

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКОГО ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА ВОКРУГ ФОТОСИСТЕМЫ I

Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю.

(Москва)

Рассматривается процесс циклического транспорта электронов вокруг фотосистемы I (PSI) в хлоропластах высших растений и водорослей. Предложен ряд кинетических моделей циклического Fd-зависимого электронного транспорта вокруг PSI. Проведенное исследование кинетических моделей позволило описать совокупность экспериментальных данных по зависимости кинетических параметров восстановления P700 при различных концентрациях добавленного Fd в рамках обсуждаемой схемы взаимодействия встроенных в мембрану мультиферментных комплексов и подвижных переносчиков.

MODELING OF CYCLIC ELECTRON TRANSPORT AROUND PHOTOSYSTEM I

Kovalenko I.B., Riznichenko G.Yu.

(Moscow)

Cycle electron transport around photosystem I (PSI) in chloroplasts of higher plants and algae is considered. A series of kinetic models of ferredoxin-dependent cyclic electron transport around PSI is suggested. The investigation of the kinetic models of cycle electron transport allowed us to describe the set of experimental data for dependence of kinetic parameters of P700 reduction at different concentrations of exogenous ferredoxin in the context of the scheme of interaction of intermembrane multiprotein complexes and mobile carriers.

Циклический транспорт электронов вокруг фотосистемы I (PSI) в хлоропластах высших растений и водорослей, в отличие от линейного фотосинтетического транспорта электронов от во-

ды на NADPH, представляет собой антимицин-чувствительный перенос электрона с акцепторной стороны PSI в пул пластохинонов. Физиологический смысл циклического транспорта электронов заключается в генерации дополнительного протонного градиента, а также в предотвращении окислительного стресса при больших интенсивностях света.

Схема процессов, связанных с циклическим транспортом электронов вокруг PSI, представлена на рис. 1. Комплекс PSI под действием света катализирует окисление пластоцианина (Pc) на люменальной поверхности мембраны тилакоида и восстановление ферредоксина (Fd) на стромальной стороне мембраны, причем дальнейшее окисление ферредоксина и восстановление пула пластохинонов 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-оксидо-редуктазы (FQR) [1-4]. Последующее окисление PQ приводит к восстановлению Pc (локализован в люмене), процесс происходит с участием цитохромного b₆/f комплекса в соответствии со схемой Q-цикла Митчелла.

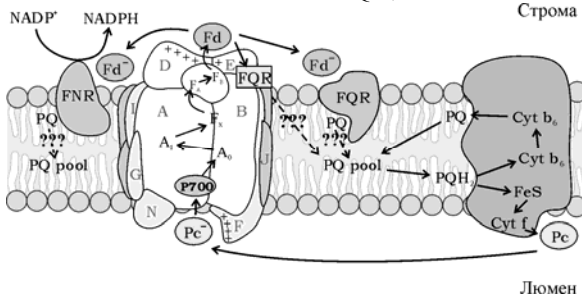


Рис. 1. Организация циклического транспорта электронов в хлоропластах. Показаны мембрана тилакоида и компоненты цепи ЦЭТ: комплексы PSI, FQR, FNR и комплекс цитохромов b₆/f, а также подвижные переносчики электрона Pc, Fd и Q. Знаки вопроса отмечают вероятные пути переноса электронов, где механизм транспорта не установлен.

На кафедре биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова в группе проф. Т.Е. Кренделевой было прове-

дено экспериментальное исследование кинетики фотоиндуцированного сигнала ЭПР I, отражающего изменение степени восстановления $P700$ – фотоактивного пигмента PSI [5], во временном диапазоне 0,1-10 сек. При включении света наблюдали быстрое возрастание амплитуды сигнала ЭПР I, т.е. окисление $P700$, с выходом ее значения на стационарный уровень (рис. 2). Кинетика восстановления после выключения света хорошо аппроксимировалась двумя экспонентами.

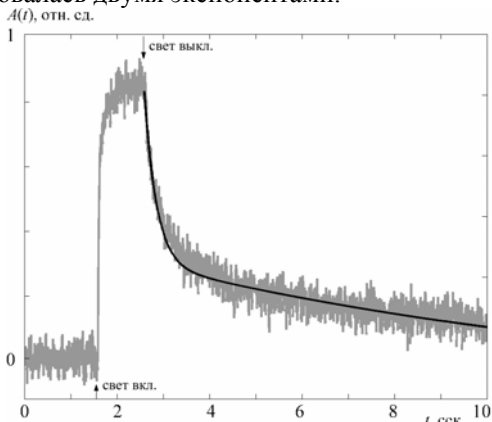


Рис. 2. Кинетическая кривая фотоиндуцированного сигнала ЭПР I катион-радикала $P700$. Сплошная линия – представление кривой темнового восстановления фотоокисленного $P700^+$ в виде суммы двух убывающих экспонент $A(t) = A_1 \exp(-k_1 t) + A_2 \exp(-k_2 t)$, где A_1 , A_2 – амплитуды быстрого и медленного компонентов восстановления, соответственно, k_1 , k_2 – показатели экспонент быстрого и медленного компонентов, соответственно. Стрелками указаны моменты включения и выключения света.

В табл. 1 представлены полученные при разложении экспериментальных кривых на две экспоненты характеристики быстрой и медленной фаз восстановления $P700^+$ при разных концентрациях добавленного Fd: значения амплитуд и показатели экспонент каждой из фаз, и вклад быстрой фазы в суммарный сигнал. Из таблицы видно, что характерное время быстрого компонента составляло около 200 мс, время медленного компонента варьировало в пределах 2-5 с. При увеличении концентрации Fd увеличивался относительный вклад быстрого компонента в восстановление $P700^+$, при этом его характерное время (величина,

обратная показателю экспоненты) менялось незначительно. В то же время при увеличении концентрации добавленного Fd показатель экспоненты медленного компонента увеличивался, то есть процесс восстановления $P700^+$, которому соответствует медленная фаза, ускорялся. Амплитуда и вклад медленной фазы уменьшались при увеличении концентрации добавленного Fd. В [6] высказывалось предположение о том, что медленная фаза восстановления $P700$ представляет собой процесс «довосстановления» $P700$ от разнородного донорного окружения.

Таблица 1. Зависимость параметров кинетики темнового восстановления фотоокисленного $P700^+$ в тилакоидах гороха в анаэробных условиях от концентрации добавленного Fd. A_1 и A_2 – амплитуды быстрой и медленной фаз сигнала, соответственно, k_1 и k_2 – показатели экспонент, и τ_1 и τ_2 – характерные времена быстрой и медленной фаз сигнала.

Концентрация добавленного Fd, мкл	A_1 , отн.ед.	k_1 , c^{-1}	τ_1 , с	A_2 , отн.ед.	k_2 , c^{-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

В задачу настоящей работы входило построение ряда кинетических моделей, соответствующих различным схемам взаимодействия гипотетических участников циклического Fd-зависимого транспорта вокруг PSI с целью выбора адекватной схемы, описывающей совокупность экспериментальных данных (табл. 1) на наблюдаемых временных масштабах 0.1 – 10 с.

Для обсуждения соотношения параметров быстрой и медленной компонент сигнала темнового восстановления фотоокисленного $P700^+$ рассмотрим упрощенную модель изучаемых процессов.

В этой модели мы рассматриваем циклический транспорт электронов как совокупность окислительно-восстановительных процессов, происходящих с участием трансмембранного пигмент-белкового комплекса PSI, пластохинона и подвижных белков-переносчиков ферредоксина и пластоцианина. Для описания процесса переноса электрона в реакционном центре PSI используются системы обыкновенных дифференциальных урав-

нений [7-9]. В модели мы использовали редуцированные схемы состояний комплексов. Мы не детализировали стадий переноса электронов внутри комплекса, характерные времена которых существенно меньше времени наблюдаемых в эксперименте процессов (0.1 с). В данной модели мы считали, что в комплекс реакционного центра PSI входят два компонента, первичный донор электронов P_{700} и акцептор А. В рамку обведены компоненты, составляющие комплекс. Изменения редокс-состояний компонентов на участках, на которых перенос электрона осуществляется подвижными переносчиками (Pc, PQ, Fd), описываются с помощью закона действующих масс. Предположительное участие в процессе цитохромного b_6/f комплекса и FQR учитывали на уровне констант скоростей взаимодействия компонентов на соответствующих участках.

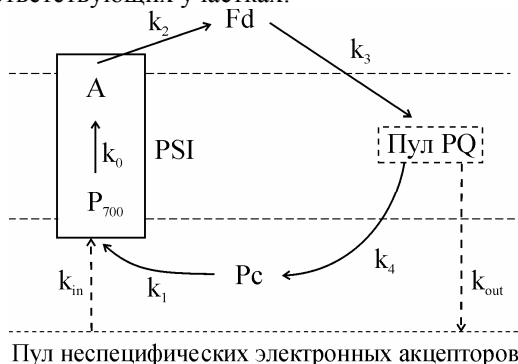


Рис. 3. Схема упрощенной кинетической модели циклического транспорта электронов вокруг PSI. P_{700} – пигмент реакционного центра PSI, А – обобщенный акцептор, Fd – ферредоксин, Pc – пластоцианин, PQ – пластохион. Стрелками показаны пути электронного транспорта, k_{in} , k_{out} , k_1 , ..., k_4 – константы скоростей соответствующих реакций переноса электрона. Пунктирными линиями изображены границы тилакоидной мембраны и граница пула неспецифических акцепторов и доноров электронов.

Численное решение системы уравнений производилось с помощью программы Model Vision Studium [10]. В численном эксперименте наблюдали кинетические кривые темнового восстановления P_{700}^+ при различных значениях концентрации ферредоксина. При оценке параметров модели некоторые из них выбирались в соответствии с литературными данными, другие

считались свободными и варьировались. «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/м² (условия эксперимента) $k_0 = 250 \text{ с}^{-1}$. Константы реакций между Pс и P700: $k_1 = 4 \cdot 10^3$; между Pс и Q: $k_4 = 50$ [11, 12]; между PSI и Fd: $k_2 = 5 \cdot 10^5$ [4]. Остальные константы варьировали. Концентрации пластоцианина и пластохинона в расчете на один реакционный центр составляли 2 и 6. В начальный момент 10% Fd считали восстановленным.

Параметры модельной кинетики окислительно-восстановительных превращений P700⁺ представлены на рис. 4. Как и для экспериментальной кривой быстрая фаза процесса восстановления P700⁺, представляющая собственно циклический транспорт, может быть хорошо аппроксимирована одной экспонентой. Однако как в эксперименте, так и в модели восстановление посредством циклического потока происходит не полностью. Медленная фаза, завершающая окончательное восстановление P700⁺, определяется обменом электронами с пулом неспецифических электронных акцепторов. Суммарная кинетическая кривая может быть аппроксимирована суммой двух экспонент. При этом амплитуда быстрой фазы растет, медленной – соответственно уменьшается. Время быстрой фазы остается практически неизменным, а медленной – увеличивается.

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

Схема наиболее полной модели изображена на рис. 5, наряду с перечисленными компонентами она включает гипотетический белковый комплекс FQR.

Схема состояний для комплекса фотореакционного центра PSI представлена на рис. 6а. Предполагается, что комплекс реакционного центра PSI состоит из двух компонентов, первично-

го донора электронов P700 и обобщенного акцептора A , а также сайта посадки Fd.

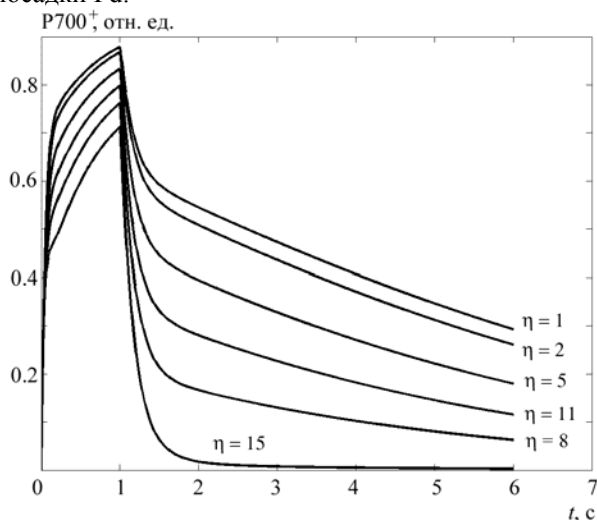


Рис. 4. Модельная кинетика окислительно-восстановительных превращений P700⁺. Fd0 – отношение концентрации Fd к концентрации PSI.

Комплекс цитохромов b_6/f (рис. 6б) считаем состоящим из двух компонентов, а именно центра Риске R и высокопотенциального цитохрома b_h , а также места посадки пластохинона Q_n . Транспорт электронов через цитохромный комплекс осуществляется по Q-циклу. Между Fd в комплексе и Fd в растворе устанавливается динамическое равновесие. Предполагается, что Fd-PQ-редуктазная реакция осуществляется в отдельном комплексе ферредоксин-хинон редуктазы FQR (рис. 6в), который может находиться в одном из 6 состояний.

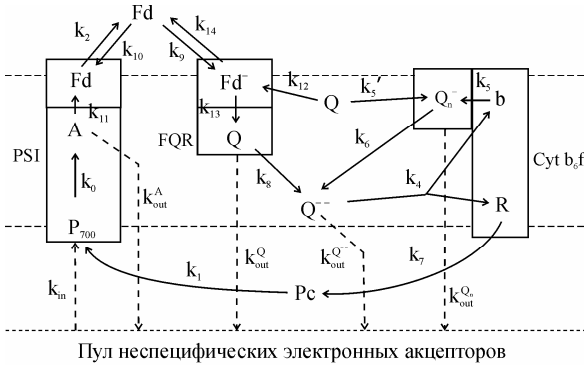


Рис. 5. Схема кинетической модели циклического транспорта электронов вокруг PSI. Прямоугольниками обозначены комплексы PSI, FQR и цитохромный b_6/f комплекс. P_{700} – пигмент реакционного центра PSI, A – обобщенный акцептор, R – центр Рискае, b – высокопотенциальный цитохром b_n , Fd – ферредоксин, Pc – пластоцианин, Q – пластохинон, Q^- – пластохинон, 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.

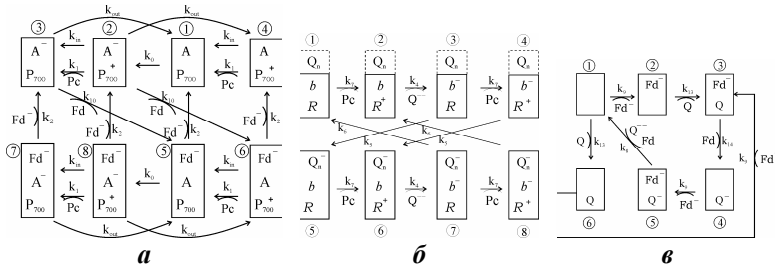


Рис. 6. Схемы состояний комплексов, участвующих в циклическом транспорте электронов. Каждый прямоугольник представляет собой одно из состояний комплексов, определяемое редокс-состояниями входящих в них переносчиков электрона. Стрелками показаны пути электронного транспорта, k_{in} , k_{out} , k_1, \dots, k_{14} – константы скоростей соответствующих реакций переноса электрона. **а)** фотореакционный центр PSI. P_{700} – пигмент реакционного центра PSI, A – обобщенный акцептор. **б)** цитохромный b_6/f комплекс. R – центр Рискае, b – высокопотенциальный цитохром b , Q_n^- – пластохинон на месте посадки n цитохромного комплекса (у внешней поверхности мембраны). **в)** комплекс FQR.

Система уравнений, соответствующая модели (рис. 5, 6), содержит 26 обыкновенных дифференциальных уравнений. Пере-

менными в ней выступают вероятности состояний комплексов и относительные концентрации подвижных переносчиков Pс, Fd, PQ в восстановленной форме. Начальные условия задавали в соответствии со стационарным распределением электронов в системе в отсутствие освещения.

Параметры модели выбирали в соответствии с литературными данными. «Световая» константа $k_0 = 250$ (см. выше). Константы скорости в цитохромном комплексе: $k_4 = 50$, $k_5 = 457$, $k_6 = 10000$, $k_7 = 4000$ [12]. Константы реакций между Pс и P700: $k_1 = 4000$, между Fd и PSI: $k_{11} = 5 \cdot 10^5$ [11, 12]. Остальные константы варьировали.

Как и в упрощенной модели 1, кинетика восстановления P700 в полной модели может быть аппроксимирована двумя экспонентами, причем быстрая компонента отражает собственно циклический транспорт с участием Fd, Pс, PQ, комплексов FQR и $\text{cyt } b_6/f$, а «медленный компонент» отражает взаимодействие с пулом неспецифических акцепторов.

Обсуждение.

Проведенное исследование кинетических моделей циклического электронного транспорта вокруг фотосистемы 1 позволило описать совокупность экспериментальных данных по зависимости кинетических параметров восстановления P700 при различных концентрациях добавленного Fd во временном диапазоне 0,1-10 сек. в рамках обсуждаемой схемы взаимодействия встроенных в мембрану мультиферментных комплексов и подвижных переносчиков (рис.1). Несмотря на сложность протекающих процессов, наблюдаемая в эксперименте и на модели кинетическая кривая восстановления P700 может быть аппроксимирована в виде двух экспонент: быстрой (сотни мс) и медленной (секунды) компонентов.

Амплитуда и вклад быстрой компоненты зависит от концентрации добавленного Fd (рис. 5). Действительно, если степень восстановленности добавляемого Fd задана, общее число электронов в системе будет увеличиваться с увеличением концентрации Fd, в то время как в условиях эксперимента диурон блокирует приток электронов от PSII и естественного донора электронов – системы разложения воды. Увеличение общего числа электронов в системе циклического транспорта приводит к уве-

личению амплитуды быстрой фазы восстановления P700 и ее вклада, однако почти не влияет на скорость быстрой фазы восстановления. Характерное время этой фазы определяется скоростями переноса электрона на отдельных стадиях циклического транспорта, в частности, скоростью взаимодействия PQ с цитохромным комплексом, являющейся наиболее медленной в циклическом транспорте электронов.

Особенно большую дискуссию в литературе вызывала природа медленной (характерное время – несколько секунд) компоненты [2, 3, 6]. Модель показывает, что после освещения часть электронов «задерживается» в стромальной части в виде восстановленных молекул семихинона и Fd. Относительно медленный переход этих молекул в нейтральное состояние через неспецифические редокс реакции сопровождается медленным «довосстановлением» окисленного светом P700.

В модели медленная фаза процесса восстановления P700⁺ может быть описана наличием большого неспецифического пула электронов, из которого и происходит медленное «довосстановление» P700. Скорость этой медленной неспецифической фазы тем больше, чем больше общее число электронов в системе.

Фотоактивный пигмент реакционного центра PSI является сильным окислителем [4, 13]. Поэтому в отсутствие восстановленного специфического донора P_s возможен медленный перенос электрона на окисленный P700 с других, неспецифических доноров. В [6] Scheller высказал предположение, что медленная стадия восстановления P700 отражает способность P700⁺ «извлекать электроны из окружающих молекул», т.к. эта реакция наблюдалась даже в присутствии кислорода. Он также отмечает, что медленная стадия похожа на реакцию, наблюдаемую на выделенных PSI. В [14] Норе отмечает наличие медленной фазы восстановления окисленного вспышкой P700⁺. Он считает, что эта медленная фаза «нефизиологическая». Выводы, следующие из нашей модели, соответствуют этим предположениям.

Уточнение схемы взаимодействий переносчиков и их природы требует моделирования результатов ингибиторного анализа и представляет предмет дальнейшего исследования.

Авторы выражают благодарность сотрудникам каф. биофизики биологического ф-та МГУ проф. Т.Е.Кренделевой, Г.П.Кукарских, К.Н.Тимофееву за предоставленные экспериментальные данные и совместные дискуссии и зав. каф. биофизики проф. А.Б.Рубину за постоянное внимание к работе и плодотворные обсуждения.

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

Литература.

1. Allen, J.F., Cyclic, pseudocyclic and noncyclic photophosphorylation: new links in the chain. *TRENDS in Plant Science*, 2003. **8**(1): p. 15-19.
2. Bendall, D.S. and R.S. Manasse, Cyclic photophosphorylation and electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995. **1229**: p. 23-38.
3. Cleland, R.E. and D.S. Bendall, Photosystem I cyclic electron transport: Measurement of ferredoxin-plastoquinone reductase activity. *Photosynth. Res.*, 1992. **34**: p.409-418.
4. Malkin, R. and K. Niyogi, Photosynthesis, in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones, Editors. 2000, American Society of Plant Physiologists.
5. Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Тимофеев К.Н., Иванов Б.Н., Рубин А.Б. Ферредоксинзависимый циклический транспорт электронов в изолированных тилакоидах протекает с участием ферредоксин-НАДФ-редуктазы. Доклады академии наук, 2001. **379**(5): p. 1-4.
6. Scheller, H.V., In vitro cyclic electron transport in barley thylakoids follows two independent pathways. *Plant Physiology*, 1996. **110**: p. 187-194.
7. Ризниченко, Г.Ю. Математические модели первичных процессов фотосинтеза. ВИНТИ, 1991. **31**.
8. Рубин, А.Б. Биофизика. 2 изд. Т.2. 2000. М.: Книжный дом "Университет".
9. Рубин, А.Б., Г.Ю. Ризниченко, Н.Ф. Пытьева, Кинетика биологических процессов. 1987, М.: Изд-во МГУ.
10. Бенькович Е.С., Колесов Ю.Б., Сениченков Ю.Б. Практическое моделирование динамических систем. СПб: БХВ-Петербург, 2002.

11. Hope, A.B., Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000. **1456**: p. 5-26.
12. Hope, A.B., J. Liggins, and D.B. Matthews, The kinetics of reactions in and near the cytochrome b/f complex of chloroplasts. Cytochrome b-563 reduction. *Aust. J. Plant Physiol.*, 1989. **16**: p. 353-364.
13. Говинджи, Фотосинтез. Т. 1. М.: "Мир", 1987.
14. Hope A.B., Huilgol, R.R., Panizza M., Thompson, M., Matthews, D.B. The flash-induced turnover of cytochrome b-563, cytochrome f and plastocyanin in chloroplasts. Models and estimation of kinetic parameters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992. **1100**: p. 15-26.