

## **Модели клеточной и молекулярной регуляции фотосинтетической цепи водород-выделяющих микроводорослей**

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

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова*

[riznich@biophys.msu.ru](mailto:riznich@biophys.msu.ru)

Разработаны кинетические, броуновские и молекулярные модели процессов электронного транспорта, определяющих активность водород-выделяющих микроводорослей. С использованием моделей изучена роль pH в регуляции электронных потоков в гранальных (Фотосистема II) и стромальных (Фотосистема I) областях фотосинтетической мембраны при переключении нормального режима активного фотосинтеза и фиксации углерода на режим неактивного фотосинтеза и продуцирования молекулярного водорода. Мультимасштабная кинетическая модель электронных потоков в фотосистеме II, сопряженных с трансмембранным переносом протонов, объясняет кинетический механизм скачкообразного переключения потоков электронов с линейного электронного транспорта на цепь хлородыхания и закисление стромы в области фотосистемы 2 (pH ~ 7). Для выяснения молекулярных механизмов переключения электронных потоков на акцепторной стороне фотосистемы I разработаны многочастичные броуновские модели взаимодействия ферредоксина, принимающего электроны от фотосистемы I, с альтернативными акцепторами: НАД(Ф)Н (путь фиксации CO<sub>2</sub>) и гидрогеназой (путь производства водорода). Анализ электростатических свойств взаимодействующих молекул и молекулярно-динамическое моделирование позволяют изучить молекулярные механизмы возрастания потока электронов с ферредоксина на гидрогеназу при щелочных pH (~ 8–8.5). Совокупность полученных результатов подтверждает гипотезу о регуляторной роли локальных значений pH в процессах фотосинтеза.

*Ключевые слова: кинетическая модель, броуновская многочастичная модель, молекулярное моделирование, фотосинтез, электронный транспорт, механизмы регуляции.*

## **Models of cellular and molecular regulation of the photosynthetic chain of hydrogen-producing microalgae**

Riznichenko G.Yu., Diakonova A.N., Kovalenko I.B., Plyusnina T.Yu.,  
Khruschchev S.S., Fyodorov V.A.

*Lomonosov Moscow State University*

Kinetic, Brownian, and molecular models of electron transport processes determining the activity of hydrogen-producing microalgae have been developed. The role of pH in the regulation of the electron fluxes in the granal (Photosystem II) and stromal (Photosystem I) regions of the photosynthetic membrane and in switching of the normal mode of active photosynthesis and carbon fixation to the mode of inactive photosynthesis and molecular hydrogen production was studied. The multiscale kinetic model of electron fluxes in Photosystem II, coupled to transmembrane proton transfer, explains the kinetic mechanism of electron fluxes switching from the linear electron transport to the chain of chlororespiration and acidification of the stroma in the area of Photosystem II (pH ~ 7). To elucidate the molecular mechanisms of the electron fluxes switching on the acceptor side of the Photosystem I, multiparticle Brownian models of the interaction of ferredoxin, which receives electrons from the Photosystem I, with alternative acceptors: NAD(P)H (the CO<sub>2</sub> fixation pathway) and hydrogenase (the hydrogen production pathway) have been developed. The analysis of the electrostatic properties of interacting molecules and molecular dynamics simulation allows to study the molecular mechanisms of the increased flux of ferredoxin electrons to hydrogenase at alkaline pH (~ 8–8.5). The results obtained confirm the hypothesis of the regulatory role of local pH values in photosynthetic processes.

*Key words: kinetic model, Brownian multiparticle model, molecular modeling, photosynthesis, electronic transport, control mechanisms*

## 1. Введение

Традиционным методом моделирования процессов в субклеточных системах является «системно-динамический» подход к моделированию. В изучаемой системе выделяются описывающие систему переменные – измеримые характеристики (концентрация веществ), постулируется достаточность выделенных характеристик для описания системы, ищутся связи между этими характеристиками [1]. В качестве переменных в моделях фотосинтетического электронного транспорта рассматриваются концентрации переносчиков фотосинтетической цепи или концентрации состояний мультиферментных комплексов, пропорциональные вероятностям этих состояний. Для решения конкретных задач рассматриваются модели разной степени детализации. При этом важную роль играет существенное различие характерных времен отдельных процессов, позволяющее упрощать систему дифференциальных уравнений, учитывая малый параметр при производных и заменяя дифференциальные уравнения для «быстрых переменных» алгебраическими [2].

В последние годы при моделировании систем самой разной природы получили распространение «агентные» модели. «Агентный» (объектный, атомистический, корпускулярный) метод моделирования предполагает выводить свойства сложных систем из свойств и способов взаимодействия, составляющих эти системы «агентов» или «атомов» – простейших объектов, составляющих эту систему. «Агентной» может быть модель типа клеточного автомата, каждая клетка которого наделена определенными характеристиками, и определено взаимодействие между клетками. В моделях Броуновской динамики «агент» представляет физический объект, макромолекулу, обладающую определенной массой, объемом и распределением заряда. В моделях молекулярной динамики в качестве «агентов» выступают атомы, взаимодействие между которыми задается определенными силовыми полями.

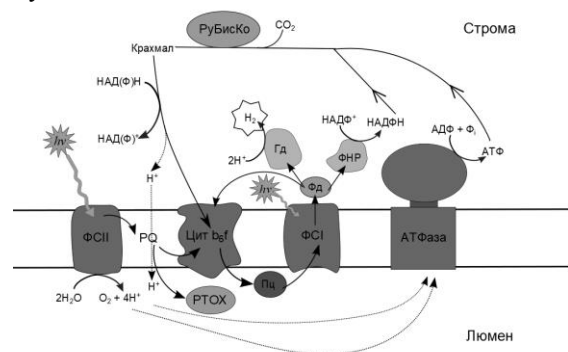
Для ответа на качественные вопросы о типе динамического поведения системы удобно описывать систему с помощью системно-динамической (кинетической) модели. Для выяснения физических (биофизических) механизмов взаимодействия биомолекул в клеточных системах, необходимы «агентные» модели. Их сочетание позволяет изучать способы регуляции процессов в сложных живых системах, каковыми являются микроводоросли.

В данной работе системно-динамические (кинетические) и атомистические (броуновские и молекулярные) модели применены для изучения механизмов регуляции процессов электронного транспорта, определяющих активность водород-выделяющих микроводорослей. Последние

рассматриваются в качестве потенциального источника альтернативного топлива – молекулярного водорода ( $H_2$ ).

## 2. Организация фотосинтетической цепи водород-выделяющих водорослей

Выделение  $H_2$  зелеными микроводорослями наблюдается после инкубации клеток в анаэробных условиях в темноте, катализатором реакции является фермент гидрогеназа, в качестве донора для гидрогеназы выступает белок ферредоксин (Фд) – конечный акцептор электрон-транспортной цепи фотосинтеза. В обычных условиях кислород является ингибитором гидрогеназы, в условиях голодания в клетках резко падает эффективность работы фотосистемы 2 (ФСII), создаются анаэробные условия, что ведет к экспрессии фермента гидрогеназы и формированию электрон-транспортного пути с выделением водорода. В естественных условиях этот процесс предотвращает перевосстановление электрон-транспортной цепи в условиях голодания [3]. Схема электронных путей в клетках зеленых микроводорослей представлена на рисунке 1.



**Рис. 1.** Электрон-транспортная цепь фотосинтеза водород-выделяющих микроводорослей. ФСII – фотосистема II, Цит  $b_6f$  – цитохромный  $b_6f$ -комплекс, Пц – пластоцианин, ФСИ – фотосистема I, РТОХ – пластидная терминальная оксидаза, Фд – ферредоксин, Гд – гидрогеназа, ФНР – ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктаза. Стрелками показаны пути переноса электронов и протонов.

В голодающих культурах процессы выделения  $O_2$  и  $H_2$  разделяются во времени [4–6]. На первом этапе выращивания водород-выделяющей культуры происходит нормальный фотосинтез: фиксация  $CO_2$ , выделение кислорода в результате окисления  $H_2O$  и накопление биомассы. Затем клетки помещают в среду с недостатком серы, азота или магния, через некоторое время это приводит к ингибированию процесса биосинтеза. Основные изменения в процессе голодания происходят на двух ключевых стадиях электронного транспорта, связанных с акцепторными участками ФСII и ФСИ.

### 3. Акцепторный участок фотосистемы II. Кинетическая модель

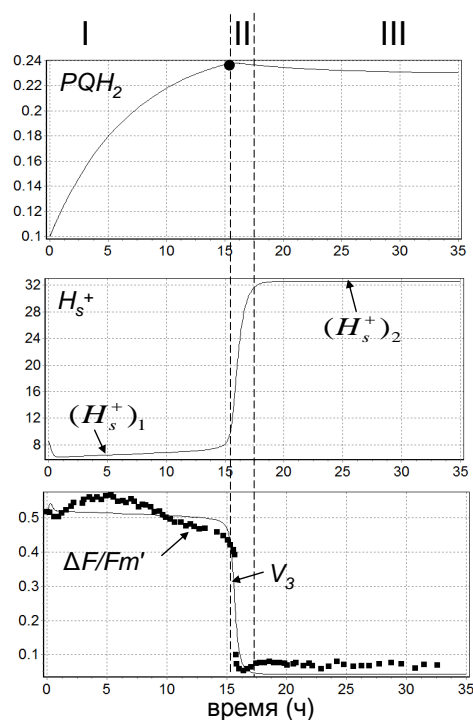
При нарушении ре-синтеза белка D1 ФСII скорость окисления воды и выделения кислорода падает. Когда скорость выделения кислорода становится меньше скорости его поглощения в процессе дыхания, культура становится анаэробной. Это дает сигнал к синтезу гидрогеназы и выделению молекулярного водорода.

Метод измерения флуоресценции фиксирует резкое падение уровня активности ФСII, которое для водород-выделяющих водорослей *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях серного голодания происходит на 15–16 день голодания [7], рисунок 2, нижний график. Этот факт указывает на существование триггерного механизма, переключающего метаболизм клетки с режима биосинтеза на режим выделения водорода.

Для состояний ФСII была сформулирована система дифференциальных уравнений, описывающих переходы между разными состояниями фотосистемы II, изменение концентрации протонов в строме вблизи фотосинтетической мембраны за счет обмена протонами стромы и примембранной области, их потребление в реакциях ФСII. Модель затем была редуцирована с учетом квазиравновесных стадий, подробный вывод приведен в работе [8]. В модели учитываются изменение концентрации восстановленного пластохинона за счет восстановления молекулами НАД(Ф)Н в хлородыхании, фотосистемой II в фотосинтезе, окисление пластидной терминальной оксидазой в хлородыхании и в цепи фотосинтеза.

В системе можно выделить три характерных масштаба времени: 1) 0.1–200 мс – диапазон времен переходов между разными состояниями фотосинтетических реакций; 2) 30–50 с – время установления стационарного значения pH в строме и люмене после освещения, которое характеризует временной диапазон изменений концентрации протонов; 3) ~30 ч – время накопления и распада крахмала и белков при минеральном голодании, характеризует скорость накопления молекул НАД(Ф)Н, образующихся в этих процессах, и как следствие, скорость изменения степени восстановленности пула пластохинона при хлородыхании молекулами НАД(Ф)Н.

Используя теорему Тихонова о квазистационарных состояниях [2], можно выделить три подсистемы в соответствии с тремя масштабами времени, и рассматривать каждую подсистему отдельно.



**Рис. 2.** 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 хиноновый акцептор. Точки – экспериментальные данные изменения активности фотосистемы II, полученные в [7] для *C. reinhardtii* в условиях серного голодания. Линия – модельная кривая изменения квазистационарной скорости переноса электронов в фотосистеме II, полученная на модели [8].

Подробный анализ модели [8, 9] и фитирование параметров по данным флуоресценции [10] на начальном этапе роста культуры и после продолжительного голодания позволили смоделировать происходящие в системе процессы (рис. 2). Модель описывает кинетический механизм скачкообразного переключения потоков электронов между фотосинтетической цепью и цепью хлородыхания, резкого падения активности ФСII и закисления стромы в области ФСII (pH ~ 7).

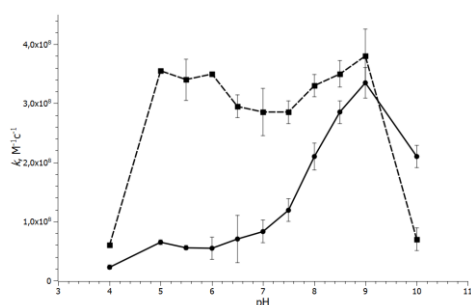
### 4. Акцепторный участок фотосистемы I

На акцепторной стороне ФСI происходит переключение электронного потока через ферредоксин (Фд), непосредственно акцептирующий электроны с ФСI, с классического пути фотосинтеза с фиксацией атмосферного углекислого газа (CO<sub>2</sub>) 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 [11]. Для выяснения механизмов переключения электронных потоков от Фд с ФНР на гидрогеназу была разработана «агентная» броуновская модель процессов взаимодействия белков – донора Фд и альтернативных акцепторов ФНР и гидрогеназы. Проведен анализ электростатических свойств взаимодействующих молекул донора Фд и акцептора: ФНР или гидрогеназы.

В броуновской многочастичной модели белки сближаются и образуют комплексы за счет двух физических процессов: диффузии и электростатических взаимодействий. Белки рассматриваются как твердые тела, источником информации о форме поверхности белков и распределении поверхностных зарядов является Protein Data Bank [12–14]. Подробное описание моделей взаимодействия Фд с ФНР и гидрогеназой представлено в работах [15, 16].

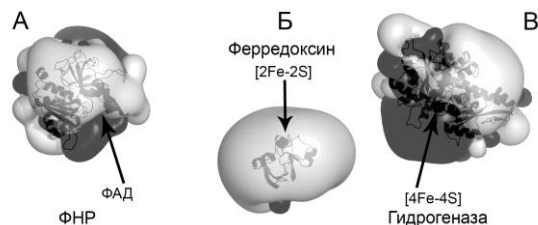
Для оценки влияния изменения рН стромы на распределение потоков от Фд, были рассчитаны зависимости скоростей образования комплексов ферредоксина с ФНР и Фд с гидрогеназой (рис. 3).



**Рис. 3.** Зависимость константы скорости связывания ферредоксина с ФНР (пунктирная линия) и гидрогеназой (сплошная линия) от рН [16].

В области значений рН 5-7.5 константа скорости связывания гидрогеназы и Фд практически не изменяется, а затем резко увеличивается, достигает максимума при рН 9 и вновь снижается. рН стромы хлоропластов изменяется от 6 единиц рН в темноте до 8-8.5 единиц на свету. Этот процесс сопровождается изменением сродства белков друг к другу.

На рисунке 4 представлен пример эквипотенциальных поверхностей ферредоксина, ФНР и гидрогеназы при рН = 6 и при ионной силе  $I = 150$  мМ. Темно-серый цвет соответствует положительно заряженным областям, светло-серый – отрицательно заряженным областям.



**Рис. 4.** Эквипотенциальные поверхности ФНР (А), ферредоксина (Б) и гидрогеназы (В) при рН = 8,  $I = 150$  мМ. Светло-серый цвет соответствует потенциалу  $-7$  мВ, темно-серый  $+7$  мВ.

Анализ эквипотенциальных поверхностей показывает, что в случае гидрогеназы изменение рН в сторону щелочных значений ведет к уменьшению области положительного заряда в окрестности [4Fe-4S]-кластера. Константа скорости образования комплекса Фд-гидрогеназа при рН 7.5–9, существенно возрастает, поскольку молекула Фд принимает в процессе броуновского движения в электростатическом поле гидрогеназы правильную ориентацию по отношению к кофактору.

## 5. Образование реакционного комплекса Фд–ФНР. Молекулярная динамика

Разработанный нами [17] метод кластерного анализа комплексов молекул донора и акцептора позволяет анализировать структуры образовавшихся в процессе диффузии и электростатического взаимодействия предварительных комплексов с точки зрения их способности перейти в состояние финального комплекса, в котором осуществляется реакция. Для этого рассматривается молекулярная динамика предварительных комплексов из начальных состояний, соответствующих наиболее вероятным взаимным расположениям молекул донора и акцептора. Анализ молекулярно-динамических траекторий, исходящих из различных начальных расположений предварительного кластера позволит выявить роль отдельных элементов структуры макромолекул в конформационных изменениях, приводящих систему к финальному комплексу, в котором происходит реакция переноса электрона.

## 6. Заключение

Полученные с помощью кинетических, броуновских и молекулярных моделей результаты позволяют изучить регуляторную роль рН в переключении электронных потоков водород-выделяющих водорослей на клеточном и молекулярном уровне и дать интерпретацию наблюдаемых экспериментальных фактов.

## 7. Благодарности

Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФИ №17-04-00-676.

## 8. Список литературы

1. Павловский Ю.Н., Белотелов Н.В., Бродский Ю.И. *Компьютерное моделирование*. М.: Физматкнига, 2014.
2. Тихонов А.Н. Системы дифференциальных уравнений, содержащие малые параметры при производных. *Мат. Сб.* 1952. Т. 32. № 3. С. 1052.
3. Melis A., Happe T. Hydrogen production. Green Algae as a source of energy. *Plant Physiol.* 2001. V. 12. P. 3740–3748.
4. Melis A., Zhang L., Forestier M., Ghirardi M.L., Siebert M. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* 2000. V. 122. P. 127–136.
5. Antal T.K., Matorin D.N., Kukarskikh G.P., Lambrev M.D., Tuystjärvi 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. V. 39. P. 18194–18203.
6. 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. V. 5. P. 5633–5637.
7. 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. V. 94. P. 13–22.
8. Плюснина Т.Ю., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Регуляция электрон–транспортных путей в клетках *Chlamydomonas reinhardtii* в условиях стресса. *Физиология растений.* 2013. Т. 60. № 4. С. 549–560.
9. Rznichenko G.Yu., Plyusnina T.Yu., Diakonova A.N., Kovalenko I.B., Khrushchev S.S., Rubin A.B. pH regulation of hydrogen–generating microalgae photosynthetic chain. Kinetic and multiparticle Brownian models. Chapter 8. In: *Nonlinearity: Problems, Solutions and Applications*. United States: Science Publishers Inc., 2017. P. 181–202.
10. Плюснина Т.Ю., Воронова Е.Н., Гольцев В.Н., Погосян С.И., Яковлева О.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Редуцированная модель фотосистемы II для оценки характеристик фотосинтетического аппарата по данным индукции флуоресценции. *КиМ.* 2012. Т. 4. № 4. С. 943–958.
11. Plyusnina T.Yu., Voronova E.N., Goltzev V.N., Pogosyan S.I., Yakovleva O.V., Rznichenko G.Yu., Rubin A.B. Reduced model of photosystem II and its use to evaluate the photosynthetic apparatus characteristics according to the fluorescence induction curves. *Computer Research and Modeling.* 2012. V. 4. P. 943–958.
12. Yacoby I., Pochekaïlov 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. V. 108. P. 9395–9401.
13. Rubin A.B., Rznichenko G.Yu. *Mathematical biophysics*. New York: Springer, 2014.
14. Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Diakonova A.N., Rznichenko G.Yu., Rubin A.B. Computer simulation of proteinprotein association in photosynthesis. *Math. Mode. Nat Phenom.* 2011. V. 6. P. 39–54.
15. Хрущев С.С., Абатурова А.М., Дьяконова А.Н., Устинин Д.М., Зленко Д.В., Федоров В.А., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование взаимодействий белков фотосинтетической электрон-транспортной цепи фотосинтеза методом броуновской динамики. *Биофизика.* 2015. Т. 60. С. 270–292.
16. Khrushchev S.S., Abaturova A.M., Fedorov V.A., Ustinin D.M., Kovalenko I.B., Rznichenko G.Yu., Rubin A.B. Brownian–dynamics simulations of protein–protein interactions in the photosynthetic electron transport chain. *Biophysics.* 2015. V. 60. P. 212–231.
17. Дьяконова А.Н., Хрущев С.С., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Роль электростатических взаимодействий при образовании комплексов ферредоксин – ферредоксин – НАДФ<sup>+</sup> – редуктаза и ферредоксин–гидрогеназа. *Биофизика.* 2016. Т. 61. № 4. С. 677–685.
18. Diakonova A.N., Khrushchev S.S., Kovalenko I.B., Rznichenko 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. V. 61. P. 572–579.
19. Diakonova A.N., Khrushchev S.S., Kovalenko I.B., Rznichenko 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. *Phys. Biol.* 2016. V. 13. P. 056004.
20. Хрущев С. С., Абатурова А.М., Федоров В.А., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Идентификация промежуточных состояний в процессе диффузионного сближения электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома f. *Биофизика.* 2015. Т. 60. С. 629–638.
21. Khrushchev S.S., Abaturova A.M., Fedorov V.A., Kovalenko I.B., Rznichenko G.Yu., Rubin A.B. The identification of intermediate states of the electrontransfer proteins plastocyanin and cytochrome f diffusional encounters. *Biophysics.* 2015. V. 60. P. 513–521.