

МНОГОЧАСТИЧНАЯ МОДЕЛЬ ДИФФУЗИИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПЛАСТОЦИАНИНА С ЦИТОХРОМОМ f В ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКОМ ПОЛЕ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

© 2010 г. О.С. Князева, И.Б. Коваленко*, А.М. Абатурова*, Г.Ю. Ризниченко*, Е.А. Грачев, А.Б. Рубин*

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

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

E-mail: al:aop@gmail.com

Поступила в редакцию 03.12.09 г.

Построена модель электростатических взаимодействий белка пластоцианина с тилакоидной мембраной и цитохромом f . С использованием уравнения Пуассона–Больцмана рассчитаны электростатические потенциалы белков, участвующих в процессе переноса электрона, и тилакоидной мембраны при различных значениях ионной силы. Показано влияние электрического поля тилакоидной мембраны на процесс диффузии и образования комплекса пластоцианин–цитохром f в люмене тилакоида хлоропласта. Рассчитаны константы скорости реакции образования комплекса в зависимости от ионной силы и величины поверхностного заряда на мембране.

Ключевые слова: пластоцианин, цитохром f , фотосинтетическая мембрана, липиды, электронный транспорт, многочастичная компьютерная модель, электростатические взаимодействия, потенциал.

Первичные процессы фотосинтеза (поглощение кванта света, разделение зарядов в реакционных центрах фотосистем, перенос электрона по фотосинтетической цепи) осуществляются в тилакоидной мембране хлоропласта. Тилакоидные мембраны образуют стопки, называемые гранами, а также соединяющие их ламеллы стромы [1]. В мембрану встроены белковые комплексы – фотосистема I (ФС I), фотосистема II, цитохромный b_6/f -комплекс и АТФ-синтаза. Цитохромный b_6/f -комплекс распределен равномерно в гранальных и стромальных областях мембраны, в то время как фотосистема I располагается только в стромальной части мембраны и в краевых гранальных участках [1]. Цитохромный b_6/f -комплекс состоит из четырех больших субъединиц (цитохрома f , цитохрома b_6 , белка Риске, субъединицы IV) и четырех малых субъединиц (PetG, PetL, PetM,

PetN). Цитохром f служит донором электронов для белка пластоцианина, который переносит электрон от цитохромного b_6/f -комплекса на фотосистему I. Неравномерное распределение белковых комплексов в мембране приводит к тому, что при переносе электрона пластоцианин диффундирует на довольно большие расстояния (до сотен нм [2–4] в межмембранном пространстве, толщина которого, равная 4–10 нм [5], сравнима с размерами молекулы самого пластоцианина ($40 \times 28 \times 30 \text{ \AA}$)). Люмен заполнен выступающими частями трансмембранных мультиферментных комплексов, которые затрудняют диффузию пластоцианина [6]. Однако пластоцианин довольно быстро переносит электрон ($\sim 30\text{--}50 \text{ мкс}$ [7]) от цитохромного b_6/f -комплекса к фотосистеме I. Направленная диффузия пластоцианина к сайту связывания с белковым комплексом осуществляется за счет электростатических взаимодействий [6,8–10].

Данная работа посвящена разработке модели электростатических взаимодействий пластоцианина с цитохромом f и тилакоидной мембраной, и является продолжением цикла работ, посвященных прямому многочастичному ком-

Сокращения: МГДГ – моногалактозилдиацилглицерол, ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерол, ДСХ – диацилсульфоинозитилглицерол, ФГ – фосфатидилглицерол, ФС I – фотосистема I, Цит f – цитохром f , Пц – пластоцианин, Фд – ферредоксин.

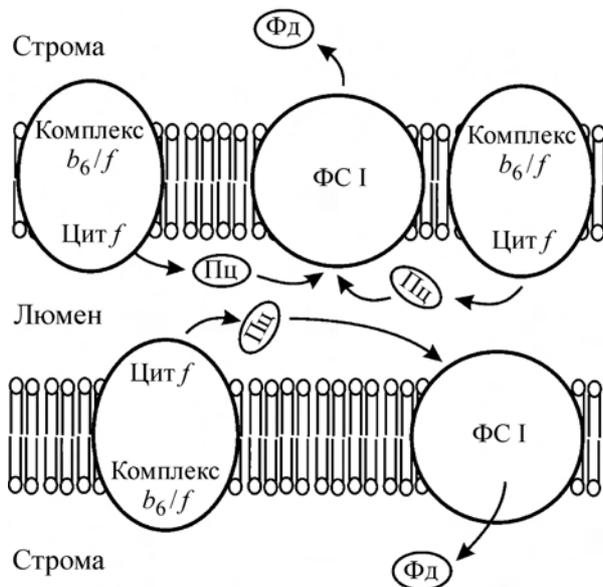


Рис. 1. Схема фотосинтетического электронного транспорта в стромальной части тилакоидной мембраны. Изображены две тилакоидные мембраны и встроенные в нее мультиферментные комплексы, фотосистема I (ФС I), цитохромный b_6/f -комплекс. В межмембранном пространстве показан переносчик электронов пластоцианин (Пц), в стромальной области показан переносчик ферредоксин (Фд). Стрелками изображен транспорт электронов.

пьютерному моделированию фотосинтетического электронного транспорта [10–14].

В работе [13] исследовалась зависимость скорости реакции образования комплекса пластоцианин–цитохром f в люмене тилакоида от геометрии сцены многочастичной компьютерной модели, т.е. от размеров люминального пространства, однако поверхностный заряд фотосинтетической мембраны не учитывался. Особенностью тилакоидных мембран является наличие большого количества гликолипидов: сульфоллипидов и галактолипидов. В основном это нейтральные липиды, т.е. галактолипиды: моногалактозилдиацилглицерол (МГДГ, 50%) и дигалактозилдиацилглицерол (ДГДГ, 30%) [15–17]. Около 15–20% от общего количества липидов составляют заряженные липиды: сульфоллипид диацилсульфохиновозилглицерол (ДСХ) и фосфоллипид фосфатидилглицерол (ФГ), которые отрицательно заряжены при нейтральном рН [15–17]. Известно также, что тилакоидная мембрана несет отрицательный поверхностный заряд при нейтральном рН [18], одним из источников которого могут быть отрицательно заряженные липиды (ФГ, ДСХ) [19]. При понижении рН величина поверхностного заряда уменьшается, при рН около 4,1 мембра-

на становится электрически нейтральной, а при рН ниже 4,1 положительно заряженной [20]. В обзоре [18] приведены значения поверхностного заряда для различных тилакоидных мембран от $-8,4$ до -74 мКл/м². По данным работы [21] для тилакоидной мембраны пшеницы, выращенной при различном освещении, величина поверхностного заряда составляет от -23 мКл/м² до -34 мКл/м². Поверхностный заряд фотосинтетической мембраны может влиять на взаимодействие белков, участвующих в процессах электронного транспорта. В данной работе с помощью прямого многочастичного моделирования исследуется реакция образования комплекса пластоцианин–цитохром f в люминальном пространстве тилакоида в зависимости от величины поверхностного заряда на мембране при различных значениях ионной силы.

Предлагаемая прямая многочастичная модель основана на методах броуновской динамики [22–26]. Однако в отличие от классических моделей броуновской динамики, в которых описывается взаимодействие отдельных пар белковых молекул, наша модель позволяет описывать одновременное взаимодействие и динамику большого количества частиц (белков, белковых комплексов и т.д.) в трехмерном реакционном объеме. Модель позволяет также исследовать влияние параметров окружения (например, влияние поверхностного заряда тилакоидной мембраны) на скорость исследуемой реакции. Результатом компьютерного эксперимента являются полученные расчетным путем кривые изменения во времени количества образованных белковых комплексов. Это дает возможность сравнивать полученные модельные кривые с экспериментальными без привлечения дополнительных гипотез о кинетическом механизме протекания реакции.

МОДЕЛЬНАЯ СЦЕНА

Область моделирования представляет собой две фотосинтетические мембраны, между которыми находится люминальное пространство (рис. 1). В модели каждая фотосинтетическая мембрана представляет собой две заряженные плоскости, ограничивающие липидный бислой с двух сторон. При построении модели мембраны на двумерной плоскости равномерно распределяются точечные отрицательные заряды, количество этих зарядов определяется из экспериментальных данных по концентрации и распределению заряженных липидов (ФГ и ДСХ) в бислое по формуле:

$$N_{\text{ch}} = \sum_{\text{type}} p_i S_i / S_{\text{memb}},$$

где p_i – процентное количество липидов i -го типа; S_i – средняя площадь, приходящаяся на один липид i -го типа. Модельную сцену формируют четыре построенные таким образом отрицательно заряженные плоскости, которые представляют собой два внутренних (люминальных) и два внешних (стромальных) участка фотосинтетической мембраны.

В модели тилакоидная мембрана и цитохромы f являются неподвижными объектами, с которыми взаимодействуют подвижные переносчики пластоцианины. Пластоцианины диффундируют в люминальном пространстве, ограниченном с двух сторон мембраной, на них действуют силы вязкого трения, случайная броуновская сила и силы электростатического отталкивания и притяжения. Мембрана в модели отрицательно заряжена, молекулы пластоцианина и цитохрома f несут формальные положительные и отрицательные заряды на полярных аминокислотах. Заряды на белках рассчитываются в соответствии с данными об их структуре, как описано в работе [27].

Силы, действующие на пластоцианины со стороны неподвижного окружения, и силы их взаимодействия между собой рассматривались отдельно. Электростатическую силу, действующую на i -й подвижный объект, рассчитывали по формуле:

$$F_{\text{элек}}^i = \sum_{j, i \neq j} F_{ij} + F_{\text{окр}}^i,$$

где F_{ij} – сила взаимодействия между подвижными белками i и j ; $F_{\text{окр}}^i$ – электростатическая сила, действующая на i -й подвижный белок за счет электростатического поля неподвижной модельной сцены, создаваемого зарядами мембраны, цитохромов f и ионами раствора. Для расчета этой силы необходимо было определить величину электрического потенциала, для чего использовали уравнение Пуассона–Больцмана [28], описывающее электрическое поле вокруг неподвижных зарядов с учетом свободных ионов. В основе уравнения Пуассона–Больцмана лежит уравнение Пуассона, которое следует из теоремы Остроградского–Гаусса: поток вектора напряженности электрического поля через любую произвольно выбранную замкнутую поверхность пропорционален заключенному внутри этой поверхности заряду: $\text{div} \vec{E} = \frac{\rho}{\epsilon_0}$ (уравнение Пуассона для вакуума).

В нашем случае

объемная плотность зарядов ρ складывается из плотности зарядов белков, ионов в растворе и зарядов на поверхности мембраны. Уравнение Пуассона в среде с диэлектрической проницаемостью ϵ выглядит следующим образом:

$$\text{div}(\epsilon \vec{E}) = \frac{\rho}{\epsilon_0}. \quad (1)$$

Уравнение (1) позволяет вычислить значение потенциала электростатического поля в каждой точке. Поскольку напряженность электростатического поля \vec{E} есть градиент потенциала, взятый с обратным знаком:

$$\vec{E} = -\text{grad} \phi,$$

то уравнение (1) принимает вид:

$$\nabla(\epsilon(\vec{r}) \nabla \phi(\vec{r})) = -\frac{1}{\epsilon_0} \rho(\vec{r}),$$

где ϵ_0 – диэлектрическая постоянная, $\rho(\vec{r})$, $\epsilon(\vec{r})$ и $\phi(\vec{r})$ – локальные значения объемной плотности зарядов, диэлектрической проницаемости среды и электростатического потенциала. В модели диэлектрическая проницаемость принималась равной: внутри белков и мембран $\epsilon = 2$, в растворе $\epsilon = 80$. Для неподвижной модельной сцены плотность зарядов $\rho(\vec{r})$ складывается из плотности зарядов мембраны и белков (цитохромов f), а также свободных ионов в растворе:

$$\rho = \rho_{\text{ion}} + \rho_{\text{prot}} + \rho_{\text{memb}}.$$

Объемная плотность ионов рассчитывается по формуле:

$$\rho_{\text{ion}}(\vec{r}) = \sum c_i z_i e_0,$$

где z_i – зарядовое число; e_0 – заряд электрона; c_i – локальные концентрации ионов.

Свободные ионы в растворе распределены равномерно, однако непосредственно вблизи поверхностей белков и мембран с неподвижными зарядами они попадают в их электростатическое поле и распределяются неоднородно. В предположении, что свободные ионы не взаимодействуют между собой, их распределение в электростатическом поле неподвижных зарядов с потенциалом $\phi(\vec{r})$ подчиняется закону Больцмана:

$$c_i = c_i^{\text{bulk}} \exp(-W_i/kT),$$

где c_i^{bulk} – объемная концентрация ионов; $W_i = z_i e_0 \Phi(\vec{r})$ – работа по перемещению иона из объема в окрестность точки $\vec{r} \cong (x, y, z)$. Таким образом,

$$\rho_{\text{ions}}(\vec{r}) = \sum_i c_i z_i e_0 = \sum_i c_i^{\text{bulk}} e_0 z_i \exp[-z_i e_0 \Phi(\vec{r}) / kT].$$

При малых значениях потенциала $z_i e_0 \Phi / kT < 1$ это выражение можно разложить в ряд по малым степеням:

$$\begin{aligned} \rho_{\text{ions}}(\vec{r}) &= \sum_i c_i^{\text{bulk}} z_i e_0 \exp[-z_i e_0 \Phi(\vec{r}) / kT] \approx \\ &\approx - \sum_i c_i^{\text{bulk}} z_i^2 e_0^2 \frac{\Phi(\vec{r})}{kT} = - 2I e_0^2 \frac{\Phi(\vec{r})}{kT}, \end{aligned}$$

где $I = \frac{1}{2} \sum_i c_i^{\text{bulk}} z_i^2$ – ионная сила, $1/\text{M}^3$.

Полученное уравнение Пуассона–Больцмана

$$\nabla(\epsilon(\vec{r}) \nabla \Phi(\vec{r})) = - \frac{1}{\epsilon_0} (- 2I e_0^2 \frac{\Phi(\vec{r})}{kT} + \rho_{\text{prot}} + \rho_{\text{memb}})$$

решается методом итераций. Для этого вся область моделирования разбивается на кубические ячейки размером $2 \times 2 \times 2 \text{ \AA}$. Значение потенциала в каждой такой ячейке вычисляется по итерационной формуле [29], для чего используются значения потенциала на предыдущем шаге в соседних шести ячейках:

$$\Phi_{i,j,k}^n = \frac{\sum_{m=1}^6 \frac{(\epsilon_m + \epsilon_{i,j,k})}{2} \Phi_m^{n-1} + \frac{1}{\epsilon_0 h} (q_{i,j,k}^{\text{prot+memb}})}{\sum_{m=1}^6 \frac{(\epsilon_m + \epsilon_{i,j,k})}{2} + \kappa h^2} \quad (2)$$

где $\kappa = \frac{2I e_0^2}{\epsilon_0 kT}$; h – шаг сетки; $\Phi_{i,j,k}^n$ – значение

потенциала на n -м шаге в точках i, j, k , суммирование идет по шести соседним ячейкам; ϵ_m и Φ_m^{n-1} – диэлектрическая проницаемость и значение потенциала на предыдущем ($n - 1$) шаге в одной из соседних с i, j, k ячеек; $q_{i,j,k}^{\text{prot+memb}}$ – суммарный заряд попавших в ячейку i, j, k зарядов белков и мембран.

Для задания граничных условий значения потенциала принимаются равными нулю на некотором удалении от внешней поверхности мембраны ($> 50 \text{ \AA}$), так как из-за экранирования

молекулами воды значение потенциала электрического поля близко к нулю. Как видно из формулы (2) для расчета потенциала, кроме граничных условий необходимо знать величины зарядов (q^{memb} , q^{prot}), ионную силу и диэлектрическую проницаемость в каждой ячейке. Величина заряда в ячейке рассчитывается суммированием всех зарядов (от белков и мембран), попавших в эту ячейку. Уравнение Пуассона–Больцмана для подвижных белков решается аналогично. Граничные условия выбираются нулевыми на расстоянии $\sim 50 \text{ \AA}$ от поверхности белка.

МОДЕЛИРОВАНИЕ ДВИЖЕНИЯ И ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСОВ МОЛЕКУЛ

В модели молекулы белков-переносчиков (молекулы пластоцианина) рассматриваются как броуновские частицы, совершающие поступательное и вращательное движения в вязкой среде под действием случайной и внешней электростатической сил. Уравнения движения таких частиц имеют вид:

$$\xi_{\text{п}}^x \frac{dx}{dt} = f_x(t) + F_x, \quad \xi_{\text{вп}}^x \frac{d\alpha}{dt} = m_x(t) + M_x,$$

где x – координата, вдоль которой рассматривается движение; $\xi_{\text{п}}^x$ – коэффициент вязкого трения вдоль этой координаты; $f_x(t)$ и F_x – проекции случайной и электростатической сил на ось x соответственно. Электростатическая сила рассчитывается как

$$\vec{F}_x = - \sum_i q_i \frac{\partial \Phi(\vec{r}_i)}{\partial x},$$

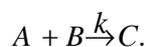
где q_i – i -й заряд подвижного белка. Случайная сила $f_x(t)$ распределена нормально с нулевым средним и дисперсией, равной

$$\frac{2kT \xi_{\text{п}}^x}{\Delta t},$$

здесь k – постоянная Больцмана; T – температура. $\xi_{\text{вп}}^x$ – коэффициент вязкого трения для вращательного движения вокруг оси x ; $m_x(t)$ и M_x – моменты случайной и электростатической сил относительно оси x соответственно. Для расчетов коэффициентов трения в уравнении Ланжевена подвижные объекты рассматривались в виде эллипсоидов вращения. Уравнение Ланжевена решается численно в собственной ортогональной системе координат, совмещенной с осями эллипсоида: на каждом шаге для

каждой подвижной частицы в модели вычисляются смещения эллипсоида вдоль его осей и повороты вокруг его осей под действием броуновской силы. Для моделирования столкновений объектов их форму аппроксимировали набором сфер [10]. Образование комплексов белков (докинг) моделировали следующим образом: при приближении белка-переносчика к сайту связывания с трансмембранным комплексом на расстояние, меньшее или равное расстоянию докинга, в модели с некоторой вероятностью происходило образование комплекса. Под расстоянием докинга понимается расстояние между определенными аминокислотными остатками молекул, участвующих в образовании комплекса. Расстояние докинга и вероятность образования комплекса являются параметрами модели.

На каждом шаге в модели подсчитывается число образуемых комплексов, и строится кривая зависимости числа образованных комплексов от времени. Как правило, экспериментальные кинетические кривые принято интерпретировать в рамках определенных кинетических моделей (схемами первого или второго порядка) и характеризовать их набором кинетических параметров (констант скоростей). Поэтому каждую временную кривую, вычисляемую в прямой модели, мы рассчитывали исходя из схемы простой бимолекулярной реакции и характеризовали константой скорости:



Для идеального раствора скорость бимолекулярной реакции пропорциональна концентрации участвующих в реакции частиц (закон действующих масс). Таким образом, если начальное количество белков обоих типов одинаково и равно N_0 , соответствующее кинетическое уравнение, описывающее скорость образования комплексов, имеет вид:

$$\frac{dC}{dt} = k(N_0 - C)^2,$$

где C – количество образованных комплексов, k – константа скорости реакции. Интегрируя это уравнение, получим зависимость:

$$C(t) = N_0 - \frac{N_0}{N_0 kt + 1}. \quad (3)$$

Аппроксимируя по этой формуле полученную зависимость количества образованных комплексов от времени, можно вычислить константу скорости реакции связывания белков, в предположении о бимолекулярном характере реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 2 представлены рассчитанные с помощью уравнения Пуассона–Больцмана электростатические потенциалы для пластоцианина и цитохрома f в растворе. Для визуализации потенциалов, создаваемых заряженными аминокислотными остатками отдельных белков, мы использовали построенную по алгоритму Коннолли [30] поверхность молекулы белка. В каждой точке этой поверхности оттенками серого цвета отображено значение электрического потенциала.

На модельной сцене молекулы цитохрома f случайным образом распределяются и фиксируются вдоль мембраны, а их конкретная ориентация и положение относительно мембраны выбирается в соответствии с данными о расположении этой субъединицы в цитохромном b_6/f -комплексе [31].

На рис. 3–5 показана люминальная область размерами $400 \times 400 \times 100 \text{ \AA}$, ограниченная с двух сторон двумя мембранами, толщиной 50 \AA каждая. Цитохромы f изображены черным цветом. Изображены также рассчитанные по уравнению Пуассона–Больцмана эквипотенциальные поверхности электростатического потенциала в люминальном пространстве тилакоида для стромального участка тилакоидной мембраны и четырех молекул цитохрома f . Темно-серые области – отрицательные эквипотенциальные поверхности ($-6,5 \text{ мВ}$), светло-серые – положительные эквипотенциальные поверхности ($+6,5 \text{ мВ}$). Мембрана создает отрицательное электрическое поле, напряженность которого максимальна у поверхности мембран и убывает к центру люмена.

В работе [10] с помощью эксперимента на многочастичной компьютерной модели были рассчитаны временные кривые связывания пластоцианина с цитохромом f в растворе, для которых были подобраны следующие параметры: расстояние докинга и вероятность образования комплекса пластоцианина с цитохромом f . В данной работе мы исследовали влияние заряда на мембране на диффузию и образование комплексов пластоцианина с цитохромом f в люмене тилакоида. Используя полученные в работе [10] параметры, мы рассчитали кинетические кривые связывания пластоцианина и цитохрома f при различных значениях величины заряда на мембране и различных значениях ионной силы. На рис. 6 приведена типичная временная кривая, которая хорошо аппроксимируется гиперболической зависимостью (3).

На скорость реакции образования комплексов пластоцианина и цитохрома f могут оказывать влияние различные факторы, в числе

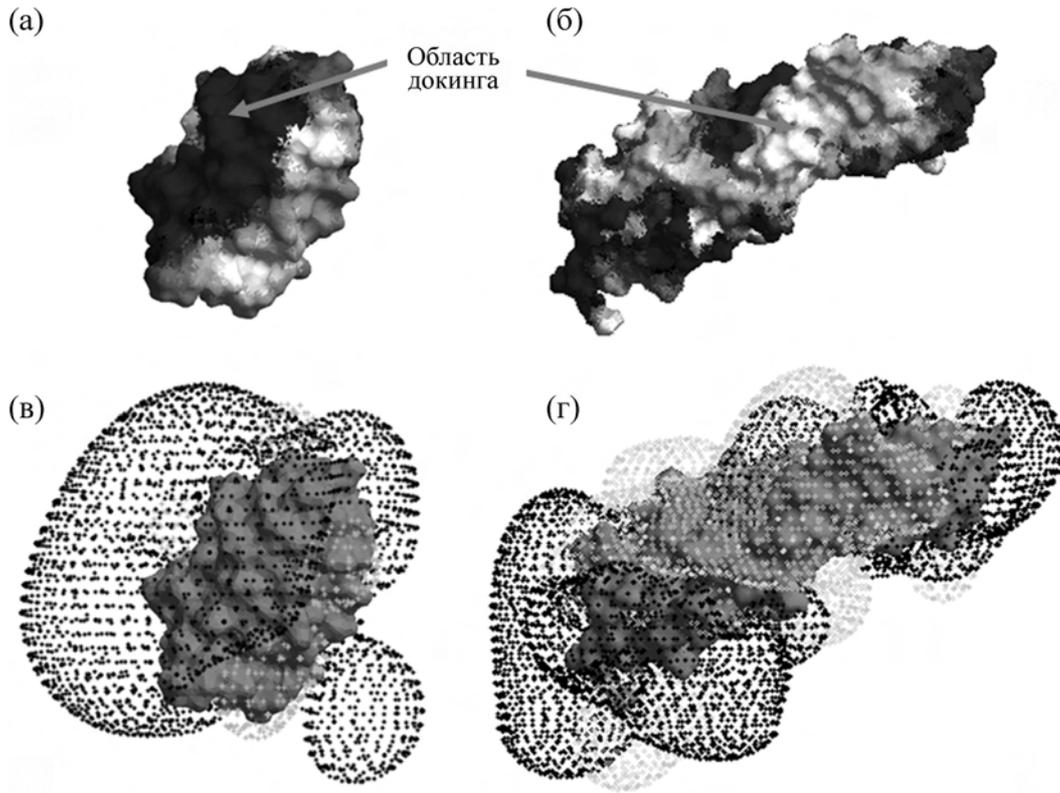


Рис. 2. Молекулы пластоцианина (а) и цитохрома *f* (б). Светло-серым цветом отображены положительные значения потенциала на поверхности белка, темно-серым – отрицательные. Стрелками показаны области докинга, на пластоцианине – область отрицательного потенциала, на цитохроме – положительного. Эквипотенциальные поверхности вокруг пластоцианина (в) и цитохрома *f* (г), светло-серым цветом отображены эквипотенциальные поверхности +6,5 мВ, черным –6,5 мВ.

которых ионная сила раствора и поверхностный заряд тилакоидной мембраны. Взаимодействие отрицательных зарядов пластоцианина и положительных зарядов цитохрома *f* способствует их сближению и образованию в итоге активного комплекса, окончательно фиксируемого водородными связями, ван-дер-ваальсовыми и гидрофобными взаимодействиями, в котором уже может осуществляться перенос электрона. Эк-

ранирование этих зарядов на белках ионами раствора при увеличении ионной силы приводит к ослаблению электростатических взаимодействий между пластоцианином и цитохромом *f* и, как следствие, к уменьшению скорости реакции [10,32].

С другой стороны, известно, что в процессе докинга двух белков могут образовываться и непродуктивные промежуточные комплексы, не

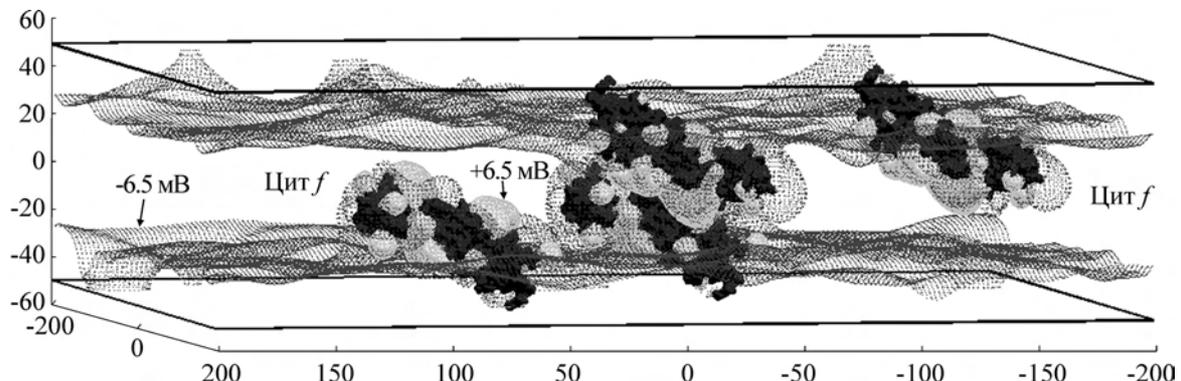


Рис. 3. Эквипотенциальные поверхности (+6,5 мВ и –6,5 мВ) тилакоидной мембраны и цитохромов *f*, pH 7,0, $I = 100$ мМ, $\sigma = -46,7$ мКл/м².

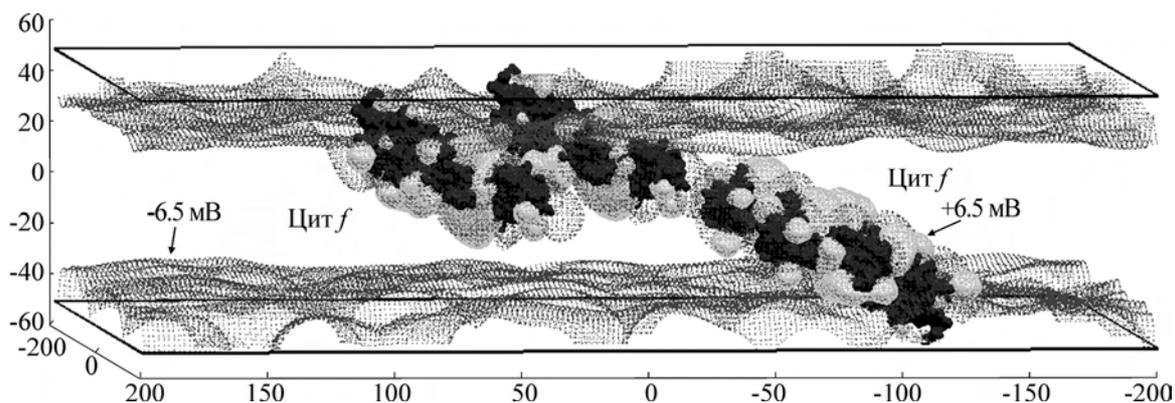


Рис. 4. Эквипотенциальные поверхности (+6,5 мВ и -6,5 мВ) тилакоидной мембраны и цитохромов *f*, рН 7,0, $I = 150$ мМ, $\sigma = -46,7$ мКл/м². Плоскости представляют собой люминальные границы тилакоидных мембран.

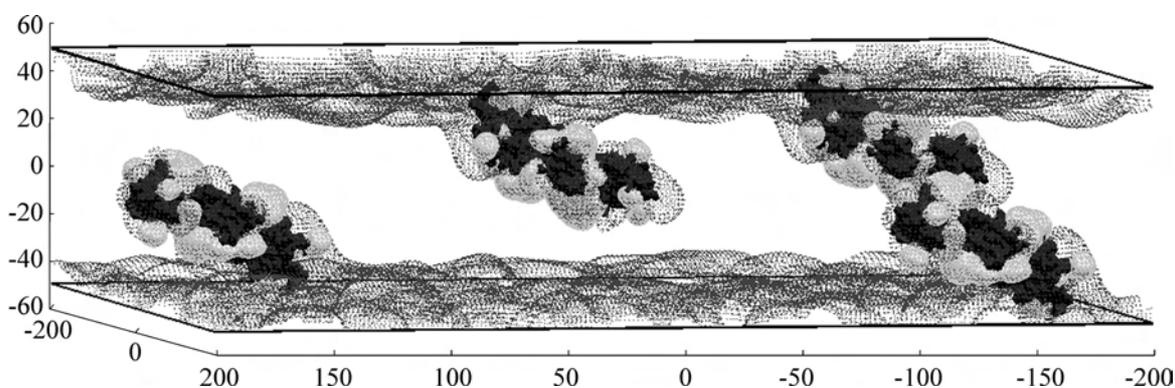


Рис. 5. Эквипотенциальные поверхности (+6,5 мВ и -6,5 мВ) тилакоидной мембраны и цитохромов *f*, рН 7,0, $I = 100$ мМ, $\sigma = -18,6$ мКл/м².

удовлетворяющие условиям докинга [33,34]. За счет броуновской диффузии эти непродуктивные комплексы разрушаются, и затем могут преобразовываться в активный финальный комплекс. Сформированные случайно непродуктивные комплексы, не удовлетворяющие условиям докинга, фиксируются относительно сильными электростатическими взаимодействиями между пластоцианином и цитохромом *f* при значениях ионной силы, близких к нулю. Этот феномен приводит к уменьшению константы скорости реакции за счет увеличения доли непродуктивных комплексов. Действительно, простые оценки показывают, что в случае нулевой ионной силы энергия электростатических взаимодействий двух белков сравнима с энергией теплового движения, тогда как уже при ионной силе 100 мМ энергия электростатических взаимодействий на порядок меньше энергии теплового движения и непродуктивные комплексы быстро разрушаются.

Другим фактором, влияющим на снижение скорости реакции образования комплексов пластоцианина с цитохромом *f* является поверхно-

стный заряд мембраны, создающий отрицательное электростатическое поле вблизи ее поверхности, препятствующее отрицательно заряжен-

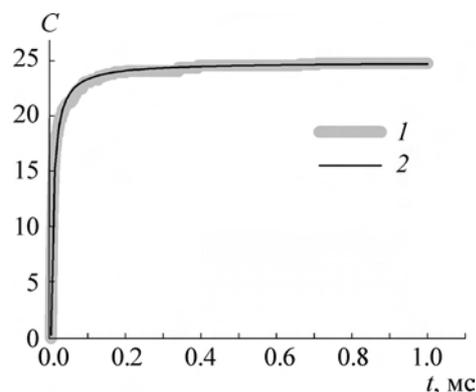


Рис. 6. Полученные в компьютерном эксперименте временная кривая связывания цитохрома *f* и пластоцианина (1) и аппроксимационная кривая (2), соответствующая формуле (3). Плотность заряда на мембране $-23,3$ мКл/м², размер области моделирования $100 \times 100 \times 10$ нм, рН 7,0, $I = 100$ мМ, количество белков по 25 каждого типа. Константа скорости реакции $k \approx 3,7 \cdot 10^8$ М⁻¹·с⁻¹.

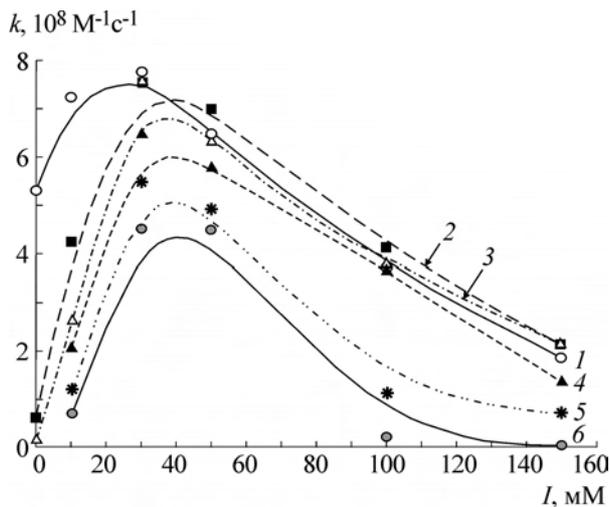


Рис. 7. Зависимости константы скорости реакции связывания цитохрома f и пластоцианина от величины ионной силы для различных значений плотности заряда на мембране σ , мКл/м²: 0 (1); -18,6 (2); -28 (3); -32,7 (4); -37,3 (5); -42 (6). Размер области моделирования $100 \times 100 \times 10$ нм, рН 7,0, количество белков по 25 каждого типа.

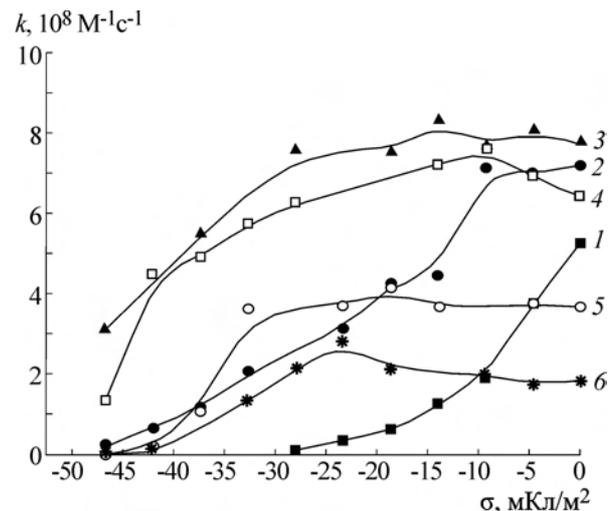


Рис. 8. Зависимости константы скорости реакции связывания цитохрома f и пластоцианина от величины плотности заряда на мембране для различных значений величины ионной силы I : 1 - 0; 2 - 10; 3 - 30; 4 - 50; 5 - 100; 6 - 150 мМ. Размер области моделирования $100 \times 100 \times 10$ нм, рН 7,0, количество белков по 25 каждого типа.

ному пластоцианину приблизиться к связанному с мембраной цитохрому f .

Рассмотрим характер влияния ионной силы раствора и поверхностного заряда тилакоидной мембраны на константу скорости реакции (рис. 7 и 8). На рис. 7 представлена вычисленная на модели зависимость константы скорости реакции образования комплекса пластоцианина с цитохромом f от ионной силы I при различных значениях поверхностной плотности заряда σ на мембране. Из семейства кривых, приведенных на рис. 7, видно, что скорость реакции зависит от ионной силы немонокотонным образом: с увеличением I от 0 до 20–40 мМ константа скорости увеличивается, достигает максимальных значений при $I = 20$ –40 мМ и уменьшается при дальнейшем увеличении ионной силы.

В модели при значениях ионной силы от 0 до 20 мМ перестройке непродуктивного комплекса в активный препятствует сильное электростатическое притяжение между неправильно сблизившимися белками, так как броуновская сила оказывается недостаточной, чтобы разрушить этот уже сформировавшийся непродуктивный комплекс, не удовлетворяющий условиям докинга. При значениях ионной силы выше 20–30 мМ константа скорости реакции образования комплекса пластоцианина с цитохромом f уменьшается уже из-за экранирования электрических зарядов на взаимодействующих белках ионами раствора.

Исследовали также влияние поверхностной плотности заряда на мембране на реакцию образования комплекса пластоцианина с цитохромом f . В каждом эксперименте количество белков, размер области моделирования, в том числе размер люмена, оставались неизменными, плотность заряда σ на мембране менялась от 0 (полностью незаряженная мембрана) до -46,7 мКл/м². Значение $\sigma = -46,7$ мКл/м² соответствует заряженной мембране, в которой вся площадь мембраны приходится на липиды (17% площади приходится на заряженные липиды). Меньшие значения поверхностной плотности заряда выбирали с учетом того, что больше половины площади тилакоидной мембраны (51–76%) приходится на трансмембранные белки [35], кроме того, часть отрицательного заряда на мембране скомпенсирована положительными ионами. Все эти особенности учитываются в модели изменением эффективной поверхностной плотности мембранного заряда σ .

На рис. 8 представлена зависимость константы скорости реакции от плотности поверхностного заряда при различных значениях ионной силы (0, 10, 30, 50, 100, 150 мМ). Видно, что характер влияния поверхностной плотности заряда мембраны на образование комплекса определяется ионной силой. При малых значениях ионной силы ($I = 0, 10$ мМ, рис. 8, кривые 1 и 2) заряды мембраны слабо экранированы, они мешают пластоцианину приблизиться к цитохрому f , закрепленному на поверхности мем-

браны, поэтому скорость реакции, начиная с малых значений σ , уменьшается с ростом этого параметра. С увеличением ионной силы влияние электростатического потенциала, создаваемого зарядами мембраны, уменьшается из-за экранирования зарядов ионами раствора. Падение константы с ростом σ при больших значениях $I = 30, 50$ мМ (кривые 3 и 4 на рис. 8) начинается лишь при $\sigma < 15$ мКл/м². При физиологических значениях ионной силы ($I = 100\text{--}150$ мМ, кривые 5 и 6 на рис. 8) поверхностная плотность заряда мембраны уже практически не оказывает влияния на скорость реакции образования комплекса пластоцианина и цитохрома f при $-30 < \sigma < 0$ мКл/м² из-за экранирования зарядов мембраны большим количеством заряженных ионов в этих условиях. Лишь при $\sigma < -30$ мКл/м² константа начинает уменьшаться, так как сильное отрицательное поле мембраны в этом случае препятствует приближению отрицательно заряженного пластоцианина к сайту связывания с цитохромом f .

В обзоре [18] приведены экспериментальные данные о заряде на поверхности мембраны тилакоида, в том числе на ее люминальной поверхности. Из приведенных данных следует, что значения поверхностной плотности заряда различаются в гранальных областях, где в основном расположены комплексы фотосистемы II, и стромальных областях мембраны, где преобладают комплексы фотосистемы I. В стромальных областях поверхностная плотность заряда составляет от $-8,4$ до $-10,8$ мКл/м². В гранальных областях поверхностная плотность заряда больше и составляет от -20 до -74 мКл/м². Из результатов моделирования следует, что в стромальных участках мембраны поверхностный заряд не влияет на скорость образования комплекса пластоцианина и цитохрома f . Однако в гранальных участках мембраны, где плотность заряда выше, может наблюдаться ингибирование реакции образования этого комплекса, так как отрицательно заряженная мембрана может препятствовать связыванию отрицательно заряженного пластоцианина с цитохромом f .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашей работы позволяют установить связь между значением плотности заряда на фотосинтетической мембране, ионной силой и скоростью образования комплекса пластоцианин–цитохром f в люмене тилакоида.

При нулевой ионной силе наблюдается ингибирование реакции связывания пластоцианина и цитохрома f , создаваемое двумя факторами: электрическим полем мембраны, препятст-

вующим подходу отрицательно заряженного пластоцианина к сайту связывания с цитохромом f , и сильными электростатическими взаимодействиями между белками, благодаря которым пластоцианин проводит больше времени в непродуктивных ориентациях, в которых не происходит окончательного связывания с цитохромом f . С другой стороны, модельный эксперимент показал, что при физиологических значениях ионной силы поле мембраны в стромальных областях практически не влияет на скорость образования комплекса цитохром f – пластоцианин. Однако в гранальных областях с большими значениями поверхностной плотности заряда может наблюдаться ингибирование реакции образования этого комплекса. Таким образом, среди существующих различных механизмов регуляции интенсивности фотосинтетического электронного транспорта, таких как фактор сужения люминального пространства [13], регуляторную роль также может играть отрицательный поверхностный заряд на мембране.

Авторы благодарны П.А. Громову и Д.М. Устинину за помощь в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 08-04-00354 и ФЦП № П2219.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P.-A. Albertsson, *TRENDS in Plant Science* **6** (8), 349 (2001).
2. А. Т. Мокроносов и В. Ф. Гавриленко, *Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты* (Изд-во МГУ, М., 1992).
3. А. В. Hope, *Biochim. Biophys. Acta* **1143**, 1 (1993).
4. E. L. Gross, in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Ed. by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (Kluwer Academic Publishers, 1996), pp. 413–429.
5. M. Mehta, V. Sarafis, and C. Critchley, *Aust. J. Plant Physiol.* **26**, 709 (1999).
6. А. В. Hope, *Biochim. Biophys. Acta* **1456**, 5 (2000).
7. W. Haehnel, A. Propper, and H. Krause, *Biochim. Biophys. Acta* **593**, 384 (1980).
8. C. Kleanthous, *Protein-protein recognition* (Oxford University Press, New York, 2000).
9. R. Malkin and K. Niyogi, in *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Ed. by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones (Kluwer Academic Publishers, 2000), pp. 413–429.
10. I. В. Kovalenko, А. М. Abaturova, Р. А. Gromov, et al., *Phys. Biol.* **3**, 121 (2006).
11. И. Б. Коваленко, Д. М. Устинин, Н. Е. Грачев и др., *Биофизика* **48** (4), 656 (2003).
12. И. Б. Коваленко, А. М. Абатурова, Д. М. Устинин и др., *Биофизика* **52** (3), 492 (2007).

13. И. Б. Коваленко, А. М. Абатурова, П. А. Громов и др., *Биофизика* **53** (2), 261 (2008).
14. Г. Ю. Ризниченко, Н. Е. Беляева, И. Б. Коваленко и А. Б. Рубин, *Биофизика* **54** (1), 16 (2009).
15. J. Joyard and R. Dource, in *Biochemistry of Plant Lipids: Structure and Function* (Academic Press, New York, 1987), pp. 215–274.
16. P. A. Siegenthaler, A. Rawlyer, and C. Giroud, *Biochemistry of Plant Lipids: Structure and Function*, Ed. by S. P.K., M. D., N. D. (Academic Press, New York, 1987), V. 161–168.
17. P. A. Siegenthaler, in *Lipids in Photosynthesis: Structure Function and Genetics*, Ed. by P. A. Siegenthaler, N. Murata (Kluwer Academic Publishers, New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2004), pp. 119–144.
18. J. Barber, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **33**, 261 (1982).
19. D. J. Murphy and I. E. Woodrow, *Biochim. Biophys. Acta* **725**, 104 (1983).
20. H. E. Akerlund, B. Andersson, A. Persson, and A. Albertsson, *Biochim. Biophys. Acta* **552**, 238 (1979).
21. C. Dahlin, *Photosynthetica* **41** (4), 635 (2003).
22. G. M. Ullmann, E.-W. Knapp, and N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 42 (1997).
23. D. C. Pearson, Jr. and E. L. Gross, *Biophys. J.* **75**, 2698 (1998).
24. F. Rienzo, R. Gabdoulline, M. Menziani, et al., *Biophys. J.* **81**, 3090 (2001).
25. E. L. Gross and D. C. Pearson Jr., *Biophys. J.* **85**, 2055 (2003).
26. E. J. Haddadian and E. L. Gross, *Biophys. J.* **91**, 2589 (2006).
27. S. R. Durell, J. K. Labanowski, and E. L. Gross, *Arch. Biochem. Biophys.* **277**, 241 (1990).
28. Б. В. Дерягин, Н. В. Чураев и В. М. Муллер, *Поверхностные силы* (Наука, М., 1985).
29. G. M. Ullmann, *Macromolecular Electrostatics* (University Heidelberg, 2004).
30. M. L. Connolly, *J. App. Crystallography* **16**, 548 (1983).
31. G. Kurisu, H. Zhang, J. L. Smith, and W. A. Cramer, *Science* **302**, 1009 (2003).
32. A. Kaant, S. Young, and D. S. Bendall, *Biochim. Biophys. Acta* **1277**, 115 (1996).
33. M. Ubbink, M. Ejdebeck, B. G. Karlsson, and D. S. Bendall, *Structure* **6**, 323 (1998).
34. A. Diaz-Quintana, J. A. Navarro, M. Hervas, et al., *Photosynth. Res.* **75**, 97 (2003).
35. H. Kirchhoff, U. Mukherjee, and H.-J. Galla, *Biochemistry* **41**, 4872 (2002).

Multiparticle Computer Simulation of Diffusion and Interaction of Plastocyanin with Cytochrome *f* in the Electrostatic Field of the Thylakoid Membrane

O.S. Knyazeva*, I.B. Kovalenko, A.M. Abaturova**, G.Yu. Riznichenko**, E.A. Grachev*, and A.B. Rubin****

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

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

A multiparticle computer model of plastocyanin-cytochrome *f* complex formation in the thylakoid lumen has been designed, which takes electrostatic interactions of proteins and the thylakoid membrane into account. The Poisson–Boltzmann formalism was used to determine the electrostatic potential field generated by the electrical charges of the proteins and the thylakoid membrane for different ionic strength values. The role of electrostatic field of the thylakoid membrane in plastocyanin–cytochrome *f* complex formation was determined. Using the model, the rate constant of plastocyanin–cytochrome *f* reaction for different values of ionic strength and membrane surface charge were calculated.

Key words: plastocyanin, cytochrome f, photosynthetic membrane, lipids, electron transport, multiparticle computer model, electrostatic interactions, electrostatic potential