ограниченной диффузии подвижных переносчиков в отдельных компартментах системы (строма, люмен, внутримембранное пространство). Сравнение результатов кинетического и прямого моделирования указывает на важную роль пространственной организации системы в формировании кинетики редокс-превращений P700⁺.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тилакоиды гороха (*Pisum sativum* L., сорт Совершенство) выделяли из листьев 12-дневных проростков в среде, содержащей 0,4 М сахарозу, 3 мМ MgCl₂, 2 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 30 мМ HEPES, pH 7,8, и хранили замороженными в жидком азоте с добавлением 20% глицерина. Перед экспериментом тилакоиды отмывали в среде, содержащей 0,2 М сахарозу, 6 мМ MgCl₂, 30 мМ трицин, pH 7,6. Ферредоксин выделяли из листьев гороха [9]. Кинетику светоиндуци-

рованного сигнала ЭПР I ($g = 2,0025$) P700⁺ регистрировали с помощью радиоспектрометра 3-сантиметрового диапазона (РЭ-1307, НТО АН), соединенного с компьютером. Накапливали и усредняли 10 сигналов. Свет галогеновой лампы КГМ-300 поступал к кювете через систему тепловых фильтров. Реакционная смесь объемом 0,1 мл содержала 50 мМ трицин, pH 7,5, 5 мМ MgCl₂, 6 мМ глюкозу, 2 мМ хлорид аммония, 400 ед/мл каталазы, 40 мкМ Fd (если не указано иначе) и тилакоиды (0,1 мг Хл). Образование пула восстановленного ферредоксина, необходимого для функционирования циклического транспорта электронов, осуществляли путем освещения тилакоидов в реакционной смеси в течение 30 с интенсивным белым светом. До его выключения добавляли диурон до 10 мкМ концентрации для ингибирования поступления электронов от фотосистемы II. Анаэробные условия создавали, обдувая реакционную среду аргоном и добавляя 4 ед/мл глюкозооксидазы. Добавки, влияние которых исследовали, вносили после диурона. Подготовленную таким образом реакционную смесь освещали в течение 1,5 с, регистрируя кинетику светоиндуцированных изменений окислительно-восстановительного состояния P700. Кинетику темновой релаксации сигнала анализировали методом нелинейной регрессии с помощью программы Mathcad 7.

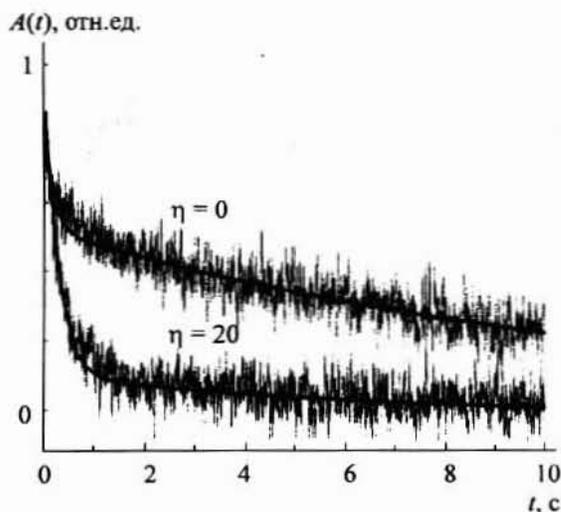


Рис. 2. Кинетические кривые фотоиндуцированного сигнала ЭПР I катион-радикала P700 в темноте для двух различных концентраций экзогенного ферредоксина. Сплошные линии – представление кривых темнового восстановления фотоокисленного P700⁺ в виде суммы двух убывающих экспонент: $A(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)$, где A_1 , A_2 – амплитуды быстрой и медленной компонент восстановления соответственно, k_1 , k_2 – показатели экспонент быстрой и медленной компонент соответственно (см. таблицу); η – отношение концентрации добавленного Fd к концентрации PSI.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТА

Примеры типичной экспериментальной кинетики сигнала ЭПР I представлены на рис. 2. При включении света наблюдали быстрое возрастание амплитуды сигнала ЭПР I, т.е. окисление P700, с выходом ее значения на стационарный уровень. Кинетика восстановления по-

сле выключения света хорошо аппроксимировалась двумя экспонентами. В таблице представлены полученные при разложении экспериментальных кривых на две экспоненты характеристики быстрой и медленной фаз восстановления P700⁺ при разных концентрациях добавленного ферредоксина: значения амплитуд и показатели экспонент каждой из фаз и вклад быстрой фазы в суммарный сигнал. Из таблицы видно, что характерное время быстрой компоненты составляло около 200 мс, время медленной компоненты варьировало в пределах 2-5 с. При увеличении концентрации Fd увеличивался относительный вклад быстрой компоненты в восстановление P700⁺, при этом ее характерное время (величина, обратная показателю экспоненты) менялось незначительно. В то же время при увеличении концентрации добавленного Fd показатель экспоненты медленной компоненты увеличивался, т.е. процесс восстановления P700⁺, которому соответствует медленная фаза, ускорялся. Амплитуда и вклад медленной фазы уменьшались при увеличении концентрации добавленного Fd. Это подтверждает высказанное в [7] предположение о том, что медленная фаза восстановления P700, по-видимому, представляет собой процесс «довосстановления» P700 от разнородного донорного окружения. Для формальной интерпретации полученных экспериментальных данных использовали метод кинетического моделирования.

ОПИСАНИЕ КИНЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ И РЕЗУЛЬТАТЫ МОДЕЛИРОВАНИЯ

Кинетика сигнала ЭПР в изучаемой экспериментальной системе определяется следующими процессами. Фотосистема I под действием

Зависимость параметров кинетики темнового восстановления фотоокисленного P700⁺ в тилакоидах гороха в анаэробных условиях от концентрации добавленного ферредоксина

Концентрация добавленного ферредоксина, мкл	A_1 , отн.ед.	k_1 , с ⁻¹	τ_1 , с	A_2 , отн.ед.	k_2 , с ⁻¹	τ_2 , с	$A_1/(A_1 + A_2)$
0	0,240	6,85	0,146	0,361	0,181	5,51	0,33
5	0,166	4,93	0,203	0,276	0,218	4,57	0,35
10	0,458	4,49	0,222	0,192	0,514	1,94	0,74
15	0,593	4,28	0,233	0,163	0,428	2,33	0,80
20	0,656	4,23	0,236	0,159	0,464	2,15	0,86

Примечание. A_1 и A_2 – амплитуды быстрой и медленной фаз сигнала соответственно, k_1 и k_2 – показатели экспонент, τ_1 и τ_2 – характерные времена быстрой и медленной фаз сигнала. Последний столбец – вклад быстрой фазы в суммарный сигнал.

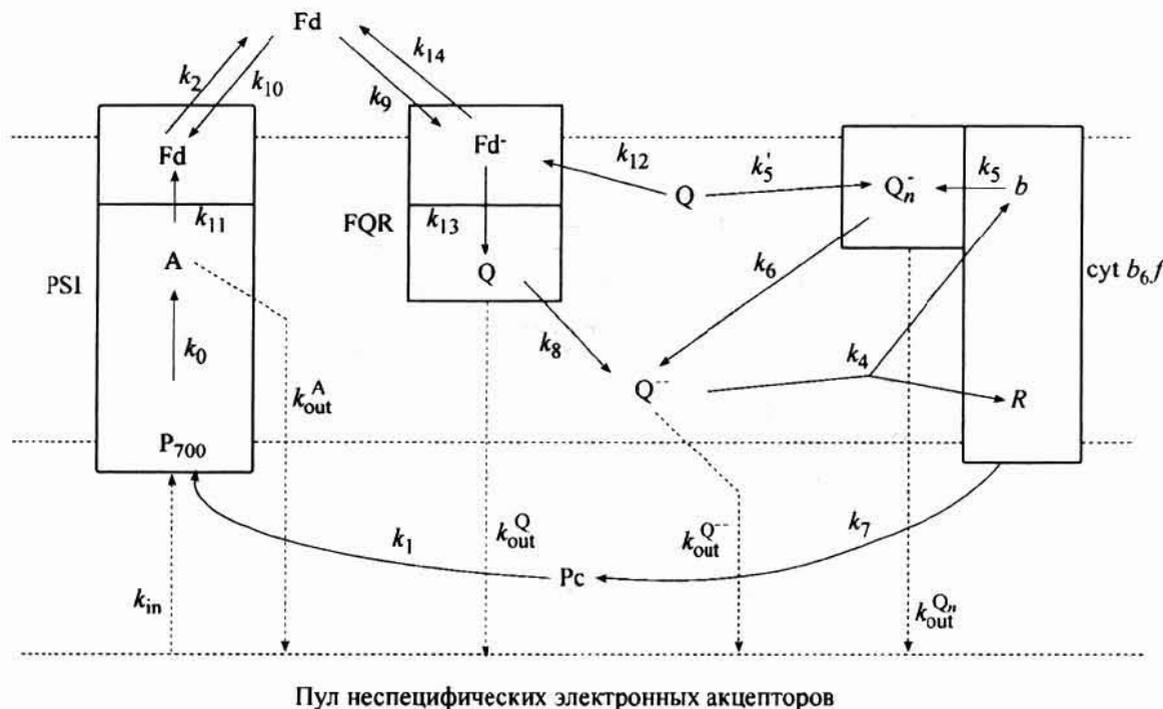


Рис. 3. Схема кинетической модели циклического транспорта электронов вокруг фотосистемы I. Прямоугольниками обозначены комплексы PSI, FQR и цитохромный b_6/f -комплекс. P_{700} – пигмент реакционного центра фотосистемы I, A – обобщенный акцептор, R – центр Риске, b – высокопотенциальный цитохром b_h , Fd – ферредоксин, Pc – пластоцианин, Q – пластохинон, Q^- – пластохинол, Q_n – семихинон на n-сайте комплекса цитохромов (у внешней поверхности мембраны). Стрелками показаны пути электронного транспорта, k_{in} , k_{out} , k_1, \dots, k_{14} – константы скоростей соответствующих реакций переноса электрона. Пунктирными линиями изображены границы тилакоидной мембраны и граница пула неспецифических акцепторов и доноров электронов.

света катализирует окисление пластоцианина (Pc) на люменальной поверхности мембраны тилакоида и восстановление Fd на стромальной стороне мембраны. В дальнейшем происходит окисление Fd и восстановление пула PQ. 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-редуктазы. Последующее окисление PQ приводит к восстановлению Pc (локализован в люмене), процесс происходит с участием цитохромного b_6/f -комплекса (см. рис. 1).

Нами был построен ряд последовательно усложняющихся кинетических моделей, наиболее подробные из которых учитывали процессы докинга Fd на акцепторной стороне фотосистемы I, участие цитохромного трансмембранного комплекса в окислительно-восстановительных превращениях пластохинона, посадку PQ на цитохромный комплекс и двухэлектронную природу этого переносчика. Схема наиболее

полной модели изображена на рис. 3; наряду с перечисленными компонентами она включает гипотетический белковый комплекс FQR.

Перенос электрона в мультиферментных комплексах описывали с помощью уравнений для вероятностей состояний этих комплексов. В модели мы использовали редуцированные схемы состояний комплексов. Мы не детализировали стадии переноса электронов внутри комплекса, характерные времена которых существенно меньше времени наблюдаемых в эксперименте процессов (0,1 с). Взаимодействие комплексов с подвижными переносчиками описывали согласно закону действующих масс [10,11].

Схема состояний для комплекса фотореакционного центра фотосистемы I представлена на рис. 4а. Предполагается, что комплекс реакционного центра PSI состоит из двух компонентов, первичного донора электронов P_{700} и обобщенного акцептора A, а также сайта посадки Fd. Комплекс цитохромов b_6/f (рис. 4б) считали состоящим из двух компонентов, а именно центра Риске R и высокопотенциального цитохрома b_h , а также места посадки пластохинона Q_n . Транспорт электронов через

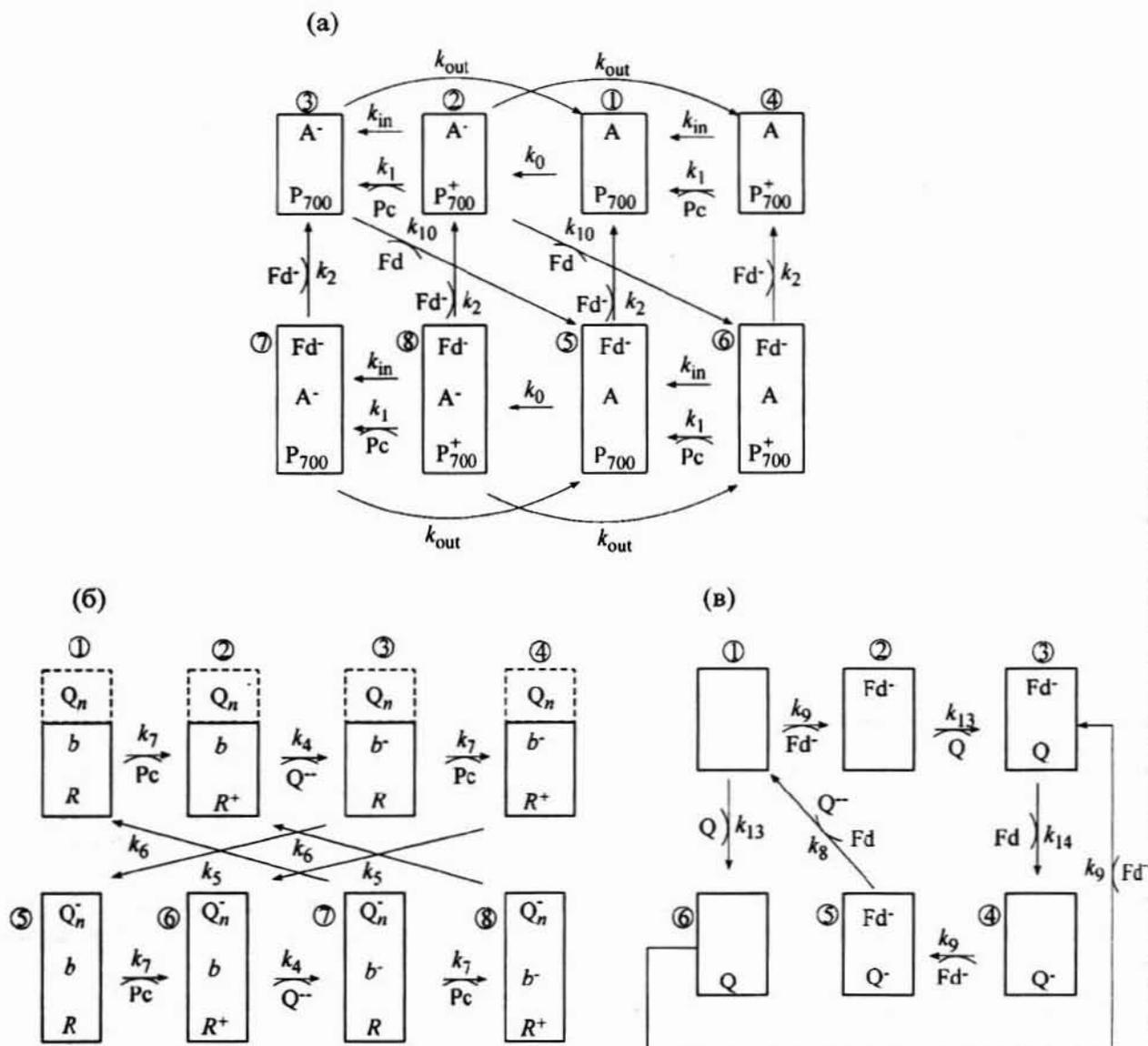


Рис. 4. Схемы состояний комплексов, участвующих в циклическом транспорте электронов. Каждый прямоугольник представляет собой одно из состояний комплексов, определяемое редокс-состояниями входящих в них переносчиков электрона. Стрелками показаны пути электронного транспорта; k_{in} , k_{out} , k_1 , ..., k_{14} – константы скоростей соответствующих реакций переноса электрона; (а) – фотореакционный центр PSI. P₇₀₀ – пигмент реакционного центра PSI, А – обобщенный акцептор; (б) – цитохромный *b*₆/*f*-комплекс. R – центр Риске, *b* – высокопотенциальный цитохром *b*, Q_{*n*} – пластохинон на месте посадки *n* цитохромного комплекса (у внешней поверхности мембраны); (в) – комплекс FQR.

цитохромный комплекс осуществляется по Q-циклу. Между F_d в комплексе и F_d в растворе устанавливается динамическое равновесие. Предполагается, что F_d-PQ-редуктазная реакция осуществляется в отдельном комплексе ферредоксин-хинон-редуктазы (рис. 4в), который может находиться в одном из шести состояний.

Система уравнений, соответствующая модели (рис. 3), содержит 26 обыкновенных дифференциальных уравнений. Переменными в ней

являются вероятности состояний комплексов и относительные концентрации подвижных переносчиков P_c, F_d, PQ в восстановленной форме. Начальные условия задавали в соответствии со стационарным распределением электронов в системе в отсутствие освещения. Численное решение системы уравнений производили с помощью программы Model Vision Studium [12].

Параметры модели выбирали в соответствии с литературными данными. «Световую»

константу k_0 считали пропорциональной интенсивности света: $k_0 = I\sigma$, где I – интенсивность света, σ – эффективное сечение поглощения PSI. При интенсивности света, равной 500 Вт/м^2 (условия эксперимента), $k_0 = 250 \text{ с}^{-1}$ [13–15]. Константы скорости в цитохромном комплексе: $k_1 = 50$, $k_5 = 457$, $k_6 = 10000$, $k_7 = 4000$ [16]. Константы реакций между Pс и P700: $k_{11} = 4 \cdot 10^3$ [17]; между PSI и Fd: $k_{11} = 5 \cdot 10^5$ [18]. Осветительные константы варьировали.

Модельная кинетика окислительно-восстановительных превращений P700 представлена на рис. 5. Как и для экспериментальной кривой (рис. 2) быстрая фаза процесса восстановления P700⁺, представляющая собственно циклический транспорт, может быть хорошо аппроксимирована одной экспонентой. Однако как в эксперименте (рис. 2), так и в модели (рис. 5) восстановление P700⁺ посредством циклического потока происходит не полностью, так как после освещения часть электронов «задерживается» в стромальной части в виде восстановленных молекул семихинона, Fd или иных групп. Естественно, что по истечении более длительного времени пигмент P700 будет восстановлен от неспецифических доноров. Таким образом, результирующая кривая восстановления фотоокисленного P700 приближенно представляет собой сумму двух экспонент.

Амплитуда и вклад быстрой компоненты, как показало моделирование редокс-превращения P700, зависит от концентрации добавленного ферредоксина (рис. 5). Действительно, 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 фотосистемы II и естественного донора электронов – системы разложения воды. Увеличение общего числа электронов в системе циклического транспорта приводит к увеличению амплитуды быстрой фазы восстановления P700 и ее вклада, однако не влияет на ее скорость, которая определяется скоростями переноса электрона на отдельных стадиях циклического транспорта, остающимися неизменными.

Медленная фаза процесса восстановления P700⁺ может быть описана в модели либо включением слабого протока через систему, либо наличием большого неспецифического пула электронов, из которого и происходит медленное «довосстановление» P700. Скорость этой медленной неспецифической фазы будет тем

P700⁺, отн.ед.

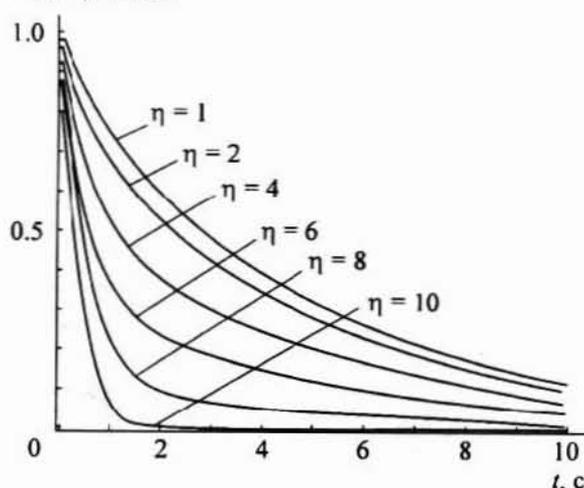


Рис. 5. Модельная кинетика окислительно-восстановительных превращений P700⁺; η – отношение концентрации Fd к концентрации PSI.

больше, чем больше общее число электронов в системе (см. таблицу).

Какова природа медленной фазы? Фотоактивный пигмент реакционного центра фотосистемы I является сильным окислителем [18,19]. Поэтому в отсутствие восстановленного специфического донора Pс возможен медленный перенос электрона на окисленный P700 с других, неспецифических доноров. Н.В. Scheller в работе [7] предположил, что медленная стадия восстановления P700 отражает способность P700⁺ «извлекать электроны из окружающих молекул», так как эта реакция наблюдалась даже в присутствии кислорода. Он также отмечает, что медленная стадия похожа на реакцию, наблюдаемую на выделенных PSI. В работе [20] А.В. Норе отмечает наличие медленной фазы восстановления окисленного вспышкой P700⁺. Он считает, что эта медленная фаза «нефизиологическая». Выводы, следующие из нашей модели, соответствуют этим предположениям.

ПРЯМОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ЦИКЛИЧЕСКОГО ТРАНСПОРТА ВОКРУГ ФОТОСИСТЕМЫ I

Кинетический подход, используемый при моделировании первичных процессов, имеет ряд недостатков. Главный из них – трудность учета пространственной структурной неоднородности системы. При моделировании взаимодействия выделенных фрагментов с экзоген-

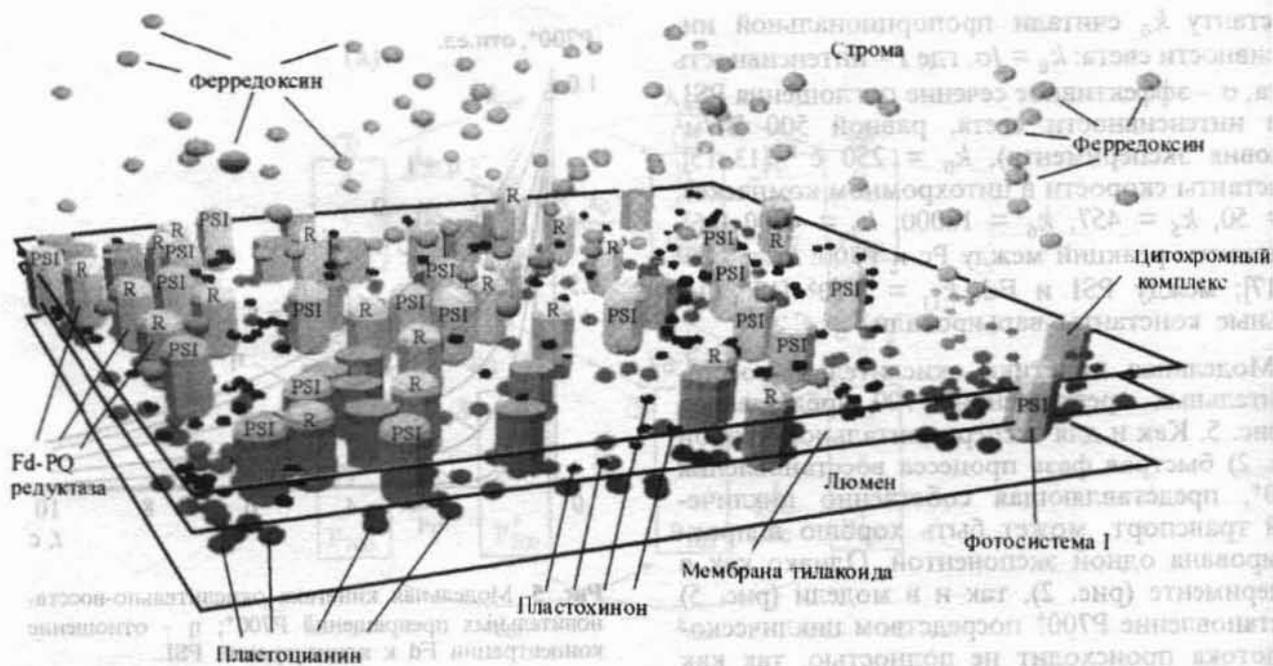


Рис. 6. Визуализация трехмерной сцены «прямой» модели циклического транспорта электронов. Показаны часть мембраны тилакоида, люменальное и стромальное пространства.

ными донорами и акцепторами в растворе применение закона действующих масс было оправдано относительной гомогенностью системы. Однако в нативной тилакоидной мембране взаимодействия мультиферментных комплексов с подвижными переносчиками осуществляются в разных компартаментах системы (в строме – с Fd, в липидном слое мембраны – с PQ, в люмене – с Pc) (см. рис. 1). По крайней мере в двух из этих компартов – внутримембранном пространстве и люмене – в силу сравнимости их геометрических размеров и размеров встроенных в них белковых комплексов далеко не обеспечиваются возможности свободной диффузии.

Нельзя априори считать диффузию свободной и в стромальном пространстве. В самом деле, хотя стромальное пространство достаточно обширно, однако вблизи мембраны в силу наличия мембранных белковых комплексов и их реакционных центров диффузию уже нельзя считать свободной. При кинетическом подходе к моделированию представляют трудность моделирование докинга, 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 фотосистемы I с участием всех представленных на рис. 3 компонентов.

Модель представляет собой трехмерную сцену (рис. 6), в которую входят: мембрана тилакоида, внутритилакоидное пространство, люменальное пространство. На сцене находятся пигмент-белковые комплексы (PSI, цитохромный комплекс, FQR) и подвижные переносчики электрона (Pc, Fd, PQ).

Для моделирования движения Pc, Fd, PQ в пространствах соответствующих компартов использовали 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 [21], 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. 6). Внутренняя часть тилакоида ограничена мембраной. Внутри тилакоида (в люмене) движутся частицы Pс, которые могут нести на себе электрон. Снаружи (в строме) движутся частицы Fd, 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 [18,22,23]. Комплексы PSI могут принять электрон от Pс, под действием света перенести его на другую сторону мембраны и передать ферредоксину. В темноте этот механизм не работает. Освещенность в модели задается вероятностью переноса электрона с P700 на А, 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 [18]. В свою очередь, Pс является донором для фотоактивного пигмента P700 (донорная часть комплекса PSI). Таким образом, цикл замыкается.

P700, отн.ед.

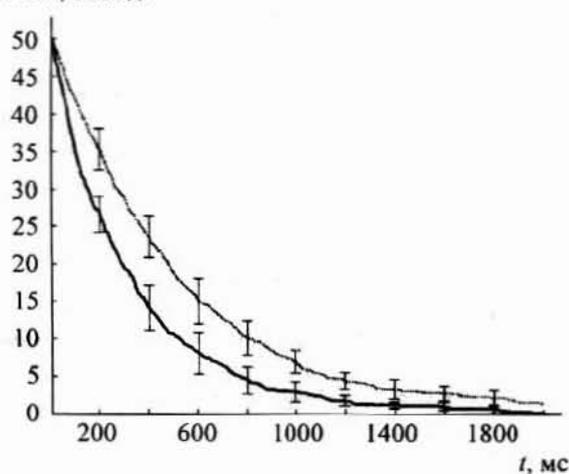


Рис. 7. Кинетика восстановления фотоокисленного P700⁺ для случая равномерного распределения комплексов PSI, cyt *b*₆/f и FQR на мембране тилакоида (пунктирная линия) и случая, когда PSI и cyt *b*₆/f образуют комплекс (сплошная линия). Изображены кинетические кривые, усредненные по десяти реализациям вычислительного эксперимента.

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, по-

сле чего комплекс распадается и окислившийся пластоцианин возобновляет броуновское движение.

Построенная прямая модель, так же как и кинетическая модель, представленная выше, позволяет моделировать наблюдаемые 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 распределения 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.

В качестве примера на рис. 7 представлены две кривые темнового восстановления P700⁺, полученные на прямой модели. Пунктирная линия соответствует равномерному распределению комплексов PSI, *cyt b₆f* и FQR на мембране тилакоида. Сплошная линия соответствует случаю, когда комплексы PSI и *cyt b₆f* 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 *cyt b₆f* 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 [2]. 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 P_c через цитохромный *b₆f*-комплекс.

Подробное исследование свойств и возможностей предложенного способа моделирования первичных процессов фотосинтеза в тилакоидной мембране предполагается осуществить в дальнейшем.

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 [10,11,24]. Моделирование переноса электрона в выделенных фрагментах фотосистемы I в присутствии искусственных доноров и акцепторов электрон и идентификация параметров системы были выполнены в работах [10,25,26]. 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 процесс 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 метод прямого моделирования представляется весьма перспективным, первая попытка применить который для описания циклического переноса электронов вокруг фотосистемы I в стромальной части тилакоида предпринята в данной работе.

Прямое моделирование позволяет уточнить правомерность подходов, используемых при кинетическом моделировании, и выяснить пределы его применимости. С использованием прямой модели появляется возможность выяснить, какое влияние оказывают структурные особенности системы на значения констант скоростей реакций и другие параметры, используемые в кинетической модели, и какова 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 модели, представляют предмет дальнейшего исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных

исследований (гранты № 03-04-49048, № 01-07-90131).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Тимофеев К.Н., Иванов Б.Н., Рубин А.Б. // Докл. РАН. 2001. Т. 379, № 5. С. 1-4.
2. Bendall D.S., Manasse R.S. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1229. P. 23-38.
3. Moss D.A., Bendall D.S. // Biochim. Biophys. Acta. 1984. V. 767. P. 389-395.
4. Heimann S., Schreiber U. // Plant Cell Physiol. 1999. V. 40. P. 818-824.
5. Cleland R.E., Bendall D.S. // Photosynth. Res. 1992. V. 34. P. 409-418.
6. Hosler J.P., Yocum C.F. // Biochim. Biophys. Acta. 1985. V. 808. P. 21-31.
7. Scheller H.V. // Plant Physiol. 1996. V. 110. P. 187-194.
8. Allen J.F. // TRENDS in Plant Science. 2003. V. 8(1). P. 15-19.
9. Мутускин А.А., Пшенова К.В., Колесников П.А. // Биохимия. 1966. Т. 31. С. 924-927.
10. Ризниченко Г.Ю. // Итоги науки и техники. Сер. Биофизика. М.: ВИНТИ, 1991. С. 31.
11. Рубин А.Б. Биофизика. Т.2. М.: Книжный дом «Университет», 2000.
12. Бенькович Е.С., Колесов Ю.Б., Сениченков Ю.Б. Практическое моделирование динамических систем. СПб.: БХВ-Петербург, 2002.
13. Dau H. // Photochem. Photobiol. 1994. V. 60. P. 1-23.
14. Лебедева Г.В., Беляева Н.Е., Ризниченко Г.Ю., Демин О.В., Рубин А.Б. // Биофизика. 2002. Т. 47, вып. 6. С. 1044-1058.
15. Schreiber U., Neubauer C. // Z. Naturforsch. 1987. V. 42c. P. 1255-1264.
16. Hope A.B., Liggins J., Matthews D.B. // Aust. J. Plant Physiol. 1989. V. 16. P. 353-364.
17. Hope A.B. // Biochim. Biophys. Acta. 2000. V. 1456. P. 5-26.
18. Malkin R., Niyogi K. // Biochemistry & Molecular Biology of Plants / Eds. B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. American Society of Plant Physiologists. 2000. P. 568-628.
19. Говинджи. Фотосинтез. Т.1. М.: Мир, 1987.
20. Hope A.B., Huilgol R.R., Panizza M., Thompson M., Matthews D.B. // Biochim. Biophys. Acta. 1992. V. 1100. P. 15-26.
21. Дой, Эдвардс. Динамическая теория полимеров. М.: Мир, 1999.
22. Albertsson P.-A. // TRENDS in Plant Science. 2001. V. 6(8). P. 349-354.
23. Albertsson P.-A. // Recent Res. Devel. Bioener. 2000. V. 1. P. 143-171.
24. Rznichenko G.Yu., Lebedeva G.V., Demin O.V., Belyaeva N.E., Rubin A.B. // J. Biol. Phys. 1999. V. 25. P. 177-192.
25. Rznichenko G.Yu., Vorobjeva T.N., Khrabrova E.N., Rubin A.B. // Photosynthetica. 1990. V. 24(3). P. 37-51.
26. Воробьева Т.Н., Кренделева Т.Е., Ризниченко Г.Ю., Шайтан К.В., Рубин А.Б. // Молекуляр. биология. 1983. Т. 17. С. 82-91.

Experimental and Theoretical Investigation of Cyclic Electron Transport around Photosystem I

I.B. Kovalenko*, D.M. Ustinin**, N.E. Grachev**, T.E. Krendeleva*, G.P. Kukarskikh*, K.N. Timofeev*, G.Yu. Rznichenko*, E.A. Grachev**, and A.B. Rubin*

*Biological Department, Lomonosov Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119992 Russia

**Physical Department, Lomonosov Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119992 Russia

The kinetics of photoinduced EPR I signals at different concentrations of ferredoxin was studied on isolated pea chloroplasts. A kinetic model of ferredoxin-dependent electron transport around photosystem I was suggested. A multiparticle model was constructed, which makes it possible to «directly» model the processes of electron transfer in multiprotein complexes and limited diffusion in different compartments of the system (stroma, lumen, and intermembrane space). A comparison of the kinetic and «direct» models revealed an important role of spatial organization of the system in the kinetics of redox turnover of P700.

Key words: photosystem I, cyclic electron transport, kinetic model, multiparticle model, ferredoxin