

Кинетическая модель цитохромного bf комплекса тилакоидной мембраны.

1. Описание модели.

1.1. Структура модели

Мы рассмотрели bf комплекс как мембранный фермент, катализирующий перенос электронов от пластохинола на пластоцианин, сопряженный с переносом протонов из стромы хлоропласта в люмен тилакоида, подобно тому, как это сделано в работе (Демин и др. 1998 и 2000) при описании функционирования цитохромного комплекса в мембране митохондрий. Модель строилась в предположении функционирования Q-цикла Митчелла. Соответствующая совокупность окислительно-восстановительных реакций изображена на рис.1.

Подача электронов в Q-цикл может происходить как от ФС II, так и от ферредоксина (в случае циклического транспорта электронов). В нашей модели этому процессу соответствует реакция восстановления пластохинона, Q, до пластохинола, QH₂, (показана на схеме жирной стрелкой без номера). Эта реакция происходит на стромальной «s» поверхности тилакоидной мембраны, после чего пластохинол диффундирует к люменальной «l» стороне мембраны (реакция 26, жирная пунктирная стрелка в левой части схемы).

После связывания с центром «р» bf комплекса пластохинол отдаёт один электрон на железосерный центр Риске, FeS, и освобождает один протон в люмен тилакоида с образованием комплекса протонированного семихинона с FeS (FeS^I-QH[•]) (реакции 1, 2, 3, и 4 в зависимости от редокс состояний FeS и гемов цитохрома b).

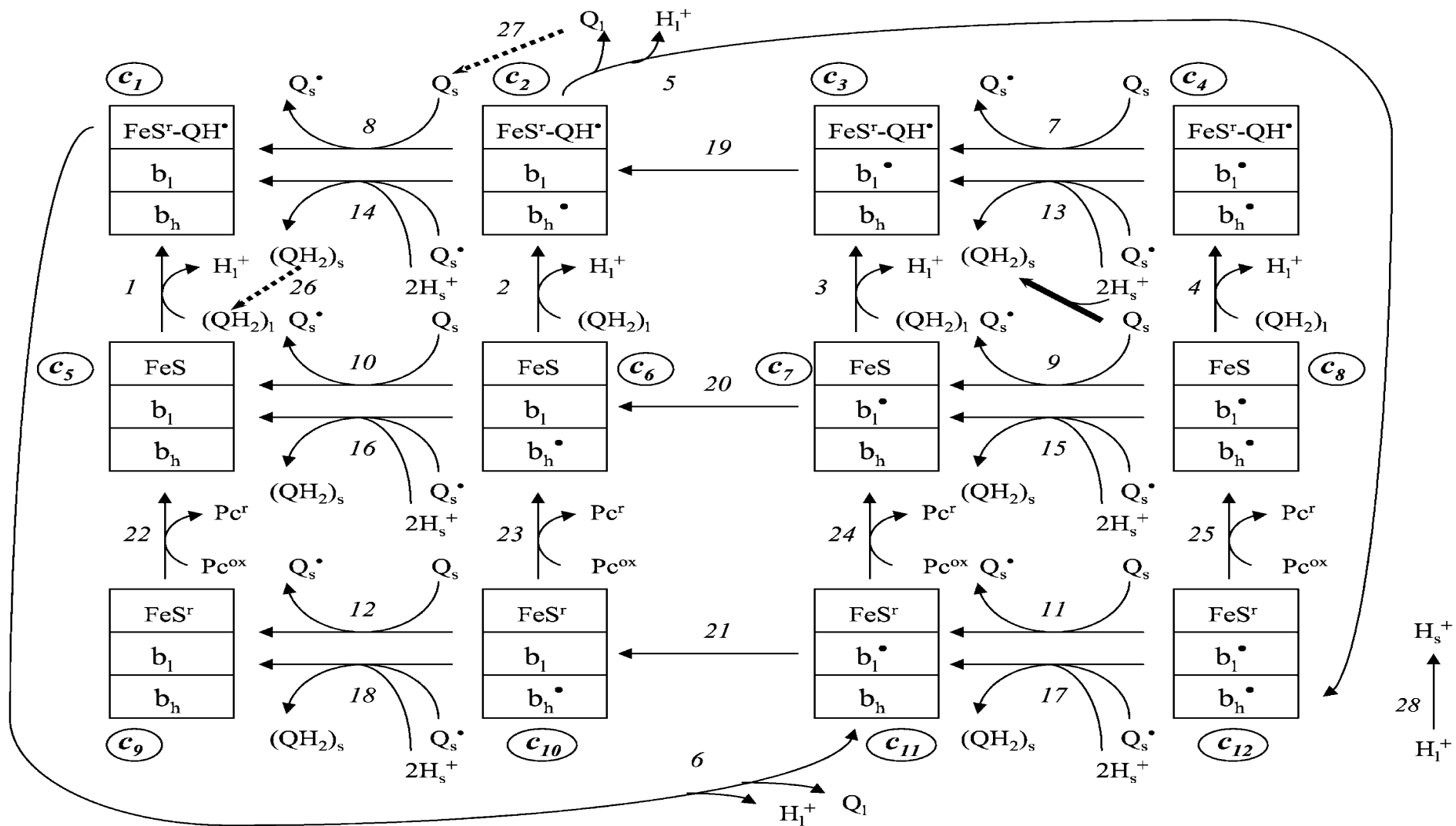


Рис.1. Схема каталитического цикла цитохромного b_f комплекса. FeS – железосерный центр Риске, b_l и b_h - низко- и высокопотенциальный геммы цитохрома b ; QH_2 – пластохинол, Q – пластохинон, Q^\bullet - семихинон, Pc^r и Pc^{ox} – восстановленная и окисленная формы пластоцианина. Индексы «l» и «s» обозначают люменальную и стромальную локализацию соответствующего компонента системы. Описание цикла приведено в тексте. Цифры рядом со стрелками и буквы над прямоугольниками (c_i , $i=1, \dots, 12$) соответствуют номерам реакций и обозначениям переменных модели.

Если низкопотенциальный гем цитохрома b (b_1) окислен (как в состояниях c_1 и c_2), семихинон в составе комплекса ($FeS^+ - QH^*$) отдаёт гему b_1 электрон, превращаясь в свободный пластохинон, высвобождая второй протон в люмен тилакоида (реакции 5 и 6). Если b_1 восстановлен, семихинон остаётся связанным с центром Риске до тех пор, пока b_1 не станет окисленным (в результате реакций 7, 13 и 19) и, следовательно, способным принять второй электрон от семихинона. Затем пластохинон диффундирует с люменальной стороны на стромальную (реакция 27, жирная пунктирная стрелка в верхней части схемы).

Трансмембранный перенос электрона между гемами цитохрома b : (от b_1 к b_h) осуществляется в реакциях 19-21. Восстановленный гем b_h восстанавливает пластохинон в стромальном центре связывания «п», с образованием семихинона Q_s^* , (реакции 7-12). Образовавшийся семихинон берёт второй электрон с гема b_h , превращаясь в пластохинол и поглощая при этом два протона из стромы хлоропласта (реакции 13-18).

Электрон от восстановленного FeS – центра Риске передается на цитохром f и затем на пластоцианин (реакции 22-25). На схеме не показана стадия, соответствующая переносу электрона между FeS - центром и цитохромом f , т.к. между этими переносчиками устанавливается быстрое равновесие (константы прямого и обратного переноса $> 10^5 \text{ c}^{-1}$, константа равновесия около 3 (Норе, Huilgol et al. 1992)).

1.2. Формулировка модели.

Модель представляет собой систему обыкновенных дифференциальных уравнений для концентраций различных редокс-состояний цитохромного комплекса ($c_1 - c_{12}$), пластоцианина (Pc^f, Pc^{ox}), люменальных и стромальных форм пластохинона ($(QH_2)_l, (QH_2)_s, Q_l, Q_s, Q_s^*$), а также концентраций протонов в люмене (H_l^+) и строме (H_s^+) тилакоида. Дифференциальное уравнение для каждого i -го компонента системы имело вид:

$$\frac{dx_i}{dt} = v_{np.}(X_i) - v_{номп.}(X_i)$$

где X_i – концентрация i -го компонента системы, измеряемая в мМ; $v_{np.}(X_i)$ и $v_{номп.}(X_i)$ – суммарные скорости его производства и потребления, измеряемые в мМ/с. Концентрации различных состояний цитохромного комплекса рассчитывались как произведение вероятности данного состояния на общую концентрацию комплексов в мембране. Взаимодействие цитохромного комплекса с подвижными переносчиками описывалось по закону действующих масс в предположении бимолекулярной реакции.

При записи уравнений скорости отдельных реакций электронного переноса мы учитывали зависимость констант скорости и констант равновесия ряда из них от величины трансмембранного электрического потенциала $\Delta\Psi$ согласно следующим формулам:

$$k_{eq}(\Delta\Psi) = \exp\left(-\frac{\alpha \cdot \Delta\Psi}{RT/F}\right) k_{eq}$$

$$k_+(\Delta\Psi) = \exp\left(-\frac{\delta \cdot \alpha \cdot \Delta\Psi}{RT/F}\right) k_+$$

$$k_-(\Delta\Psi) = \exp\left(-\frac{(1-\delta) \cdot \alpha \cdot \Delta\Psi}{RT/F}\right) k_-$$

$$\Delta\Psi = (H_l - H_s) \frac{F}{C_m}$$

Здесь α – та доля мембранного потенциала $\Delta\Psi$, которая генерируется рассматриваемой стадией при переносе заряда через мембрану, δ – та часть мембранного потенциала ($\alpha \cdot \Delta\Psi$), которая влияет на константу скорости прямой реакции; K_{eq} , k_+ и k_- – константа равновесия, константа скорости прямой и обратной реакций при $\Delta\Psi = 0$. c_m – удельная емкость тилакоидной мембраны, F – постоянная Фарадея, H_l и H_s – концентрация протонов в люмене и строме.

Предполагалось, что в Q-цикле электрогенными являются следующие стадии: трансмембранный перенос электрона от гема b_l на гем b_h (реакции 19-21); перенос протонов в реакциях восстановления пластохинона (реакции

13-18) и окисления пластохинола (реакции 1-6). Процессу межгемного переноса электрона отводилось 80% всего электрогенеза, а оставшиеся 20% делились поровну между протон-транспортирующими стадиями, что соответствует данным, полученным в работах (Drachev, B.S. et al. 1989; Semenov 1993; Дёмин, О.В. и др. 1998) для цитохромного комплекса bc_1 пурпурных бактерий.

Электрический мембранный потенциал $\Delta\Psi$ в модели также считали переменной величиной, и его зависимость от времени рассчитывали в соответствии с дифференциальным уравнением:

$$\frac{c_m}{F} \left(\frac{d(\Delta\Psi)}{dt} \right) = v(q_{lumen}) - v(q_{stroma}),$$

где c_m – удельная емкость тилакоидной мембраны (варьировалась от 2.0 до 10.0 Кул/(В·л) в соответствии с оценками (Bulychev and Wim. 1999)), F – постоянная Фарадея; $v(q_l)$, $v(q_s)$ – скорости производства объемной плотности заряда в люмене (q_l) и строме (q_s); q_l и q_s измеряются в мМ и являются функциями концентрации ионов H^+ в соответствующих компартментах хлоропласта.

В нашей модели мы учитывали, что люмен тилакоида обладает буферными свойствами, которые мы аппроксимировали тремя протон-связывающими группами B_1 , B_2 и B_3 с pK для протонов, варьирующихся от 6.7 до 8.7:

$$B_j + H_n^+ = B_j H, \quad K_{jB} = \frac{B_j \cdot H_n^+}{B_j H},$$

$$K_{1B} = 10^{-6.7} M, K_{2B} = 10^{-7.7} M, K_{3B} = 10^{-8.7} M$$

Значения K_{jB} и концентрации буферных групп B_j , были выбраны таким образом, чтобы удовлетворить экспериментальным данным по буферной ёмкости люмена тилакоида (Van Kooten. et. al 1986). Также в нашей

модели мы учли пассивную утечку протонов через мембрану тилакоида (реакция 28 на рис. 1), аппроксимировав ее простой зависимостью: $v_{28} = V_{\text{leak}} * H^+ / (K_h + H^+)$.

Уравнения.

Модель состоит из 26 обыкновенных дифференциальных уравнений. Полностью система уравнений и пояснения значений переменных и параметров приведены в Приложении. Переменные в модели имеют разную природу:

- **Вероятности (относительные концентрации) состояний комплекса, приведенных на рис. 1.** (12 переменных).

Относительная концентрации различных состояний цитохромного комплекса рассчитывались как произведение вероятности данного состояния на количество цитохромных комплексов, приходящихся на один реакционный центр ФС1.

Сумма вероятностей этих 12 состояний равна единице. Это означает, что независимыми являются 11 переменных. Вероятности переходов между состояниями k_i ($i=1-25$) могут зависеть от концентраций подвижных переносчиков (например, PQ и Pс), от концентрации протонов в люмене или строме, от потенциала на мембране. Поэтому уравнения для изменений во времени вероятностей состояний являются нелинейными. В качестве примера рассмотрим уравнение для вероятности 6-го состояния (см. схему на рис. 2.1.):

$$\begin{aligned} \frac{dC_6}{dt} = & -k_2 e^{\alpha_1(H_l - H_s)} C_6 (QH_2)_l - k_{10} C_6 Q_s - k_{16} e^{\gamma_1(H_l - H_s)} C_6 Q_s^* H_s^2 - \frac{k_{20}}{Keq_{20}} e^{\delta_{-1}(H_l - H_s)} C_6 \\ & - \frac{k_{23}}{Keq_{23}} C_6 PC^r + k_{20} e^{\delta_1(H_l - H_s)} C_7 + k_{23} C_{10} PC^o + \frac{k_2}{Keq_2} e^{\alpha_{-1}(H_l - H_s)} C_2 H_l \\ & + \frac{k_{10}}{Keq_{10}} C_5 Q_s^* + \frac{k_{16}}{Keq_{16}} e^{\gamma_{-1}(H_l - H_s)} C_5 (QH_2)_s \end{aligned}$$

Переменные C_i , $i = 2, 5, 6, 7, 10$ соответствуют концентрациям различных кинетических состояний bf комплекса, определяемых редокс состоянием входящих в него переносчиков электрона. C_2 : комплекс протонированного семихинона с восстановленным FeS, b_l окислены и b_h восстановлен. C_5 : FeS, b_l и b_h окислены. C_6 : FeS окислен, b_l окислен и b_h восстановлен. C_7 : FeS окислен, b_l восстановлен и b_h окислен. C_{10} : FeS восстановлен, b_l окислен и b_h восстановлен. $(QH_2)_l$: концентрация люменального пластохинола. $(QH_2)_s$: концентрация стромального пластохинола. Q_s^* : концентрация семихинона в строме. Q_s : концентрация стромального пластохинона. Q_l : концентрация люменального пластохинона. PC^o : концентрация окисленного пластоцианина. PC^r : концентрация восстановленного пластоцианина. H_l : концентрация протона в люмене. H_s : концентрация протона в строме. $k_2, k_{10}, k_{16}, k_{20}, k_{23}$: константы скоростей прямых реакций. В уравнении константы скоростей обратных реакций выражены через константы прямых реакций, деленных на константы равновесия.

Как видно из уравнения, изменение состояния C_6 происходит в результате следующих процессов. Концентрация состояния C_6 увеличивается за счет прямых реакций 20 (перехода электрона с высокопотенциального на низкопотенциальный цитохром) и 23 (перехода электрона с цитохромного комплекса от центра Риске через цитохром f на Рс, а также за счет обратных реакций 2, 10 и 16 (5 последних членов со знаком плюс). C_6 расходуется в результате прямых реакций 2 (окисление PQH₂, восстановление FeS и выделение одного протона в люмен), 10 (восстановление хинона в п-сайте в процессе переноса электрона от на хинон) и 16 (образование пластохинола с поглощением двух протонов из стромальной части и получением второго электрона от b_h) и обратных реакций 20 и 23 (5 первых членов с знаком минус). Экспоненциальные множители описывают зависимость вероятности перехода между состояниями от электрохимического потенциала.

Изменение вероятности состояния C_6 во времени, получаемое из решения системы уравнений, приведено на рисунке 2.

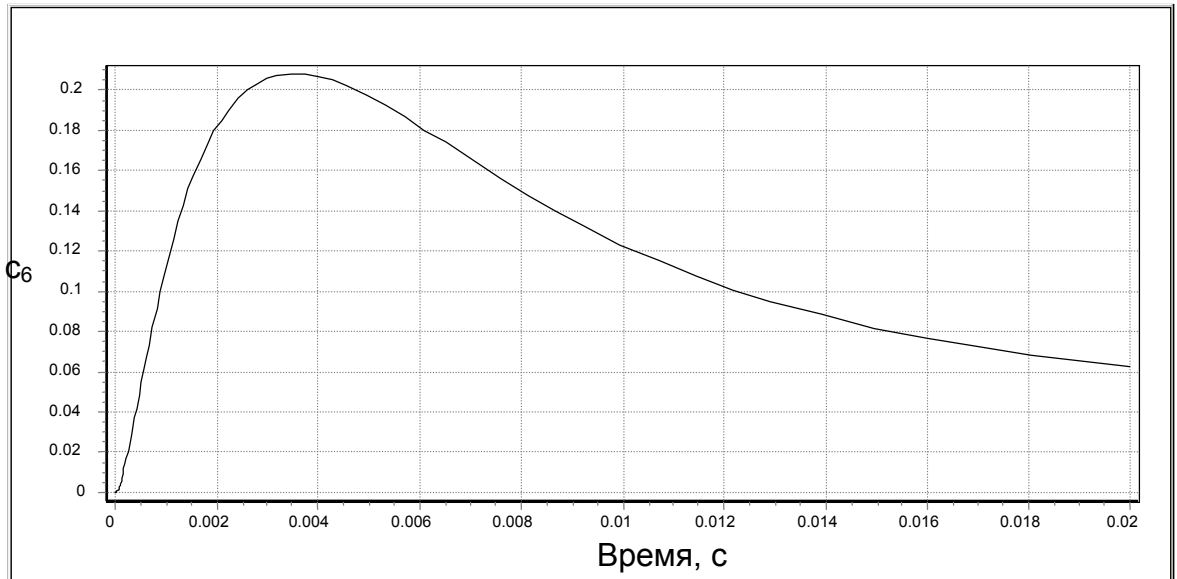


Рис. 2. Изменение относительной концентрации состояния C_6 (см. рис. 1) во времени.

- **Концентрации подвижных переносчиков (7 переменных):** Концентрации люменальных и стромальных форм пластохинона $(QH_2)_l$, $(QH_2)_s$, Q_l , Q_s , $Q_s^{\cdot-}$, пластоцианина (Pc^r , Pc^{ox}). В качестве примера рассмотрим изменение концентрации пластохинона в люмене Q_l во времени:

$$\frac{dQ_l}{dt} = -\frac{k_5}{Keq_5} e^{\beta_1(H_l - H_s)} C_{12} H_l Q_l - \frac{k_6}{Keq_6} e^{\beta_1(H_l - H_s)} C_{11} H_l Q_l + k_6 e^{\beta_1(H_l - H_s)} C_1 + k_5 e^{\beta_1(H_l - H_s)} C_2 - k_{D2} (Q_l - Q_s)$$

C_1 , C_2 , C_{11} , C_{12} : относительные концентрации состояний комплекса, H_l : концентрации протонов в люмене, k_1 , k_2 , k_{11} , k_{12} : константы скоростей прямых реакций, константы скоростей обратных реакций выражены через константы прямых реакций, деленных на константы равновесия.

Q_1 образуется в результате прямых реакций 5 и 6, обратные реакции с знаком минус описывают расход Q_1 , последний член справа описывает диффузию пластохинона от люмена в строму.

Изменение концентрации пластохинона в люмене во времени приведено на рисунке 3.

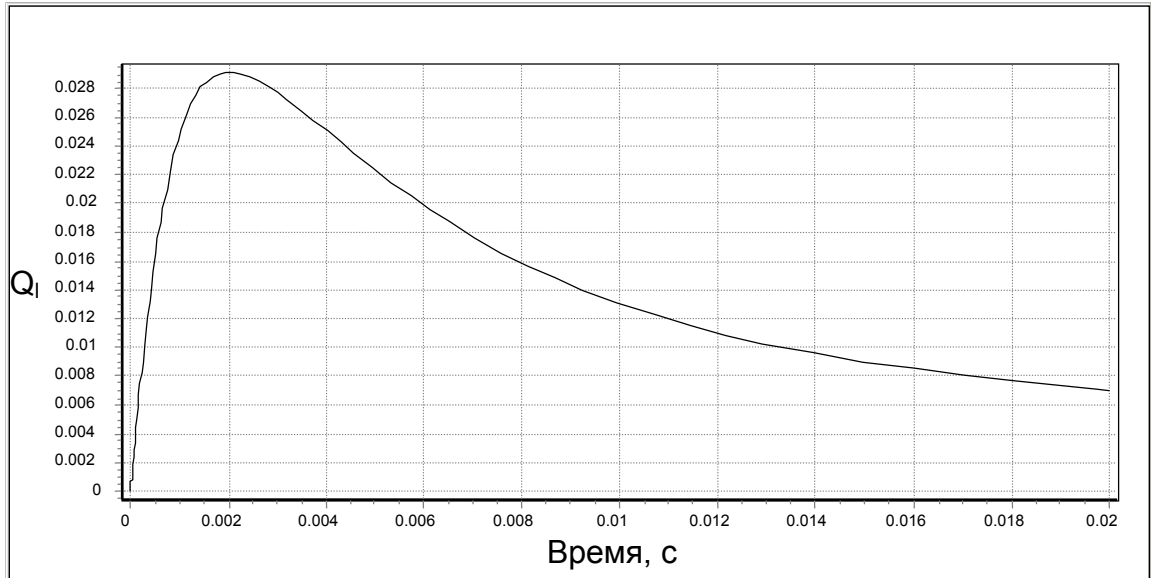


Рис. 3. Изменение относительной концентрации Q_1 в люмене во времени

• **Концентрация протонов в люмене:**

Уравнение для изменения во времени концентрации протонов в люмене описываются следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dH_l}{dt} = & +k_1 e^{\alpha_1(H_l-H_s)} C_5 (QH_2)_l + k_2 e^{\alpha_1(H_l-H_s)} C_6 (QH_2)_l + k_3 e^{\alpha_1(H_l-H_s)} C_7 (QH_2)_l \\ & + k_4 e^{\alpha_1(H_l-H_s)} C_8 (QH_2)_l + k_5 e^{\beta_1(H_l-H_s)} C_2 + k_6 e^{\beta_1(H_l-H_s)} C_1 - \frac{k_1}{Keq_1} e^{\alpha_1(H_l-H_s)} C_1 H_l \\ & - \frac{k_2}{Keq_2} e^{\alpha_1(H_l-H_s)} C_2 H_l - \frac{k_3}{Keq_3} e^{\alpha_1(H_l-H_s)} C_3 H_l - \frac{k_4}{Keq_4} e^{\alpha_1(H_l-H_s)} C_4 H_l \\ & - \frac{k_5}{Keq_5} e^{\beta_1(H_l-H_s)} C_{12} H_l Q_l - \frac{k_6}{Keq_6} e^{\beta_1(H_l-H_s)} C_{11} H_l Q_l - \frac{V_H H_l}{K_H + H_l} \\ & - k_{29} (H_l B_1 - B_{1H} K_{1B}) - k_{30} (H_l B_2 - B_{2H} K_{2B}) - k_{31} (H_l B_3 - B_{3H} K_{3B}) \end{aligned}$$

C_i $i=1,2,3,4,5,6,7,8,11,12$ относительные концентрации состояний комплекса, $(QH_2)_l$: концентрация люменального пластохинола.

Q_l : концентрация люменального пластохинона

B_1, B_2 и B_3 : концентрации буферных групп B_j ,

B_{jH} $i=1-3$ концентрации буферных групп, которые захватили протон.

Протон в люмене (H_l) образуется в результате первых 6 реакций, 6 средних членов с знаком минус показывают обратные реакции, 13-й член характеризует пассивную утечку протонов через мембрану тилакоида и 3 последних члена описывают буферные свойства системы.

Изменения во времени концентрации протонов в люмене показано на рисунке 4.

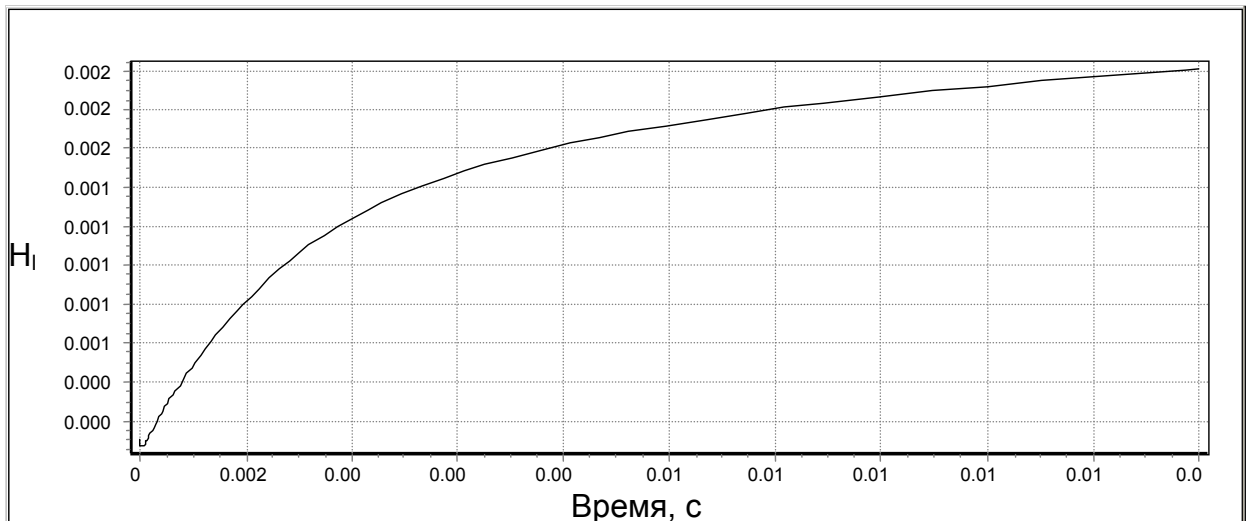


Рис.4. Изменение во времени концентрации протонов в люмене.

- **Концентрации буферных групп B_j (6 переменных)**

$$\frac{dB_j}{dt} = -k_{30}(H_l B_j - B_{jH} K_{jB})$$

$$K_{jB} = \frac{B_j \cdot H_n^+}{B_{jH}} \quad j = 1, 2, 3$$

Первый член уравнения $\frac{dB_j}{dt}$ - это захват протонов буфером B_j , а второй член – выделение протонов в люмене. В качестве примера на рисунке 5 приведено изменение B_2 во времени.

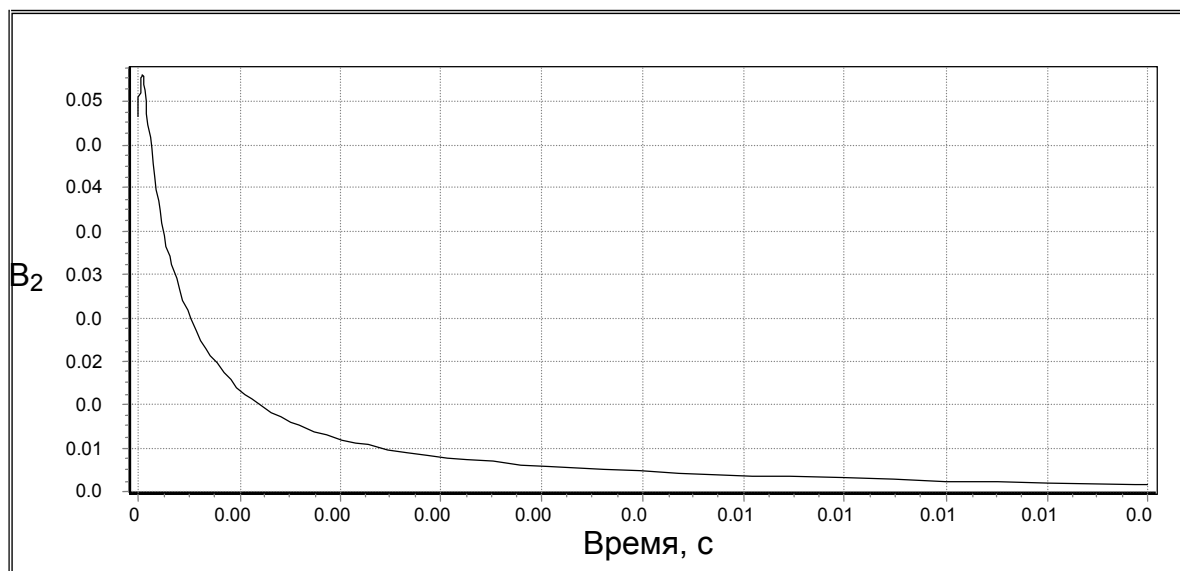


Рис.5. Изменение во времени концентрации буферной группы B_2

Все уравнения подробно описаны в приложении, там приведено также начальное значение каждой переменной.

2. Методы решения

2.1. Прямая и обратная задача

Наша задача служит примером обратной задачи или задачей идентификации параметров. В этих задачах, и решение и уравнения в общем виде известны, а необходимо найти набор параметров, при которых решение получаемое из уравнения, согласуется с из опыта уже известным решением. Надо отметить, что здесь параметры не просто математические, а несут важную физическую информацию, причём они являются показателями скорости реакции, и показывают меры взаимодействия между разными компонентами. Более того, совместимость значений параметров, которые получаются при решении обратной задачи со значениями сходных

параметров в других физических системах, даст хорошей критерий адекватности модели.

В любом алгоритме для решения обратной задачи, необходимой стадией является решение системы дифференциальных уравнений, описывающих физические явления. Поэтому на первом этапе нужно найти подходящий метод решения системы уравнения. Для этого следует хорошо изучить свойства уравнения. Из обсуждения в предыдущих главах можно различать особенности наших уравнений. Они являются нелинейными, причем в разных степенях зависимости (до четырех) от переменных. Их можно считать нежесткими, хотя в них есть разные диапазоны времени. Нас интересует поведение системы в течение времени релаксации после возбуждения системы с помощью светового импульса (примерно 20мс). Более длительные изменения не входят в наше рассмотрение, так как в экспериментах измеряется переходное состояние фотосинтезирующей системы. С другой стороны, первоначально, из-за светового импульса возникает резкое изменение в распределении комплексов среди разных состояний, но поскольку это происходит очень быстро, и флуоресценция начинает регистрироваться после этого короткого импульса, его эффект можно отразить в начальных условиях (т.е. в начальных значениях переменных).

2.2. Алгоритмы решения и их реализация

При решении задачи идентификации, т.е. определения параметров, исследователь сталкивается с рядом вопросов, которые необходимо решить заранее. Это задача выбора критерия сравнения расчёта с измерениями, проблемы устойчивости системы и метода решения дифференциальных уравнений, а также условия наблюдаемости и идентифицируемости рассматриваемой системы.

Для того чтобы решить задачу, её решение можно разделить на две части: решение дифференциальных уравнений и поиск параметров.

Существует ряд хорошо разработанных алгоритмов для решения дифференциальных уравнения в случае нелинейных уравнений, в частности алгоритмы разных реализаций метода Рунге-Кутты. Следует отметить, что так как число уравнений большое, и они нелинейные, возникает некоторые сложности, что при решении необходимо рассматривать. Чтобы проверить решение, все расчеты проводились с использованием трех разных программных обеспечений:

- Пакета программ DBsolve (7.0), которая предназначена для построения модели для разных биохимических (метаболических) методов и анализа и подгонки под экспериментальные данные. В этом пакете все модели рассматриваются как системы обыкновенных дифференциальных уравнений.
- Вычислительная среда MATLAB как мощное средство для решения широкого спектра различных задач.
- С помощью языка программирования PASCAL. Скорость, гибкость, возможность большей точности и прозрачность всех стадии решения являются преимущество этого метода.

Из сравнения получаемых данных было возможно найти и исправить ошибки в программировании и получить достоверные результаты.

2.3. Методы идентификации параметров

Как правило, идентификация состоит из трех этапов (Ризниченко Г.Ю. 1988).

1. Выбор структуры модели на основании априорной информации об исследуемом процессе и качественных характеристик процесса и модели.
2. Выбор критерия близости объекта и модели, основанный на специфике задачи.
3. Определение параметров модели, оптимальных с точки зрения выбранного критерия близости (идентификация параметров модели).

При проведении эксперимента на объект оказывают некоторое воздействие, например, освещают его светом определенной интенсивности. Критерием близости объекта и модели естественно взять какую-либо функцию от рассогласования выходных сигналов объекта и модели при одинаковых входных воздействиях.

Обозначим выходные сигналы модели через $y(t)$, выходные сигналы объекта — через $x(t)$, а их рассогласование — через $\varepsilon(t)$: $\varepsilon(t) = y(t) - x(t)$. Пусть Q — критерий близости модели и объекта: $Q = f(\varepsilon(t))$.

Часто значение $\varepsilon(t)$ в разные моменты времени имеет разную значимость для исследователя. Чтобы учесть это, введем весовую функцию $\omega(t)$. Тогда $Q = f[\varepsilon^2(t), \omega(t)]$.

Наиболее распространенным критерием близости модели и объекта является критерий минимума среднеквадратичного отклонения: $Q(t) = \varepsilon^2(t)$, $\omega(t)$. Этот критерий привлекателен тем, что представляет собой выпуклую одноэкстремальную функцию относительно ε . Его применение приводит к наиболее удобным алгоритмам поиска параметров модели.

Для количественной оценки расхождения экспериментальных данных и результатов расчётов записывают некоторый функционал, включающий параметры модели (такими параметрами в нашем случае являются константы скорости реакций). В качестве такого функционала обычно выбирают сумму взвешенных квадратов отклонений модельных значений измеряемых переменных от экспериментальных данных:

$$\varepsilon = x_{\text{экс.}} - x_{\text{теор.}}$$

$$Q = \sum_i \omega_i (x_{i,\text{экс.}} - x_{i,\text{теор.}})^2$$

Очевидно, что оценку параметров из модели можно проводить для параметров, к которым оценочная функция Q обладает высокой чувствительностью. Поэтому необходимо проверить чувствительность модели к отдельным параметрам.

«Выходные сигналы» модели зависят от значений ее параметров $x_{теор} = x_{теор}(k_1, \dots, k_n)$ и t , поэтому Q является функцией параметров модели:

$$Q = Q(k_1, \dots, k_n, t)$$

Таким образом, идентификация параметров модели сводится к поиску минимума критерия Q в пространстве параметров. При поиске минимума произвольной функции возникает проблема однозначности найденного набора значений параметров. Для обоснования единственности полученного решения осуществляют поиск минимума из различных начальных точек. Если процесс поиска заканчивается в одной и той же точке, найденный минимум можно считать единственным.

Задача минимизации функции ставит ещё одну проблему - точности нахождения минимума. Эта проблема тесно связана с проблемой выбора стратегии поиска.

Рассмотрим простейший метод поиска минимума произвольной функции — метод фитирования, или метод сетки, который часто используют при идентификации параметров моделей биологических процессов. В этой методе пространство неизвестных параметров разделяется на сетки и над ним определяются линии уровня исследуемой функции как замкнутых линий. В узлах «сетки» производят вычисление значений функции и из полученных значений выбирают наименьшее. Очевидно, что найденный таким способом минимум может весьма далеко отстоять от истинного минимума. Для более точного определения необходимо сделать сетку более частой, а это сильно увеличивает объем вычислений.

Метод фитирования часто применяют для грубых оценок параметров, однако для более точных оценок необходимы более тонкие методы, позволяющие теми или иными способами отслеживать изменения функции. Эти методы используют последовательную стратегию поиска — при выборе каждой следующей точки, где будет вычисляться функция, используется

информация, полученная при предыдущих вычислениях, что позволяет существенно ускорить поиск и повысить точность нахождения минимума.

Как работают подобные методы, можно показать на примере одного из наиболее эффективных методов для поиска минимума нелинейных функций, особенно функций типа среднеквадратичного отклонения, — метода конфигураций. В основе метода лежит гипотеза о локальной неизменности направления поиска. На первом этапе, в районе начальной точки, поиск ведется медленно, с помощью небольших шагов. По мере успешного продвижения вперед длина их возрастает, и это длится до тех пор, пока выбранное направление правильно. Затем поиск замедляется, вся процедура повторяется вновь и начинается движение в новом направлении. Поиск заканчивается, когда длина пробного шага станет меньше заранее заданной величины.

В процессе отработки метода удалось эмпирически установить, что время поиска растет пропорционально первой степени числа неизвестных параметров (в классических градиентных методах время растет пропорционально кубу числа переменных). В приложение Б подробно описывается этот алгоритм (алгоритм Хука-Дживса) и его реализация. Этот алгоритм использовался, нами в некоторых случаях также использовался метод фитирования для идентификации параметров модели.

3. Результаты моделирования и идентификации параметров системы.

К настоящему времени в литературе имеется большое количество данных о протекании реакций электронного переноса в bf комплексе. Однако, эти данные, как правило, получены на различных объектах (интактные клетки (Joliot and A. 1984; Sackstede 2000), изолированные тилакоиды (Moss and Rich 1987; Jones and J. 1988; Heimann, Ch. et al. 1998; Kirchoff, Horstmann et al. 2000), изолированные bf комплексы (Nitschke, G. et

al. 1989; Metzger, W.A. et al. 1996), в различных экспериментальных условиях, с использованием различных фотоспектрометрических методов. Такое разнообразие данных делает их трудно сравнимыми. Вместе с тем, ввиду сложности разработанной нами модели для ее верификации необходим набор экспериментальных зависимостей, полученных в стандартизованных условиях.

Такому требованию в наибольшей степени отвечают данные, опубликованные в (Норе, Huilgol et al. 1992), полученные на суспензии тилакоидов хлоропластов гороха. В этой работе изучалось изменение во времени концентраций восстановленного гема цитохрома b_h , окисленного цитохрома f , окисленного пластоцианина Pc^{ox} и концентраций протонов в люмене тилакоида H_1^+ после насыщающей вспышки света продолжительностью 15 нс.

Для ингибирования электронного транспорта от ФС II в экспериментальную суспензию добавляли диурон (окончательная концентрация в суспензии 10 мкМ). Восстановление пула пластохинонов достигалось добавлением дурухинола (400 мкМ). Полученные экспериментальные зависимости приведены на рис. 6.а, в и г (показаны квадратами), и были использованы нами для идентификации параметров модели. Для процедуры идентификации параметров нами были использованы данные, полученные в (Норе, Huilgol and др. 1992) на интервале измерений 20 мс. Отметим, что в работе (Норе, Huilgol et al. 1992) для идентификации параметров были использованы только первые 7 мс измерений.

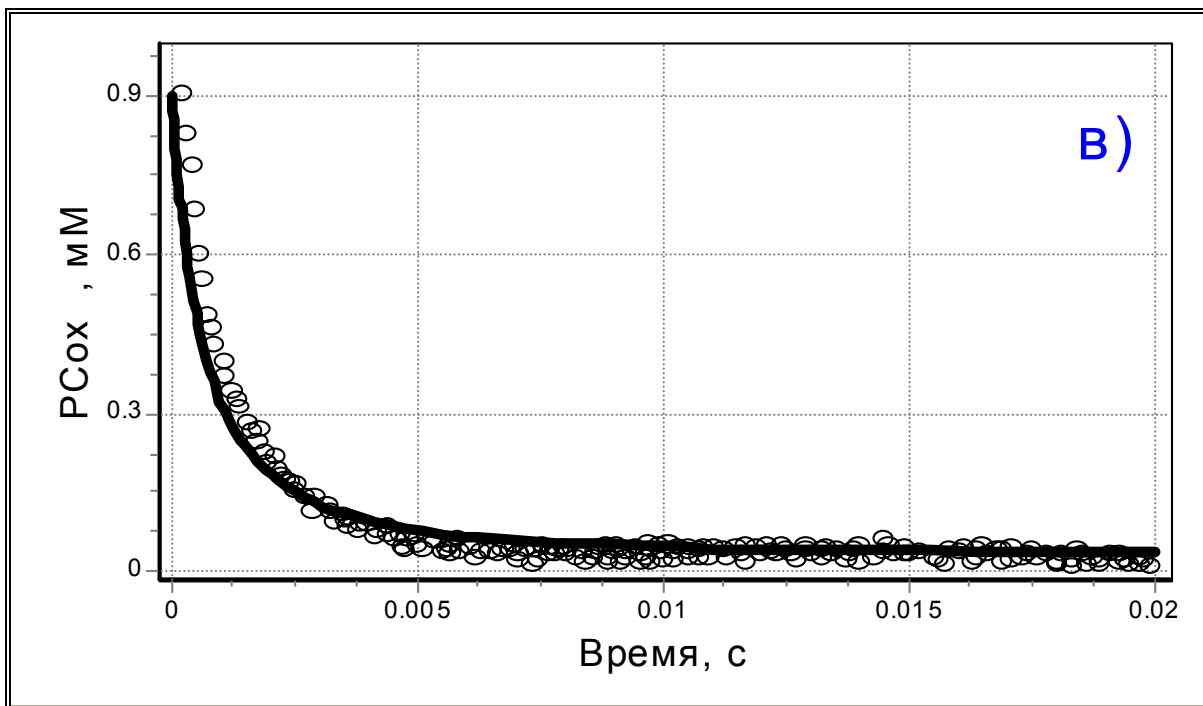
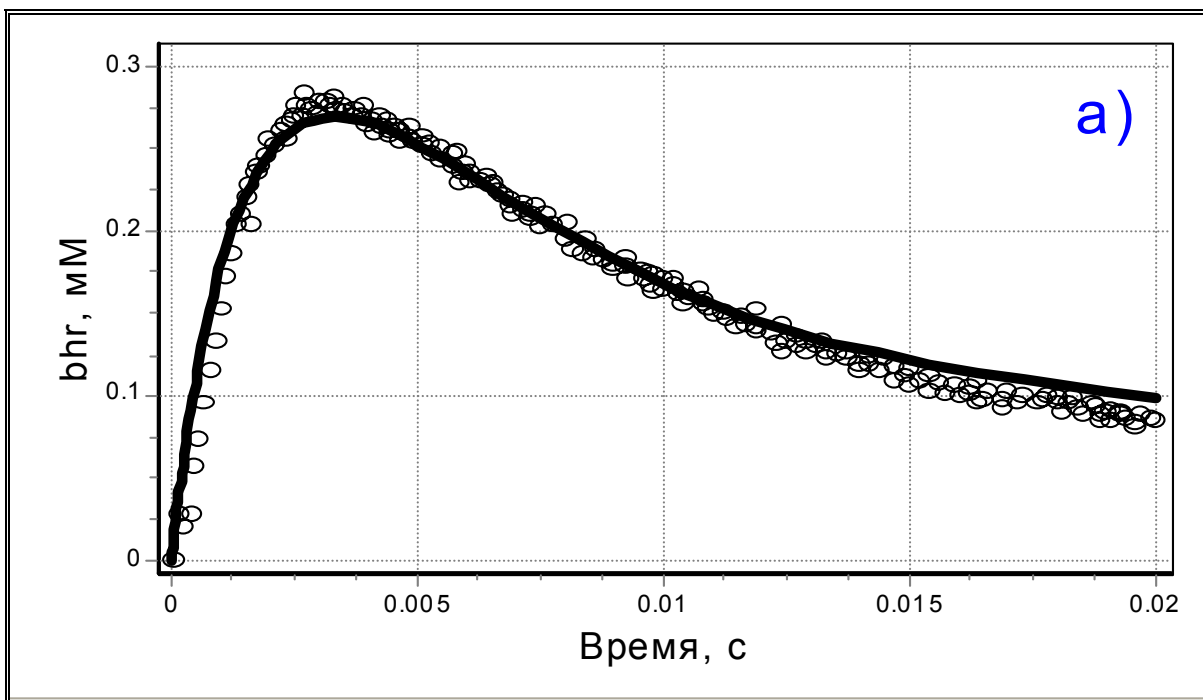


Рис. 6. Продолжение и комментарии на следующей странице

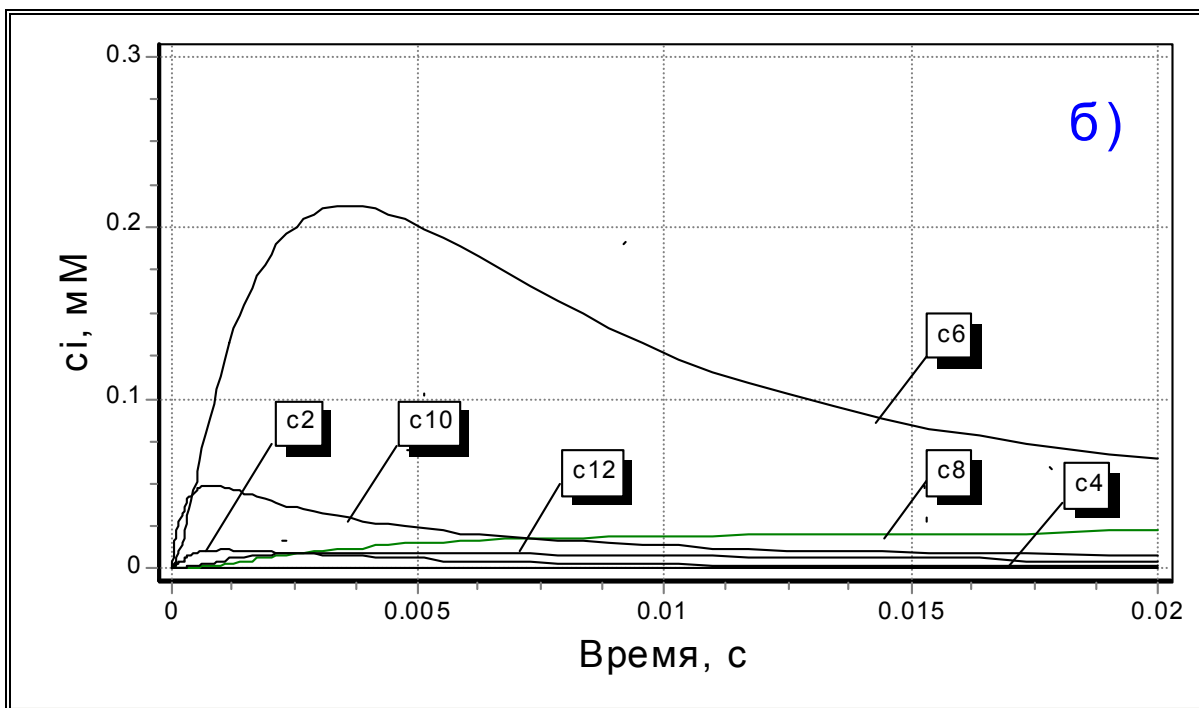
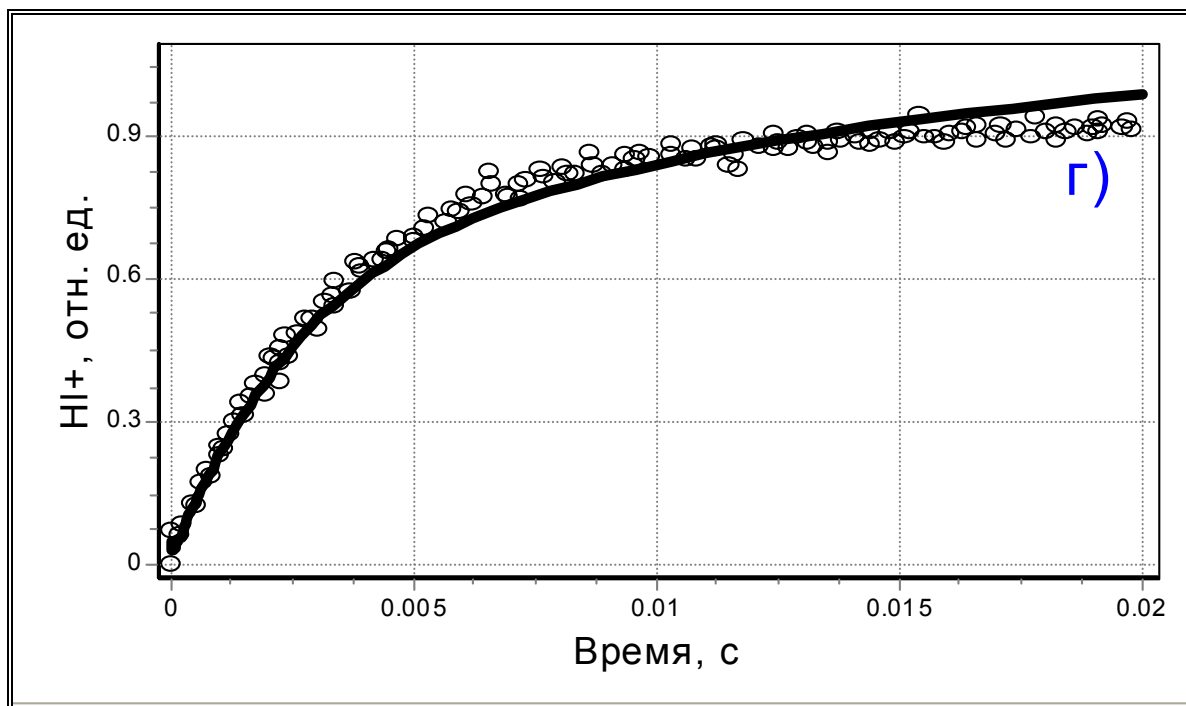


Рис. 6. Результаты идентификации параметров модели по экспериментальным данным, опубликованным в (Норе, Huilgol et al. 1992). На графиках приведены изменения во времени концентраций восстановленного гема цитохрома b_h (а), окисленного платоцианина Pc^{ox} (в), и концентрации протонов в люмене тилакоида H_1^+ (г) после насыщающей вспышки света продолжительностью 15 нс. На графике (б) показаны изменения во времени концентраций различных состояний цитохромного b_f комплекса, содержащих в своем составе восстановленный b_h . Круглыми знаками изображены экспериментальные точки, сплошными линиями – теоретические кривые.

При моделировании описанных экспериментальных зависимостей мы исходили из следующих начальных условий: пул пластохинонов полностью восстановлен, с учетом стехиометрии 6 молекул пластохинона на 1 цитохромный комплекс; весь bf комплекс находится в состоянии с восстановленным FeS центром Риске и окисленным b_h , т.е. в состояниях c_1 , c_3 , c_9 и c_{11} ; 90% пластоцианина – в окисленной форме; концентрация протонов в люмене и строме соответствует $pH = 7$. Полный перечень начальных значений переменных модели приведен в Таблице 1. Концентрация восстановленного цитохрома b описывалась как сумма концентраций состояний bf комплекса, содержащих в своем составе восстановленный b_h , что соответствует данным (Норе, Huilgol et al. 1992) о том, что основной вклад в регистрируемый сигнал принадлежит гему b_h :

$$b_{hr} = C_2 + C_4 + C_6 + C_8 + C_{10} + C_{12}$$

Большинство параметров модели были «свободными» и уточнялись в результате процедуры идентификации параметров по экспериментальным данным. В качестве начальных оценок ряда констант скоростей использовались данные, полученные в работах (Норе, Liggins et al. 1989; Норе, Huilgol et al. 1992; Berry и Rumberg 2000).

Результаты идентификации параметров системы по экспериментальным данным приведены в Таблице 1, а соответствующие им теоретические кривые показаны на рис. 6 а-г сплошными линиями.

Как видно из таблицы, оценки, полученные нами для большинства констант скоростей, находятся в интервале оценок, предложенных другими авторами. Так, константы скорости переноса электрона от пластохинола к центру Риске (k_1 - k_4) в нашей модели имеют значение 500 c^{-1} , что близко к оценкам (Норе, Huilgol et al. 1992) (около 200 c^{-1}).

Таблица 1 Параметры модели, идентифицированные с использованием экспериментальных данных, опубликованных в (Hope, Huilgol et al. 1992)

Процесс	Константа скорости прямой реакции {константа равновесия}	Оптимизированное значение (c^{-1})	Оценки других авторов(c^{-1}) *значение получено через редокс потенциал
Перенос на FeS от пластохинола (QH ₂)	$k_i \{K_{eqi}\}$ $i=1, \dots, 4$	500 {180}	200 (Hope, Huilgol et al. 1992) 7850 (Berry and Rumberg 2000)
Перенос на b_1 от QH [•]	$k_i \{K_{eqi}\}$ $i=5, 6$	900 {1.29}	650 {1} (Berry and Rumberg 2000)
Перенос от b_h на Q_s	$k_i \{K_{eqi}\}$ $i=7, \dots, 12$	1500 {450}	407 {2,4} (Hope, Huilgol et al. 1992) 2000 {1.25} (Berry and Rumberg 2000) {2.65} * (Hope, Huilgol et al. 1992)
Перенос от b_h на $Q_s^•$	$k_i \{K_{eqi}\}$ $i=13, \dots, 18$	1370 {5}	2000 {1.25} (Berry and Rumberg 2000)
Перенос от b_1 на b_h	$k_i \{K_{eqi}\}$ $i=19, \dots, 21$	527 {10}	{30} (Berry and Rumberg 2000) 100000 {40} * (Hope, Huilgol et al. 1992)
Перенос от FeS на PC	$k_{22} \{K_{eq22}\}$ $k_{23} \{K_{eq23}\}$ $k_{24} \{K_{eq24}\}$ $k_{25} \{K_{eq25}\}$	1820 {215} 3050 {215} 1820 {215} 3050 {215}	{4.8} (Berry and Rumberg 2000) 2000 {8} (Hope, Huilgol et al. 1992) 4000 {10} (Hope, Liggins et al. 1989)

Близкие оценки получились также для констант скорости переноса электрона на пластоцианин (k_{22} - k_{25}): 2000 – 3000 c^{-1} в нашей модели, 2000-4000 c^{-1} в (Hope, Liggins et al. 1989; Hope, Huilgol et al. 1992). Кроме того, значения констант, полученные для переноса электрона от b_h на пластохинон 1500 c^{-1} и на семихинон 1370 c^{-1} близки к оценкам Berry (Berry and Rumberg 2000) (2000 c^{-1}).

Поскольку все процессы в модели были описаны как обратимые, нам удалось оценить константы равновесия отдельных реакций электронного переноса. Для большинства реакций полученные значения констант равновесия близки к известным. Вместе с тем, для процессов переноса

электрона от b_h на пластохинон, и восстановления пластоцианина получены более высокие значения констант равновесия (450 и 215), чем в работах (Норе, Huilgol et al. 1992; Berry and Rumberg 2000) (<10), что, возможно, связано с тем, что в нашей модели мы не рассматривали возможность оттока электронов от восстановленного пластоцианина, что могло иметь место в экспериментальной ситуации.

Более детальное по сравнению с известными моделями (Норе, Liggins et al. 1989; Норе, Huilgol et al. 1992; Норе 1993) описание каталитического цикла цитохромного комплекса позволило нам оценить ряд констант электронного переноса, не поддающихся определению с использованием других моделей. Так, в моделях (Норе, Liggins et al. 1989; Норе, Huilgol et al. 1992; Норе 1993) исходно заложено предположение об очень быстром ($> 10^5$ с^{-1}) переносе электрона между гемами b_l и b_h , на основании чего и проведена редукция системы. В нашей модели получены более низкие оценки для констант скорости этого процесса (k_{19} - k_{21}): 500-600 с^{-1} .

Поскольку электрохимический потенциал протонов в нашей модели являлся переменной, мы смогли оценить конечную концентрацию протонов в люмене тилакоида ($2 \cdot 10^{-3}$ мМ, что соответствует рН 5.7) и трансмембранный электрический потенциал (120 мВ). Кроме того, была уточнена оценка для емкости тилакоидной мембраны (1.5 Кул/В·л).

Детальное рассмотрение процессов переноса электронов в цитохромном bf комплексе позволило нам проанализировать вклад кинетики отдельных состояний в форму теоретической кривой, описывающей кинетику восстановленного цитохрома b (рис.2.6.б). Результаты анализа показали, что в предположении функционирования Q-цикла и при кинетических параметрах системы, приведенных в Таблице 2.1, основной вклад в регистрируемый сигнал вносит состояние цитохромного комплекса s_6 (с восстановленным b_h и окисленными b_l и FeS).

Таким образом, нами построена кинетическая модель процессов в изолированном цитохромном комплексе. Проведена идентификация параметров модели, в том числе констант скоростей переноса электрона между внутренними компонентами комплекса, по экспериментальным данным. Полученные в результате процедуры идентификации значения параметров находятся в пределах диапазона значений, оцененных различными авторами из эксперимента.

Для использования результатов моделирования цитохромного комплекса при построении модели функционирования фотосинтетической мембраны необходимо детализировать процессы взаимодействия комплекса с подвижными переносчиками. Эти процессы включают несколько стадий: диффузию подвижного переносчика (пластохинона в мембране, P_c в люмене), докинг, собственно перенос электрона, отделение подвижного переносчика с места посадки. В рассмотренной модели все эти процессы объединены в одну реакцию, причем предполагается, что взаимодействие происходит по закону действующих масс. Такое рассмотрение является слишком идеализированным и не учитывает имеющихся данных о пространственной организации фотосинтетической мембраны. В настоящее время ведётся работа по сопряжению модели процессов в цитохромном комплексе с прямой моделью процессов в фотосинтетической мембране.