

На правах рукописи

ФРОЛОВ АЛЕКСЕЙ ЕВГЕНЬЕВИЧ

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ pH-ЗАВИСИМОЙ
РЕГУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРОННОГО И ПРОТОННОГО ТРАНСПОРТА
В ХЛОРОПЛАСТАХ**

Специальность 03.00.02 - Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2009

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета
Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: доктор физико-математических наук, профессор
Тихонов Александр Николаевич

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук, профессор
Караваев Владимир Александрович

кандидат физико-математических наук,
Черепанов Дмитрий Александрович

Ведущая организация: Институт химической физики имени
Н.Н.Семенова РАН

Защита состоится 18 июня 2009 года в 16 час. на заседании Совета по защите диссертаций Д501.002.11 по физико-математическим наукам при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: Москва, ГСП-1, 119991, Ленинские горы 1-2, МГУ, физический факультет, аудитория 5-19.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Автореферат разослан 14 мая 2009 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 501.002.11
доктор физико-математических наук

Г.Б. Хомутов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Изучение механизмов регуляции процессов электронного и протонного транспорта в клетках фотосинтезирующих бактерий, водорослей и в хлоропластах высших растений – актуальная задача биофизики фотосинтеза. Фотосинтез играет исключительно важную роль в круговороте веществ и энергии в биосфере. Известно, что в цепи электронного транспорта фотосинтезирующих организмов оксигенного типа имеются несколько участков, скорость электронного транспорта на которых контролируется значениями рН внутритилакоидного пространства (люмена) и стромы. Протолитическая реакция окисления пластохинола цитохромным b_6/f -комплексом – лимитирующая стадия переноса электронов между фотосистемами 2 и 1 (ФС2 и ФС1), скорость которой зависит от рН люмена (pH_i). Скорость электронного транспорта на акцепторном участке ФС1 зависит от активности ключевых ферментов цикла Кальвина, которая, в свою очередь, контролируется величиной рН стромы (pH_o). Таким образом, фотоиндуцированные изменения pH_i и pH_o могут оказывать существенное влияние на кинетику световых и темновых стадий фотосинтеза в фотосинтетических системах оксигенного типа. Математическое моделирование рН-зависимых стадий электронного и протонного транспорта в хлоропластах высших растений может играть важную роль в анализе механизмов регуляции световых и темновых стадий фотосинтеза.

Цель и задачи исследования

Основной целью данной диссертационной работы является теоретическое исследование рН-зависимой регуляции электронного и протонного транспорта в хлоропластах. Для решения этой задачи в диссертационной работе были выполнены теоретические исследования, направленные на решение двух конкретных задач.

1) Построение математической модели электронного и протонного транспорта в хлоропластах высших растений, учитывающей фотоиндуцированные изменения рН в люмене и в строме хлоропласта.

2) Квантово-химическое моделирование реакции окисления пластохинола в активном центре Q_o цитохромного b_6f -комплекса, являющейся лимитирующей стадией в цепи электронного переноса между двумя фотосистемами.

Научная новизна и практическая значимость работы

Впервые построена математическая модель процессов электронного и протонного транспорта в хлоропластах, учитывающая наряду с изменениями pH_i фотоиндуцированные изменения pH в строме, влияющие на скорость оттока электронов от ФС1 за счет активации ферментов цикла Кальвина. Эта модель описывает основные закономерности сложной кинетики фотоиндуцированного окисления P_{700} в интактных хлоропластах.

Построены две модельные системы для квантовомеханического исследования реакции двухэлектронного окисления пластохинола в Q_o центре цитохромного b_6f -комплекса. Результаты расчетов свидетельствуют о том, что первая стадия окисления хинола (переноса атома водорода от хинола к железо-серному центру Риске) является эндоэргическим процессом, скорость которого лимитирует время оборота b_6f -комплекса.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы представлены на Международной конференции «Ломоносов-2004», серия «Физика» (Москва), Vth Meeting of Russian Society for Photobiology and the International Conference "Light Energy Conversion in Photosynthesis" (Pushchino, 2008).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 4 работы, из них в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК – 2, тезисов докладов на Российских и международных научных конференциях – 2.

Объем и структура работы

Диссертация состоит из введения, четырех глав, включая обзор литературы и методы, заключения и выводов. Общий объем работы составляет ___ стр. текста, включая ___ рис., 2 таблицы и список литературы, содержащий ___ наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Рассмотрена актуальность темы диссертационной работы, сформулирована цель работы и определены основные задачи исследования.

Глава 1. Обзор литературы

В первом разделе Главы 1 даны краткие сведения о фотосинтезе, рассмотрена схема строения хлоропластов. Следующий раздел содержит описание цепи электронного транспорта в фотосинтетических системах оксигенного типа, рассмотрена схема расположения электрон-транспортных комплексов (ФС1, ФС2 и *b₆f*-комплекса) и их взаимодействие в тилакоидной мембране. Обсуждаются механизмы сопряжения электрон-транспортных процессов с процессами трансмембранного переноса протонов, особое внимание уделено роли пластохинона в этих процессах. Рассмотрено сопряжение энергодонорных реакций электронного транспорта с энергоакцепторными процессами синтеза АТФ.

Третий раздел Главы 1 посвящен регуляции фотосинтеза в хлоропластах. Основное внимание уделено анализу двух механизмов рН-зависимой регуляции, имеющих непосредственное отношение к теме диссертационной работы.

1. Регуляция электронного переноса на донорной стороне ФС1, обусловленная замедлением электронного транспорта в результате снижения рН_i.
2. Ускорение оттока электронов от ФС1 вследствие индуцированной светом активации ферментов цикла Кальвина.

В четвертом разделе описана структура и особенности функционирования цитохромного *b₆f* комплекса. Основное внимание уделено реакции окисления пластохинола, являющейся лимитирующей стадией в работе цепи фотосинтетического транспорта электронов.

В пятом разделе кратко рассмотрены теоретические работы по математическому моделированию электронного транспорта в фотосинтетических системах, которые наиболее близки к теме настоящей диссертационной работы. В последнем разделе Главы 1 рассмотрены теоретические аспекты электронного и протонного транспорта в биологических системах.

Глава 2. Методы

В главе 2 приведены краткие сведения о методе функционала плотности. Описана программа «Природа» (автор Д.Н. Лайков), которая позволяет проводить расчеты методом функционала плотности для достаточно больших систем. Все основные расчеты были выполнены с использованием обменно-корреляционного функционала PBE и наборов базисных функций 3z и 4z.

Глава 3. Моделирование электронного и протонного транспорта в хлоропластах с учётом активации цикла Кальвина и изменений рН стромы

В этой главе описана разработанная в диссертации математическая модель электронного и протонного транспорта в хлоропластах высших растений и клетках цианобактерий, учитывающая фотоиндуцированные изменения внутритилакоидного рН (pH_i) и рН стромы (pH_o). Наряду с нециклическим транспортом электронов от ФС2 к конечному акцептору ФС1, в модели учитываются процессы синтеза АТФ, сопряженного с трансмембранным переносом протонов через АТФ-синтазу, а также потребление АТФ и NADPH в цикле Кальвина. Учет фотоиндуцированных изменений рН в строме и в люмене позволил описать влияние рН-зависимых процессов регуляции электронного транспорта на донорной и акцепторной сторонах ФС1 на кинетику фотоиндуцированных редокс-превращений ряда переносчиков электрон-транспортной цепи.

Для оценки фотоиндуцированных изменений рН в строме хлоропласта рассмотрена модель, предполагающая наличие трех замкнутых компартментов (рис.1). Мы принимаем, что все электронные переносчики, встроенные в тилакоидную мембрану (ФС1, ФС2, цитохромный *b₆f*-комплекс, АТФ-синтаза), равномерно распределены в мембране. Подвижные переносчики, связывающие ФС2 и ФС1, также равномерно распределены в системе – в тилакоидной мембране находятся молекулы пластохинона, во внутритилакоидном объеме – пластоцианин, в строме находятся терминальные акцепторы ФС1. Электронный перенос на участке *b₆f*-комплекс → пластоцианин → ФС1 не является лимитирующим звеном в цепи нециклического транспорта электронов.

Считается, что скорость окисления пластохинола контролируется величиной внутритилакоидного pH_i .

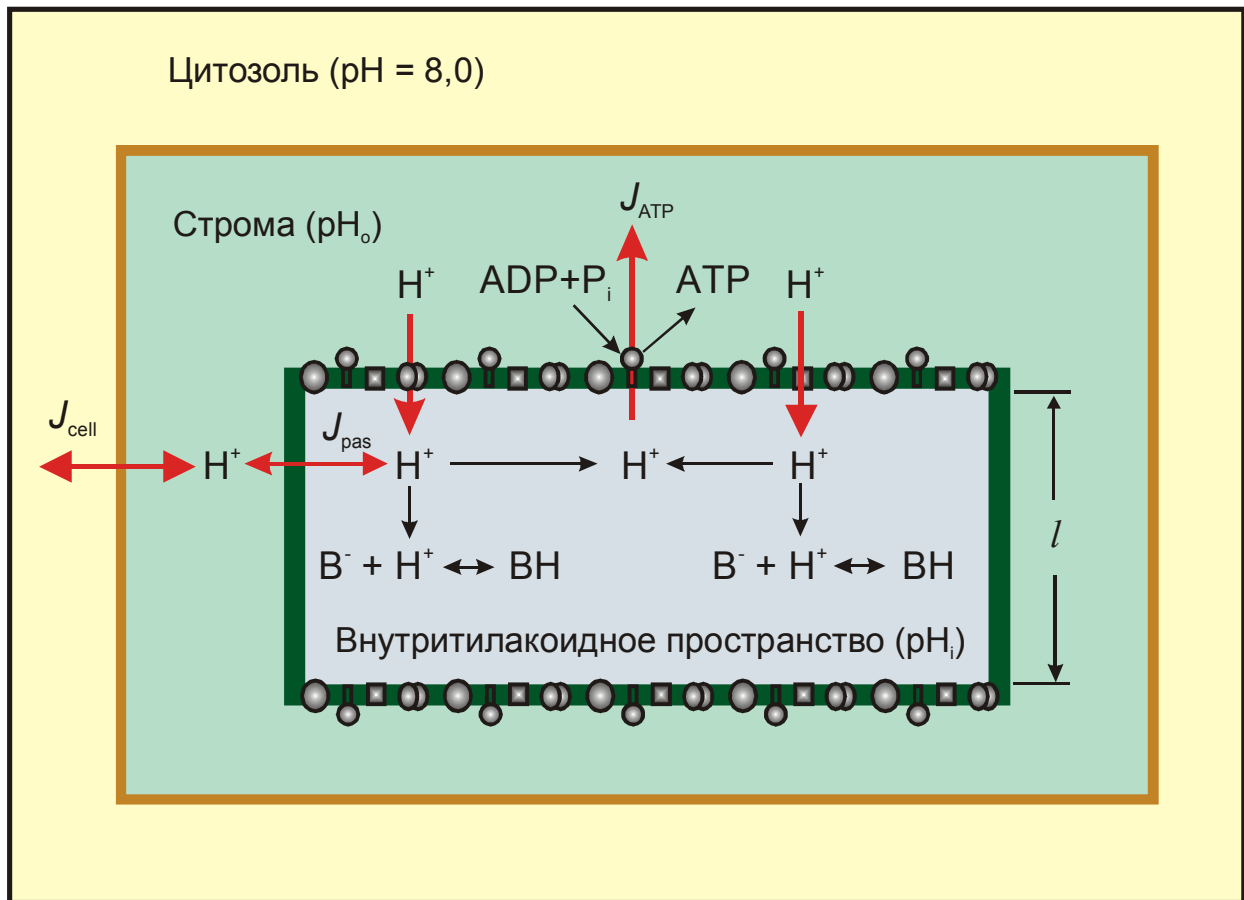


Рис. 1. Схема компартментализации фотосинтетического аппарата в хлоропласте.

Рассматриваются следующие процессы протонного транспорта. Появление протонов внутри тилакоида происходит за счет разложения воды в ФС2 и окисления пластохинола b_6f -комплексом. Изменение концентрации ионов водорода в строме происходит вследствие связывания протонов молекулами пластохинона, восстанавливаемыми ФС2, а также восстановленными молекулами NADP. Кроме этого, учитывается связывание протонов буферными группами, расположенными в строме и на обеих поверхностях тилакоидной мембраны (рис.2). Рассматриваются трансмембранный перенос протонов, сопряженный с синтезом АТФ (поток J_{ATP}), а также пассивная утечка протонов из тилакоида в строму (поток J_{pass}), не связанная с синтезом АТФ, и поток протонов из стромы в цитозоль (поток J_{cell}). Локализованный в строме восстановленный терминальный акцептор электрона A^- принимает протоны из стромы.

Протонированная форма этого переносчика (АН) потребляется в реакциях цикла Кальвина. Схема редокс-превращений конечного акцептора электрона А показана на рис. 2.

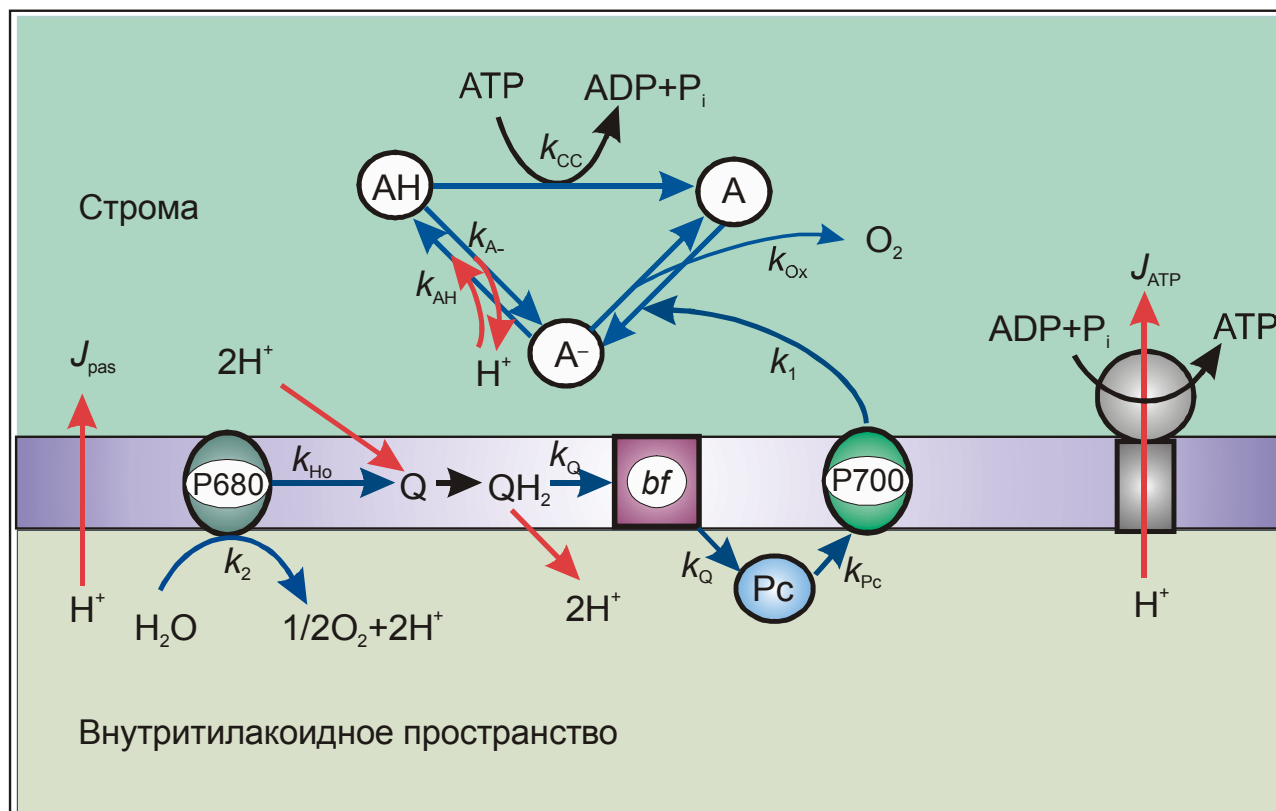


Рис. 2. Схема электрон-транспортных и протон-транспортных процессов, рассматриваемых в модели.

Для описания электрон-транспортных процессов введены следующие переменные: 1) $[P_{700}^+]$ – концентрация окисленных реакционных центров, входящих в состав комплексов ФС1; 2) $[Pc]$ – концентрация окисленного пластоцианина; 3) $[Q]$ – концентрация окисленного пластохинона; 4) $[P_{680}^+]$ – концентрация окисленных центров ФС2; 5) $[A]$ – концентрация окисленной формы конечного акцептора электрона; 6) $[AH]$ – концентрация восстановленной протонированной формы конечного акцептора электрона, $[ATP]$ – концентрация АТФ. Для описания протон-транспортных процессов введены переменные $[H_i^+]$ и $[H_o^+]$ – активности ионов водорода внутри тилакоида и в строме, соответственно. Система уравнений, описывающая кинетику редокс-превращений электронных переносчиков, имеет следующий вид:

$$\frac{d[P_{700}^+]}{dt} = L_1 k_1 [A] ([P_{700}]_0 - [P_{700}^+]) - k_{pc} [P_{700}^+] ([Pc]_0 - [Pc]), \quad (1)$$

$$\frac{d[Pc]}{dt} = -4 \frac{\sigma_{bf}}{l} K_Q ([Q], [Pc], [H_i^+]) + 2 \frac{k_{pc}}{l} [P_{700}^+] ([Pc]_0 - [Pc]), \quad (2)$$

$$\frac{d[Q]}{dt} = \sigma_{bf} K_Q ([Q], [Pc], [H_i^+]) - \frac{1}{2} L_2 k_{Ho} [Q] [H_o^+] ([P_{680}]_0 - [P_{680}^+]), \quad (3)$$

$$\frac{d[P_{680}^+]}{dt} = L_2 k_{Ho} [Q] [H_o^+] ([P_{680}]_0 - [P_{680}^+]) - k_2 [P_{680}^+], \quad (4)$$

где L_1, L_2 – числа квантов света, попадающих к первичным донорам ФС1 и ФС2 в единицу времени; k_1, k_2, k_{pc}, k_{Ho} – эффективные константы скоростей соответствующих реакций, σ_{bf} – поверхностная плотность b_{6f} -комплекса, l – толщина внутритилакоидного пространства (рис. 1, 2). Функция $K_Q([Q], [Pc], [H_i^+])$ характеризует совокупность процессов, связанных с окислением молекулы пластохинола цитохромным b_{6f} -комплексом.

Следующие два уравнения описывают изменения концентраций окисленной (A) и восстановленной протонированной (AH) форм конечного акцептора электрона ФС1:

$$\frac{d[A]}{dt} = -L_1 k_1 \frac{2\varepsilon}{l} [A] ([P_{700}]_0 - [P_{700}^+]) + k_{cc} ([AH], [ATP]) + k_{ox} ([A]_0 - [A] - [AH]), \quad (5)$$

$$\frac{d[AH]}{dt} = k_{AH} [H_o^+] ([A]_0 - [A] - [AH]) - k_{A^-} [AH] - k_{cc} ([AH], [ATP]), \quad (6)$$

где k_{AH}, k_{A^-} – константы скоростей реакций превращения конечного акцептора, k_{ox} – константа скорости окисления восстановленной формы конечного акцептора электрона (A^-) кислородом; ε – отношение внутреннего объема тилакоида к объему стромы.

Функция (7) описывает в обобщенной форме потребление NADPH и ATP в различных процессах биосинтеза (цикл Кальвина, синтез жирных кислот и т.д.).

$$k_{cc} ([AH], [ATP]) = R_{cc} \cdot \left(\frac{[ATP][AH]}{k_2^s + k_3^s [ATP] + k_4^s [AH] + k_5^s [ATP][AH]} \right) \quad (7)$$

Множитель R_{CC} является функцией, феноменологически описывающей процессы рН-зависимой активации ферментов цикла Кальвина. Для описания этих процессов была выбрана функция, имеющая следующий вид:

$$R_{CC} = \left(\frac{k_{\min}^s - k_{\max}^s}{1 + e^{\frac{pH_o - X_0}{\Delta X}}} + k_{\max}^s \right). \quad (8)$$

При выборе этой функции мы исходили из литературных данных о зависимости активности ключевых ферментов цикла Кальвина от рН стромы.

Синтез АТФ из АДФ и ортофосфата АТФ-синтазными комплексами и их расход в реакциях биосинтеза описывали уравнением:

$$\frac{d[ATP]}{dt} = \frac{2\varepsilon}{\Omega_1 l} J_{ATP} - \frac{1}{\Omega_2} k_{CC}([AH], [ATP]), \quad (9)$$

где Ω_1 и Ω_2 – стехиометрические коэффициенты соответствующих реакций.

Система уравнений, описывающая протон-транспортные процессы, имеет вид:

$$\left[1 + \sum_m \frac{2K_{im}^s B_{im}^s}{l(K_{im}^s + [H_i^+])^2} \right] \frac{d[H_i^+]}{dt} = \frac{2}{l} (k_2[P_{680}^+] + 2\sigma_{b/f} K_Q - J_{pas} - J_{ATP}), \quad (10)$$

$$\begin{aligned} & \left[1 + \frac{2\varepsilon K_o^s B_o^s}{l(K_o^s + [H_o^+])^2} + \frac{K^V B^V}{(K^V + [H_o^+])^2} \right] \frac{d[H_o^+]}{dt} = \frac{2\varepsilon}{l} [J_{pas} + J_{ATP} - J_{cell} - L_2 k_{H_o} [Q][H_o^+]([P_{680}]_0 - [P_{680}^+])] + \\ & + k_{A^-} [AH] - k_{AH} [H_o^+]([A]_0 - [A] - [AH]) + \frac{n}{\Omega_2} k_{CC}([AH], [ATP]) - \frac{2n\varepsilon}{\Omega_1 l} j_{ATP} \end{aligned} \quad (11)$$

Параметры K_o^s , K_{im}^s , K^V , B_o^s , B_{im}^s , B^V характеризуют буферные свойства системы. Функция (12) определяет пассивную утечку протонов через тилакоидную мембрану:

$$J_{pas} = \frac{\sigma_M k_o k_i ([H_i^+] - [H_o^+])}{k_o (K_{M_o} + [H_o^+]) + k_i (K_{M_i} + [H_i^+])}. \quad (12)$$

Здесь σ_M - поверхностная плотность протон-проводящих групп тилакоидной мембраны; k_i, k_o - константы скоростей, характеризующих перенос ионов водорода через тилакоидную мембрану; K_{M_i}, K_{M_o} - константы равновесия, характеризующие взаимодействие протонов с буферными группами на внутренней и внешней

сторонах тилакоидной мембраны. Аналогичным образом задаются потоки протонов через АТФ-синтазу (J_{ATP}) и между стромой и цитозолем (J_{cell}).

На рис. 3 показана кинетика изменений pH_i , pH_o и концентрации АТФ после включения света. Стационарное состояние достигается, когда $[ATP]/[ATP]_0 \rightarrow 1$, при этом поток ионов водорода через АТФ-синтазу существенно уменьшается. На рис. 4 показаны для примера кривые фотоиндуцированных изменений концентраций P_{700}^+ и различных форм конечного акцептора электрона. Теоретически рассчитанная кинетика изменений $[P_{700}^+]$ имеет немонотонный вид, характерный для нативных фотосинтетических систем окисленного типа (кривая О-Р-М-S-T-F). Сравнительный анализ кинетических кривых для разных электронных переносчиков и фотоиндуцированных изменений pH_i и pH_o позволил выделить два основных фактора рН-зависимой регуляции электронного транспорта, определяющих немонотонную временную зависимость $[P_{700}^+]$: а) торможение электронного транспорта между фотосистемами вследствие уменьшения pH_i , и б) ускорение оттока электронов от ФС1 вследствие увеличения pH_o .

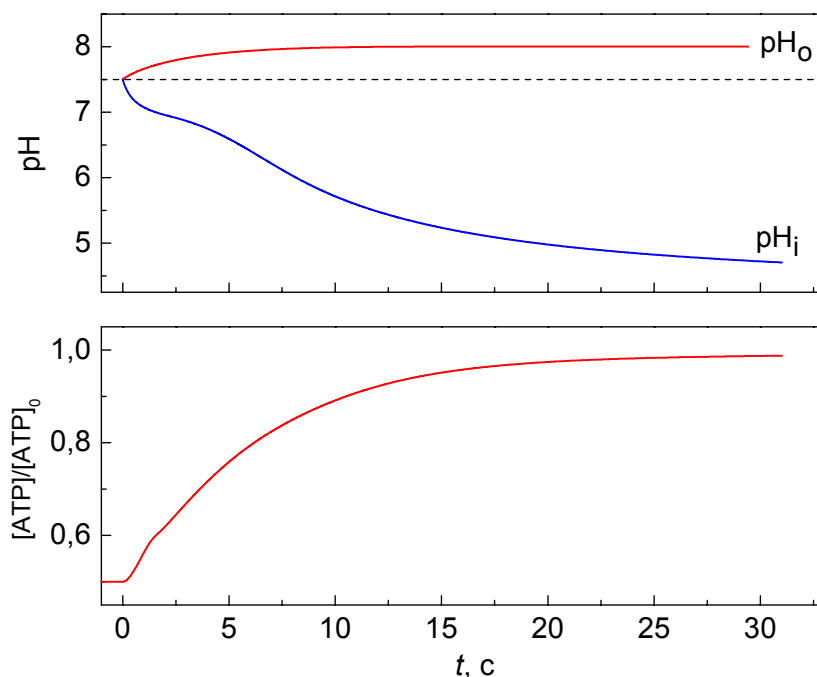


Рис. 3. Кинетика фотоиндуцированных изменений $pH_o(t)$, $pH_i(t)$ (наверху) и концентрации $[ATP](t)/[ATP]_0$ (внизу).

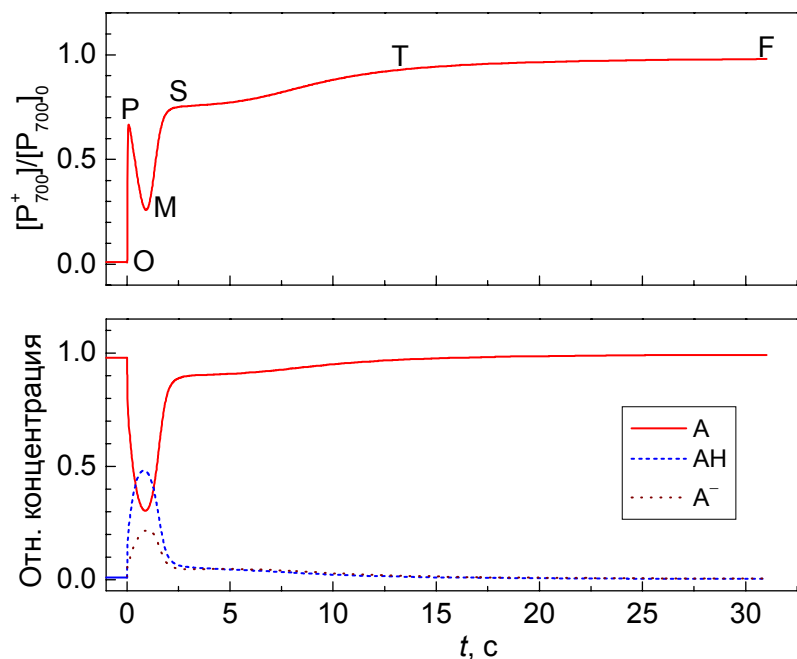


Рис. 4. Кинетика фотоиндуцированных изменений концентраций $[P_{700}^+](t)/[P_{700}]_0$ (наверху), $[A](t)/[A]_0$, $[AH](t)/[A]_0$ и $[A^-](t)/[A]_0$ (внизу).

Глава 4. Квантовохимическое моделирование реакции окисления пластохинола в Q_0 центре цитохромного b_6f -комплекса

4.1. Расчет спектров ЭПР для пластосемихинона и его аналогов

В данном разделе приведены результаты расчетов спектров ЭПР методом функционала плотности для анион-радикалов пластохинона и его аналогов, проведено сравнение расчетных и экспериментальных спектров (рис. 5). Модельные системы, построенные для анализа двух последовательных одноэлектронных шагов окисления хинола (рис. 6, 7 и 8) содержат триметил-1,4-бензохинол ($TMQH_2$) – аналог пластохинола без изопреновой цепи. Окисление $TMQH_2$ рассматривается как модельная реакция для окисления пластохинола в активном центре Q_0 . Расчеты спиновой плотности на атомах, на основании которых был смоделирован спектр ЭПР анион-радикала молекулы триметилхинона, дали хорошее согласие с экспериментом (рис. 5). Это свидетельствует об адекватности использованного нами метода расчета электронных характеристик молекул хиноидной природы.

4.2. Квантовохимическое моделирование реакции окисления пластохинола до пластосемихинона в активном центре Q_o b_6f -комплекса

На рис. 7 показана модельная система, использованная для расчетов изменения энергии для первой стадии окисления хинола ($QH_2 + ISP_{ox} \rightarrow QH^{\bullet} + H^+ISP_{red}$), включающая в себя дважды восстановленный триметил-1,4-бензохинол ($TMQH_2$), железо-серный кластер $[Fe_2S_2]$ и ближайшие к нему фрагменты полипептидной цепи C, окружающей железо-серный кластер (Cys134-Thr135-His136-Leu137-Gly138-Cys139, Cys154-His155-Gly156-Ser157, Cys152 и Tyr159). Исходная геометрия этой системы была построена на основе рентгеноструктурных данных для b_6f -комплекса из *Chlamidomonas reinhardtii* (код структуры 1Q90).

Энергетические профили реакции окисления хинола до семихинона

Первая стадия окисления пластохинола обычно рассматривается как лимитирующая стадия, которая определяет скорость работы b_6f комплекса. Знание энергетических характеристик этого процесса было использовано для оценки константы скорости окисления QH_2 . Нами было рассчитано, как энергия модельной системы меняется при перемещении атома водорода от QH_2 к N_{ϵ} атому His-155 железо-серного белка Риске (ISP). В качестве координаты реакции ($O-H \cdots N_{\epsilon} \rightarrow O \cdots H-N_{\epsilon}$) выбрано расстояние между атомами H и N_{ϵ} (параметр R_{N-H}). Нами были выполнены расчеты для четырех конформаций модельной системы: 1) исходная (неоптимизированная) система, построенная на основе рентгеноструктурных данных (модель **X-1**), 2) частично оптимизированная система, полученная на 35-м шаге процедуры оптимизации (модель **A-1**), 3) частично оптимизированная система, полученная на 257-м шаге процедуры оптимизации (модель **B-1**), и 4) полностью оптимизированная система (модель **C-1**). Конформация частично оптимизированной системы **A-1** близка к геометрии исходной системы, она была использована в качестве базисной модели для описания первой стадии окисления $TMQH_2$.

На рис. 9 показаны энергетические профили реакции переноса атома водорода от $TMQH_2$ к N_{ϵ} атому имидазольного кольца His-155, рассчитанные для трех конформаций модельной системы (модели **A-1**, **B-1** и **C-1**).

Показанные энергетические профили описывают перенос атома водорода вдоль пути наименьшей потенциальной энергии. Эти пути были найдены путем «точечных» расчетов, полученных для различных положений атома водорода между TMQH₂ и His-155.

Для частично оптимизированной системы **A-1** энергетический профиль имеет локальные минимумы, соответствуют координатам реакции $R_{N_e-H} = 2,64$ и $1,05 \text{ \AA}$. Перенос атома водорода $O-H \cdots N_e \rightarrow O \cdots H-N_e$ идет с повышением энергии ($\Delta E = 10,6$ ккал/моль). Энергетический барьер реакции равен $E_a^f = 25,4$ ккал/моль. При дальнейшей оптимизации геометрии системы, сопровождающейся понижением энергии, водородная связь между атомами H1 и N_e становится короче. В то же время перенос атома водорода от TMQH₂ к ISP становится менее выгодным. В системе **B-1** реакция $O-H \cdots N_e \rightarrow O \cdots H-N_e$ идет с повышением энергии $\Delta E = 18,6$ ккал/моль, а энергетический барьер $E_a^f = 26,6$ ккал/моль. Для полностью оптимизированной системы (модель **C-1**) был найден только один локальный минимум энергии при $R_{N_e-H} = 1,65 \text{ \AA}$, соответствующий ковалентной связи атома водорода в молекуле TMQH₂. Это означает, что в полностью оптимизированной системе перенос атома водорода от QH₂ к His-155 невозможен.

Константа скорости и энергия реорганизации первой стадии окисления хинола

Знание разности энергии ΔE для переноса протона от TMQH₂ к ISP позволяет оценить константу скорости для первой стадии окисления TMQH₂. Скорость окисления хинола можно оценить в рамках подхода, предложенного Крофтсом для вычисления константы скорости электронного переноса (k_{PCET}), сопряженного с переносом протона (Crofts, 2004). В этом случае константу скорости k_{PCET} можно оценить из уравнения

$$\log_{10} k_{PCET} = 13 - \frac{\beta}{2.303}(R - 3,6) - \gamma \frac{(\Delta G_{ET}^0 + \lambda)^2}{\lambda} - \Delta pK, \quad (13)$$

где R – расстояние (\AA) между донором (QH₂) и акцептором электрона (атом Fe1 железо-серного кластера), $\beta = 1,4$ (\AA^{-1}), $\gamma = 3,1$ (эВ^{-1}), ΔG_e (эВ) – разность энергий конечного и начального состояний для реакции электронного

переноса, $\Delta pK = (pK_{QH_2} - pK_{ISP_{ox}})$ – разность значений pK донора (хинол) и акцептора (His155) протона, λ – энергия реорганизации (эВ). Наши расчеты показали, что с достаточно высокой точностью можно использовать соотношение $\Delta G_{ET}^{\circ} \approx \Delta E_{ET}$, где ΔE_{ET} – вклад электронной компоненты в изменение потенциальной энергии при переносе протона от хинола к $[Fe_2S_2]$ кластеру.

Электронная компонента изменения энергии (ΔE_{ET}) может быть выделена из полного изменения энергии $\Delta E = E_{QH^*ISP_{red}H} - E_{QH_2^*ISP_{ox}}$ с помощью соотношения

$$\Delta E_{ET} = \Delta E - 2.303RT(pK_{QH_2} - pK_{ISP_{ox}}), \quad (14)$$

где pK_{QH_2} и $pK_{ISP_{ox}}$ соответствуют значениям pK донора протона (QH_2) и его акцептора (His155). Для $TMQH_2$ значение pK_{QH_2} диссоциации протона в гидрофобную среду ($QH_2 \rightarrow QH^- + H^+$) составляет величину $pK_{QH_2} = 10,7$ (Rich, 1984). Значение $pK_{ISP_{ox}} = 6,5$ взято из литературных данных по титрованию *bdf*-комплекса из *Chlamidomonas reinhardtii*.

На рис. 10 показаны зависимости $\log_{10} k_{PCET}$ от $-\Delta G_{PCET}^{\circ}$, рассчитанные для различных значений энергии реорганизации λ и параметра $R = 6.7 \text{ \AA}$, соответствующего расстоянию между атомом Н1 молекулы QH_2 и атомом Fe1 $[Fe_2S_2]$ кластера. Из семейства парабол, рассчитанных по уравнению (13) для различных значений λ (рис. 10), можно выбрать кривые, одновременно удовлетворяющие кинетическим данным ($\log_{10} k_{PCET} = 2,44$; горизонтальная линия), известным из литературы, и полученным нами теоретическим значениям $-\Delta G_{PCET}^{\circ}$. Анализ результатов наших расчетов показал, что хорошее согласие с экспериментом может быть достигнуто при низких ($\lambda_1 \sim 0,02-0,05$ эВ) или при относительно высоких ($\lambda_2 \sim 1-2,8$ эВ) значениях энергиях реорганизации. Абсолютные значения λ_1 и λ_2 зависят от конфигурации системы и от длины пути переноса электрона.

Относительно низкие значения энергии реорганизации, определяемой изменениями парциальных зарядов на атомах модельной системы, были получены на основе классической теории Маркуса (Marcus, 1956). Для оценки энергии реорганизации λ_0 была использована формула:

$$\lambda_o = \left(\frac{1}{\varepsilon_0} - \frac{1}{\varepsilon_s} \right) \sum_{i=1}^M (\Delta q_i)^2 \left(\frac{1}{2a_o} + \frac{1}{2a_i} - \frac{1}{R_i} \right) \quad (15)$$

Здесь Δq_i – изменение заряда на i -м атоме в результате переноса протона от QH₂ к His155, a_o и a_i – радиусы атома O1 молекулы QH₂ и i -го атома соответственно, ε_0 и ε_s – оптическая и статическая диэлектрические проницаемости, R_i – расстояние между атомом O1 и i -м атомом. Показано, что при значениях ε_s в интервале от 4 до 10 энергия реорганизации λ_o попадает в интервал от 0,035 до 0,070 эВ.

4.3. Квантово-химическое моделирование реакции окисления пластосемихинона

На рис. 8 показана модельная система, использованная для расчетов изменений энергии на втором шаге окисления хинола (TMQH + b_6^L (ox) → TMQ + H⁺ b_6^L (red)). Данная система включает в себя семихинон TMQH, низкопотенциальный гем b_6^L и ближайшие аминокислотные остатки полипептидной цепи В, окружающие гем b_6^L (His86, Arg87, Thr134, Gly135, Tyr136, His187). Карбоксильная группа Glu78 рассматривается как акцептор протона, отдаваемого молекулой TMQH. Расстояние между атомом водорода H2 молекулы TMQH и ближайшим атомом кислорода карбонильной группы Glu78 составляет 3,5 Å. Исходная геометрия этой системы была построена на основе рентгеноструктурных данных для кристаллизованного b_6f -комплекса (структура X-2). Структура, соответствующая частично оптимизированной геометрии модельной системы, обозначена как A-2. Для этой системы нами было показано, что перенос протона от TMQH на депротонированную карбонильную группу Glu78 является экзотермичным процессом, характеризующимся значительным понижением энергии $\Delta E_2 = E(\text{QH} \dots \text{E}_{78}) - E(\text{Q} \dots \text{H} \cdot \text{E}_{78}) = -20,4$ ккал/моль.

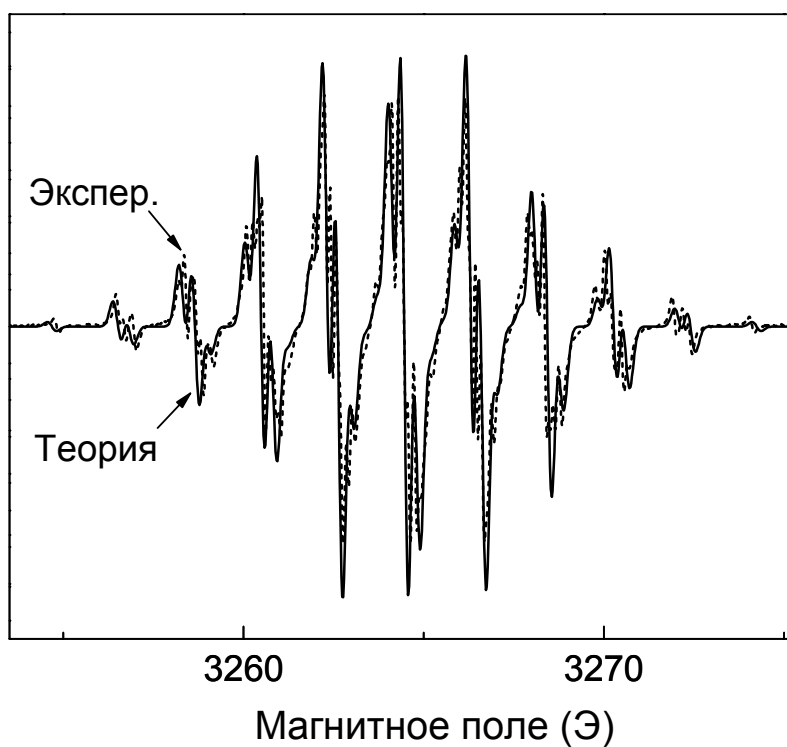


Рис. 5. Экспериментальный спектр ЭПР (пунктирная линия) анион-радикала триметилхинона, растворенного в диметилсульфоксиде, и расчетный спектр того же радикала (сплошная линия).

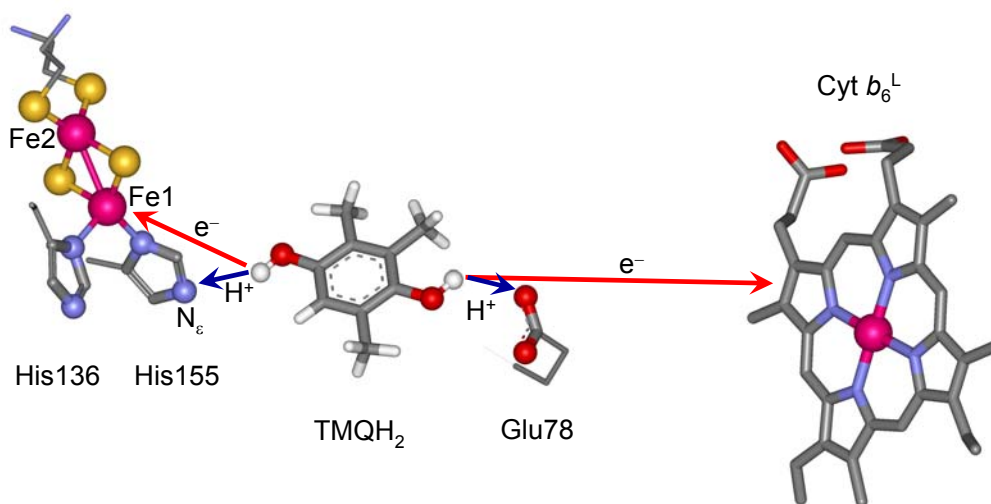


Рис. 6. Схема моделируемых процессов электронного и протонного транспорта.

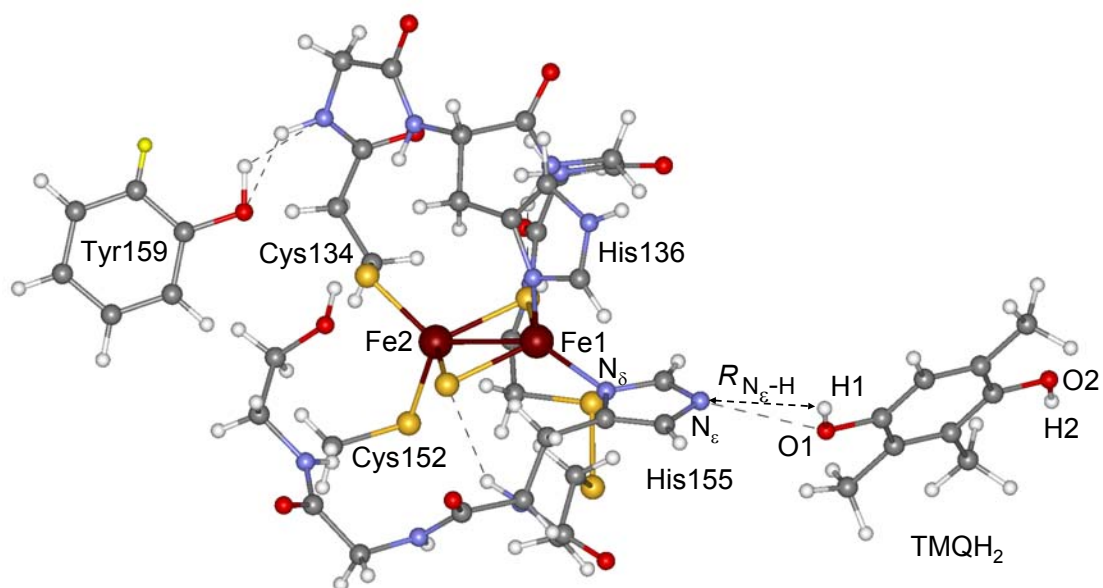


Рис. 7. Структура модельной системы для описания первой стадии окисления хинола.

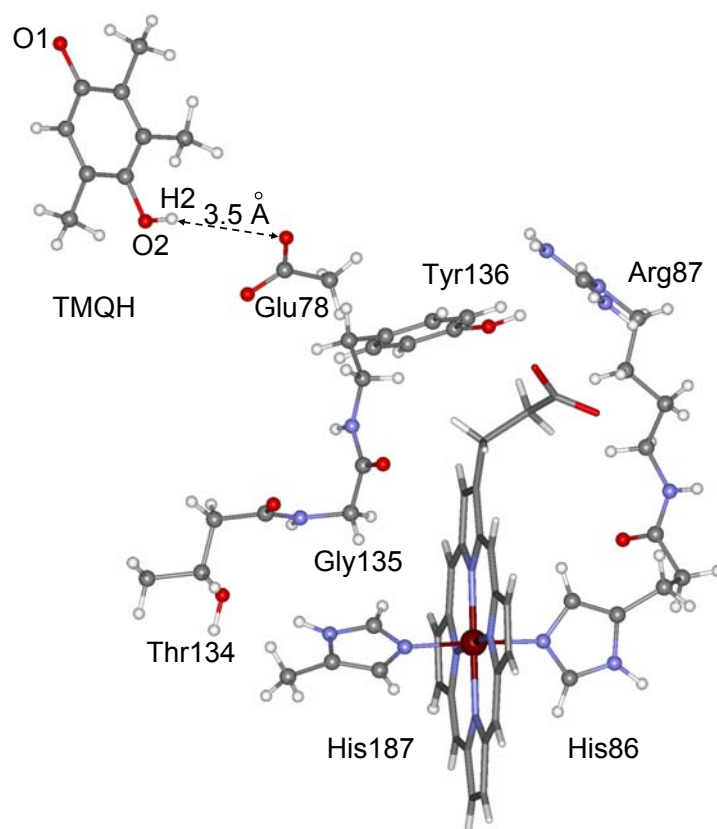


Рис. 8. Структура модельной системы для описания второй стадии окисления хинола.

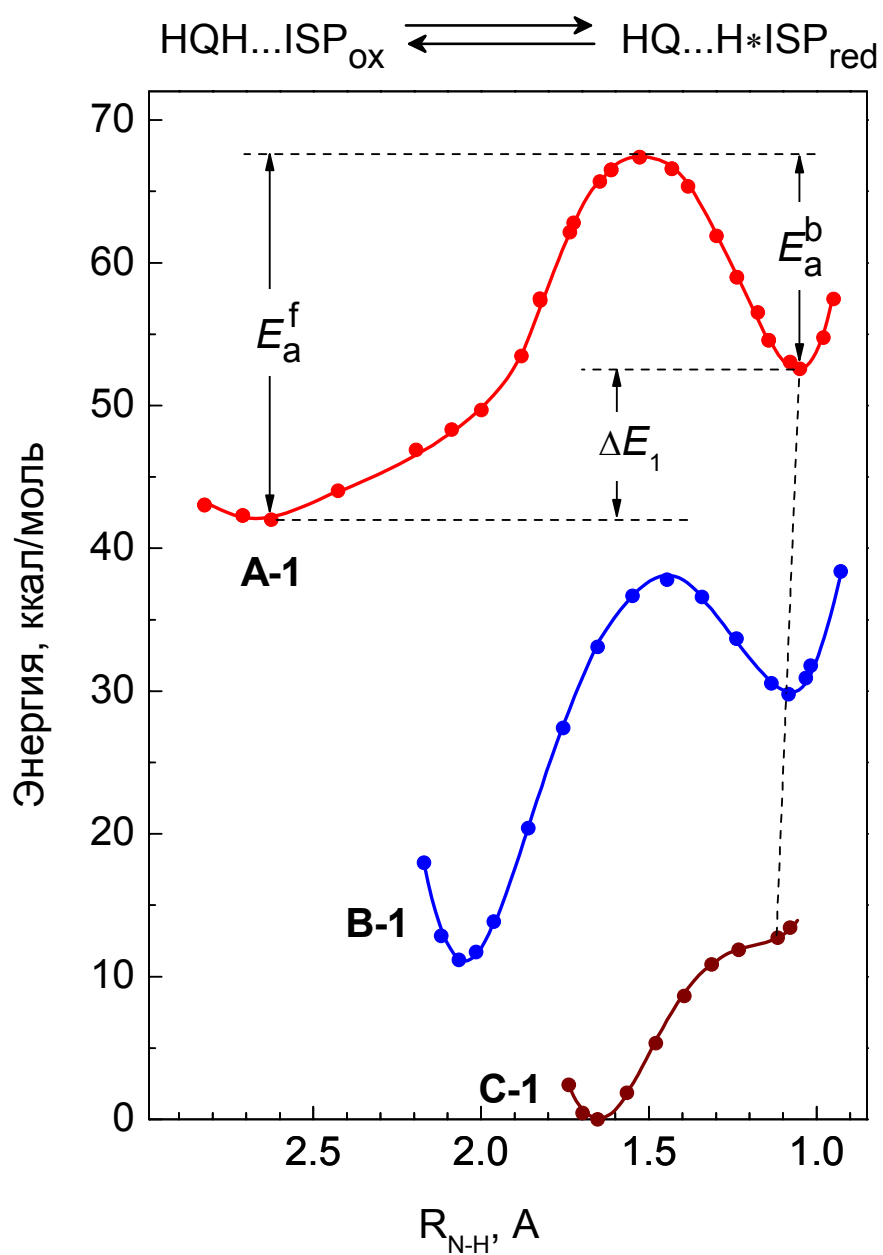


Рис. 9. Энергетические профили реакции переноса атома водорода от TMQH_2 к N_ϵ атому имидазольного кольца His-155, рассчитанные для трех конформаций системы, моделирующей реакцию окисления пластохинола до пластосемихинона (модели А-1, В-1 и С-1).

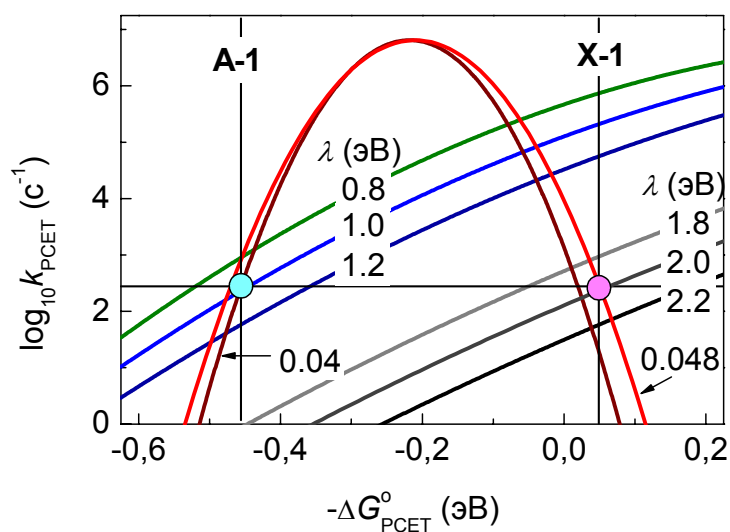


Рис. 10. Графики зависимости $\log_{10} k_{\text{PCET}}$ от $-\Delta G_{\text{PCET}}^{\circ}$, рассчитанные по уравнению (13) для различных значений энергии реорганизации λ при $R = 6,7 \text{ \AA}$.

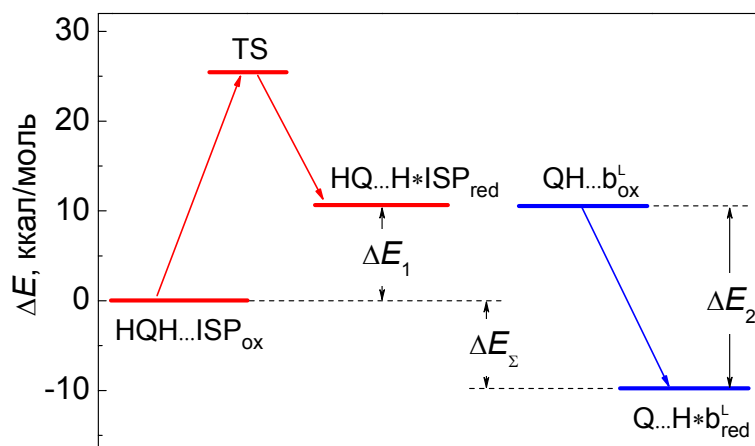
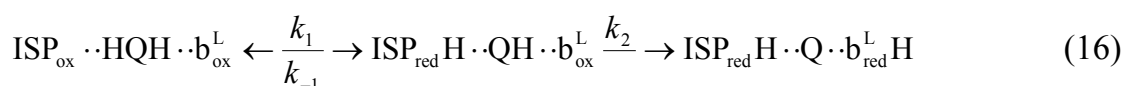


Рис. 11. Изменения энергии для двух шагов окисления TMQH_2 , вычисленные для модельных систем **A-1** и **A-2**.

На рис. 11 приведены диаграмма изменений энергии для двух стадий окисления TMQH_2 , вычисленные для модельных систем **A-1** и **A-2**. На этой диаграмме выравнены уровни энергии, соответствующие «продуктам» первой реакции ($\text{ISP}_{\text{red}}\text{H}\dots\text{TMQH}$) и «субстратам» второй реакции окисления хинола ($\text{TMQH}\dots\text{Glu78}\cdot\text{b}_{\text{ox}}^{\text{L}}$). Видно, что поглощение энергии на первом шаге окисления TMQH_2 до TMQH ($\Delta E_1 = 10,6$ ккал/моль) компенсируется значительным понижением энергии на шаге окисления TMQH до TMQ ($\Delta E_2 = -20,4$ ккал/моль).

Общее изменение энергии для двух шагов окисления хинола, полученное из независимых расчетов энергий конфигураций **A-1** и **A-2**, является отрицательной величиной: $\Delta E_{\Sigma} = \Delta E_1 + \Delta E_2 \approx -9,8$ ккал/моль. Отметим, что вычисления ΔE_{Σ} относятся только к первичным стадиям окисления хинола (перенос атома H), которые не учитывают дальнейших изменений системы, связанных с возможными конформационными перестройками и последующей диссоциацией в водную фазу протонов, перенесенных на аминокислотные остатки His155 и Glu78.

Эффективная константа скорости двухэлектронного окисления хинола до хинона (k_{QH_2}) была рассчитана в рамках простой схемы, включающей две последовательные реакции переноса атома водорода:



Константа скорости k_{-1} обратного переноса протона от ISP на семихинон связана с константой скорости прямой реакции k_1 соотношением $k_{-1} = \alpha \cdot k_1 e^{\Delta G_1^{\circ} / k_B T}$. Поправочный коэффициент $\alpha \leq 1$ введен для учета влияния конформационной подвижности ISP на вероятность обратного переноса протона ($HQ \dots H \cdot ISP_{red} \rightarrow HQH \dots ISP_{ox}$). Эффективность полного окисления хинола до хинона вычисляли по формуле:

$$k_{QH_2} / k_1 = 1 / (1 + \alpha \cdot e^{\Delta G_1^{\circ} / k_B T} k_1 / k_2) \quad (17)$$

Расчеты отношения k_{QH_2} / k_1 , вычисленного для значений параметров $\Delta G_1^{\circ} = 10,7$ ккал/моль (модель **A-1**) и $k_1 = 280$ с⁻¹ при различных величинах поправочного коэффициента α , показали, что при медленной диффузии ISP ($\tau_1 = 1/k_1 \ll \tau_{diff}$, где τ_{diff} - характерное время смещения ISP от Q_o центра к цитохрому *f*) эффективное окисление хинола ($k_{QH_2} / k_1 \geq 0,5$) может происходить только при условии $k_2 \geq 10^{10}$ с⁻¹. С увеличением подвижности ISP ($\tau_1 / \tau_{diff} \gg 1$) эффективное окисление хинола может происходить при более низких скоростях второй стадии окисления хинола ($k_2 \sim 10^6 - 10^9$ с⁻¹). Оценки диапазона возможных значений константы скорости k_2 показали, что в широком диапазоне энергий реорганизации ($0,25 \leq \lambda \leq 2,8$ мВ) значения k_2 оказываются достаточно

большими ($10^6 \leq k_2 \leq 2 \cdot 10^{11} \text{ c}^{-1}$), чтобы удовлетворить условию эффективного окисления хинола в центре Q_0 в ходе двух последовательных стадий переноса электрона на высоко- и низкопотенциальные акцепторы b_6f -комплекса.

Заключение.

В заключении подведены основные итоги выполненного исследования.

ВЫВОДЫ

1. Построена математическая модель процессов электронного и протонного транспорта в хлоропластах, впервые учитывающая не только фотоиндуцированные изменения рН внутритилакоидного пространства (pH_i), но и изменения рН в строме (pH_0), влияющие на процессы активации реакций цикла Кальвина.
2. Выделены два основных фактора рН-зависимой регуляции электронного транспорта, определяющие немонотонную временную зависимость редокс превращений P_{700} и других электронных переносчиков:
 - а) торможение электронного транспорта между фотосистемами вследствие уменьшения pH_i ;
 - б) ускорение оттока электронов от ФС1, обусловленное увеличением pH_0 .
3. Построены модельные системы для описания методом функционала плотности двух стадий окисления пластохинола в хинон-связывающем центре Q_0 цитохромного b_6f -комплекса фотосинтетической цепи переноса электронов.
4. Расчеты спиновой плотности на ядрах атомов водорода анион-радикала триметил-1,4-бензохинона дали хорошее согласие с экспериментом, что свидетельствует об адекватности использованного метода расчета электронных характеристик молекул хиноидной природы.
5. Впервые рассчитаны энергетические диаграммы для двух элементарных стадий реакции окисления триметил-1,4-бензохинола (аналог пластохинола) в центре Q_0 , сопряженных с процессами последовательного переноса электронов от молекулы хинола к железо-серному центру Риске и цитохрому b_6^L . Полученные результаты хорошо согласуются с представлениями о том,

что лимитирующей стадией в работе цепи электронного транспорта между фотосистемами является первая стадия окисления хинола в хинон-связывающем центре Q_0 цитохромного b_6f -комплекса.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Фролов А.Е., Тихонов А.Н. «Влияние фотоиндуцированных изменений рН стромы и внутритилакоидного пространства на кинетику электронного транспорта в хлоропластах. Математическая модель» - *Биофизика*, т. 52, №4, стр. 656-665 (2007).
2. Фролов А.Е., Тихонов А.Н. «Окисление пластохинола цитохромным b_6f комплексом. Исследование методом функционала плотности» – *Журнал физической химии*, т. 83, №3, стр. 593-595 (2009).
3. Фролов А.Е. «Математическая модель тилакоида как распределенной гетерогенной системы электронного и протонного транспорта» - Сборник тезисов Международной конференции «Ломоносов-2004», серия «Физика», т. 1. стр.89-90 (2004).
4. Frolov A.E., Ptushenko V.V., Trubitsin B.V., Tikhonov A.N. «pH-dependent regulation of electron transport in chloroplasts». Abstracts of Vth Meeting of Russian Society for Photobiology and the International Conference "Light Energy Conversion in Photosynthesis", Pushchino, P. 75 (2008).