

КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА МЕЖДУ ПЛАСТОЦИАНИНОМ И ЦИТОХРОМОМ f В ЛЮМЕНЕ ТИЛАКОИДА

© 2008 г. И.Б. Коваленко, А.М. Абатурова, П.А. Громов*, Д.М. Устинин, Г.Ю. Ризниченко, Е.А. Грачев*, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы;

*Физический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Воробьевы горы
E-mail: kovalenko78@mail.ru*

Поступила в редакцию 13.06.07 г.

После доработки 17.09.07 г.

Исследована диффузия пластоцианина и образование комплекса «пластоцианин–цитохром f » (субъединицы цитохромного b_6/f -комплекса) в люмене тилакоида. Построена имитационная компьютерная модель диффузии и связывания этих белков, учитывающая их электростатическое взаимодействие. На основании экспериментальных данных оценены значения параметров модели для образования комплекса пластоцианин–цитохром f в растворе. С помощью модели исследована зависимость константы скорости образования комплекса пластоцианин–цитохром f от размеров люминального пространства. Показано, что сужение люминального пространства приводит к резкому уменьшению скорости реакции, что соответствует наблюдаемому в эксперименте ингибированию реакции при гиперосмотическом стрессе.

Ключевые слова: пластоцианин, цитохром f , диффузия, белковый комплекс, люмен, электростатические взаимодействия.

У высших растений и водорослей фотосистемы I и II (ФС I, ФС II) поглощают световую энергию и иницируют фотосинтетические процессы транспорта электронов и протонов в тилакоидной мембране. Цитохромный комплекс сопрягает работу двух фотосистем, принимая электроны от ФС II и передавая их на ФС I. Транспорт электронов от цитохромного комплекса до ФС I осуществляет подвижный переносчик электронов белок–пластоцианин.

Пластоцианин является небольшим водорастворимым белком, который диффундирует в люмене – узком замкнутом пространстве между тилакоидными мембранами. Молекулы пластоцианина окисляют цитохром f и восстанавливают реакционный центр фотосистемы I, перемещаясь в люминальном пространстве на довольно большие расстояния (сотни нанометров) и перенося электроны между гранальными и стромальными областями в тилакоидах [1,2]. В нативном хлоропласте толщина люмена (4 – 10 нм [3]) сравнима с размерами пластоцианина

(40 × 28 × 30 Å, рис. 1). Поэтому в люмене диффузия пластоцианина сильно затруднена выступающими частями трансмембранных мультиферментных комплексов и другими молекулами пластоцианина [4]. Известно, что электростатические взаимодействия играют ключевую роль при связывании пластоцианина с мультиферментными комплексами при значениях ионной силы, pH и температуры, соответствующих физиологическим условиям. Благодаря наличию электростатических сил притяжения и отталкивания диффузия пластоцианина к сайту связывания с белковым комплексом имеет направленный характер, а молекула пластоцианина ориентируется в электрическом поле комплекса [4].

Известно, что ширина люминального пространства может меняться при гиперосмотическом стрессе, изменении интенсивности освещения и pH [5]. В обзоре [6] приведены усредненные значения расстояния между двумя соседними парами мембран в гранальных стопках, полученные с помощью анализа электронных микрофотографий из 17 литературных источников. Если принять, что толщина одной мембраны равна примерно 5 нм, то можно вычис-

Сокращения: ФС – фотосистема, Рс – пластоцианин, Сyt f – цитохром f .

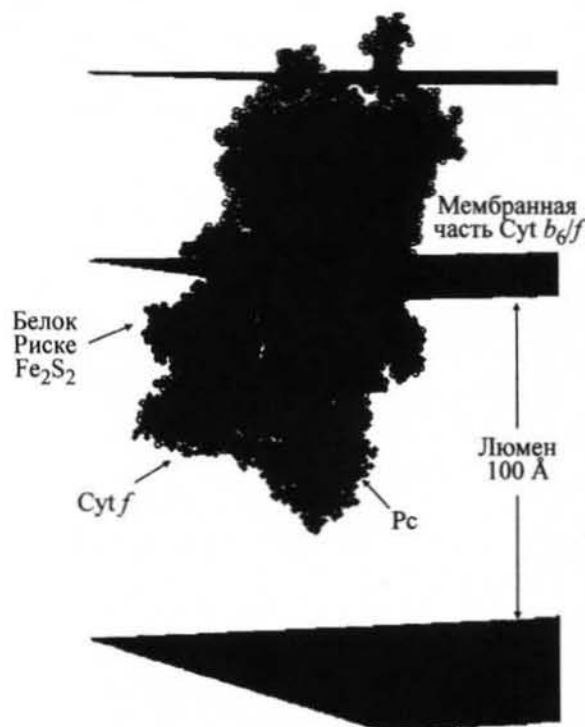


Рис. 1. Расположение комплекса Рс-Сyt *f* относительно Cyt *b₆/f*-комплекса, встроенного в мембрану. Рисунок получен совмещением Pdb структур 2PCF и 1Q90.

лить ширину люминального пространства. По приведенным в обзоре данным, вычисленная таким образом ширина люмена варьирует от 4 до 14 нм, однако величины 6 и 11 нм наиболее распространены. Некоторыми исследователями [5] при освещении наблюдалось сужение люминального пространства в гранальных стопках до 30%, этим можно объяснить значения толщины люминального пространства, равные 6 и 11 нм, которые могут соответствовать световой и темновой адаптации хлоропластов. В недавней работе [7] с помощью метода электронно-микроскопической томографии определена трехмерная организация тилакоидных мембран в хлоропластах высших растений. Согласно этой работе, средняя ширина гранального слоя, т.е. двух мембран и люминального пространства между ними, так же как и стромальной ламеллы, равна 20 ± 2 нм, что соответствует средней толщине люмена, равной 10 нм.

В работе [8] на тилакоидах *Chlamydomonas reinhardtii* изучали ингибирование реакций взаимодействия пластоцианина с цитохромом *f* и P700 гиперосмотическим стрессом. Было показано, что добавление соли приводит к удалению воды из люминального пространства и, как следствие, к его сужению в среднем от 5 до 1,5 нм.

Это приводит к ингибированию реакций взаимодействия пластоцианина с цитохромом *f* и P700, так как минимальный диаметр пластоцианина составляет 2,8 нм. Такие оценки ширины люмена кажутся нам несколько заниженными по сравнению со значениями, приведенными в обзоре [6], а также в работе [7].

В работе [9] на изолированных тилакоидах высших растений при гиперосмотическом стрессе наблюдалось увеличение скорости взаимодействия пластоцианина с P700 и цитохромом *f*. Этот эффект был объяснен уменьшением люминального пространства и, как следствие, увеличением концентрации пластоцианина. Было высказано предположение, что люминальные части тилакоидных мембран и связанные с ними белки в *Chlamydomonas reinhardtii* могут отличаться от таковых у высших растений и в случае с высшими растениями препятствовать сильному сужению люмена [8].

В работе [10] изучалось латеральное распределение пластоцианина методом иммуноцитохимической локализации и регистрации кинетики изменения редокс-состояния P700⁺. После темновой адаптации концентрация пластоцианина в стромальной части люмена была в примерно два раза выше концентрации пластоцианина в гранальных областях. При освещении наблюдали увеличение концентрации пластоцианина в гранальных областях; за счет ее уменьшения в стромальных областях и был сделан вывод об индуцируемой светом диффузии пластоцианина из стромальных областей в гранальные. Часть пластоцианина уходит в гранальную область и, возможно, прилипает к мембранам из-за уменьшения pH. Поскольку на свету также происходит сужение люмена в гранальной области, то некоторые молекулы пластоцианина могут оказаться заблокированными, следовательно, поток электронов от цитохромного комплекса к ФС I может уменьшиться в гранальных областях.

Для изучения диффузии пластоцианина в люмене и его взаимодействия с мультиферментными комплексами представляется целесообразным построение модели переноса электрона пластоцианином в люмене, которая, с одной стороны, будет учитывать сложную геометрию люминального пространства, а с другой – описывать электростатические взаимодействия белков – участников электронного транспорта. В последние годы появились работы, в которых изучаются кинетические характеристики процесса образования комплекса двух белков с помощью методов броуновской динамики. В работах [11,14] построены модели броуновской динамики образования комплекса пластоциа-

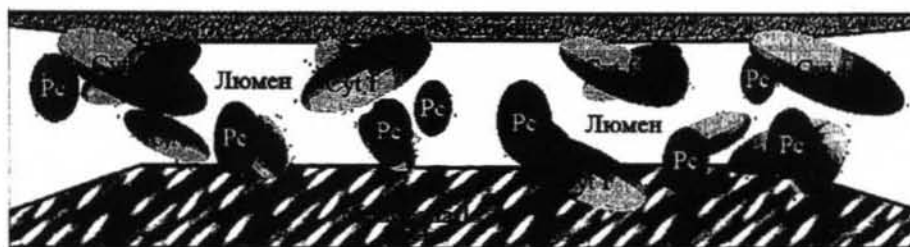


Рис. 2. Визуализация люмена, ограниченного сверху и снизу тилакоидными мембранами (заштрихованы) и пластоцианина и цитохрома *f*.

нина и цитохрома *f* в растворе, проведено исследование процесса образования комплекса этих белков, изучены структура образовавшегося комплекса и возможность переноса электрона в нем. В моделях также учитывается электростатическое взаимодействие между этими белками. Однако в этих работах не рассматривается диффузия молекул пластоцианина в люмене тилакоида и их взаимодействие с цитохромными *b₆/f*-комплексами и комплексами фотосистемы I.

В предыдущей работе [15] нами был разработан метод прямого компьютерного моделирования диффузии и взаимодействия белков — подвижных переносчиков электрона, учитывающий сложную геометрию реакционного объема и переносчиков. В работе [6] была построена компьютерная модель образования комплекса пластоцианина и цитохрома *f* в растворе, учитывающая геометрическую форму этих белков и их электростатические взаимодействия. На основании моделирования зависимости константы скорости реакции белков от ионной силы раствора для семи различных мутантов и сравнения полученных данных с экспериментальными данными был сделан вывод о корректности описания процесса образования комплекса пластоцианина и цитохрома *f* в растворе.

В настоящей работе с помощью метода прямого компьютерного моделирования изучается образование комплекса пластоцианина и цитохрома *f* в люмене тилакоида. В модели учитывается наличие мембран, ограничивающих люминальное пространство, белки цитохрома *f* располагаются в люмене в соответствии с экспериментальными данными о структуре цитохромного *b₆/f*-комплекса, пластоцианин диффундирует в люмене. С помощью модели получена зависимость константы скорости образования комплекса белков от геометрии (длины и ширины) люминального пространства и характера расположения комплексов.

ОПИСАНИЕ МОДЕЛИ

Модельная сцена представляет собой трехмерный реакционный объем, имеющий форму прямоугольного параллелепипеда и представляющий модель люминального пространства (рис. 2). Этот реакционный объем сверху и снизу ограничен мембранами, с торцов применены зеркальные граничные условия. Площадь мембран, расстояние между ними, плотность расположения цитохромных комплексов на мембранах и концентрации подвижных переносчиков оценивались по литературным данным. Диаметр гранальной мембраны варьируется от 300 до 600 нм [17], плотность цитохромных *b₆/f*-комплексов на мембране равна 2,55 на 1000 нм² [18], концентрация пластоцианина составляет 430 мкМ.

Цитохромный *b₆/f*-комплекс из *Chlamydomonas reinhardtii* состоит из четырех больших субъединиц — цитохрома *f*, цитохрома *b₆*, железосерного белка Риске и субъединицы IV, а также из четырех малых гидрофобных субъединиц [19]. Белки Риске и цитохром *f* выступают в люмен (рис. 1). Диффундирующий в люмене пластоцианин реагирует с цитохромом *f*, образуя с ним комплекс и окисляя его. В 1998 г. Ubbink с коллегами [20] получили с помощью метода ЯМР структуру комплекса пластоцианина шпината и цитохрома *f* турнепса (Pdb структура 2PCF). В 2003 г. с помощью рентгеноструктурного анализа была получена структура цитохромного *b₆/f*-комплекса *Chlamydomonas reinhardtii* (Pdb структура 1Q90). Совместив эти две структуры, мы нашли возможное взаимное расположение комплекса пластоцианина и цитохрома *f* относительно мембраны (рис. 1). При моделировании мы реализовали такое положение цитохрома *f* относительно мембраны. В модели молекулы пластоцианина диффундируют в люминальном пространстве и могут образовать комплекс с неподвижными молекулами цитохрома *f*, только приняв соответствующую ориентацию относительно молекул цитохрома *f*.

Движение и взаимодействие белков. Взаимодействие белков-подвижных переносчиков электронов может быть условно разделено на несколько этапов [2]: (1) диффузию и сближение белков за счет действия электростатических сил притяжения между молекулами; (2) взаимодействие отдельных частей молекул, взаимную ориентацию молекул в пространстве и образование предварительного комплекса; (3) гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, конформационную перестройку белков и образование комплекса, в котором возможен транспорт электрона; (4) перенос электрона в комплексе. В нашей модели явным образом описываются диффузия, электростатические взаимодействия белков и образование предварительного комплекса. Конформационные изменения, гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия учтены неявно с помощью параметра вероятности взаимодействия белков.

Описание метода моделирования реакции пластоцианина с цитохромом f в растворе приведено в работе [16]. В данной работе тот же самый метод применяется для моделирования реакции в люмене. Поскольку каждая молекула пластоцианина и цитохрома рассматривается как отдельный объект в трехмерном пространстве, имеющий конечный объем и определенную форму, моделирование реакции в ограниченном объеме люмена принципиально ничем не отличается от моделирования реакции в растворе. Единственное отличие – это более плотное расположение молекул в пространстве и возможные столкновения частиц пластоцианина с мембраной («стенками» реакционного объема), что легко учитывается естественным образом при моделировании движения частиц. Молекулы пластоцианина рассматриваются как броуновские частицы, совершающие поступательное и вращательное движение в вязкой среде под действием случайной силы, возникающей из-за столкновений с молекулами среды, и электростатической силы. Для описания процесса движения мы использовали уравнение Ланжевена, описывающее изменение каждой координаты со временем под действием случайной и электростатической сил.

Уравнение Ланжевена для поступательного движения имеет вид:

$$\xi_{tr}^x \frac{dx}{dt} = f_x(t) + F_x,$$

где x – координата, вдоль которой рассматривается движение, ξ_{tr}^x – коэффициент вязкого трения вдоль этой координаты, $f_x(t)$ и $\overline{F}_x$ – проекции случайной и электростатической сил на ось x соответственно.

Уравнение Ланжевена для вращательного движения:

$$\xi_{rot}^x \frac{d\varphi}{dt} = m_x(t) + M_x,$$

где ξ_{rot}^x – коэффициент вязкого трения для вращательного движения вокруг оси x , $m_x(t)$ и M_x – моменты случайной и электростатической сил относительно оси x соответственно. Случайная сила $f_x(t)$ распределена нормально с нулевым средним и дисперсией, равной $\frac{2kT\xi_{tr}^x}{\Delta t}$. Здесь k – постоянная Больцмана, T – температура.

Для упрощения расчетов коэффициентов вязкого трения в модели молекулы пластоцианина и цитохрома f представлялись как эллипсоиды вращения. Трехмерная модель молекулы строилась по данным Protein Data Bank. Оси и размеры эллипсоидов выбирались таким образом, чтобы момент инерции относительно оси вращения был минимальным и моменты инерции исходной молекулы и соответствующего ей эллипсоида совпадали при условии однородной плотности эллипсоида.

Для описания рассматриваемой области моделирования (модельной сцены) задается ортогональная система координат модельной сцены. На границах области моделирования используются зеркальные граничные условия. С каждым объектом модельной сцены (т.е. с белками-подвижными переносчиками электрона) связывается отдельная (собственная) система координат. Собственная система координат любого объекта совмещена с осями соответствующего эллипсоида. Выбор такой системы координат обусловлен тем, что в ней известны коэффициенты вязкого трения для эллипсоида.

Уравнение Ланжевена решается численно в собственной ортогональной системе координат, совмещенной с осями эллипсоида: на каждом шаге в модели вычисляются смещения эллипсоида вдоль его осей и повороты вокруг его осей под действием броуновской силы. Найденные в собственной системе координат значения перемещений и поворотов затем пересчитываются в перемещения и повороты в лабораторной системе координат. Положение любого объекта в модели задается смещением и матрицей поворота собственной системы координат относительно лабораторной системы координат.

При расчете столкновений белков использовалось описание формы белков с помощью набора сфер. Для того чтобы проверить факт

столкновения двух молекул, необходимо определить, пересекаются соответствующие им наборы сфер или нет. Радиусы и координаты центров сфер выбирали таким образом, чтобы при минимальном количестве сфер отклонение формы тела, представляемого сферами, от поверхности белка было не более 2 Å.

Большое внимание уделено электростатическим взаимодействиям белков. Известно, что электростатическое взаимодействие играет ключевую роль в процессах связывания пластоцианина и цитохрома *f* [2,4,21]. Заряженные аминокислотные остатки и парциальные заряды белков создают вокруг них неоднородное электрическое поле. Если белок находится далеко от других белков, то его движение определяется только свободной броуновской диффузией. При приближении к другим белкам и комплексам белок ориентируется в электрическом поле, создаваемом этими белками, и может занять выгодную позицию для последующего связывания.

В нашей модели белок считается областью с диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 2$ с пространственно-распределенными фиксированными зарядами [22]. Раствор считается областью с диэлектрической проницаемостью $\epsilon = 80$ с мобильными зарядами (ионами). При значительных расстояниях между белками (больше 35 Å) электростатические взаимодействия очень слабы из-за экранирования электрического поля молекулами воды, поэтому в модели электростатическое взаимодействие между белками учитывается только при сближении их поверхностей на расстояние менее 35 Å, которое мы назвали расстоянием электростатического взаимодействия. На расстоянии 35 Å в растворе с ионной силой 100 мМ экранирование приводит к уменьшению электростатического потенциала в 80 раз по сравнению с раствором без ионов соли [22].

Для каждого типа белков в некоторой области вокруг белка рассчитывается значение потенциала электрического поля. Для нахождения силы и ее момента, действующих на отдельный заряд в белке, вычисляется градиент потенциала, создаваемого другими белками, в той точке, где находится заряд. По известному градиенту поля и величине заряда вычисляется сила, действующая на заряд. Для того чтобы рассчитать силу и момент силы, действующие в целом на молекулу, надо просуммировать силу и момент, действующие на каждый из зарядов данной молекулы.

Параметры модели. В результате хаотического броуновского движения в модели может происходить сближение двух или большего количества белков на расстояние электростатиче-

ского взаимодействия. При этом белки ориентируются в электрическом поле других белков, могут занять выгодную для связывания позицию и образовать предварительный комплекс. Образование предварительного комплекса означает, что расстояния между взаимодействующими частями молекул должно быть меньше некоторых расстояний, которые мы называем расстояниями докинга. Эти расстояния являются параметрами модели (таблица 1). Последующие процессы образования финального комплекса учтены в модели неявно с помощью параметра вероятности образования комплекса белков. Удачный подбор параметров модели (расстояний и вероятности связывания) обеспечивает выгодную для последующего связывания взаимную ориентацию белков относительно друг друга.

Таким образом, расстояниями докинга r_i мы называем расстояния между определенными аминокислотными остатками молекул пластоцианина и цитохрома в комплексе. Связывание белков, занимающих выгодную взаимную ориентацию, происходит с некоторой вероятностью P , которую мы называем вероятностью докинга.

В модели на каждом шаге подсчитывается суммарное количество восстановленных и окисленных молекул пластоцианина и цитохрома *f*, по этим данным можно построить кинетическую кривую изменения концентрации белков в окисленном или восстановленном состоянии. Аппроксимируя полученную кинетическую кривую в соответствии с законом действующих масс, мы можем получить значение константы скорости реакции второго порядка связывания молекул пластоцианина и цитохрома *f*.

В нашей предыдущей работе [16] были оценены значения параметров модели (расстояния и вероятность связывания), для которых вычисленные по кинетической модельной кривой константы скорости для дикого и мутантных типов пластоцианина при ионной силе 100 мМ были наиболее близки к экспериментальным значениям из работы [23].

Параметры в работе [16] оценивали следующим образом. В качестве расстояний докинга были взяты расстояния между семью аминокислотными остатками пластоцианина и цитохрома *f*, которые в комплексе, описанном в работе [20], находятся в непосредственном соседстве, а также расстояние между атомами Си и Fe. Для различных сочетаний значений расстояний докинга (варьировались от 10 до 50 Å с шагом 1 Å) были получены зависимости константы скорости для реакции образования комплекса между молекулами цитохрома *f* и мо-

Таблица 1. Расстояния между атомами в комплексе пластоцианин-цитохром *f*, используемые нами в модели в качестве условия образования комплекса

Аминокислотные остатки Рс и Cyt <i>f</i> , расположенные рядом в комплексе Рс-Cyt <i>f</i>	Номера и названия атомов, между которыми измеряется расстояние		Расстояние в модели, <i>R</i> , Å
	Рс	Cyt <i>f</i>	
Asp42-Arg209 (D42-R209)	591 – OD2	3278 – NH2	18
Glu43-Lys187 (E43-K187)	607 – HB	2930 – HE	18
Asp44-Lys185 (D44-K185)	618 – OD2	2895 – HZ	18
Glu60-Lys58 (E60-K58)	842 – HA	912 – HZ	25
–	1435 – Cu	3881 – Fe	40

молекулами пластоцианина дикого типа и семью мутантными от вероятности докинга.

Оказалось, что для однозначного задания положения молекулы пластоцианина относительно молекулы цитохрома *f* в комплексе достаточно задавать расстояния между пятью парами атомов (табл. 1). Значение вероятности докинга, при котором полученные нами значения констант скоростей ближе всего соответствовали экспериментальным значениям, оказалось равным 0,01. Сравнение модельных значений констант с экспериментальными при ионной силе 100 мМ представлено в табл. 2. Качественное совпадение с экспериментальными данными позволило сделать вывод о том, что предложенный метод прямого моделирования образования комплекса белков с учетом электростатических взаимодействий применим для описания взаимодействия пластоцианина и цитохрома *f* в растворе.

В данной работе мы моделируем процесс образования комплекса пластоцианина и цитохрома *f* в люмене тилакоида, при этом значения параметров модели (расстояния и вероятность связывания) положили равными параметрам модели для раствора. Мы предполагаем, что эти элементарные параметры, характеризующие процесс образования комплекса из двух белков, не зависят от объема и размеров системы.

Таблица 2. Значения констант скорости реакции Рс с Cyt *f* при ионной силе 100 мМ, определенные в работе [22] для различных мутантов Рс при pH 6, и константы скорости реакции, полученные на модели при значениях параметров, указанных в табл. 1 и вероятности докинга 0,01

Название мутации	k_2 , 10^6 , Мс ⁻¹ (из эксперимента)	k_c , 10^6 , Мс ⁻¹ (из модели)
wt	185 (± 20)	159 (± 4)
Q88E	220 (± 30)	287 (± 9)
D42N	76,5 (± 1,5)	76 (± 3)
E43N	56,1 (± 1)	73 (± 2)
E43K	29,3 (± 0,7)	36,9 (± 0,5)
E43Q/D44N	26,9 (± 0,6)	35,8 (± 0,7)
E59K/E60Q	13,8 (± 0,2)	23,9 (± 0,8)
E59K/E60Q/E43N	5,56 (± 0,01)	8,2 (± 0,8)

РЕЗУЛЬТАТЫ

Моделировалась стадия образования комплекса между пластоцианином из шпината и цитохромом *f* из турнепса (молекулярные структуры белков из Protein Data Bank), процесс передачи электрона в комплексе считали быстрым по сравнению с этой стадией.

С помощью компьютерной модели мы исследовали зависимость константы скорости реакции образования комплекса пластоцианина и цитохрома *f* в люмене тилакоида от ширины люминального пространства (расстояния между мембранами). При этом количество молекул (270 молекул пластоцианина и 270 молекул цитохрома *f*) и площадь мембран (322 × 322 нм) оставались постоянными. Расстояние между мембранами изменяли от 7 до 200 нм. Зависимость константы скорости от расстояния между мембранами вычислена для двух случаев: а) молекулы цитохрома *f* закреплены на мембране в люмене; б) молекулы цитохрома *f* диффундируют в реакционном объеме кубической формы, при этом объем и количество молекул такие же, как и в случае (а) (рис. 3). Случай (а) соответствует экспериментальным данным по расположению цитохрома *f* относительно мембраны в тилакоиде; случай (б) соответствует эксперименту на выделенных частицах в растворе. Результаты численного эксперимента приведены на рис. 4 и 5.

Из рис. 4 видно, что скорость реакции максимальна при расстоянии между мембранами

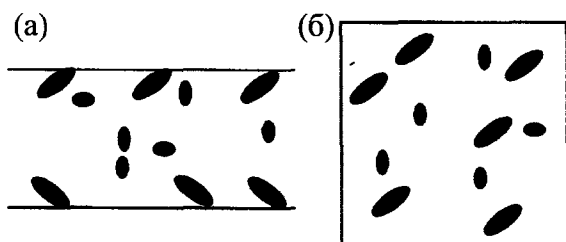


Рис. 3. Два варианта модельной сцены: (а) – молекулы *Cyt f* закреплены на мембранах в люмене в соответствии со структурными данными; (б) – молекулы диффундируют в кубическом реакционном пространстве, объем которого равен объему люмена в случае (а).

тилакоида, равном 8 нм. При увеличении расстояния скорость реакции снижается из-за уменьшения концентрации пластоцианина. При расстоянии меньше 8 нм скорость реакции также снижается.

Из рис. 5 видно, что для случая 1 константа скорости второго порядка реакции пластоцианина и цитохрома *f*: $k = 2,2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ максимальна при расстоянии между мембранами тилакоида 8 – 10 нм; если расстояние меньше 7 нм, то наблюдается резкое уменьшение значений константы скорости вплоть до нуля. Это объясняется тем, что молекула цитохрома *f* с присоединенным к нему пластоцианином выступает из мембраны на 7 нм, и вследствие наличия противоположной мембраны при расстоянии меньше 7 нм образование комплекса пластоцианин–цитохром *f* невозможно. С увеличением расстояния между мембранами константа скорости также уменьшается. Это может быть объяснено тем, что молекулы цитохрома *f* закреплены на мембранах и, как следствие, молекулы пластоцианина удалены от них на большое расстояние в начальный момент времени. Для случая 2, когда молекулы расположены в кубическом реакционном объеме, уменьшения константы скорости при уменьшении реакционного объема не наблюдается. При увеличении реакционного объема больше $5 \cdot 10^6 \text{ нм}^3$ константа скорости не зависит от расстояния между мембранами.

При изменении концентрации молекул пластоцианина и цитохрома *f* в растворе константа скорости реакции второго порядка не должна зависеть от концентрации, если встречи молекул случайны. Наличие максимума константы скорости при расстоянии между мембранами 8 – 10 нм свидетельствует о невыполнении закона действующих масс в случае, если концентрация молекул высока. Для оценки константы скорости мы аппроксимировали полученную кривую в соответствии с законом действующих масс,

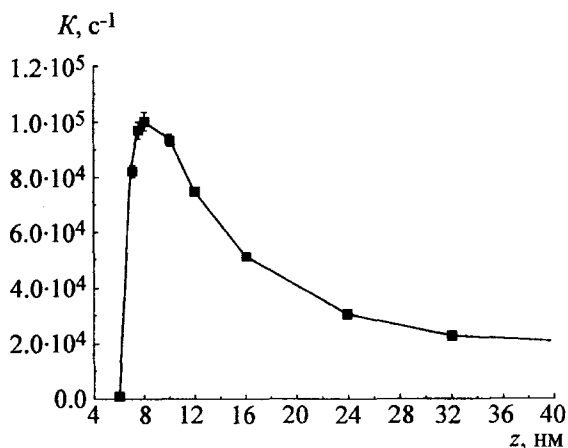


Рис. 4. Зависимость скорости реакции образования комплекса *Pc-Cyt f*, отнесенной к концентрации *Cyt f*, в люмене тилакоида, от расстояния *z* между мембранами при постоянном количестве молекул.

который предполагает равновероятные встречи молекул друг с другом в течение всего времени реакции. В начальный момент реагенты хорошо перемешаны, т.е. молекулы занимают случайные положения, но никакие две частицы не находятся друг от друга ближе радиуса взаимодействия. В ходе реакции «константа» скорости k очень велика в начальный момент времени, из-за пар молекул, которые находились близко в начальный момент, затем k убывает и приближается к стационарному значению [24]. Это стационарное значение и есть то значение, которое наблюдается в эксперименте.

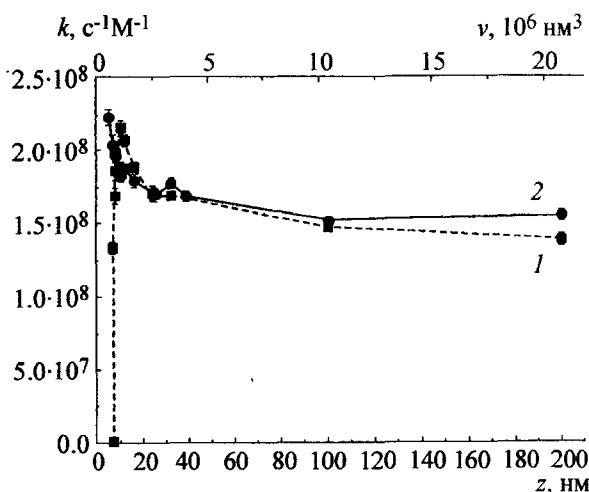


Рис. 5. Зависимости бимолекулярной константы скорости реакции образования комплекса *Pc-Cyt f* при постоянном количестве молекул от: 1 – расстояния *z* между мембранами для реакции в люмене тилакоида и 2 – объема реакционного пространства. Концентрации молекул в люмене и растворе совпадают.

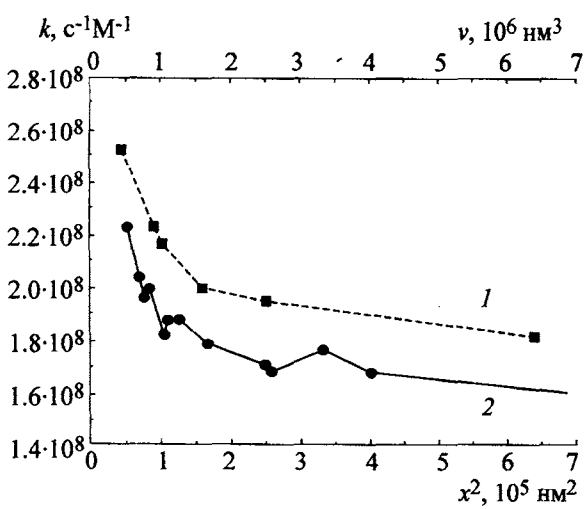


Рис. 6. Зависимости константы скорости бимолекулярной реакции образования комплекса Рс-Сyt f при постоянном количестве молекул от: 1 – площади мембраны при постоянном расстоянии между мембранами 10 нм для реакции в люмене тилакоида и 2 – объема реакционного пространства. Количество молекул в люмене и растворе одинаково.

Также электростатические взаимодействия начинают играть роль при близком расположении молекул в растворе и увеличивают вероятность встречи молекул и их связывания при увеличении концентрации.

Мы также исследовали зависимость величины константы скорости реакции образования комплекса пластоцианина и цитохрома *f* в люмене тилакоида от размера люмена в латеральном направлении при постоянном расстоянии между мембранами, равном 10 нм, и постоянном количестве молекул пластоцианина и цитохрома *f* (270 молекул). В латеральной плоскости люмен имел форму квадрата с длиной стороны *x*, которую мы называем длиной люмена. Длину люмена изменяли от 200 до 1200 нм. Результат приведен на рис. 6 (кривая 1). Этот случай соответствует варианту модельной сцены (а) на рис. 3. Для сравнения значений константы скорости реакции мы также построили зависимость константы скорости реакции пластоцианина и цитохрома *f* в кубическом реакционном пространстве от объема реакционного пространства (кривая 2 на рис. 6). Этот случай соответствует варианту модельной сцены (б) на рис. 3.

Из рис. 6 видно, что при уменьшении реакционного объема, т.е. при увеличении концентрации молекул, константа скорости увеличивается. Это свидетельствует о невыполнении закона действующих масс в случае высокой концентрации молекул. Когда молекулы цитохрома *f* закреплены на мембранах (см. рис. 3а), наблюдаются большие значения константы ско-

рости реакции по сравнению со случаем, когда молекулы цитохрома *f* взаимодействуют с молекулами пластоцианина в кубическом реакционном объеме (см. рис. 3б). Это может быть связано с тем, что в первом случае мембраны ограничивают объем для диффузии пластоцианина, препятствуя его уходу из области притяжения цитохрома *f*, а также с тем, что молекулы цитохрома *f* на мембранах находятся в удобной для связывания пространственной ориентации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты нашей работы позволяют установить связь между значением ширины люмена тилакоида и скоростью образования комплекса пластоцианин-цитохром *f* в люмене. Модельный эксперимент показал, что при сужении люминального пространства до 7 нм наблюдается ингибирование реакции пластоцианина и цитохрома *f*, так как цитохромный *b/f*-комплекс с присоединенным к нему пластоцианином выступает из мембраны на расстояние около 7 нм, и поэтому при расстоянии меньшем 7 нм между противоположными мембранами образование комплекса пластоцианин-цитохром *f* затруднено. Ингибирование реакции пластоцианина и цитохрома *f* наблюдали в работе [8] на тилакоидах *Chlamydomonas reinhardtii* при гиперосмотическом стрессе. Было показано, что добавление соли приводит к удалению воды из люминального пространства и, как следствие, к его сужению в среднем с 5 нм до 1,5 нм. Это приводило к ингибированию реакций взаимодействия пластоцианина с цитохромом *f* и Р700, так как минимальный диаметр пластоцианина 2,8 нм. Такие оценки ширины люмена кажутся нам несколько заниженными по сравнению со значениями, приведенными в обзоре [6], а также в работе [7], так как давление, используемое для получения тонких срезов хлоропластов, может приводить к их сжатию.

В работе [9] на изолированных тилакоидах высших растений при гиперосмотическом стрессе наблюдалось увеличение скорости взаимодействия пластоцианина с Р700 и цитохромом *f*. Этот эффект был объяснен уменьшением люминального пространства и, как следствие, увеличением концентрации пластоцианина. Несомненно, эти экспериментальные результаты экспериментальным результатам из работы [8] и нашим модельным экспериментам может проявляться из-за того, что люминальные части тилакоидных мембран и связанные с ними белки в *Chlamydomonas reinhardtii* могут отличаться от таковых у высших растений и в случае с высшими растениями препятствовать сильному

five times is really not TOO much.
сужению люмена. Некоторое увеличение скорости реакции с $1,7 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ до $2,2 \cdot 10^8 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ при не слишком сильном сужении люмена с 40 до 8 нм наблюдалось нами в модельном эксперименте. Однако при дальнейшем сужении люмена происходило полное ингибирование реакции.

Взаимодействие пластоцианина и цитохромного *b/f*-комплекса в люмене тилакоида – это пример биохимической реакции, ингибирование которой происходит за счет изменения физического характеристика окружающего пространства, в данном случае изменения ширины люмена. Мы предполагаем, что физиологический смысл такого ингибирования может заключаться в регуляции электронного транспорта на стадии восстановления или окисления пластоцианина в люмене тилакоида, наряду с уменьшением скорости выделения протонов в люмен при взаимодействии платохинолов с цитохромным комплексом и другими механизмами регуляции, препятствующими фотоповреждениям при высокой интенсивности света и замедляющими скорость линейного электронного транспорта [25]. Такой физический механизм регуляции замедляет скорость переноса электрона при линейном транспорте, так как сужение люмена происходит в гранальных областях тилакоидных мембран. Однако в стромальных областях мембраны, где происходит циклический транспорт электронов, сужения люмена не наблюдается и скорость переноса электрона с цитохрома *f* на пластоцианин не изменяется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. B. Hope, *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 1 (1993).
2. E. L. Gross, in *Oxygenic photosynthesis: the light reactions*, Ed. by D. R. Ort and C. F. Yocum (Kluwer Acad. Publ., Dordrecht, 1996), pp. 413–429.
3. M. Mehta, V. Sarafis, and C. Critchley, *Aust. J. Plant Physiol.* **26**, 709 (1999).
4. A. B. Hope, *Biochim. Biophys. Acta* **1456**, 5 (2000).
5. S. Murakami and L. Packer, *J. Cell Biol.* **47**, 332 (1970).
6. J. P. Dekker and E. J. Boekema, *Biochim. Biophys. Acta* **1706**, 12 (2005).
7. E. Shimoni, O. Rav-Hon, I. Ohad, et al., *Plant Cell* **17**, 2580 (2005).
8. J. A. Cruz, B. A. Salbilla, A. Kanazava, and D. M. Kramer, *Plant Physiol.* **127**, 1167 (2001).
9. W. Haehnel, A. Propper, and H. Krause, *Biochim. Biophys. Acta* **593**, 384 (1980).
10. W. Haehnel, R. Ratajczak, and H. Robenek, *J. Cell Biol.* **108**, 1397 (1989).
11. G. M. Ullmann, E.-W. Knapp, and N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 42 (1997).
12. D. C. Pearson Jr. and E. L. Gross, *Biophys. J.* **75**, 2698 (1998).
13. F. Rienzo, R. Gabdoulline, M. Menziani, et al., *Biophys. J.* **81**, 3090 (2001).
14. E. L. Gross and D. C. Pearson Jr., *Biophys. J.* **85**, 2055 (2003).
15. И. Б. Коваленко, Д. М. Устинин, Н. Е. Грачев и др., *Биофизика* **48** (4), 656 (2003).
16. I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, P. A. Gromov, et al., *Phys. Biol.* **3**, 121 (2006).
17. L. A. Staehelin G. W. M. van der Staay, in *Oxygenic Photosynthesis. The Light Reactions*, Ed. by D. R. Ort and C. F. Yocum (Kluwer Academic Publishers, 1996), pp. 11–30.
18. P.-A. Albertsson, *Trends in Plant Science* **6** (8), 349 (2003).
19. D. Stroebel, Y. Choquet, J.-L. Popot, and D. Picot, *Nature* **426**, 413 (2003).
20. M. Ubbink, M. Ejdebeck, B. G. Karlsson, and D. S. Bendall, *Structure* **6**, 323 (1998).
21. C. Kleanthous, *Protein-protein recognition* (Oxford University Press, New York, 2000).
22. А. В. Филькенштейн и О. Б. Птицин, *Физика белка*. (Книжный дом «Университет», М., 2002).
23. A. Kaant, S. Young, and D. S. Bendall, *Biochim. Biophys. Acta* **1277**, 115 (1996).
24. А. Х. Воробьев, *Диффузионные задачи в химической кинетике* (Изд-во МГУ, М., 2003).
25. А. Б. Рубин, *Биофизика* (Книжный дом «Университет», М., 2000).
26. И. Б. Коваленко, А. М. Абатурова, П. А. Громов и др., *Математика. Компьютер. Образование* **12** (3), 955 (2005).

Computer Simulation of Complex Formation between Plastocyanine and Cytochrome *f* in Thylakoid Lumen

I.B. Kovalenko*, A.M. Abaturova*, P.A. Gromov, D.M. Ustinin, G.Yu. Riznichenko, E.A. Grachev* and A.B. Rubin

*Biological Department, Lomonosov Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119992 Russia

**Physical Department, Lomonosov Moscow State University, Vorob'evy Gory, Moscow, 119992 Russia

The diffusion of the protein plastocyanine and complex formation between plastocyanine and cytochrome *f* (a subunit of a cytochrome *b₆f* complex) in the chloroplast thylakoid lumen has been studied. A 3D computer simulation model of diffusion and binding of plastocyanine and cytochrome *f* has been constructed, which considers their electrostatic interaction. Based on the experimental data, the parameters of the model for complex formation between plastocyanine and cytochrome *f* in solution have been estimated. The dependence of the rate of plastocyanine-cytochrome *f* reaction on the size of the luminal space has been studied. It was shown that the contraction of the luminal space leads to a decrease in the reaction rate, which is in agreement with the experimental data on the inhibition of the reaction under hyperosmotic stress.

Key words: plastocyanine, cytochrome *f*, diffusion, protein complex, lumen, electrostatic interactions