

## БИОЛОГИЯ

УДК 577.37

### АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МОДЕЛЕЙ С ОДНИМ, ДВУМЯ, ЧЕТЫРЬМЯ И ШЕСТЬЮ СОСТОЯНИЯМИ ДЛЯ КАЧЕСТВЕННОГО ОПИСАНИЯ $H^+$ -САХАРОЗНОГО СИМПОРТЕРА РАСТЕНИЙ

© 2012 г.

*В.С. Сухов, В.А. Калинин, О.В. Орлова, Л.М. Сурова,  
О.Н. Шерстнева, В.А. Воденеев*

Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского

vssuh@mail.ru

Поступила в редакцию 22.11.2011

Исследована применимость моделей, учитывающих одно, два, четыре и шесть состояний переносчика, к описанию  $H^+$ -сахарозного симпортера растений. Для каждой из моделей найдены значения параметров. Показано, что использованные модели хорошо качественно описывают зависимости активности симпортера от концентрации сахарозы и мембранного потенциала. Обсуждается вопрос о границах их применимости.

*Ключевые слова:* высшие растения,  $H^+$ -сахарозный симпортер, математическое моделирование.

#### Введение

Дальний транспорт углеводов, в частности сахарозы, по флоэме является основным процессом, обеспечивающим передачу энергии от фотосинтезирующих органов растения к нефотосинтезирующим. Начальным этапом такого транспорта является загрузка сахарозы в ситовидные элементы. Она может осуществляться через плазмодесмы (симпластный путь) и через выход сахарозы в апопласт с последующим ее поглощением ситовидными элементами (апопластный путь) [1]. Ключевую роль в загрузке сахарозы из апопласта играет  $H^+$ -сахарозный симпортер, осуществляющий совместный перенос одного протона и одной молекулы сахарозы через плазматическую мембрану ситовидного элемента [1, 2].

Являясь системой вторичного активного транспорта [1, 2],  $H^+$ -сахарозный симпортер может взаимодействовать с другими транспортными системами (посредством изменения химических градиентов сахарозы и протонов и градиента электрического потенциала на плазмалемме), что осложняет его экспериментальное исследование. В свою очередь, теоретический анализ функционирования данной системы требует разработки математической модели  $H^+$ -сахарозного симпортера. Наиболее распространенным подходом к описанию транспортных ферментов является кинетический, в рамках которого переносчик описывается как система,

имеющая одно, два или более состояний [3–10]. При этом увеличение количества учитываемых состояний позволяет более детально описать процесс переноса вещества через мембрану. В то же время такое увеличение приводит к росту числа уравнений и усложнению модели, что затрудняет определение ее параметров.

Таким образом, математическое моделирование  $H^+$ -сахарозного симпортера требует выбора адекватной модели, которая, с одной стороны, описывает основные свойства данного переносчика, а с другой – является максимально простой. Цель настоящей работы – анализ качественного соответствия экспериментальным данным результатов, полученных с использованием моделей  $H^+$ -сахарозного симпортера с одним, двумя, четырьмя и шестью состояниями.

#### Описание модели

При разработке модели с одним состоянием (рис. 1а) был использован подход, опирающийся на уравнение Гольдмана–Ходжкина–Катца, который был применен нами ранее для описания вторичного активного транспорта ионов через плазмалемму растений [3, 4]:

$$j_{\text{Sucr}} = -\frac{V}{[H^+]^0} \left( \frac{[\text{Sucr}]_{\text{in}} [H^+]_{\text{in}} \frac{FE_m}{RT} \frac{1}{1 - \exp(-FE_m/RT)} - [\text{Sucr}]_{\text{out}} [H^+]_{\text{out}} \frac{FE_m \exp(-FE_m/RT)}{RT 1 - \exp(-FE_m/RT)} \right) \quad (1)$$

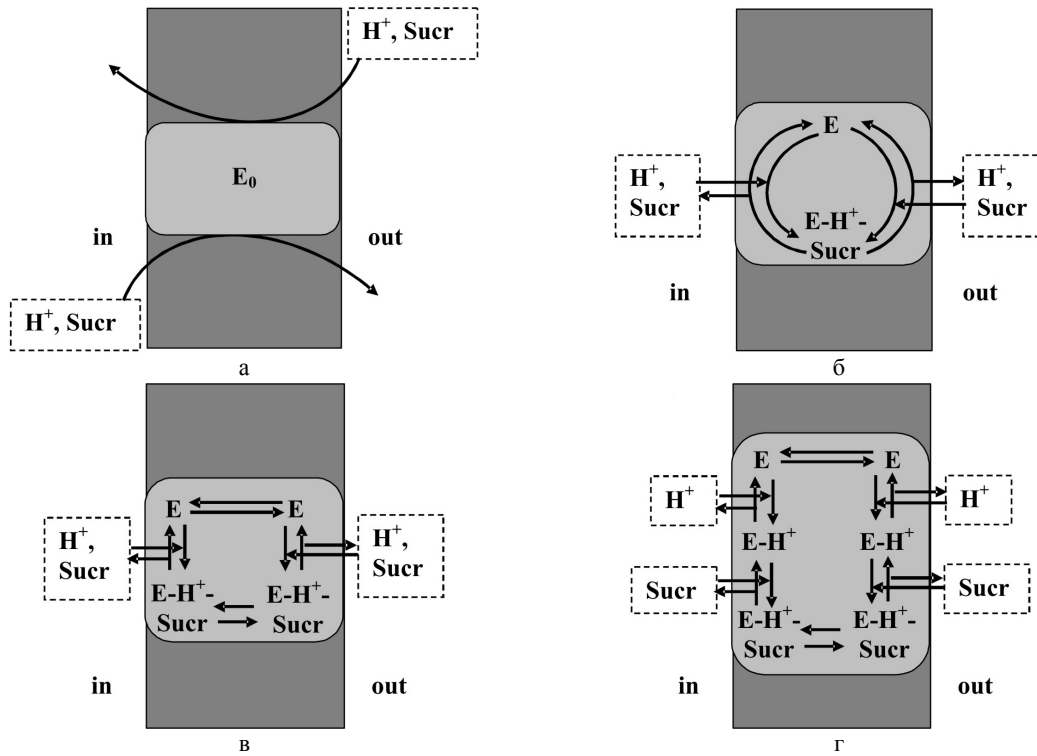


Рис. 1. Схемы моделей  $H^+$ -сахарозного симпортера с одним (а), двумя (б), четырьмя (в) и шестью (г) состояниями (пояснения в тексте)

где  $j_{\text{Sucr}}$  – поток сахарозы,  $V$  – параметр модели, характеризующий скорость переноса и концентрацию фермента,  $[\text{Sucr}]$  и  $[\text{H}^+]$  – концентрации сахарозы и протонов внутри (in) или вне (out) клетки,  $E_m$  – мембранный потенциал,  $F$ ,  $R$  и  $T$  – стандартные термодинамические величины,  $[\text{H}^+]^0 = 10^{-7}$  М – концентрация протонов для нейтральной среды.

Модель, учитывающая два состояния переносчика (свободное и связанное с сахарозой и протоном) (рис. 1б), опиралась на описание, предложенное в работах [3–5]:

$$j_{\text{Sucr}} = E_0 \frac{k_{+1}k_{+2} - k_{-1}k_{-2}}{k_{+1} + k_{-1} + k_{+2} + k_{-2}}, \quad (2)$$

$$\text{где } k_{+1} = k_1 \frac{FE_m}{RT} \frac{\exp(-\frac{FE_m}{RT})}{1 - \exp(-\frac{FE_m}{RT})} \frac{[\text{Sucr}]_{\text{out}}[\text{H}^+]_{\text{out}}}{[\text{H}^+]^0},$$

$$k_{-1} = k_1 \frac{FE_m}{RT} \frac{1}{1 - \exp(-\frac{FE_m}{RT})}, \quad k_{+2} = k_2 \quad \text{и}$$

$$k_{-2} = k_2 \frac{[\text{Sucr}]_{\text{in}}[\text{H}^+]_{\text{in}}}{[\text{H}^+]^0}, \quad k_1 \text{ и } k_2 - \text{константы скорости}$$

перехода фермента из одного состояния в другое с переносом иона и молекулы сахарозы и без такого перехода. Следует отметить, что если при использовании первого подхода требуется только один параметр ( $V$ ), то при использовании модели с двумя состояниями требуется уже три параметра ( $E_0$ ,  $k_1$  и  $k_2$ ).

Модель с четырьмя состояниями (рис. 1в) учитывала как свободное или связанное с сахарозой и протоном состояние фермента, так и его ориентацию на внутреннюю и внешнюю стороны мембраны. Так как скорость образования и распада комплекса переносчик–сахароза–протон можно полагать существенно большей, нежели скорость переноса сахарозы и протонов через мембрану, то процесс ассоциации и диссоциации переносимых веществ с  $H^+$ -сахарозным симпортером может быть рассмотрен как быстрый. В этом случае может быть использован подход, предложенный в ряде работ Хансена и Градманна [6, 9]. При его использовании перенос иона также может быть описан уравнением (2), однако уравнения для констант скорости принимают другой вид (3):

$$k_{+1} = k_1 \frac{FE_m}{RT} \frac{\exp(-\frac{FE_m}{RT})}{1 - \exp(-\frac{FE_m}{RT})} [\text{EHSucr}]_{\text{out}},$$

$$k_{-1} = k_1 \frac{FE_m}{RT} \frac{1}{1 - \exp(-\frac{FE_m}{RT})} [\text{EHSucr}]_{\text{in}}, \quad (3)$$

$$k_{+2} = k_2 [\text{E}]_{\text{in}}, \quad k_{-2} = k_2 [\text{E}]_{\text{out}},$$

$$\text{где } [\text{EHSucr}]_{\text{out}} = \frac{[\text{Sucr}]_{\text{out}}[\text{H}^+]_{\text{out}}}{K[\text{H}^+]^0 + [\text{Sucr}]_{\text{out}}[\text{H}^+]_{\text{out}}} \quad \text{и}$$

$$[\text{E}]_{\text{out}} = \frac{K_1[\text{H}^+]^0}{K[\text{H}^+]^0 + [\text{Sucr}]_{\text{out}}[\text{H}^+]_{\text{out}}} - \text{доли связан-}$$

Таблица 1

Значения параметров, использованных в моделях H<sup>+</sup>-сахарозного симпортера с одним, двумя, четырьмя и шестью состояниями

Состояние \ Параметры	$E_0$	$V$	$k_1$	$k_2$	$K$	$K_1$	$K_2$
1 состояние	-	10	-	-	-	-	-
2 состояния	1	-	10	10	-	-	-
4 состояния	1	-	10	10	1	-	-
6 состояний	1	-	10	10	-	1	1

Значения всех параметров являются безразмерными

ного с протоном и сахарозой комплекса и свободного переносчика с внешней стороны мембраны,  $[EHSucr]_{in} = \frac{[Sucr]_{in}[H^+]_{in}}{K[H^+]^0 + [Sucr]_{in}[H^+]_{in}}$  и

$$[E]_{in} = \frac{K_1[H^+]^0}{K[H^+]^0 + [Sucr]_{in}[H^+]_{in}} - \text{доли связанно}$$

го с протоном и сахарозой комплекса и свободного переносчика с внутренней стороны мембраны,  $K$  – константа диссоциации комплекса с протоном и сахарозой, которую принимали равной для переносчиков, ориентированных на разные стороны мембраны. При этом даже в данной упрощенной модификации модель с четырьмя состояниями требует четыре параметра ( $E_0, k_1, k_2$  и  $K$ ).

В варианте, учитывающем 6 состояний фермента [9], процессы связывания протона и сахарозы описывали отдельно (рис. 1г). В этом случае были использованы уравнения (2) и (3), однако доли фермента в различных состояниях были рассчитаны как:

$$\begin{aligned}
 [EHSucr]_{out} &= \frac{[Sucr]_{out}[H^+]_{out}}{K_1K_2[H^+]^0 + K_2[H^+]_{out} + [Sucr]_{out}[H^+]_{out}}, \\
 [E]_{out} &= \frac{K_1K_2[H^+]^0}{K_1K_2[H^+]^0 + K_2[H^+]_{out} + [Sucr]_{out}[H^+]_{out}}, \\
 [EHSucr]_{in} &= \frac{[Sucr]_{in}[H^+]_{in}}{K_1K_2[H^+]^0 + K_2[H^+]_{in} + [Sucr]_{in}[H^+]_{in}}, \\
 [E]_{in} &= \frac{K_1K_2[H^+]^0}{K_1K_2[H^+]^0 + K_2[H^+]_{in} + [Sucr]_{in}[H^+]_{in}},
 \end{aligned}
 \tag{4}$$

где  $K_1$  и  $K_2$  – константы диссоциации для протона и сахарозы соответственно. При этом описание модели с шестью состояниями требует использования пяти параметров ( $E_0, k_1, k_2, K_1$  и  $K_2$ ).

### Результаты и их обсуждение

Возможность использования нескольких альтернативных моделей для описания функционирования H<sup>+</sup>-сахарозного симпортера делает актуальным вопрос о наиболее простой модели, способной симулировать основные свой-

ства переносчика. В литературе имеются данные, показывающие зависимость скорости переноса протонов и сахарозы от величины потенциала на мембране [11], а также от концентрации сахарозы с внутренней [11] и внешней [12] сторон плазмалеммы. Эффективность предложенных моделей была оценена путем качественного сравнения имитированных ими зависимостей скорости транспорта от потенциала и концентрации сахарозы с экспериментальными. Значения параметров, при которых симулировались такие зависимости, приведены в табл. 1.

На первом этапе исследования было проведено сравнение экспериментальной и теоретических зависимостей поглощения сахарозы от ее концентрации во внешней среде. При этом в качестве экспериментальных данных использовали результаты работы [12], которая была выполнена с применением метода меченых атомов. Для корректного качественного сравнения зависимостей были рассчитаны относительные величины потоков, для чего максимальное значение потока принимали за единицу. Было показано (рис. 2а), что активность H<sup>+</sup>-сахарозного симпортера во всех вариантах практически линейно возрастает по мере увеличения концентрации сахарозы во внешней среде, что хорошо соответствует эксперименту. При этом результаты, полученные при использовании различных по своей сложности моделей, сходны, что показывает близкую степень их адекватности эксперименту.

Далее была проведена оценка влияния на функционирование H<sup>+</sup>-сахарозного симпортера концентрации сахарозы с внутренней стороны плазматической мембраны. Для этого были использованы экспериментальные данные, полученные методом турбодиметрии на инвертированных везикулах [11]. Для корректного сравнения модели и эксперимента также были использованы относительные величины, а поток рассматривался для нормально ориентированной плазматической мембраны. Показано (рис. 2б), что при изменении концентрации сахарозы с внутренней стороны плазмалеммы активность симпортера практически не меняется, что также согласуется с экспериментом и подтверждает равную применимость всех четырех использованных моделей.

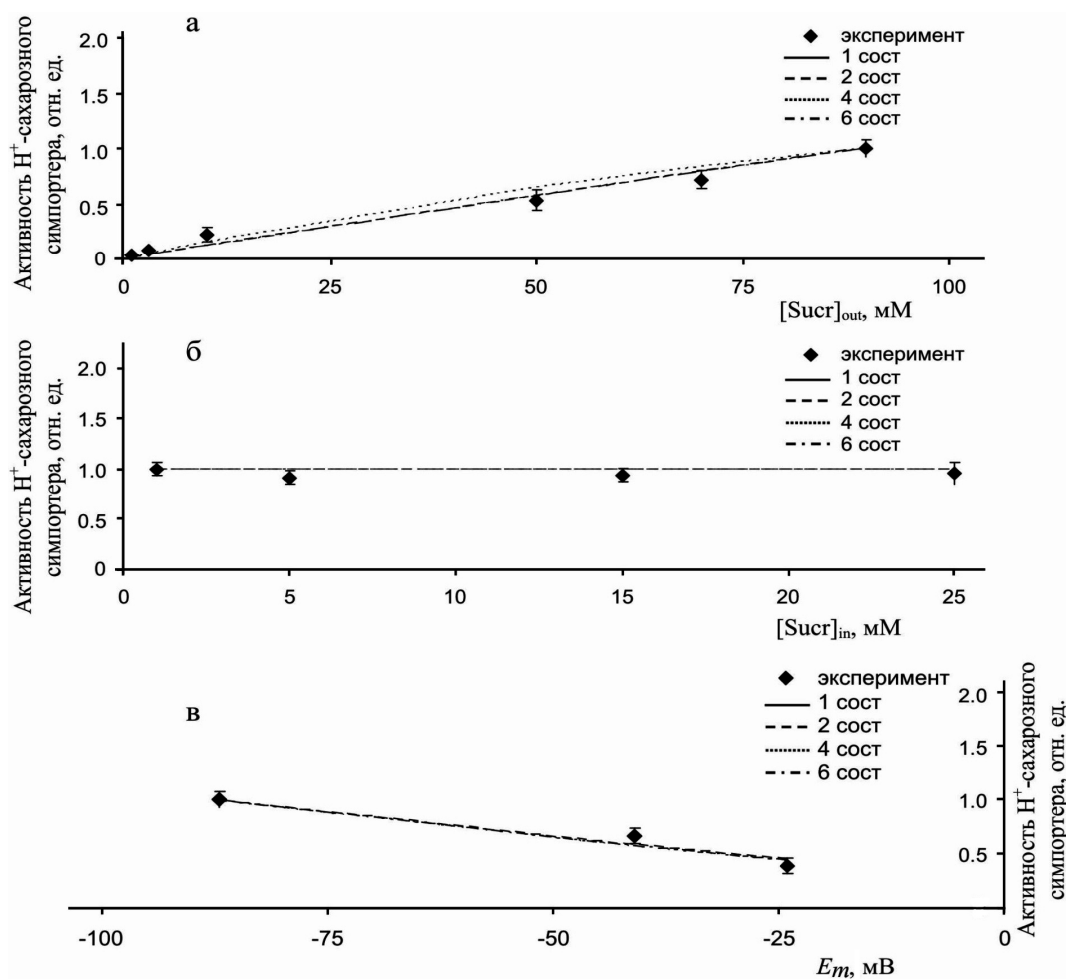


Рис. 2. Экспериментальная и теоретические зависимости активности H<sup>+</sup>-сахарозного симпортера от концентрации сахаразы вне (а) и внутри (б) клетки и от величины мембранного потенциала (в). Экспериментальные значения для зависимости транспорта сахаразы от ее внеклеточной концентрации взяты из работы [12], от внутриклеточной концентрации и потенциала – из работы [11]

Для оценки способности моделей описывать зависимость транспорта сахаразы от мембранного потенциала использовали данные работы [11], в рамках которой рассматривалась зависимость активности H<sup>+</sup>-сахарозного симпортера (оцененная методом турбодиметрии) от калиевого диффузионного потенциала на плазматической мембране, который в такой модельной системе может быть принят в качестве потенциала покоя. Для сравнения экспериментальной и теоретических зависимостей были использованы относительные единицы измерения потока и нормально ориентированные мембраны. При этом показано (рис. 2в), что снижение мембранного потенциала вызывало существенное уменьшение транспорта сахаразы как в эксперименте, так и в модели, а различий в зависимостях, описанных моделями с разным числом состояний, не наблюдалось.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что все рассмотренные модели приблизительно с равной эффективностью описывают

влияние на транспорт сахаразы таких факторов, как ее концентрация и мембранный потенциал. В то же время усложнение модели приводит к возрастанию количества параметров, необходимых для ее описания. На основании этого можно заключить, что наиболее простая модель, учитывающая только одно состояние фермента, является оптимальной при моделировании зависимости активности H<sup>+</sup>-сахарозного симпортера от концентрации сахаразы и мембранного потенциала. Однако следует отметить, что такая модель изначально неприменима к описанию субстратного насыщения скорости переноса протонов и сахаразы ферментом, к детальному описанию действия ингибиторов, влияющих на строго определенные стадии каталитического цикла, и к решению ряда других задач. Кроме того, остается открытым вопрос: насколько модель, учитывающая одно состояние переносчика, способна не только качественно, но и количественно описать поглощение сахаразы на везикулярном и клеточном уров-

нях. Его решение является задачей дальнейших исследований.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 11-04-97071-р\_поволжье\_а).*

#### Список литературы

1. Sauer N. // FEBS Letters. 2007. V. 581. P. 2309–2317.
2. Lalonde S., Wipf D., Frommer W.B. // Annu. Rev. Plant Biol. 2004. V. 55. P. 341–372.
3. Sukhov V., Vodeneev V. // J. Membrane Biol. 2009. V. 232. P. 59–67.
4. Sukhov V., Nerush V., Orlova L., Vodeneev V. // J. Theor. Biol. 2011. V. 291. P. 47–55.
5. Beilby M.J., Shepherd V.A. // J. Membrane Biol. 2001. V. 181. P. 77–89.
6. Gradmann D., Boyd C.M. // Eur. Biophys. J. 2004. V. 33. P. 396–411.
7. Лаврова А.И., Плюснина Т.Ю., Булычев А.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. // Биофизика. 2005. Т. 50. С. 1088–1094.
8. Плюснина Т.Ю., Лаврова А.И., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. // Биофизика. 2005. Т. 50. С. 492–499.
9. Hansen U.-P., Gradmann D., Sanders D., Slayman C.L. // J. Membrane Biol. 1981. V. 63. P. 165–190.
10. Fisahn J., Hansen U.-P., Lucas W.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. V. 89. P. 3261–3265.
11. Калинин В.А., Орлова О.В., Оприлов В.А. // Физиология растений. 2001. Т. 48. № 3. С. 356–363.
12. Estruch J.J., Pereto J.G., Vercher Y., Beltran J.P. // Plant Physiol. 1989. V. 91. P. 259–265.

### EFFECTIVENESS ANALYSIS FOR USING ONE-, TWO-, FOUR- AND SIX- STATE MODELS FOR QUALITATIVE DESCRIPTION OF H<sup>+</sup>-SUCROSE SYMPORTER IN PLANTS

*V.S. Sukhov, V.A. Kalinin, O.V. Orlova, L.M. Surova, O.N. Sherstneva, V.A. Vodeneev*

The applicability of one-, two-, four- and six- state models for plant H<sup>+</sup>-sucrose symporter simulation has been studied. For each model, parameter values have been found. The models have been shown to provide a good qualitative description of symporter activity dependences on sucrose concentrations and the membrane potential. The model applicability ranges are discussed.

*Keywords:* higher plants, H<sup>+</sup>-sucrose symporter, mathematical simulation.