

## КИНЕТИЧЕСКИЕ И МНОГОЧАСТИЧНЫЕ БРОУНОВСКИЕ МОДЕЛИ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ ПОТОКОВ В МИКРОВОДОРОСЛЯХ, ВЫДЕЛЯЮЩИХ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ВОДОРОД

Ризниченко Г.Ю., Плюснина Т.Ю., Дьяконова А.Н., Хрущев С.С., Коваленко И.Б., Рубин А.Б.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова  
Ленинский Горы, 1, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: riznich46@mail.ru

Поступила в редакцию: 09.08.2018.

**Аннотация.** Структурно-динамические (кинетические) и агентные (многочастичные броуновские) модели использованы для изучения роль рН в регуляции электронных потоков в областях Фотосистемы II и Фотосистемы I при переключении нормального режима активного фотосинтеза и фиксации углерода на режим неактивного фотосинтеза и продуцирования молекулярного водорода. Мультимасштабная кинетическая модель описывает электронные потоки в ФС II, изменение концентрации протонов в строме и восстановление пула пластохинонов в фотосинтетическом пути и в цепи хлородыхания. На ее основе предложен кинетический механизм скачкообразного падения активности Фотосистемы II, закисления стромы в области Фотосистемы II и переключения потока электронов на путь хлородыхания. Многочастичные броуновские модели описывают конкурентное взаимодействие молекул ферредоксина, принимающего электроны от ФС I, с альтернативными акцепторами: NAD(P)H (путь фиксации CO<sub>2</sub>) и гидрогеназой (путь производства водорода). Анализ результатом многочастичного моделирования и электростатических свойств взаимодействующих молекул показал, что поток электронов от ферредоксина на гидрогеназу возрастает при щелочных значениях рН (~8-8.5) в окрестности акцепторного участка Фотосистемы I. Полученные результаты подтверждает широко обсуждаемую в литературе гипотезу о регуляторной роли локальных значений рН в процессах фотосинтеза.

**Ключевые слова:** фотосинтез, электронный транспорт, водород-выделяющие микроводоросли, кинетические модели, многочастичные броуновские модели, ферредоксин.

### ВВЕДЕНИЕ

Эффективным методом изучения биологических энергопреобразующих систем является математическое моделирование. Современные модели позволяют систематизировать разнородные экспериментальные факты и проверять гипотезы о механизмах, лежащих в основе регуляции систем живой клетки. Для изучения процессов на разных пространственных и временных масштабах эффективными оказываются различные типы математического и компьютерного описания, которые могут быть применены для анализа экспериментальных данных и анализа биофизических механизмов изучаемых процессов и поиска оптимальных условий для получения тех или иных целевых продуктов.

Наиболее распространенным методом модельного описания процессов в субклеточных системах, в том числе в фотосинтетической мембране, является «системно-динамический» подход к моделированию, основным математическим аппаратом которого традиционно являются системы дифференциальных уравнений [1, 2].

В моделях фотосинтетической энергопреобразующей мембраны в качестве переменных рассматриваются концентрации состояний мультиферментных комплексов, пропорциональные вероятностям этих состояний, а также концентрации других компонентов фотосинтетической мембраны (подвижных переносчиков электронов, ионов). Кинетические модели разной степени детализации позволяют анализировать экспериментальные данные, регистрируемые спектральными методами от суспензии клеток микроводорослей в различных условиях, и делать выводы об изменениях в фотосинтетической цепи в разных условиях эксперимента. Упрощенные кинетические модели позволяют дать качественное описание наблюдаемых нелинейных явлений.

Для воспроизведения на модели процессов взаимодействия биологических макромолекул и изучения механизмов такого взаимодействия необходимо моделирование процессов на субклеточном и молекулярном уровне. При этом важную роль играет интерьер, в котором происходит такое взаимодействие. В последние годы в связи с бурным развитием информационных технологий при моделировании систем самой разной природы получили распространение так называемые «агентные» модели. «Агентный» (объектный, атомистический, корпускулярный) метод моделирования предполагает выводить свойства сложных систем из свойств и способов взаимодействия составляющих эти системы «агентов» или «атомов» – неких простейших объектов, составляющих эту систему. В качестве «агентов» в молекулярном моделировании выступают атомы или их агрегаты (course-grain – крупнозернистое моделирование), в броуновском моделировании – биомacroмолекулы.

«Агентное» и «системно-динамическое» описания взаимно дополняют друг друга. В большой мере способ описания определяется целями моделирования. Для ответа на качественные вопросы о типе динамического поведения системы часто удобно описывать систему с помощью упрощенной «феноменологической» модели. Количественное соответствие модельных и экспериментальных кривых требует детального кинетического описания. Для выяснения физических (биофизических) механизмов взаимодействия биомacroмолекул в

клеточных системах, необходимы агентные (атомистические) модели. Их сочетание позволяет пролить свет на способы регуляции процессов в сложных живых системах, каковыми являются микроводоросли.

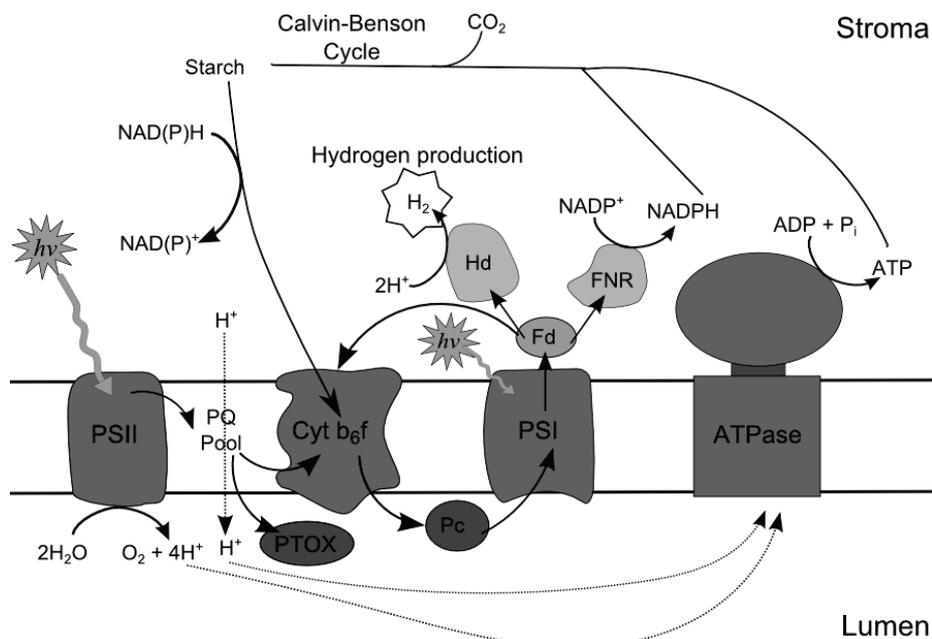
Статья посвящена обсуждению результатов, полученных на кафедре биофизики биологического факультета МГУ при моделировании процессов фотосинтетического электронного транспорта в водород-выделяющих микроводорослях методами кинетического и броуновского моделирования. Системно-динамические (кинетические) и атомистические (броуновские) модели применены для изучения механизмов регуляции процессов электронного транспорта, определяющих активность водород-выделяющих микроводорослей, рассматриваемых в качестве потенциального источника альтернативного топлива (молекулярного водорода).

#### Водород-выделяющие микроводоросли. Организация фотосинтетической цепи.

Молекулярный водород представляет собой один из видов альтернативного топлива привлекательный тем, что его сгорание с кислородом дает единственный продукт – воду, не наносящую вреда окружающей среде. Некоторые фотосинтезирующие организмы, в том числе цианобактерии и зеленые микроводоросли способны выделять  $H_2$  в анаэробных условиях в темноте [3, 4]. Необходимым катализатором реакции является фермент гидрогеназа, донором электронов для гидрогеназы служит малый белок ферредоксин (Фд) – конечный акцептор электрон-транспортной цепи фотосинтеза. В обычных условиях активной работы фотосинтетической цепи Фотосистема II (ФС II) является источником кислорода, который ингибирует экспрессию гидрогеназы. В условиях голодания в клетках нарушаются процессы синтеза белков, падает эффективность работы ФСII, создаются анаэробные условия, экспрессируется фермент гидрогеназа и возникает электрон-транспортный путь с выделением водорода. В природе этот процесс, по-видимому, носит защитный характер, предотвращая перевосстановление электрон-транспортной цепи и возникновение опасных для клетки активных форм кислорода [5]. На рисунке 1 приведена схема электрон-транспортных процессов зеленых микроводорослей.

В последние годы активно ведутся исследования по изучению условий, приводящих к увеличению количества водорода, выделяемого микроводорослями [6-8]. Исследования ведутся в нескольких направлениях: отбор естественных водород-выделяющих видов, направленный мутагенез, оптимизация условий выращивания, изучение механизмов внутриклеточной и молекулярной регуляции процессов, приводящих к переключению метаболизма клетки на путь выделения водорода.

На первом этапе выращивания водород-выделяющей культуры происходит нормальный фотосинтез: фиксация  $CO_2$ , высвобождение кислорода в результате окисления  $H_2O$  и накопление биомассы. На втором этапе клетки помещают в условия голодания (недостатка серы, азота или Mg), что приводит к ингибированию процесса биосинтеза и остановке роста клеток. В первую очередь происходит ингибирование синтеза ферментов цикла Кальвина (РуБисКо) и белка D1 реакционного центра ФСII. Поскольку ФСII постоянно повреждается на свету в результате фотоокисления, в отсутствие синтеза и восстановления белка D1 скорости окисления воды ФСII и выделения кислорода падают. Одновременно при голодании и снижении активности РуБисКо водоросли начинают накапливать крахмал в концентрациях, в 8-20 раз превышающих концентрации в нормальных условиях [9].



**Рисунок 1.** Электрон-транспортная цепь фотосинтеза водород-выделяющих организмов. PSII – Фотосистема II, Цит  $b_6f$  – цитохромный  $b_6f$ -комплекс, Pc – пластоцианин, PSI – Фотосистема I, PTOX – пластидная терминальная оксидаза, Fd – ферредоксин, Hd – гидрогеназа, FNR – ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктаза. Стрелками показаны пути электронов и протонов

В результате, когда скорость выделения кислорода становится меньше скорости его поглощения в процессе дыхания, культура быстро становится анаэробной, что дает сигнал к синтезу гидрогеназы и выделению молекулярного водорода.

Таким образом, электроны на гидрогеназу при голодании поступают как от остаточной работы ФСII, так и от катаболизма эндогенного субстрата (разложение крахмала). Кислород, выделяющийся в результате разложения  $H_2O$  гидрогеназой, используется для дыхания, что позволяет поддерживать анаэробные условия. Многочисленные экспериментальные работы показали, что основные изменения электронного транспорта в процессе голодания происходят на двух ключевых участках, связанных с акцепторными доменами ФСII и ФСI.

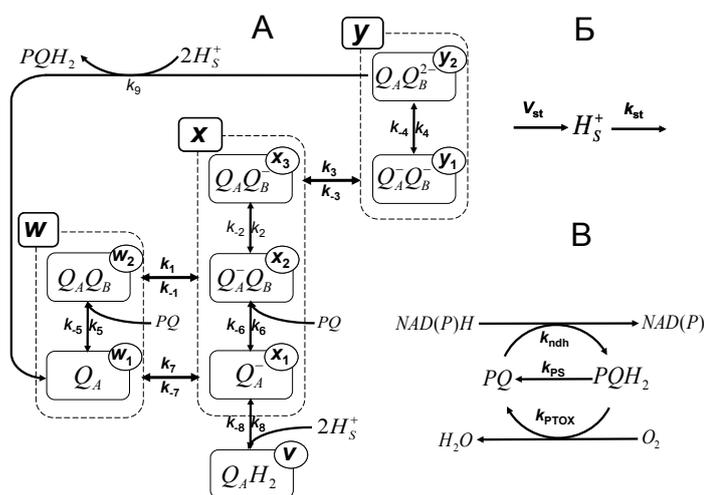
В процессе голодания активность ФСII, регистрируемая методом флуоресценции, сильно падает, причем падение это имеет пороговый характер [10], что указывает на существование триггерного механизма, ответственного за переключение типа метаболизма клетки с режима активного фотосинтеза на режим неактивного фотосинтеза и выделения водорода. При этом практически прекращается трансмембранный перенос протонов, сопряженный с электронным транспортом через ФСII. Концентрация протонов вблизи акцепторной стороны мембраны повышается на порядок от рН 8 (стационарное значение при активном фотосинтезе [11]) до значений рН 7. В работе [12] с использованием математической модели показано, что рН может служить регулирующим параметром, уменьшение величины которого приводит к переключению с активного типа фотосинтеза, соответствующего высокому значению регистрируемой в эксперименте характеристики  $F_v/F_m$ , на неактивный режим фотосинтеза, сопровождающийся выделением молекулярного водорода.

На акцепторной стороне Фотосистемы I (ФСI) происходит переключение электронного потока через Фд (непосредственно акцептирующий электроны с ФСI) с классического пути фотосинтеза с фиксацией атмосферного углекислого газа ( $CO_2$ ) и образованием органических веществ через фермент ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктазу (ФНР) на путь производства водорода через фермент гидрогеназу. Активность ФСI, обеспечивающая поток электронов на водород и производство АТФ, при этом сохраняется за счет поступления электронов из пула хинонов и циклического электронного транспорта. Важным фактором, влияющим на эффективность выделения водорода, является конкуренция между различными метаболическими путями за Фд. В анаэробных условиях, конкуренция между гидрогеназой и ФНР за Фд является фактором, ограничивающим выделение водорода [13]. Для выяснения механизмов переключения электронных потоков от Фд с ФНР на гидрогеназу и влияния локальной концентрации протонов на этот процесс была разработана прямая компьютерная модель процессов взаимодействия белков: донора Фд и альтернативных акцепторов ФНР и гидрогеназы методом многочастичной броуновской динамики. Проведен анализ электростатических свойств взаимодействующих молекул донора Фд и акцептора – ФНР или гидрогеназы [14, 15].

#### **Электрон-транспортная система микроводорослей в условиях стресса.**

В нормальных условиях основную роль играет линейный электронный транспорт, обеспечивающий перенос электронов от ФС II через цитохромный комплекс к ФС I и далее в цикл фиксации углерода Кальвина-Бенсона (рис. 1) и сопряженный перенос в люмен протонов, необходимых для работы АТФ-синтазы. В условиях стресса происходит инактивация ФСII, поток электронов на выходе ФСII падает, важную роль начинают играть процессы хлордыхания, обеспечивающего приток электронов в фотосинтетическую цепь на уровне пластохинонового пула от НАД(Ф)Н, образующегося в центральных катаболических путях гликолиза, пентозофосфатного шунта и цикла Кребса. Электроны с НАД(Ф)·Н, образующегося в центральных катаболических путях гликолиза, пентозофосфатного шунта и цикла Кребса, переносятся на пластохинон (PQ), который в восстановленной форме пластохинола передает электроны посредством РТОХ на конечный акцептор – кислород, и одновременно служит источником электронов для ФС I (через цитохромный комплекс и Pс, рис. 1.) Хлордыхание является дополнительным способом регулирования окислительно-восстановительного состояния пула PQ в хлоропластах и стимулируется в условиях высокого уровня восстановленности НАД(Ф)·Н и пула PQ. В темноте в норме примерно 25 % вторичных акцепторов  $Q_B$  присутствует в восстановленной форме [16], что свидетельствует о существенной роли хлордыхания на начальных этапах фотосинтеза и в нормальных условиях. Роль хлордыхания существенно возрастает в условиях стресса.

В литературе обсуждается вопрос о резком увеличении при стрессе числа  $Q_B$  – невозстанавливающихся центров ФII, то есть фотосистем, в которых не происходит перенос электрона с первичного хинона  $Q_A$  на вторичный хинон  $Q_B$ . В нормальных условиях первичный хинон  $Q_A$ , принимает и отдает один электрон. Если перенос электронов с  $Q_A$  на  $Q_B$  заблокирован, происходит накопление восстановленных форм  $Q_A$ , при возбуждении РЦ образуются триплетные формы  $P_{680}$ , которым может предшествовать образование дважды восстановленных форм хинона  $Q_A$ , которые протонируются, образуя хинол  $Q_AH_2$  [17]. В обычных условиях фотосинтеза первичный хинон  $Q_A$  является одноэлектронным переносчиком, тогда как вторичный хинон  $Q_B$  переносит два электрона. Однако в растворе молекулы обоих хинонов, имеющих одинаковое химическое строение и относящихся к классу убихинонов  $Q_{10}$ , способны к двухэлектронному восстановлению [18]. В составе ФС II сильная связь хинона  $Q_A$  обуславливает его “неподвижность” в реакционном центре и способность передавать только один электрон в обычных условиях. В условиях голодания и частичной дегградации структурных белков ФС II связь  $Q_A$  с белком может значительно ослабевать, а его способность к двухэлектронному восстановлению возрастать. В условиях минерального голодания в темноте образуются восстановленные формы PQ и, как следствие, накапливаются восстановленные формы  $Q_A$ , что приводит к образованию дважды протонированных форм хинола ( $Q_AH_2$ ).



**Рисунок 2.** Схема процессов, приводящих к переключению путей переноса электронов при голодании [12]. А. Схема переходов между состояниями фотосистемы II. Пунктиром обведены состояния с одинаковым количеством электронов. Б. Схема транспорта протонов в строме вблизи тилакоидной мембраны.  $V_{st}$  – приток протонов из стромы к мембране тилакоида,  $k_{st}$  – отток протонов в строму. В. Схема окислительно-восстановительных реакций пластохинона в цепи фотосинтеза и хлородыхания. NADH-дегидрогеназа в реакции катализирует перенос электронов с NADH на PQ ( $k_{ndh}$ ). РТОХ - пластидная терминальная оксидаза, в реакции  $k_{птох}$  катализирует перенос электронов с  $PQH_2$  на кислород на люминальной стороне мембраны тилакоида.  $k_{ps}$  – реакция окисления пластохинона в цепи фотосинтеза

В предложенной нами модели [12] предполагается, что регуляция транспорта электронов в хлоропластах в условиях стресса, приводящая к переключению метаболизма на путь образования водорода, связана с увеличением уровня восстановленного пластохинона ( $PQH_2$ ) и образованием дважды протонированных форм хинола  $Q_A H_2$ . Существенной особенностью регуляции является тот факт, что экспериментально наблюдаемая инактивация ФС II происходит за относительно короткие промежутки времени (рис. 2) [19]. Такое скачкообразное, «триггерное» переключение с одного режима на другой свидетельствует о существенно нелинейной природе наблюдаемых явлений.

#### Модель переключения электронных потоков на уровне пула хинонов.

Схема возможных состояний ФСII, описанных в модели, изображена на рисунке 2, в нее включены состояния, содержащие дважды протонированную форму  $Q_A H_2$ .

Последовательность первичных процессов переноса электронов в реакционном центре ФСII такова. В темноте реакционные центры находятся в открытых состояниях,  $Q_A$  ( $w_1$ ) и  $Q_A Q_B$  ( $w_2$ ). Под действием света происходит возбуждение пигмента  $P_{680}$ , разделение зарядов и перенос электрона на первичный акцептор феофитин ( $k_1$ ), а затем восстановление первичного хинона с образованием форм  $Q_A^-$  ( $x_1$ ) и  $Q_A^- Q_B$  ( $x_2$ ), константа  $k_7$ . Обратный переход с константами  $k_{-1}$  и  $k_{-7}$  описывает флуоресценцию состояний  $Q_A^-$  ( $x_1$ ) и  $Q_A^- Q_B$  ( $x_2$ ). В реакции ( $k_2$ ) электрон переходит на вторичный хинон  $Q_B$ , образуется форма  $Q_A Q_B^-$  ( $x_3$ ). Следующий квант света, поглощаемый в реакции  $k_3$ , вызывает образование формы  $Q_A^- Q_B^-$  ( $y_1$ ). Далее в реакции  $k_4$  второй электрон переходит на вторичный хинон  $Q_B$ , образуя форму  $Q_A Q_B^{2-}$  ( $y_2$ ) с полностью восстановленным вторичным хиноном. Протонирование состояния  $Q_A Q_B^{2-}$  ( $y_2$ ) приводит к высвобождению молекулы восстановленного пластохинола  $PQH_2$  из  $Q_B$ -сайта ( $k_9$ ). Затем электроны с пула пластохинонов уходят по цепи линейного транспорта фотосинтеза ( $k_{ps}$ ). Молекула  $PQ$  в реакциях  $k_5$  и  $k_6$  занимает пустой  $Q_B$ -сайт состояний  $Q_A$  ( $w_1$ ) и  $Q_A^-$  ( $x_1$ ), образуя формы  $Q_A Q_B$  ( $w_2$ ) и  $Q_A^- Q_B$  ( $x_2$ ). Присоединение двух протонов стромы  $H_S^+$  к форме  $Q_A^-$  ( $x_1$ ) ( $k_8$ ) ведет к образованию комплекса  $Q_A H_2$  ( $v$ ), который является тупиковой формой и в дальнейших реакциях переноса электрона не участвует.

В цепи хлородыхания рассмотрены две стадии: восстановление пластохинона электронами NAD(P)H в реакции, катализируемой дегидрогеназой  $ndh$ , и окисление пластидной терминальной оксидазой РТОХ с переносом электронов на кислород. Для описания представленных на схеме процессов записана система обыкновенных дифференциальных уравнений. Система редуцирована с учетом квазиравновесных стадий и закона сохранения, подробный вывод дан в работе [12].

Окончательная система уравнений приведена ниже:

$$\dot{x} = q_1 - (q_{-1} + q_8 [H_s^+]^2 + q_3 - q_1)x + (q_{-8} - q_1)v + (q_{-3} - q_1)y, \quad (1)$$

$$\dot{y} = q_3x - (q_{-3} + q_9 [H_s^+]^2)y, \quad (2)$$

$$\dot{v} = q_8 [H_s^+]^2 x - q_{-8}v, \quad (3)$$

$$\dot{H}_s^+ = V_{st} - k_{st} \cdot H_s^+ - q_9 [H_s^+]^2 y - q_8 [H_s^+]^2 x + q_{-8}v, \quad (4)$$

$$P\dot{Q}H_2 = k_{ndh} \cdot NAD(P)H \cdot (1 - PQH_2) - (k_{птох} \cdot O_2 + k_{ps}) \cdot PQH_2 + q_9 [H_s^+]^2 y. \quad (5)$$

Здесь:  $x = x_1 + x_2 + x_3$  – сумма вероятностей состояний ФС II, в которых имеется один электрон ( $Q_A^- + Q_A^- Q_B^- + Q_A^- Q_B^-$ ).  $y = y_1 + y_2$  – сумма вероятностей состояний ФС II с двумя электронами ( $Q_A^- Q_B^- + Q_A^- Q_B^{2-}$ ).  $v$  – концентрация дважды протонированного первичного хинона  $Q_A H_2$ ;  $H_s^+$  – концентрация протонов в строме вблизи мембраны;  $PQH_2$  – концентрация восстановленного пластохинона;  $NAD(P)H$  и  $O_2$  соответствуют концентрациям  $NAD(P)H$  и кислорода.  $q_i$  – эффективные константы скоростей, выраженные через сочетания констант скоростей исходной модели, связаны с концентрацией PQ и константами равновесия реакций, приведенных на рисунке 2, следующим образом [12]:

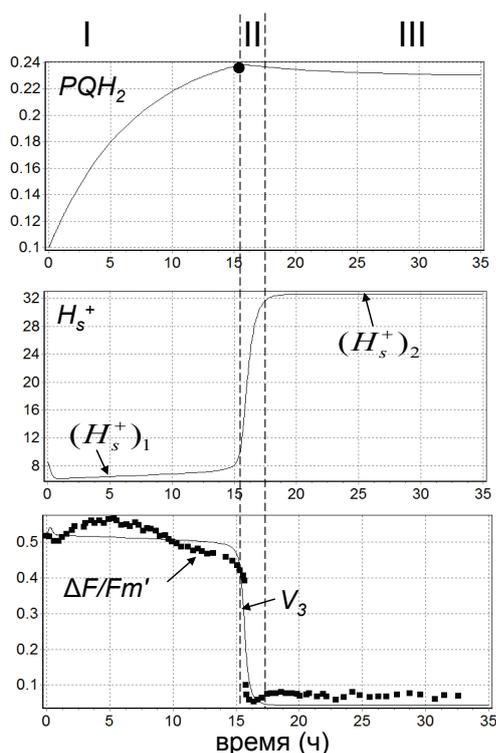
$$q_3 = k_1 \frac{K_2 \cdot K_6 \cdot PQ}{1 + K_6 \cdot PQ(1 + K_2)}, \quad q_{-1} = k_{-1} \frac{K_6 \cdot PQ + 1}{1 + K_6 \cdot PQ(1 + K_2)}, \quad q_8 = k_8 \frac{1}{1 + K_6 \cdot PQ(1 + K_2)} \quad (6)$$

Уравнения (1)-(3) соответствуют переходам между состояниями ФС II (рис.2 А). Уравнение (4) описывает изменение концентрации протонов  $H_s^+$  в строме вблизи фотосинтетической мембраны за счет обмена протонами стромы и примембранной области ( $V_{st} - k_{st} \cdot H_s^+$ ), и их потребление в реакциях ФС II (реакции  $k_8, k_{-8}, k_9$ , рис. 2А, Б). Уравнение (5) описывает изменение  $PQH_2$  в ходе восстановления молекулами  $NAD(P)H$  ( $k_{ndh}$ , рис. 2В) и окисления пластинной терминальной оксидазой в хлородыхании (реакция  $k_{птох}$  рис. 2В), восстановления фотосистемой II ( $k_9$ , рис. 2А) и окисления в цепи фотосинтеза ( $k_{ps}$ , рис. 2В).

Характерное время восстановления первичного хинона в реакциях фотосинтеза, описываемых уравнениями (1)-(3), составляет 0,1-200 мс [2]. Время установления стационарного значения pH в строме и люмене после освещения – уравнение (4), составляет 30-50 с. Время накопления и распада крахмала и белков при минеральном голодании определяет скорость изменения степени восстановленности пула пластохинона при хлородыхании молекулами  $NAD(P)H$  (5). Оно составляет около 30 ч. Учитывая, что уравнение (5) описывает процессы гораздо более медленные, чем уравнения (1)-(3), концентрацию пластохинона  $PQ$  в уравнениях (1)-(3) можно считать параметром. Концентрация протонов  $[H_s^+]$  входит в подсистему (1)-(3) как параметр, поскольку является медленно меняющейся переменной, относительно быстрых стадий переноса электронов в фотосистеме II. В работе [12] показано, что pH может служить регулирующим параметром, переключающим режим функционирования системы с активного фотосинтеза на путь выделения водорода, и получены модельные кривые для не наблюдаемых прямо в эксперименте медленных переменных. Параметры модели процессов в ФСII идентифицированы по данным индукционных кривых флуоресценции на I и III этапах роста культуры. Модель, как и эксперимент, демонстрирует скачкообразное изменение переменных на временах порядка 15 часов после начала голодания культуры.

**Нелинейный механизм кинетической регуляции в условиях голодания**

В обычных условиях на свету основной поток электронов в фотосинтетической цепи идет от реакционного центра ФС II на пул PQ и далее через цитохромный комплекс на ФС I. При этом в клетках протекает активный фотосинтез. Окислительно-восстановительные эквиваленты NAD(P)H тратятся на синтез органического вещества, в митохондриальном дыхании, происходит запасание крахмала. При выращивании микроводорослей в среде с недостатком питательных веществ в центральных катаболических путях происходит расщепление крахмала, что сопровождается накоплением восстановленных форм NAD(P)H [20]. Происходит переход в анаэробную фазу, ингибирование дыхания, на которое NAD(P)H более не тратится. Имеет место накопление восстановленных форм NAD(P)H и увеличение потока электронов от NAD(P)H на PQ. При этом увеличивается доля восстановленного пластохинона и уменьшается доля нейтрального пластохинона. Нейтральных молекул пластохинона, способного войти в свободный  $Q_B$ -сайт, становится все меньше, Следствием является



**Рисунок 3.** Кинетика переключения системы в процессе серного голодания. Верхняя кривая - изменение концентрации восстановленного пластохинона, средняя кривая - изменение квазистационарной концентрации протонов в строме, нижняя кривая - изменение квазистационарной скорости переноса электронов с первичного на вторичный хинонный акцептор. Точки – экспериментальные данные изменения активности фотосистемы II, полученные в [19] для *C.reinhardtii* в условиях серного голодания. Линия – модельная кривая изменения квазистационарной скорости переноса электронов в фотосистеме 2, полученная на модели [12]

инактивация ФС II. Уменьшение активности ФС II приводит к подавлению перекачивания протонов из стромы, что приводит к их накоплению вблизи тилакоидной мембраны и локальному закислению стромы. Избыток протонов в строме приводит к образованию и накоплению дважды протонированной формы первичного хинона  $Q_AH_2$  и накоплению  $Q_B$ -невосстанавливающих центров. Возникает петля положительной обратной связи, которая обуславливает триггерное (скачкообразное) переключение в новый режим, в котором фотосистема II находится в неактивном состоянии. Нелинейная кинетическая организация электрон-транспортных потоков позволяет растительной клетке в условиях стресса достаточно быстро, скачкообразно, переключать электронные потоки, предохраняя фотосинтетический аппарат от разрушения.

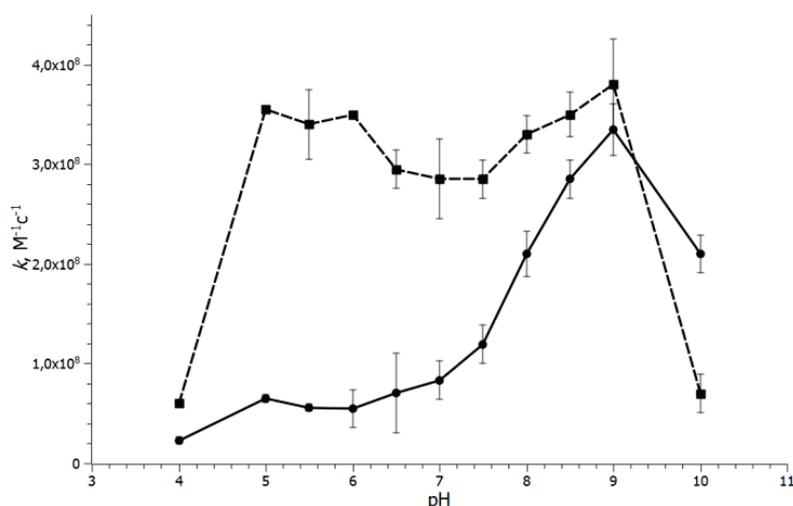
#### **Переключение потока электронов в акцепторной части ФСII с пути фиксации $CO_2$ на путь выделения водорода.**

Активация хлордыхания и восстановление пула пластохинонов при неактивной фотосистеме II позволяет Фотосистеме I продолжать получать электроны от цитохромного комплекса и Рс. Наряду с активацией циклического электронного транспорта вокруг ФСII, поток электронов от PQ-пула, обеспеченный хлордыханием, поддерживает работу ФСII.

Циклический транспорт осуществляется в непосредственной близости от ФСII, то есть в стромальных и маргинальных участках фотосинтетической мембраны, и сопряжен с переносом протонов внутрь тилакоида, который влечет за собой защелачивание стромы вблизи акцепторной стороны ФСII в процессе освещения. Для ответа на вопрос, может ли данный процесс изменения pH влиять на скорость взаимодействия ферредоксина с его белками-партнерами, мы построили серию многочастичных броуновских моделей взаимодействия ферредоксина и его альтернативных акцепторов: ФНР и гидрогеназы.

В разработанном нами методе многочастичной броуновской динамики белки сближаются и образуют комплексы за счет двух физических процессов: диффузии и электростатических взаимодействий [1, 21, 22]. Белки рассматриваются как твердые тела, источником информации о форме поверхности белков и распределении поверхностных зарядов является PDB. Метод позволяет изучать взаимодействие белков как в растворе, так и в интерьере клеточной мембраны. Подробное описание моделей взаимодействия Фд с ФНР и гидрогеназой представлено в работах [14, 15].

Свойства белков зависят от концентрации ионов водорода в среде. В хлоропластах pH может отклоняться от обычной для цитозоля величины pH=7 в зависимости от внешних условий и протекающих в клетке процессов. В клеточных компартментах pH может быть регуляторным механизмом, изменяющим скорости взаимодействия белков друг с другом и другими типами молекул, их растворимость и конформационную стабильность. Для

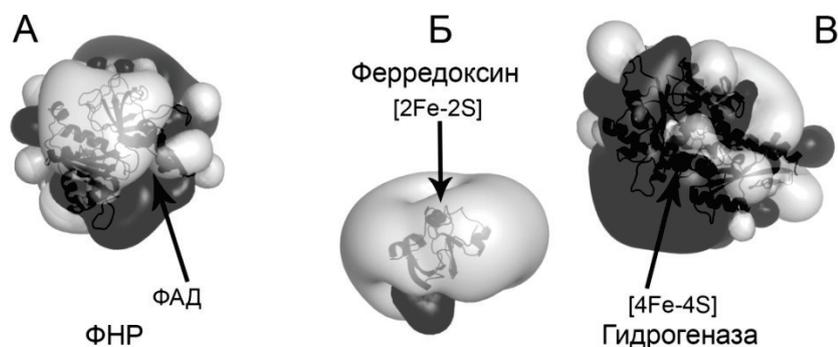


**Рисунок 4.** Зависимость константы скорости связывания ферредоксина с ФНР (пунктирная линия) и гидрогеназой (сплошная линия) от рН [15]. Каждая точка – среднее пяти расчетов, показан 95%-ный доверительный интервал

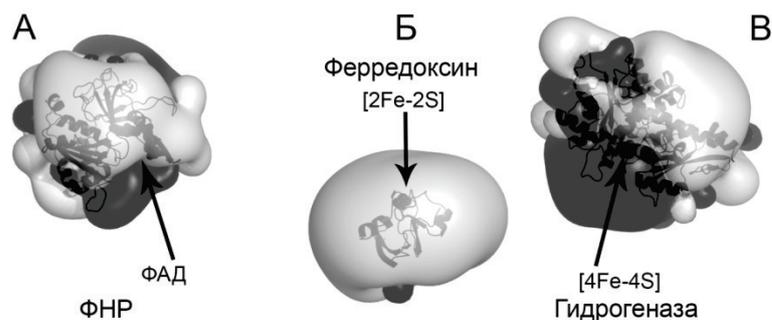
оценки влияния изменения рН стромы на распределение потоков от Фд, нами были рассчитаны зависимости скоростей образования комплексов ферредоксина с ФНР и Фд с гидрогеназой (рис. 4).

Минимальные значения константы для обеих пар белков соответствуют значениям рН 4 и 10; при этих значениях рН нарушается нативная конформация белков. В области значений рН 5-7,5 константа скорости связывания гидрогеназы и Фд практически не изменяется, резко увеличивается, достигая максимума при рН 9, и вновь снижается. Таким образом, при изменении рН стромы хлоропластов от примерно 6 единиц рН в темноте до 8-8,5 единиц на свету изменяется сродство белков друг к другу. Рассмотрим эквипотенциальные поверхности белков ферредоксина, ФНР и гидрогеназы при этих рН и ионной силе  $I = 100$  мМ, отражающие распределение зарядов на молекулах (рис. 5, 6). Темно-серый цвет соответствует положительно заряженным областям, светло-серый – отрицательно заряженным областям.

Эквипотенциальные поверхности молекулы ФНР имеют сложную форму. При рН = 6, что соответствует рН стромы в темноте (рис. 5), молекула заряжена положительно, и кофактор (ФАД) расположен в области положительного потенциала. Молекула имеет несколько отрицательно заряженных областей, включая область вблизи активного центра. Неоднородность эквипотенциальных поверхностей обеспечивает правильную ориентацию ФНР по отношению к белку-партнеру. Эквипотенциальная поверхность молекулы гидрогеназы (рис. 5В) может быть разделена на положительную и отрицательную части. Железо-серный кластер окружен положительными зарядами, противоположная часть молекулы заряжена отрицательно. Фд заряжен отрицательно (рис. 5Б). Молекула Фд имеет два небольших участка с положительным потенциалом: один из них расположен вблизи кофактора молекулы Фд [2Fe-2S]-кластера, атом железа которого формирует этот положительный участок, вторая область расположена на другой стороне молекулы далеко от активного центра. Таким образом, при рН = 6 восстановленный Фд (заряженный отрицательно) ориентируется в электрическом поле молекулы-акцептора, ФНР или гидрогеназы, притягивая положительные области молекулы-партнера. Сближение молекул в правильной ориентации маловероятно, активные центры как Фд, так и ФНР и гидрогеназы расположены в областях с положительным потенциалом.



**Рисунок 5.** Эквипотенциальные поверхности ФНР (А), ферредоксина (Б) и гидрогеназы (В) при рН = 6,  $I = 100$  мМ. Светло-серый цвет соответствует потенциалу  $-7$  мВ, темно-серый – потенциалу  $+7$  мВ



**Рисунок 6.** Эквипотенциальные поверхности ФНР (А), ферредоксина (Б) и гидрогеназы (В) при  $\text{pH} = 8$ ,  $I = 100 \text{ мМ}$ . Светло-серый цвет соответствует потенциалу  $-7 \text{ мВ}$ , темно-серый – потенциалу  $+7 \text{ мВ}$ .

При  $\text{pH} = 8$  у Фд (рис. 6Б) небольшая область положительного потенциала остается только на стороне, противоположной от железо-серного кластера. Распределение заряда на гидрогеназе и ФНР остается тем же, что при  $\text{pH} = 6$  (рис. 5А, В) – обе молекулы остаются в основном отрицательно заряженными, форма их эквипотенциальных поверхностей сохраняется. Однако в этом случае железо-серный кластер Фд расположен в области отрицательного потенциала и в процессе броуновского вращательного движения ориентируется по направлению к активным центрам молекул-акцепторов. Кинетически это проявляется в увеличении константы скорости взаимодействия Фд с ФНР и гидрогеназой (рис. 4). Такой результат соответствует физиологическим процессам в хлоропласте. ФНР начинает взаимодействовать с Фд не сразу после начала освещения, а лишь после защелачивания стромы до величин  $\text{pH}=8-8,5$ . При этих значениях происходит высвобождение молекул ФНР, иммобилизованных на мембране, в стромальное пространство, и становится возможным образование комплекса Фд-ФНР.

В случае гидрогеназы изменение  $\text{pH}$  в сторону щелочных значений ведет к уменьшению области положительного заряда в окрестности  $[4\text{Fe-4S}]$ -кластера. Константа скорости образования комплекса Фд-гидрогеназа при  $\text{pH} 7$ , существенно возрастает, молекула Фд легко находит в процессе броуновского движения в электростатическом поле гидрогеназы правильную ориентацию по отношению к кофактору. То же явление имеет место для ФНР, однако у нее распределение потенциала более гетерогенное, и эффект роста эффективности взаимодействия при росте  $\text{pH}$  не так ярко выражен.

Мы также провели серию вычислительных экспериментов, в которых в растворе взаимодействовали молекулы трех типов: донора – восстановленного ферредоксина и двух конкурирующих акцепторов – FNR и гидрогеназы [14]. Характер изменений константы взаимодействия тот же, что и зависимостей от  $\text{pH}$  констант скоростей парных взаимодействий. В обоих типах моделей минимальные значения константы для обеих пар белков соответствуют значениям  $\text{pH} 4$  и  $10$ ; при таких  $\text{pH}$  начинает нарушаться нативная конформация белков. В области значений  $\text{pH} 5-7,5$  константа скорости связывания гидрогеназы и ферредоксина практически не изменяется, а затем резко увеличивается, достигает максимума при  $\text{pH} 9$  и вновь снижается. При этом при  $\text{pH} 6,5$  константа скорости связывания ферредоксина с гидрогеназой в парной модели примерно в три раза меньше, чем константа скорости связывания Фд с ФНР; в тройной – примерно в два раза. Данный результат согласуется с экспериментальными данными: при  $\text{pH} 7$  около  $85\%$  электронов идет на ФНР и только  $15\%$  – на гидрогеназу [13]. В широком диапазоне  $\text{pH}$ , от  $5$  до  $9$ , константа скорости связывания ферредоксина и ФНР практически не изменяется. С ростом  $\text{pH}$  константа скорости взаимодействия ферредоксина и гидрогеназы значительно возрастает. Это указывает на различия в механизмах влияния  $\text{pH}$  на скорости этих двух реакций. Защелачивание стромы на свету не влияет на скорость взаимодействия ферредоксина и ФНР, но играет важную роль в увеличении сродства ферредоксина к гидрогеназе. В результате, усиливается отток электронов на водород и происходит «разгрузка» электрон-транспортной цепи.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Система фотосинтетического электронного транспорта функционирует в тилакоидных мембранах хлоропластов. Фотосинтетические реакционные центры ФСII, расположенные в гранальных областях мембраны, и ФСI, расположенные в маргинальных участках, разнесены в пространстве. Анализ процессов в водород-выделяющих микроводорослях голодания позволяет выявить роль локальных  $\text{pH}$  в переключении электронного потока на путь выделения водорода. Анализ экспериментальных данных с помощью кинетических моделей разной степени детализации [12] показывает, что локальная концентрация протонов в области обращенного в строму акцепторного участка ФСII увеличена по сравнению с благоприятными условиями активного фотосинтеза. В условиях голодания нарушается ре-синтез белка D1, падает активность водоразлагающего комплекса, трансмембранный перенос протонов внутрь тилакоидов блокируется. Концентрация протонов в области акцепторной части ФСII сравнивается с концентрацией протонов в цитоплазме ( $\text{pH}=7$ ). Понижение  $\text{pH}$  включает триггерный механизм скачкообразного переключения в новый режим, в котором фотосистема II находится в неактивном состоянии.

Иная ситуация имеет место в окрестности ФСІ. Линейный поток электронов блокируется вследствие дезактивации ФС ІІ. Однако в пул пластохинонов поступают электроны за счет хлородыхания, продолжает работать циклический транспорт вокруг ФСІ. Эти электронные потоки поддерживают сопряженный поток протонов в люмен через пул пластохинонов, связанных с цитохромным комплексом, обеспечивающий работу АТФ-синтазы. В течение этого периода в окрестности акцепторной части ФСІ сохраняется достаточно низкая концентрация протонов ( $\text{pH}=8,5$ ). Результаты многочастичного броуновского моделирования [14, 15] показывают, что при этом поток электронов на гидрогеназу способен успешно конкурировать с потоком электронов на ФНР. Таким образом, включается активный электронный поток с Фд на путь производства водорода, предотвращающий перевосстановление цепи.

Полученные с помощью математических моделей результаты позволяют дать биофизическую интерпретацию наблюдаемых экспериментальных фактов и подтверждают обсуждаемую в литературе гипотезу о регуляторной роли локального pH в процессах фотосинтеза.

#### Список литературы / References:

1. Rubin A.B., Ryznichenko G.Yu. *Mathematical biophysics*. Springer, 2014
2. Stirbet A., Ryznichenko G.Yu., Rubin A.B. Modeling chlorophyll a fluorescence transient: Relation to photosynthesis. *Biochemistry (Moscow)*, 2014, vol. 79, pp. 291-323.
3. Gaffron H., Rubin J. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *JGP*, 1942, vol. 26, pp. 219-240.
4. Oey M., Sawyer A. L., Ross I.L., Hankamer B. Challenges and opportunities for hydrogen production from microalgae. *Plant Biotechnol. J.*, 2016, vol. 14, pp. 1487-1499.
5. Melis A., Happe T. Hydrogen production. Green Algae as a source of energy. *Plant Phys.*, 2001, vol. 12, pp. 3740-3748.
6. Tolstygina I.V., Antal T.K., Kosourov S.N., Krendeleva T.E., Rubin A.B., Tsygankov A.A. Hydrogen production by photoautotrophic sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* pre-grown and incubated under high light. *Biotech. Bioeng.*, 2009, vol. 102, no. 4, pp. 1-7.
7. Volgusheva A.A., Kukarskikh G.P., Krendeleva T.E., Rubin A.B., Mamedov F. Hydrogen photoproduction in green algae *Chlamydomonas reinhardtii* under Magnesium deprivation. *RSC Advances*, 2015, vol. 5, no. 8, pp. 5633-5637.
8. Antal T.K., Matorin D.N., Kukarskikh G.P., Lambreva M.D., Tyystjärvi E., Krendeleva T.E., Tsygankov A.A., Rubin A.B. Pathways of hydrogen photoproduction by immobilized *Chlamydomonas reinhardtii* cells deprived of sulfur. *Int. J. Hyd. Energy*, 2014, vol. 39, pp. 18194-18203.
9. Tsygankov A., Kousourov S., Siebert M., Ghirardi M. Hydrogen photoproduction under continuous illumination by sulfur-deprived, synchronous *Ch. reinhardtii* cultures. *Int. J. Hyd. Energy*, 2002, vol. 27, pp. 1239-1244.
10. Antal T.K., Krendeleva T.E., Rubin A.B. Study of Photosystem 2 Heterogeneity in the Sulfur Deficient Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth. Res.*, 2007, vol. 94, pp.13-22.
11. Tikhonov A.N. pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in Chloroplasts. *Photosynth. Res.*, 2013, vol. 116, pp. 511-534.
12. Plyusnina T.Yu., Ryznichenko G.Yu., Rubin A.B. Regulation of electron transport pathways in cells of *Chlamydomonas reinhardtii* under stress conditions. *J. of Plant Physiology*, 2013, vol. 60, no. 4, pp. 518-528.
13. Yacoby I., Pochekailov S., Toporik H., Ghirardi M., King P.W., Zhang S. Photosynthetic electron partitioning between [FeFe]-hydrogenase and ferredoxin:NADP<sup>+</sup>-oxidoreductase (FNR) enzymes *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 23, pp. 9395-9401.
14. Diakonova A.N., Khrushchev S.S., Kovalenko I.B., Ryznichenko G.Yu, Rubin A.B. The role of electrostatic interactions in the formation of ferredoxin–ferredoxin NADP<sup>+</sup> reductase and ferredoxin–hydrogenase complexes. *Biophysics*, 2016, vol. 61, no. 4, pp. 572-579.
15. Diakonova A.N., Khrushchev S.S., Kovalenko I.B., Ryznichenko G.Yu, Rubin A.B. Influence of pH and ionic strength on electrostatic properties of ferredoxin, FNR, and hydrogenase and the rate constants of their interaction. *Physical Biology*, 2016, vol. 13, no. 5, p. 056004.
16. Cardona T., Sedoud A., Cox N., Rutherford A.W. [et al.] Charge separation in Photosystem II: A comparative and evolutionary overview. *Biochimica et biophysica acta-bioenergetics*, 2012, vol. 1817, pp. 26-43.
17. Gibasiewicz K., Dobek A., Breton J., Leibl W. Modulation of Primary Radical Pair Kinetics and Energetics in Photosystem II by the Redox State of the Quinone Electron Acceptor QA. *Biophys. J.*, 2001, vol. 80, pp. 1617-1630.
18. Martin E., Samoilova R.I., Narasimhulu K.V., Lin T.-J., O'malley P.J., Wraight C.A., Dikanov S.A. Hydrogen bonding and spin density distribution in the Q<sub>B</sub> semiquinone of bacterial reaction centers and comparison with the Q<sub>A</sub> site. *Am. Chem. Soc.*, 2011, vol. 133, pp. 5525-5537.
19. Antal T.K., Krendeleva T.E., Laurinavichene T.V., Makarova V.V., Ghirardi M.L., Rubin A.B., Tsygankov A.A., Seibert M. The independence of algal H<sub>2</sub> production on Photosystem II and O<sub>2</sub> consumption activities in sulfur-deprived *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 2003, vol. 1607, pp.153-160.
20. Plyusnina T.Yu., Ryznichenko G.Yu., Rubin A.B. An analysis of the distribution of key metabolic fluxes in *Chlamydomonas reinhardtii* cells under the conditions of a sulfur deficit. *Biophysics*, 2017, vol. 62, pp. 385-395.
21. Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Gromov P.A., Grachev E.A., Ustinin D.M., Ryznichenko G.Yu., Rubin A.B. Direct simulation of plastocyanin and cytochrome f interactions in solution. *Phys. Biol.*, 2006, vol. 3, pp. 121-129.

22. Kovalenko I., Knyazeva O., Antal T., Ponomarev V., Riznichenko G., Rubin A. Multiparticle Brownian dynamics simulation of experimental kinetics of cytochrome bf oxidation and photosystem I reduction by plastocyanin. *Physiologia Plantarum*, 2017, vol. 161, pp. 88-96.

#### KINETIC AND MULTI-PARTICLE BROWNIAN MODELS OF SWITCHING FLOWS IN MICROALGAE PRODUCING MOLECULAR HYDROGEN

Riznichenko G.Yu., Plyusnina T.Yu., Dyakonova A.N., Khrushchev S.S., Kovalenko I.B., Rubin A.B.

Moscow State Lomonosov University

*Leninskiye Gory 1, Moscow, 119234, Russia; e-mail: riznich46@mail.ru*

**Abstract.** Structural dynamic (kinetic) and agent (multi-particle Brownian) models are used to study the role of pH in the regulation of electron fluxes in the areas of Photosystem II and Photosystem I when switching the normal mode of active photosynthesis and carbon fixation to the regime of inactive photosynthesis and the production of molecular hydrogen. A multiscale kinetic model describes electron fluxes in PS II, an increase of the proton concentration in the stroma, and the reduction of the plastoquinone pool in the photosynthetic pathway due to the chloro-respiration chain. Based on this model a kinetic mechanism of the jump in the activity of Photosystem II, the stromal acidification in the Photosystem II region and the switching of the electron flow to the path of chloro-respiration is proposed. Multiparticle Brownian models describe the competitive interaction of ferredoxin molecules, which take electrons from PSI, to alternative acceptors: NAD(P)H (CO<sub>2</sub> fixation pathway) and hydrogenase (hydrogen production path). The analysis of the results of multiparticle modeling and electrostatic properties of interacting molecules showed that the electron flux from ferredoxin to hydrogenase increases at alkaline pH values (~ 8-8.5) in the vicinity of the Photosystem I acceptor site. The results obtained confirm the hypothesis about the regulatory role of local pH values, widely discussed in the literature in the processes of photosynthesis.

**Key words:** *photosynthesis, electronic transport, hydrogen-production from microalgae, kinetic models, multiparticle Brownian models, ferredoxin.*