

УДК 577.355.3

## ОКИСЛЕНИЕ ПЛАСТОХИНОЛА – ЛИМИТИРУЮЩАЯ СТАДИЯ В ЦЕПИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ В ХЛОРОПЛАСТАХ

© 2022 Л.Ю. Устынюк<sup>1</sup>, А.Н. Тихонов<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет,  
119991 Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет,  
119991 Москва, Россия; электронная почта: an\_tikhonov@mail.ru

Поступила в редакцию 22.06.2022

После доработки 04.08.2022

Принята к публикации 25.08.2022

Работа посвящена анализу функционирования цитохромного  $b_6f$ -комплекса (пластохинол:пластоцианин оксидоредуктаза), входящего в цепь переноса электронов фотосинтезирующих систем оксигенного типа. Кратко рассмотрены строение цепи электронного транспорта (ЦЭТ) хлоропластов и механизмы функционирования цитохромного комплекса  $b_6f$ , расположенного в ЦЭТ между фотосистемами 2 и 1 (ФС2 и ФС1). Цитохромный  $b_6f$ -комплекс окисляет молекулы пластохинола (PQH<sub>2</sub>), образующиеся в ФС2, и восстанавливает пластоцианин – донор электрона для ФС1. Окисление PQH<sub>2</sub> – стадия, лимитирующая перенос электронов между ФС2 и ФС1. Проанализированы процессы двухэлектронного (бифуркационного) окисления PQH<sub>2</sub> в каталитическом центре Q<sub>o</sub> комплекса  $b_6f$ . Методом функционала плотности исследованы две стадии окисления PQH<sub>2</sub> в системе, моделирующей центр Q<sub>o</sub>. Результаты квантово-химических расчётов согласуются с тем, что первая стадия окисления PQH<sub>2</sub> – перенос электрона к Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-кластеру белка Риске – это эндергонический (энерго-акцепторный) процесс ( $\Delta E \sim 15$  кДж·моль<sup>-1</sup>), который может лимитировать скорость функционирования цитохромного комплекса. Вторая стадия окисления хинола – перенос электрона от молекулы семихинона (PQH<sup>•</sup>), образующейся после первой стадии окисления PQH<sub>2</sub>, к низкопотенциальному гемму  $b_6^L$  – представляет собой экзоэргический (энерго-донорный) процесс ( $\Delta E < 0$ ). Результаты расчётов показывают, что окисление семихинона стимулируется в результате его смещения в сторону гема  $b_6^L$  (акцептор электрона) и приближения к карбоксильной группе Glu78, служащей акцептором протона. Полученные данные обсуждаются в рамках модели Q-цикла Митчелла, описывающей окисление пластохинола в цитохромном  $b_6f$ -комплексе.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фотосинтез, цитохромный комплекс, окисление пластохинола, моделирование.

DOI: 10.31857/S0320972522100049, EDN: BBTSHP

### ВВЕДЕНИЕ

В фотосинтетических системах оксигенного типа (хлоропласты высших растений, цианобактерии, водоросли) имеются две фотосистемы, которые за счёт энергии света осуществляют перенос электронов от воды, разлагаемой в фотосистеме 2 (ФС2), к NADP<sup>+</sup> – физиологическому акцептору электронов фотосистемы 1 (ФС1) [1–5]. Фотосинтетический транспорт электронов сопряжён с образованием трансмембранной разности электрохи-

мических потенциалов ионов водорода,  $\Delta\mu_{H^+}$ , являющейся источником энергии для АТФ-синтазных комплексов, катализирующих образование АТФ из АДФ и P<sub>i</sub> [6–9]. Баланс между АТФ и NADPH (АТФ/NADPH = 3/2), необходимый для работы цикла Кальвина–Бенсона (ЦКБ), достигается за счёт регуляторных механизмов, таких как активация или ослабление активностей ФС1 и ФС2, перераспределение электронных потоков (нециклический и циклический пути переноса), рН-зависимая регуляция электронного транспорта [10–14].

Принятые сокращения: ФС1 и ФС2 – фотосистемы 1 и 2;  $b_6^L$  и  $b_6^H$  – низко- и высокопотенциальный геммы цитохрома  $b_6$ ; Cyt – цитохром; Fd – ферредоксин; FNR – ферредоксин-NADP-редуктаза; ISP – железосерный белок, называемый белком Риске; Pс – пластоцианин; PQ – пластохинон; PQH<sub>2</sub> – пластохинол; Q<sub>o</sub> и Q<sub>i</sub> – каталитические центры цитохромного комплекса; ТМВQН<sub>2</sub> – 2,3,5-три-метил-бензохинол, аналог пластохинола.

\* Адресат для корреспонденции.

Перенос электронов от ФС2 к ФС1 обеспечивается за счёт цитохромного комплекса  $b_6f$  и мобильных переносчиков электрона – пластохинона (PQ) и пластоцианина (Pc) [1–5]. Два электрона, «извлекаемых» из молекулы воды за счёт работы водоокисляющего комплекса ФС2, переносятся на молекулу PQ, которая протонируется за счёт ионов водорода, поступающих из стромы ( $PQ + 2e^- + 2H_{out}^+ \rightarrow PQH_2$ ). Молекула пластохинола ( $PQH_2$ ) окисляется цитохромным комплексом  $b_6f$ , от которого электрон переносится к Pc (через гем  $f$ ) и далее к окисленному реакционному центру ФС1 ( $P_{700}^+$ ). Два электрона от ФС1 последовательно поступают к ферредоксин-NADP-редуктазе (FNR) через ферредоксин (Fd) и восстанавливают  $NADP^+$  до NADPH. Перенос электронов через  $b_6f$ -комплекс сопряжён с транслокацией протонов через тилакоидную мембрану. Ионы водорода, поступающие из стромы к пластохинону, при окислении  $PQH_2$  комплексом  $b_6f$  выделяются в люмен (внутритилакоидное пространство).

Особенностью тилакоидных мембран хлоропластов является их латеральная гетерогенность [15]. Большая часть комплексов ФС2 находится в тесно примыкающих друг к другу тилакоидах гран. ФС1 и АТР-синтазные комплексы локализованы в межгранных тилакоидах и на тех участках мембран (торцы гран и внешние тилакоиды), которые ориентированы в строму. Комплексы  $b_6f$  распределены равномерно вдоль мембран тилакоидов гран и межгранных тилакоидов. Вследствие латеральной подвижности молекул  $PQH_2$  и Pc гранальные комплексы  $b_6f$  могут обеспечивать латеральный транспорт электронов на сравнительно большие расстояния вдоль тилакоидов:  $ФС2 \rightarrow PQ \rightarrow b_6f \rightarrow Pc \rightarrow ФС1$ . Диффузия Pc внутри люмена (внутритилакоидное пространство) происходит намного быстрее ( $\leq 20\text{--}200$  мкс [1, 16]), чем окисление  $PQH_2$  цитохромным комплексом ( $\geq 5\text{--}20$  мс [4, 5]). Цитохромные  $b_6f$ -комплексы, находящиеся в межгранных тилакоидах, могут участвовать в циклическом переносе электронов вокруг ФС1 [17, 18]. Замедление диффузии  $PQH_2$  в тилакоидной мембране, плотно заполненной белками, может тормозить перенос электронов между ФС2 и ФС1 [19]. Однако, как показали опыты с изолированными хлоропластами класса Б, лишёнными ферментов ЦКБ, в широком диапазоне физиологических условий (рН, температура) скорость переноса электронов между ФС2 и ФС1 контролируется главным образом процессами, происходящими уже после связывания  $PQH_2$  с каталитическим центром  $b_6f$ -комплекса [4, 20].

Общая скорость переноса электронов от  $PQH_2$  к  $b_6f$ -комплексу определяется: 1) временем диффузии  $PQH_2$  в мембране, 2) временем проникновения  $PQH_2$  внутрь  $b_6f$ -комплекса и его связывания с каталитическим центром цитохромного комплекса  $Q_o$ , 3) скоростью окисления  $PQH_2$  в каталитическом центре  $Q_o$  [4, 20]. Лимитирующей стадией переноса электронов между ФС2 и ФС1 является окисление  $PQH_2$  цитохромным  $b_6f$ -комплексом. Несмотря на то что ФС1, ФС2 и  $b_6f$ -комплексы могут быть расположены в удалённых областях тилакоидной мембраны, значительная часть этих комплексов находится сравнительно близко друг от друга. Локализация  $b_6f$ -комплексов в гранах, обогащённых пигмент-белковыми комплексами ФС2, значительно сокращает путь, который молекулы  $PQH_2$  проходят от ФС2 до ближайших к ним  $b_6f$ -комплексов. В этом случае белковые препятствия, ограничивающие диффузии пластохинона в мембране, не являются критическим фактором, лимитирующим скорость окисления  $PQH_2$ . В большинстве случаев характерные времена диффузии  $PQH_2$  от ФС2 к комплексам  $b_6f$  не превышают  $\Delta\tau \approx 2\text{--}4$  мс [4, 20]. Скорость окисления  $PQH_2$  зависит от внутритилакоидного рН ( $pH_{in}$ ), поскольку процессы электронного переноса сопряжены с выходом протонов в люмен ( $PQH_2 \rightarrow PQ + 2e^- + 2H_{in}^+$ ). Вероятность депротонирования  $PQH_2$  уменьшается при понижении  $pH_{in}$  вследствие усиления «давления» со стороны протонов люмена [20–22].

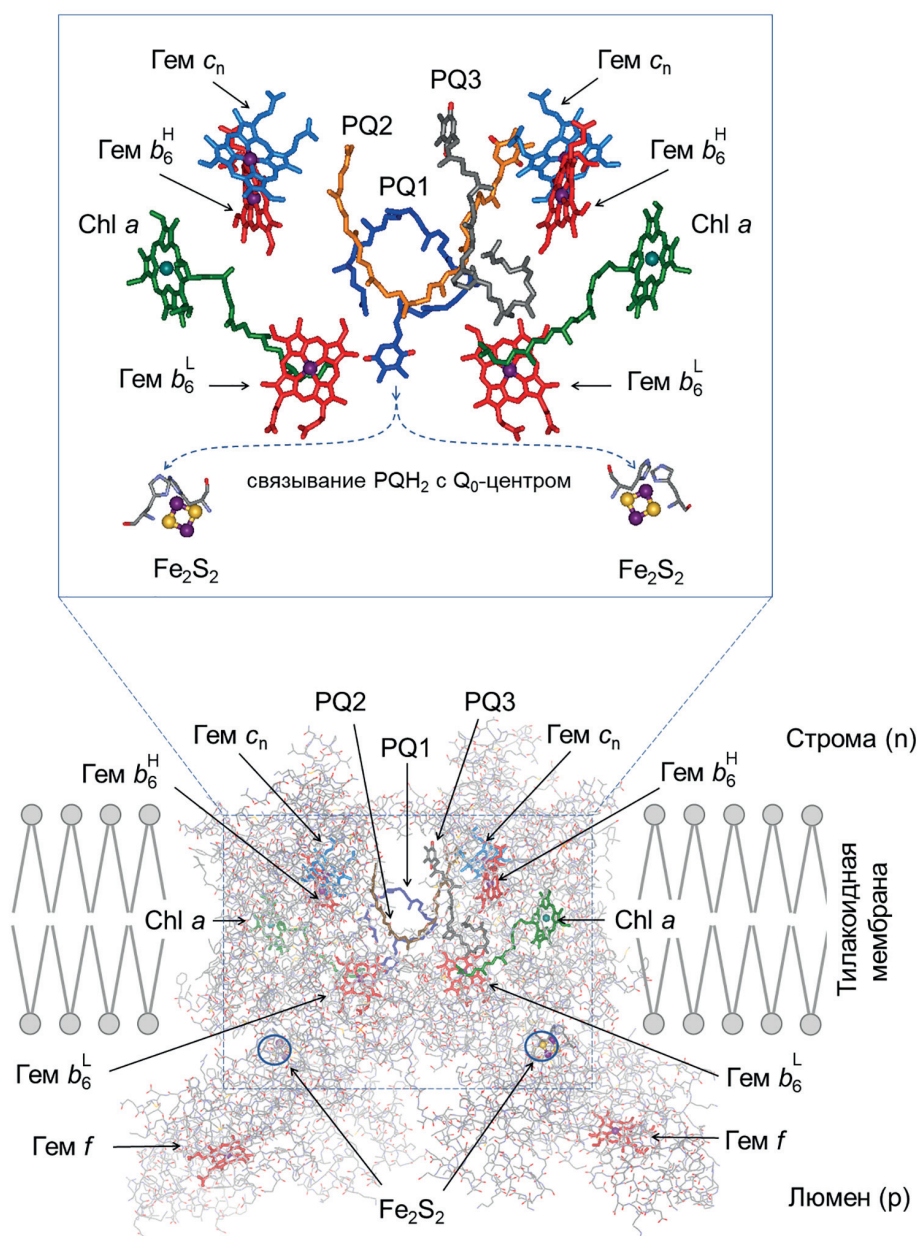
### СТРУКТУРНАЯ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЦИТОХРОМНОГО $b_6f$ -КОМПЛЕКСА

**Пространственное строение  $b_6f$  комплекса.** Цитохромный комплекс  $b_6f$  представляет собой димер, состоящий, как и родственный ему комплекс  $bc_1$ , из двух белковых мономеров [5, 23–32]). Каждый мономер содержит восемь полипептидных субъединиц. Четыре крупные субъединицы – это железосерный белок (ISP, называемый белком Риске), включающий в себя  $Fe_2S_2$ -кластер; цитохром (Cyt)  $b_6$ , который содержит низкопотенциальный и высокопотенциальный гемы ( $b_6^L$  и  $b_6^H$ ); Cyt  $f$  и субъединица IV, с которой связаны два пигмента – хлорофилл (Chl)  $a$  и  $\beta$ -каротин. Гем  $f$  выступает в люмен. На периферии каждого мономера находятся четыре малые субъединицы, представляющие собой  $\alpha$ -спирали.

Каталитические функции  $b_6f$ -комплекса связаны с редокс-превращениями  $PQH_2$  и PQ в

двух центрах,  $Q_o$  и  $Q_i$ . Расположение электронных переносчиков, участвующих в реакциях окисления  $PQH_2$  (центр  $Q_o$ ) и восстановления  $PQ$  (центр  $Q_i$ ), показано на рис. 1, построенном для нативного  $b_6f$ -комплекса шпината по данным криоэлектронной микроскопии (PDB ID: 6RQF [32]). В верхней части этого рисунка показано взаимное расположение кофакторов электронного переноса и двух молекул  $Chl a$ , находящихся внутри димерного комплекса. Димерная структура  $b_6f$ -комплекса обеспечивает формирование крупной внутрибелковой

полости ( $\sim 30 \times 25 \times 15 \text{ \AA}$ ) [26]), через которую молекулы  $PQH_2$  и  $PQ$  проникают к хинон-связывающим центрам. В нативном  $b_6f$ -комплексе шпината были обнаружены три молекулы пластохинона, обозначенные на рис. 1 как  $PQ1$ ,  $PQ2$  и  $PQ3$ . Эти молекулы значительно удалены от каталитических центров  $Q_o$ . Бензольное кольцо молекулы  $PQ1$  примыкает к гему и молекуле  $Chl a$ ;  $PQ2$  находится вблизи от гемов  $b_6^H$  и  $c_n$ , молекула  $PQ3$  расположена между гемами  $b_6^H$  и  $c_n$ , связанными с разными мономерами димерного комплекса  $b_6f$ .



**Рис. 1.** Кофакторы электронного переноса (верхняя панель) и их расположение в нативном димерном цитохромном  $b_6f$ -комплексе шпината (нижняя панель, по данным PDB ID: 6RQF [32]). Стрелками обозначено положение двух  $Fe_2S_2$ -кластеров и гемов цитохрома  $f$ , низкопотенциального и высокопотенциального гемов  $b_6^L$  и  $b_6^H$ , гемов  $c_n$  и молекул хлорофилла  $a$  ( $Chl a$ ). Символами  $PQ1$ ,  $PQ2$  и  $PQ3$  обозначены три молекулы пластохинона, которые удалены от  $Fe_2S_2$ -кластеров. Пунктирные стрелки на верхней панели символизируют, что молекула  $PQ1$  перемещается внутри белкового комплекса, приближаясь к одному из  $Fe_2S_2$ -кластеров



Сайт  $Q_o$ , в котором происходит окисление  $QH_2$ , располагается вблизи от  $Fe_2S_2$ -кластера ISP. Хинон-связывающий портал этого сайта представляет собой полость ( $\sim 11 \times 12 \text{ \AA}$ ), покрытую молекулами липидов [26, 27]. В эту полость проникает липидорастворимая молекула  $QH_2$ , которая связывается с ISP, образуя «субстрат-ферментный» комплекс ( $QH_2$ -ISP).

Второй центр связывания хинона (сайт  $Q_i$ ) расположен вблизи участка цитохромного комплекса, ориентированного в сторону стромы. Этот сайт находится в полости между гемами  $b_6^H$  и  $c_n$  [29–32]. Предполагается, что «нетипичный» гем  $c_n$  может участвовать в циклическом переносе электронов от акцепторного участка ФС1 (через Fd и FNR) к молекуле PQ, находящейся в сайте  $Q_i$  [17, 18].

**Пластохинон внутри портала  $Q_o$ .** В структурах  $b_6f$ -комплекса, полученных методом рентгеноструктурного анализа, отсутствуют нативные молекулы  $QH_2$  и PQ. О возможной локализации  $QH_2$  в каталитическом сайте  $Q_o$  чаще всего судят по положению ингибитора TDS (три-децил-стигмателлин), расположенного в непосредственной близости от  $Fe_2S_2$ -кластера. TDS образует водородную связь с атомом азота  $N_\epsilon$  гистидина (His155 – в *Chlamydomonas reinhardtii* [29], His129 – в *Mastigocladus laminosus* [30] или His128 – в  $b_6f$ -комплексе шпината [32]), являющегося лигандом одного из ионов Fe кластера  $Fe_2S_2$ . Атом  $N_\epsilon$  имидазольного фрагмента депротонированной формы His образует водородную связь с группой –OH молекулы  $QH_2$ . Образование водородной связи между  $N_\epsilon$  и –OH обычно рассматривается как необходимое условие формирования комплекса  $QH_2$ -His. Существование такой связи было показано в цитохромном комплексе  $bc_1$ , родственном  $b_6f$ -комплексу [33–39]. Полагают, что атом  $N_\epsilon$  служит первичным акцептором протона, переносимого от  $QH_2$  к окисленному ISP ( $ISP_{ox}$ ). Альтернативная модель, предполагающая, что первичным акцептором протона является близлежащая молекула воды, была предложена в работах Postila et al. [39] и Barragan et al. [40].

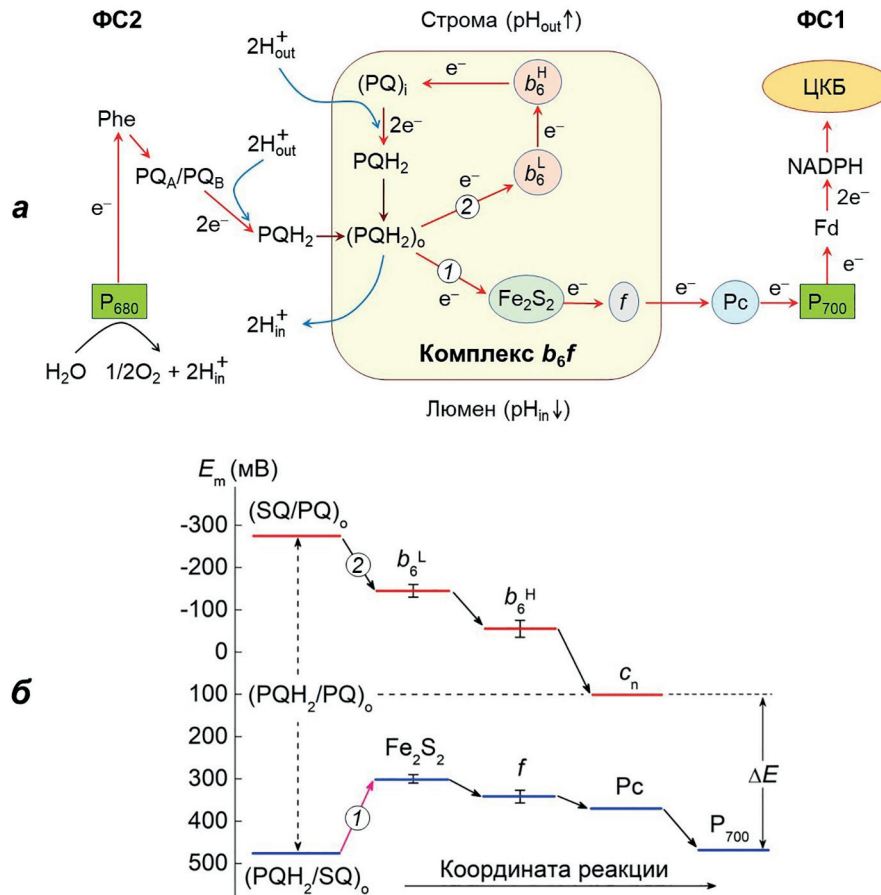
Проникновению  $QH_2$  в полость хинон-связывающего сайта  $Q_o$  предшествует его диффузия из липидной фазы тилакоидной мембраны вдоль сравнительно длинного пути внутри белкового комплекса. Интересное наблюдение заключается в том, что длинный фитильный «хвост» молекулы Chl *a* лежит на пути перемещения пластохинона к portalу  $Q_o$ . Предполагается, что Chl *a* выполняет «воротные» функции. Возможны две конформации фитильной цепи: в одной конформации эта

цепь не препятствует, а в другой – ограничивает доступ хинона к portalу  $Q_o$  [32].

Экспериментальные данные о расположении пластохинона во внутрибелковой полости портала  $Q_o$  отсутствуют. Следует, однако, иметь в виду, что пластохинон (или по крайней мере его редокс-активный фрагмент) обладает высокой подвижностью внутри полости  $Q_o$ . Эта полость покрыта липидами (23 потенциальных участка связывания липидов в расчёте на один мономер [27, 28]). Линейные размеры полости достаточно велики (расстояние между  $Fe_2S_2$  и гемом  $b_6^L$  составляет  $\sim 25 \text{ \AA}$ ), что позволяет предположить, что молекула пластохинола целиком помещается внутри полости, включая её загнутый фитильный «хвост» (рис. 1). Альтернативой является гипотетический случай, когда «голова» пластохинола проникает в гидрофобную полость и связывается с каталитическим центром  $Q_o$ , при этом гибкий фитильный «хвост» оказывается лишь частично погруженным в полость.

**Окисление пластохинола в  $Q_o$ -центре цитохромного комплекса  $b_6f$ .** На рис. 2, *a* показана упрощённая схема окислительно-восстановительных процессов, происходящих в комплексе  $b_6f$  с участием пластохинола. Центр  $Q_o$  выполняет роль хинол-оксидазы: два электрона, донируемых молекулой  $QH_2$ , направляются по разным цепям переноса электрона, высоко- и низкопотенциальной. Один электрон переносится на  $Fe_2S_2$ -кластер ISP (реакция 1); ISP служит донором электрона для Cyt *f*, который, в свою очередь, восстанавливает Pс. Второй электрон поступает от пластосемихинона к низкопотенциальному гему  $b_6^L$  (реакция 2). Восстановленный гем  $b_6^L$  передаёт электрон высокопотенциальному гему  $b_6^H$ , расположенному вблизи от центра  $Q_i$  на стромальной стороне комплекса.

На рис. 2, *b* представлена «энергетическая» диаграмма, показывающая стандартные значения редокс-потенциалов кофакторов, участвующих в переносе электронов по высоко- и низкопотенциальной цепям. Согласно этим данным, перенос электрона и протона от  $QH_2$  к ISP – это эндергонический (энерго-акцепторный) процесс, который определяет скорость окисления  $QH_2$ . Дальнейший перенос электрона в сторону  $P_{700}^+$  идет с понижением свободной энергии. В результате первой стадии окисления  $QH_2$  образуется радикальная пара  $QH\cdot - Fe_2S_2(H^+)$ . Здесь  $QH\cdot$  обозначает молекулу пластосемихинона в протонированной форме. Такая радикальная пара была зарегистрирована методом ЭПР в цитохромных комплексах  $bc_1$  и  $b_6f$  в работах группы



**Рис. 2.** Схема нециклического электронного транспорта и редокс-превращений пластохинола в цитохромном  $b_6f$ -комплексе (а). б – Диаграмма значений стандартных редокс-потенциалов переносчиков высоко- и низкпотенциальной цепи переноса электронов в цитохромном  $b_6f$ -комплексе одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Диаграмма построена на основании литературных данных о стандартных значениях редокс-потенциалов, приведённых в работе Piere et al. [77]. Ссылки на значения редокс-потенциалов для комплексов Cyt  $b_6f$  для других фотосинтезирующих организмов приведены в подписи к рис. 10 в статье Tikhonov [4]. Символами 1 и 2 обозначены реакции переноса электрона от  $PQH_2$  к  $Fe_2S_2$ -кластеру и от семихинона  $PQH^+$  – к низкпотенциальному гему  $b_6^L$  соответственно

Osyczka [28, 41–44]. Энергия связи между радикалами невелика (~3,5 ГГц). Метастабильная радикальная пара распадается на  $PQH^+$  и  $Fe_2S_2(H^+)^+$ , после чего происходят события, включающие в себя крупномасштабные структурные перестройки белкового комплекса. Перенос электрона от восстановленного кластера  $Fe_2S_2^+$  к Cyt  $f$  связан с движением мобильного фрагмента ISP, содержащего  $Fe_2S_2^+$ , в сторону гема  $f$  [45].

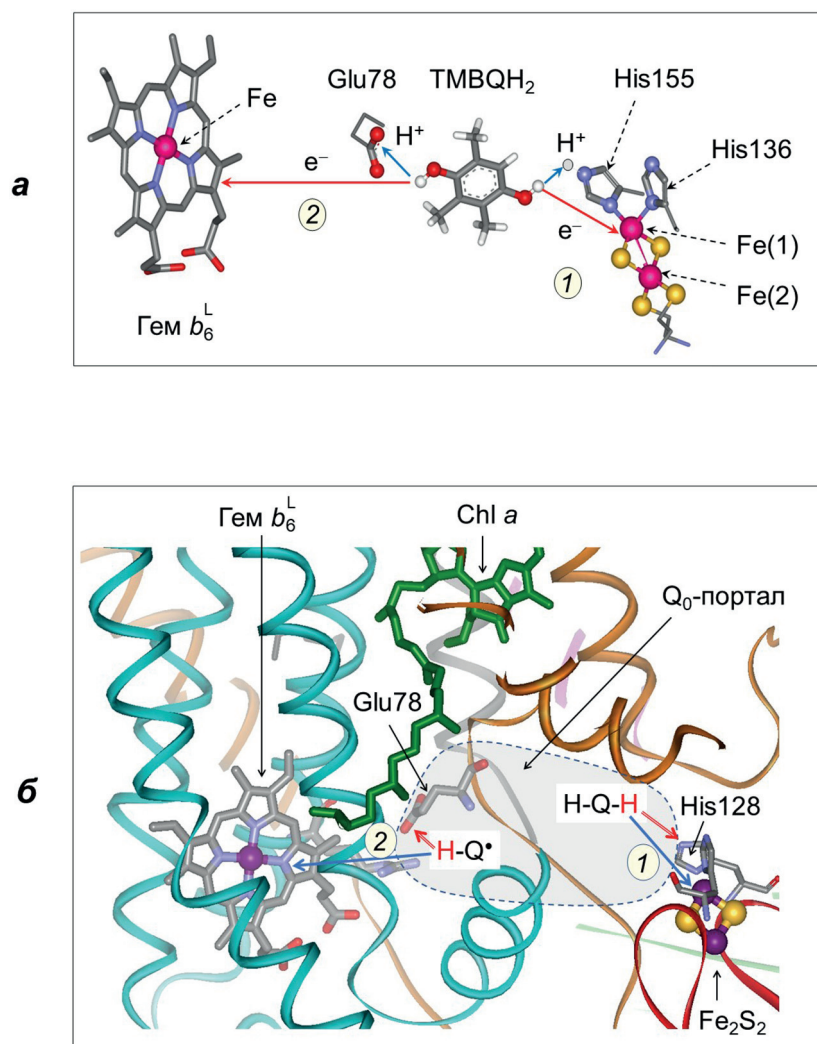
Согласно модели Q-цикла [46–48], пласто-семихинон  $PQH^+$  восстанавливает гем  $b_6^L$ . Дальнейший перенос электрона по низкпотенциальной цепи обеспечивает перенос электрона к окисленной молекуле PQ, связанной с центром  $Q_i$ . Эти реакции включают перенос электрона от  $b_6^L$  к  $b_6^H$  и происходят с понижением свободной энергии. Молекула PQ, находящаяся в центре  $Q_i$ , получает один электрон от  $b_6^H$ . Согласно модели модифицированного Q-цикла, PQ может получить второй электрон,

поступающий к ней от ФС1 по цепи циклического транспорта электронов через Fd, FNR и гем  $c_n$  ( $PSI \rightarrow Fd \rightarrow FNR \rightarrow c_n \rightarrow (PQ)_i$ ) [17, 18]. Двукратно восстановленная молекула  $PQH_2$  уходит из центра  $Q_i$  и затем может связаться с вакантным центром  $Q_o$ , имеющим высокое сродство к  $PQH_2$ . Можно предположить, что при отсутствии переносчиков циклического транспорта электронов (например, в изолированных хлоропластах класса Б), молекула семихинона  $(PQ^+)_i$ , образовавшаяся в центре  $Q_i$ , ожидает второго электрона, поступающего к ней от следующей молекулы  $PQH_2$ , окисляемой в центре  $Q_o$ . Вся совокупность процессов, показанных на рис. 2, б, свидетельствует, что окисление  $PQH_2$  до PQ – энергетически выгодный процесс: суммарное изменение свободной энергии в результате окисления  $PQH_2$ , оцениваемое по стандартным значениям редокс-потенциалов электронных переносчиков, имеет отрицательное значение.

Процессы двухэлектронного окисления  $\text{PQH}_2$  в центре  $\text{Q}_0$  сопряжены с переносом протонов от  $\text{PQH}_2$  на близлежащие протон-акцепторные группы. Общепризнано, что первичным акцептором протона, донируемого молекулой  $\text{PQH}_2$ , служит имидазольная группа His, входящего в ISP [28–38]. Считается, что первичным акцептором протона, донируемого семихиноном  $\text{PQH}^\cdot$ , служит карбоксильная группа  $-\text{COO}^-$  аминокислотного остатка Glu78 ( $-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow -\text{COOH}$ ) (рис. 3, а) [49–51]. В хлоропластах эта группа имеет ограниченную подвижность внутри белкового комплекса  $b_6f$  благодаря образованию солевого мостика между Glu78 и Arg87 [49, 52]. От  $-\text{COOH}$  протон переносится в люмен,

что происходит посредством обмена с протон-связывающими карбоксильными группами Glu3 и Glu58 [52].

Следует обратить внимание на то, что гем  $b_6^L$  и карбоксильная группа Glu78 находятся сравнительно далеко ( $\sim 6 \text{ \AA}$ ) от того участка, где появляется радикал  $\text{PQH}^\cdot$ . Оценки, сделанные на основании квантово-химических расчётов (см. ниже), показали, что при достаточно большом удалении  $\text{PQH}^\cdot$  от первичного акцептора протона  $-\text{COO}^-$  эффективность переноса электрона к гему  $b_6^L$ , сопряжённого с переносом протона, будет невелика. Окисление  $\text{PQH}^\cdot$  может заметно ускоряться после смещения радикала  $\text{PQH}^\cdot$  внутри гидрофобной полости в сторону гема  $b_6^L$  и карбоксильной



**Рис. 3.** Реакции бифуркационного (двухэлектронного) окисления ТМВQH<sub>2</sub> (а) и предполагаемые положения молекул пластохинола (H–Q–H) и пластосемихинона (H–Q<sup>·</sup>) внутри белкового портала Q<sub>0</sub> (б). Фрагмент белковой структуры, включающий в себя Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-кластер и гем  $b_6^L$ , построен на основании данных криоэлектронной микроскопии для  $b_6f$ -комплекса шпината (PDB ID: 6RQF [32]). Серым цветом обозначена полость, в которой находятся молекулы пластохинола и пластосемихинона, непосредственно взаимодействующие с ISP и гемом  $b_6^L$ . Короткие красные стрелки показывают направления переноса протонов от пластохинола к атому N<sub>ε</sub> гистидина и от пластосемихинона – к группе  $-\text{COO}^-$  Glu78 соответственно. Синие стрелки – перенос электронов к Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-кластеру и к гему  $b_6^L$ .



группы Glu78 (рис. 3, б). Аналогичное предположение было высказано Crofts [53] на основании анализа процессов окисления убихинола в комплексе  $b_c1$ .

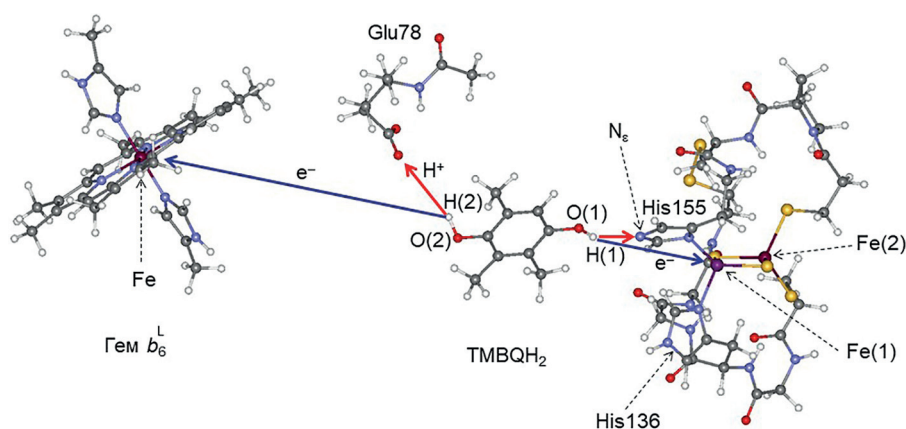
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Модельная система и методы расчетов. Геометрия модельной системы.** Полная модельная система, имитирующая расположение электронных переносчиков в каталитическом центре  $Q_6$  (рис. 4), была построена на основе кристаллической структуры  $b_6f$ -комплекса одноклеточной водоросли *C. reinhardtii* (PDB ID: 1Q90 [29]). Можно выделить четыре функциональные группы этой структуры: 1) редокс-центр, содержащий железосерный кластер ( $Fe_2S_2$ ) и окружающие его аминокислотные остатки; 2) гем  $b_6^L$ ; 3) Glu78 субъединицы IV и 4) аналог пластохинола (2,3,5-три-метил-бензохинол,  $TMVQH_2$ ). Молекула  $TMVQH_2$  была выбрана в качестве структуры, моделирующей пластохинол. Она имеет такую же структуру хинольного фрагмента, как молекула  $PQH_2$ , но не содержит фитильной цепи. Структуры каждого из четырёх фрагментов были дополнены необходимым числом атомов водорода и полностью оптимизированы как изолированные. Затем эти фрагменты были помещены в исходную систему таким образом, чтобы добиться наилучшего совмещения положений атомов в оптимизированной и в экспериментальной структурах. Предварительно оптимизированная структура  $TMVQH_2$  была помещена в то место, где, по данным рентгеноструктурного анализа, находилась молекула ингибитора TDS [31].

На завершающем этапе построения модельной системы проводилось уточнение её струк-

туры путём внесения небольших конформационных изменений. Согласно Ustynyuk et al. [54, 55], образование водородной связи между атомом H группы  $-OH$  молекулы  $TMVQH_2$  и атомом  $N_\epsilon$  приводит к уменьшению расстояния  $H-N_\epsilon$  за счёт поворота  $-OH$  вокруг связи  $C-OH$ . Такой поворот сокращает путь реакции от 2,42 Å до минимального значения – 2,08 Å. В настоящей работе сканирование зависимости энергии системы от расстояния  $H(1)-N_\epsilon$  проведено для структуры, в которой такое расстояние было минимальным.

**Вычислительные методы.** Расчеты проводили методом функционала плотности с помощью программы «Природа» [56], с использованием функционала PBE [57] и набора базисных функций TZ2P Гауссова типа. Были использованы следующие схемы сжатия орбитальных базисных функций: ( $5s1p$ )/[ $3s1p$ ] – для атомов H; ( $11s6p2d$ )/[ $6s3p2d$ ] – для атомов C, N, и O; ( $15s11p2d$ )/[ $10s6p2d$ ] – для атомов S и ( $17s13p8d$ )/[ $12s9p4d$ ] – для Fe. При расчёте синглетного состояния фрагмента белка Риске применяли неограниченный метод функционала плотности. Ранее [54, 55] нами было установлено, что для нахождения низшего по энергии синглетного электронного состояния этого комплекса необходимо изменить последовательность граничных орбиталей в одной из электронных подсистем ( $\alpha$  или  $\beta$ ). Данное обстоятельство представляется важным, поскольку в модельной системе рассматривался биядерный кластер  $Fe_2S_2$ , в котором реализуется антиферромагнитная ориентация спинов парамагнитных ионов железа. Для таких комплексов, как известно [58], энергия системы растёт с увеличением мультиплетности. Данная закономерность (так называемая «лестница» Гейзенберга) была получена нами ранее [54].



**Рис. 4.** Модельная система для реакции двухстадийного окисления пластохинола цитохромным комплексом  $b_6f$ . Символами O(1) и H(1) показаны атомы кислорода и водорода группы  $-OH$  молекулы  $TMVQH_2$ , взаимодействующей с каталитическим центром ISP (рис. 1, реакция 1). Символами O(2) и H(2) показаны атомы кислорода и водорода группы  $-OH$ , взаимодействующей с гемом  $b_6^L$  и группой  $-COO^-$  Glu78. Fe(1) и Fe(2) – два иона железа кластера  $Fe_2S_2$

Для модельной системы, построенной в настоящей работе, эта закономерность также выполнялась. Это доказывает, что синглетное электронное состояние железосерного кластера является низшим по энергии, что соответствует литературным данным [59–63].

*Спиновую плотность и заряды на атомах* вычисляли по методу Hirshfeld [64]. Согласие расчётных и экспериментальных данных по распределению спиновой плотности на атомах было показано в работе Frolov et al. [65] для радикала ТМВQH $\cdot$ .

**Спиновые характеристики.** Для окисленного редокс-центра ISP (ISP $_{ox}$ ) атом N $_{\epsilon}$  имидазолидинового остатка His155 принимали депротонированным, а для His136 – протонированным; общий заряд этого фрагмента равен  $Z = -1$ . Известно, что окисленный кластер Fe $_2$ S $_2$  является диамагнитным (спин  $S = 0$ ) вследствие антиферромагнитного взаимодействия двух парамагнитных ионов, Fe $^{3+}(1)$  и Fe $^{3+}(2)$ , каждый из которых имеет спин  $S = 5/2$  [28, 59–61]. Результаты расчётов, проведённых ранее [54], были подтверждены в настоящей работе, они согласуются с экспериментальными данными. После восстановления окисленного ISP (ISP $_{ox}$ ) кластер Fe $_2$ S $_2$  становится парамагнитным (суммарный спин равен  $S = 1/2$  [28, 59–61]). Согласно нашим расчётам, проекции спинов двух ионов железа кластера Fe $_2$ S $_2$  как в окисленном, так и в восстановленном состоянии сохраняют противоположные проекции [54], что также согласуется с экспериментальными данными об антиферромагнитном взаимодействии ионов железа в кластере Fe $_2$ S $_2$  восстановленного белка Риске.

Рассматривая взаимодействие семихинона ТМВQH $\cdot$  с Суt b $_6$ , отметим следующее. Молекула семихинона имеет спин  $S = 1/2$ ; окисленный гем b $_6^L$  парамагнитен ( $S = 1/2$ ) [28, 61]. Поэтому при описании второй стадии реакции мы рассматривали две возможности для полного спина модельной системы, описывающей окисление ТМВQH $\cdot$ ,  $S = 0$  или  $S = 1$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Первая стадия окисления ТМВQH $_2$ .** На рис. 5 показан энергетический профиль реакции (зависимость энергии системы от расстояния между атомами Н(1) и N $_{\epsilon}$ ), рассчитанный для первой стадии окисления хинола в модельной системе, включающей ТМВQH $_2$ , фрагмент белка Риска, содержащий Fe $_2$ S $_2$ -кластер и окружающие его аминокислотные остатки, а также Glu78. Энергетический профиль имеет два минимума.

Один минимум отвечает исходному положению атома Н(1) в молекуле ТМВQH $_2$ . Второй – соответствует положению Н(1) вблизи атома N $_{\epsilon}$  имидазолидинового кольца His155 и характеризует образование связи Н–N $_{\epsilon}$  ( $R_{H-N_{\epsilon}} = 1,11 \text{ \AA}$  в структуре, соответствующей второму минимуму). Расстояние между минимумами на кривой, показанной на рис. 5, составляет 0,88 \AA. Перенос атома Н(1) из начального положения (–ОН(1)) в конечное (Н(1)–N $_{\epsilon}$ ) связан с преодолением энергетического барьера ( $\Delta E^{\ddagger}$ ). Перенос Н(1) к атому N $_{\epsilon}$  – это энерго-акцепторный процесс, который сопровождается преодолением энергетического барьера и повышением полной энергии системы на величину  $\Delta E = 25,6 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$  (рис. 5).

Энергетический профиль реакции переноса Н(1), приведённый на рис. 5, был получен в предположении о неадиабатическом механизме реакции, когда в ходе быстрого переноса лёгкого атома Н(1) геометрия системы сохраняется. Затем, после переноса протона к атому N $_{\epsilon}$ , происходит небольшое изменение («релаксация») геометрии системы, которую определяли путём оптимизации координат атомов, входящих в молекулу хинона, и железосерный кластер. Изменение энергии системы после переноса Н(1) оценивали как разницу энергий «нерелаксированного» продукта ( $\Delta E = 25,6 \text{ кДж}\cdot\text{моль}^{-1}$ ) и «релаксированного» продукта реакции. В последнем случае предварительно оптимизированные структуры ТМВQH $\cdot$  и восстановленного Fe $_2$ S $_2$ -кластера с протонированным His155 в качестве лиганда находились на своих

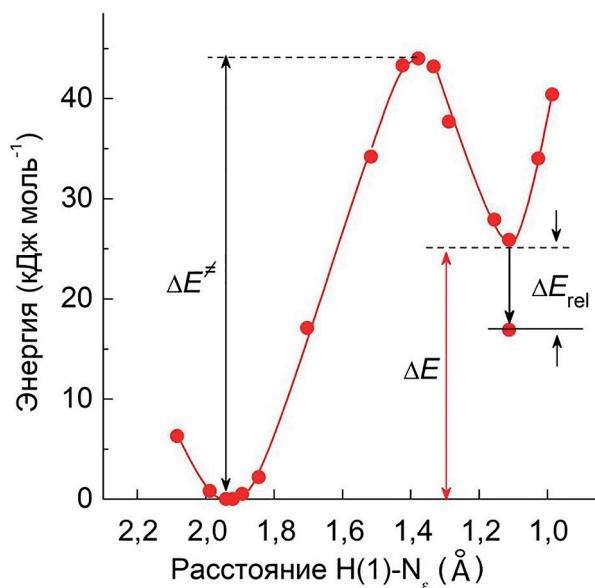


Рис. 5. Энергетический профиль первой стадии реакции окисления ТМВQH $_2$ : зависимость энергии от расстояния между атомами Н(1) и N $_{\epsilon}$  (см. обозначения на рис. 4)



местах в общей структуре изучаемой системы. Расчёты показали, что в результате «релаксации» энергия системы уменьшалась на величину  $\Delta E_{\text{rel}} = -9,0$  кДж·моль<sup>-1</sup>. Подчеркнём, что после переноса атома Н(1) и «релаксации» системы её полная энергия была выше, чем в исходном состоянии (до переноса Н(1)), на 16,6 кДж·моль<sup>-1</sup>. Близкое по порядку значение (10,5 кДж·моль<sup>-1</sup>) было получено в работе Barragan et al. [40] при моделировании работы каталитического центра Q<sub>o</sub> цитохромного комплекса bc<sub>1</sub>. Увеличение энергии в результате переноса электрона от PQH<sub>2</sub> к ISP<sub>ox</sub> (реакция I) хорошо согласуется с представлением о том, что эта реакция является эндергоническим (энерго-акцепторным) процессом [66].

Окисление хинола (отрыв атома Н1) можно рассматривать как два сопряжённых процесса, перенос двух частиц — электрона и протона, которые происходят согласованно. Первичные акцепторы электрона и протона — суть разные фрагменты белкового комплекса: электрон переносится на Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-кластер ISP, протон — на N<sub>e</sub>-атом His [54]. Говоря о согласованности процессов переноса электрона и протона, мы имеем в виду, что оба процесса происходят практически одновременно (proton coupled electron transport, PCET [67–69]). Известно, что сродство протона к His может контролироваться состоянием ISP. Редокс-превращения ISP, как известно, влияют на значения рK<sub>a</sub> протонируемого атома N<sub>e</sub> аминокислотного остатка His, являющегося лигандом для одного из ионов железа кластера Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. Для цитохромного комплекса bc<sub>1</sub> было экспериментально показано, что восстановление ISP в комплексе bc<sub>1</sub> сопровождается увеличением рK<sub>a</sub> [34–37]. Это означает, что ISP служит не только переносчиком электрона от хинола к Cyt f, но и выполняет «воротные» функции, обеспечивая перенос протонов в люмен [46, 47]. Восстановление ISP способствует протонированию его His за счёт иона водорода, донируемого молекулой PQH<sub>2</sub>, с последующим переносом протона в люмен в результате окисления ISP:  $\text{PQH}_2 + \text{ISP}_{\text{ox}} \rightarrow \text{PQH}^{\cdot} + \text{ISP}_{\text{red}}(\text{H}^+) \rightarrow \text{ISP}_{\text{ox}} + \text{H}^+_{\text{in}}$ .

Анализ распределения спиновой плотности, сделанный на основании квантово-химических расчётов, показал удовлетворительное согласие расчётных и экспериментальных данных. В начальном состоянии оба участника реакции (ТМВQH<sub>2</sub> и ISP<sub>ox</sub>) диамагнитны. Суммарное значение спиновой плотности ионов железа в окисленном кластере Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, как показали наши расчёты, близко к нулю. При этом каждый из ионов железа кластера Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> (Fe<sup>3+</sup>(1) и Fe<sup>3+</sup>(2)) является парамагнитным, но значения спинов

плотностей этих ионов имеют противоположные знаки ( $\sigma_{\text{Fe}(1)} \approx 3,2$  и  $\sigma_{\text{Fe}(2)} \approx -3,2$  а.е.), что согласуется с экспериментальными данными об антиферромагнитном взаимодействии ионов Fe<sup>3+</sup>(1) и Fe<sup>3+</sup>(2) в кластере Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>. Спиновая плотность молекулы хинола (ТМВQH<sub>2</sub>) равна нулю.

После переноса электрона от ТМВQH<sub>2</sub> к Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> происходит перераспределение спиновой плотности между атомами. Образующийся радикал ТМВQH<sup>·</sup> является парамагнитным; при этом спиновая плотность частично распределена между разными атомами ТМВQH<sup>·</sup>, но в основном она локализована на атоме О(1), ориентированном в сторону ISP. Изменение спиновой плотности на всех атомах С и О в ходе реакции переноса атома водорода (протона и электрона) равно  $\Delta\sigma(\text{ТМВQH}^{\cdot}) \approx -0,6$  а.е., изменение спиновой плотности на атомах Fe и S кластера Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> составляет близкую величину,  $\Delta\sigma(\text{Fe}_2\text{S}_2) \approx 0,5$  а.е. Таким образом, квантово-химические расчёты показывают, что сразу после переноса Н(1) от ТМВQH<sub>2</sub> к ISP<sub>ox</sub> возникает радикальная пара, образованная двумя парамагнитными частицами, ТМВQH<sup>·</sup> и Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(H<sup>+</sup>)<sup>·</sup>, с противоположными ориентациями спинов. Суммарное изменение спиновой плотности радикальной пары, определяемое как  $\Delta\sigma_{\Sigma} = [\Delta\sigma(\text{ТМВQH}^{\cdot}) + \Delta\sigma(\text{Fe}_2\text{S}_2)]$ , оказывается близким к нулю, что определяется заданием мультиплетности ( $S = 0$ ) исходной модельной системы.

Радикальная пара пластосемихинон—Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(H<sup>+</sup>)<sup>·</sup> является метастабильной. По оценкам, сделанным на основании анализа спектров ЭПР цитохромного комплекса bc<sub>1</sub> [28], энергия взаимодействия радикалов невелика, она составляет ~3,5 ГГц (в температурных единицах это эквивалентно ~1 К). После распада радикальной пары восстановленный кластер Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> смещается на значительное расстояние в сторону гема f. Это происходит за счёт отклонения мобильного домена ISP, содержащего Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub><sup>·</sup>, по механизму «ограниченной диффузии» (tethered diffusion [45]).

**Вторая стадия реакции — окисление семихинона ТМВQH<sup>·</sup>.** Согласно модели Q-цикла, молекула семихинона (в нашей модели — это ТМВQH<sup>·</sup>) окисляется низкопотенциальным гемом b<sub>6</sub><sup>L</sup>. Возникает вопрос: может ли семихинон, расположенный в месте его образования (радикальная пара ТМВQH<sup>·</sup>—Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>(H<sup>+</sup>)<sup>·</sup>), служить эффективным донором электрона для гема b<sub>6</sub><sup>L</sup> и протона — для —COO<sup>-</sup> группы Glu78? Согласно структурным данным, расстояния между семихиноном и его партнёрами — гемом b<sub>6</sub><sup>L</sup> и группой —COO<sup>-</sup> аминокислотного

остатка Glu78 – слишком велики, чтобы обеспечить эффективное окисление ТМВQH $\cdot$ . Возможна ли реализация этих процессов без смещения радикала ТМВQH $\cdot$  в сторону гема  $b_6^L$  и Glu78? Мы оценили такую возможность в рамках модели, включающей ТМВQH $\cdot$ , Glu78 и гем  $b_6^L$ , для двух случаев: когда полный спин модельной системы равен  $S_{\text{total}} = 0$  или  $S_{\text{total}} = 1$ . Эти значения спина были выбраны, исходя из того, что семихинон ТМВQH $\cdot$  и окисленный гем  $b_6^L$  имеют спины  $S = \frac{1}{2}$  [28]. В качестве координаты реакции, характеризующей перенос атома Н(2), было выбрано расстояние между Н(2) и ближайшим к нему атомом О карбоксильной группы –COO $^-$ .

Расстояние, которое проходит атом Н(2), определяется координатами Н(2) в молекуле семихинона в исходной (ТМВQH $\cdot$ , Glu78 (–COO $^-$ ), гем  $b_6^L$ ) и в конечной системе (ТМВQ, Glu78 (–COOH), восстановленный гем  $b_6^L$ ), оно составляет 2,60 Å. Расчёты, выполненные для такой модельной системы при  $S_{\text{total}} = 0$  или  $S_{\text{total}} = 1$ , показали, что в обоих случаях для радикала ТМВQH $\cdot$ , находящегося в исходном положении, энергетический барьер  $\Delta E^\ddagger$  второй стадии реакции оказывается очень высоким и составляет 273,4 кДж·моль $^{-1}$  для синглетного состояния и 295,7 кДж·моль $^{-1}$  – для триплетного состояния. Это указывает на то, что окисление радикала ТМВQH $\cdot$ , удалённого относительно гема  $b_6^L$  и карбоксильной группы Glu78, должно быть затруднено.

Результаты расчётов, выполненные методом молекулярной динамики в группе Cramer [70], указывают на то, что характерное время диффузии пластохинона внутри портала Q $_0$  на расстояние  $\sim 10$  Å может составлять  $\sim 10$  нс. Быстрая диффузия пластохинона позволяет предположить, что смещение семихинона внутри портала Q $_0$  в сторону гема  $b_6^L$  и Glu78 не является фактором, лимитирующим окисление семихинона. Приближение семихинона к группе –COO $^-$  и к гему  $b_6^L$  существенно снижает энергетический барьер реакции и ускоряет окисление семихинона. Результаты наших расчётов согласуются с этим предположением.

На рис. 6, а показано, как энергия модельной системы изменяется по мере смещения радикала ТМВQH $\cdot$  в сторону группы –COO $^-$  Glu78. В обоих случаях ( $S_{\text{total}} = 0$  и  $S_{\text{total}} = 1$ ) энергия системы уменьшается при приближении ТМВQH $\cdot$  к –COO $^-$ . От места, где семихинон образовался, до места, в котором достигается минимальное значение энергии, ТМВQH $\cdot$  должен сместиться на расстояние  $\approx 1,90$  Å для синглетного и  $\approx 1,80$  Å – для триплетного со-

стояния системы. Энергия системы при этом понижается на 74,5 и 44,5 кДж·моль $^{-1}$  соответственно, в результате чего синглетное состояние становится более устойчивым, чем триплетное, на 15,6 кДж·моль $^{-1}$ .

На рис. 6, б показаны энергетические профили реакции, характеризующие изменение полной энергии системы при переносе атома Н(2) к –COO $^-$  в зависимости от положения ТМВQH $\cdot$  относительно Glu78. Профили, рассчитанные для  $S_{\text{total}} = 0$  и  $S_{\text{total}} = 1$ , заметно различаются. В первом случае ( $S_{\text{total}} = 0$ ) энергия системы уменьшается, достигая минимума при расстоянии Н(2)–О, равном 1,06 Å, что соответствует длине связи О–Н в группе –COOH. Энергетические профили, показанные на рис. 6, б, были получены в неадиабатическом приближении, предполагающем, что перенос атома Н(2) происходит быстро, при этом остальные геометрические параметры не меняются. В слу-

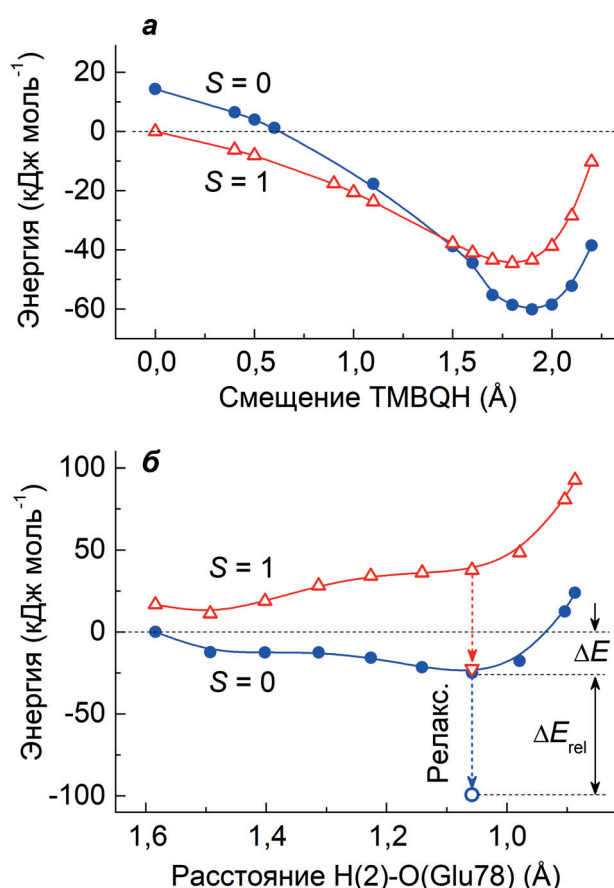


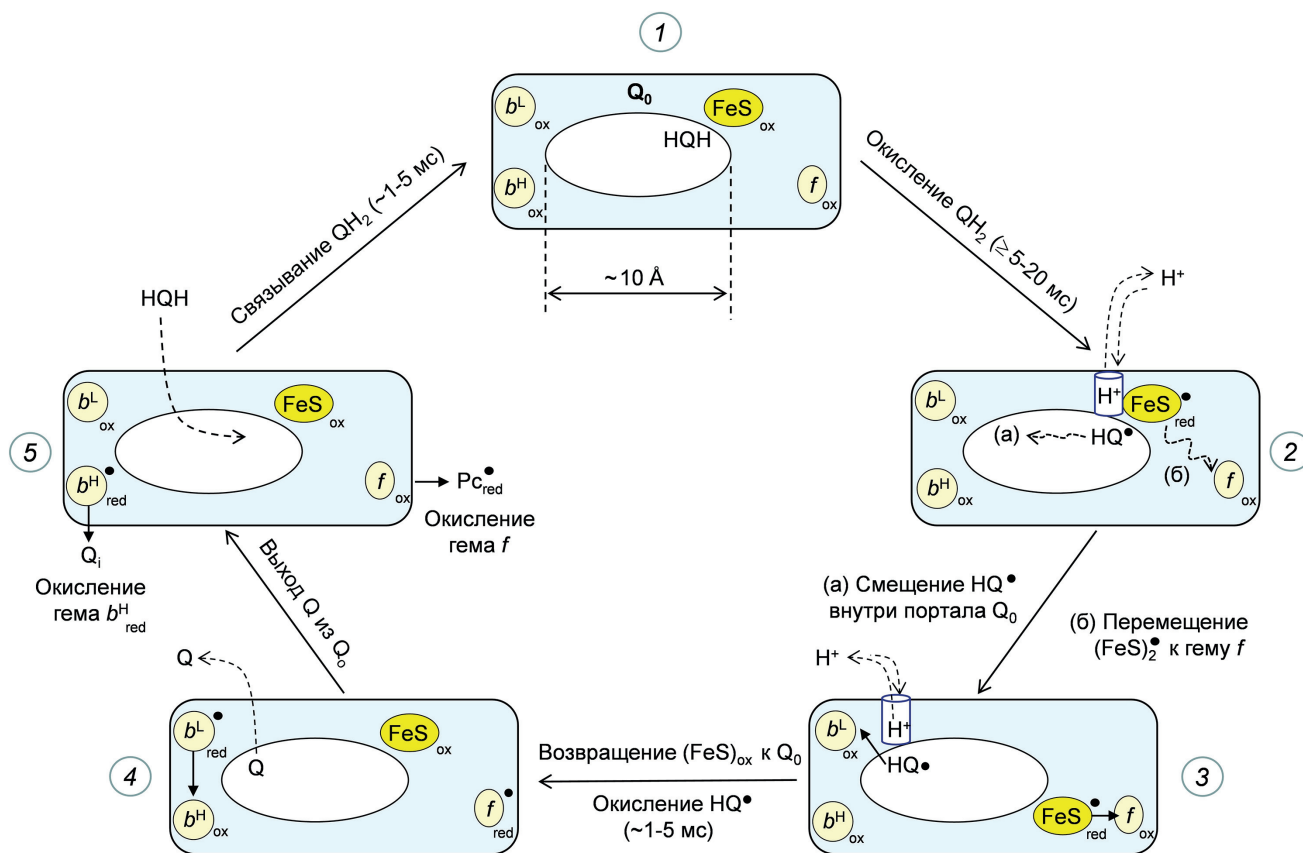
Рис. 6. Зависимости энергии системы от смещения семихинона ТМВQH $\cdot$  (а) от исходного положения в сторону карбоксильной группы Glu78 и гема  $b_6^L$ , рассчитанные для двух значений суммарного спина,  $S = 0$  и  $S = 1$ . б – Энергетические профили реакции окисления смещённой молекулы ТМВQH $\cdot$ . Вертикальными стрелками показаны изменения энергии в результате «релаксации» системы, связанной с небольшими изменениями её геометрии после переноса атома Н(2) (пояснения в тексте)

чае  $S_{\text{total}} = 0$  следующая за этим «релаксация» системы приводит к уменьшению энергии на величину  $\Delta E_{\text{rel}} \approx -74,4$  кДж·моль<sup>-1</sup>. В случае  $S_{\text{total}} = 1$  наблюдается иная картина: по мере приближения Н(2) к  $-\text{COO}^-$  энергия системы сначала повышается на 37,7 кДж·моль<sup>-1</sup>. Однако после сближения Н(2) с атомом кислорода группы  $-\text{COO}^-$  на расстояние Н(2)–О  $\approx 1,06$  Å последующая «релаксация» (изменение геометрии) системы вызывает уменьшение энергии на величину  $\Delta E_{\text{rel}} \approx -60,6$  кДж·моль<sup>-1</sup>. В обоих случаях ( $S_{\text{total}} = 0$  и  $S_{\text{total}} = 1$ ) окисление семихинона оказывается энергетически выгодным процессом. Это означает, что смещение ТМВQH<sup>·</sup> в сторону  $-\text{COO}^-$  и к гему  $b_6^L$  должно способствовать окислению семихинонового радикала.

Итак, результаты моделирования двух стадий окисления ТМВQH<sub>2</sub> показали, что бифуркационное (двухэлектронное) окисление ТМВQH<sub>2</sub> – это энергетически выгодный процесс. Суммарное изменение энергии системы в результате двух стадий окисления молекулы ТМВQH<sub>2</sub> является отрицательным.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Окисление пластохинола цитохромным  $b_6f$ -комплексом – основное звено в цепи переноса электронов в хлоропластах, которое определяет скорость переноса электронов между ФС2 и ФС1. На рис. 7 показана схема, описывающая совокупность событий, связанных с бифуркационным (двухэлектронным) окислением пластохинола в цитохромном  $b_6f$ -комплексе. Цикл превращений RQH<sub>2</sub> включает в себя стадию его проникновения в хинол-связывающий портал Q<sub>o</sub>, процессы окисления RQH<sub>2</sub> за счёт взаимодействия с ISP и гемом  $b_6^L$ , а также выход RQ из полости портала Q<sub>o</sub>. Влияние «механических» стадий (диффузия RQH<sub>2</sub> и RQ в полости портала Q<sub>o</sub>) на скорость функционирования комплекса  $b_6f$  было экспериментально показано группой Cramer [71, 72]. Путём генетических модификаций  $\alpha$ -спирали субъединицы IV (Pro105Ala и Pro112Ala) в цианобактерии *Synechococcus* sp. PCC 7002 авторам удалось сузить вход в портал Q<sub>o</sub>, тем самым затруднив проникновение RQH<sub>2</sub> к сайту его связывания



**Рис. 7.** Схема, иллюстрирующая цикл превращений пластохинола в каталитическом центре Q<sub>o</sub>. Символами HQH, HQ<sup>·</sup> и Q обозначены молекулы пластохинола, пласто-semихинона и пластохинона соответственно. Общее время перехода из состояния 3 в состояние 4 определяется временем окисления семихинона HQ<sup>·</sup> гемом  $b_6^L$ , оцениваемого по кинетике редокс-превращений  $b_6^L$ , а также скоростями стадий, связанных с окислением Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub>-кластера и возвращением в исходное положение [70–72]



с ISP. В результате таких манипуляций уменьшалась скорость восстановления  $Cyt\ f$  и замедлялся рост растений.

Основным процессом, определяющим скорость окисления  $PQH_2$  цитохромным комплексом, является «химическая» стадия реакции, связанная с переносом электрона и протона от  $PQH_2$  к соответствующим акцепторам. В согласии с моделью Q-цикла Митчелла, два электрона, донируемых молекулой хинола, переносятся по разным цепям электронного транспорта – высоко- и низкопотенциальной (рис. 3). Проведённое нами квантово-химическое моделирование бифуркационного окисления пластохинола согласуется с представлениями о том, что первая стадия окисления хинола (перенос электрона к ISP) – это эндергонический (энерго-акцепторный) процесс, который лимитирует общую скорость окисления в хинол-оксидазном центре  $Q_o$  [24]. Вторая стадия бифуркационной реакции – окисление семихинона за счёт переноса электрона к гему  $b_6^L$  – это экзоергонический (энергодонорный) процесс, идущий с понижением энергии. Результаты наших расчётов позволяют предположить, что одним из ключевых факторов эффективного сопряжения этих двух стадий, является высокая подвижность пластосемихинона внутри белковой полости хинон-связывающего центра  $Q_o$ .

Оценки подвижности пластосемихинона, сделанные методом молекулярной динамики [70], показали, что характерное время смещения молекулы хинона в сторону гема  $b_6^L$  внутри белковой полости портала  $Q_o$ , покрытой большим числом липидов [73], очень короткое, оно составляет  $\Delta\tau \sim 10$  нс. Это означает, что движение семихинона в сторону гема  $b_6^L$  и Glu78 может происходить очень быстро по сравнению с довольно медленной стадией окисления  $PQH_2$ , в результате которой образуется пластосемихи-

нон ( $\tau_{1/2} \geq 4-5$  мс [1, 4, 5]). Поэтому обе стадии бифуркационного окисления хинола – перенос электрона от  $PQH_2$  к белку Риске ( $ISP_{ox}$ ) и окисление пластосемихинона гемом  $b_6^L$  – можно рассматривать как процессы, происходящие синхронно [67–69]. Короткое время жизни семихинона может служить одной из причин того, что в  $b_6^L$ -комплексах концентрация радикалов, детектируемых методом ЭПР, очень низкая [28]. Другая причина – сильное уширение спектра ЭПР семихинонов за счёт их взаимодействия с другими парамагнитными центрами. Отметим, что короткое время жизни химически активных семихиноновых радикалов должно уменьшать вероятность побочной реакции переноса электрона от пластосемихинона, находящегося в полости портала  $Q_o$ , к молекулярному кислороду  $O_2$ , приводящей к образованию токсичного продукта – супероксидного радикала ( $O_2^-$ ) [74–76].

**Благодарности.** Статья посвящена памяти Владимира Анатольевича Шувалова, выдающегося ученого, внесшего фундаментальный вклад в выяснение механизмов электронного переноса в фотосинтетических системах.

**Вклад авторов.** Л.Ю. Устынюк – проведение квантово-химических расчётов, обработка результатов численных экспериментов, участие в написании статьи. А.Н. Тихонов – общий план работы, анализ литературных данных, подготовка графических материалов, написание статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-20047).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Haehnel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants, *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **35**, 659–693, doi: 10.1146/annurev.pp.35.060184.003303.
2. Nelson, N., Yocum, C.F. (2006) Structure and function of photosystems I and II, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 521–565, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350.
3. Mamedov, M., Govindjee G., Nadtochenko, V., and Semenov, A. Yu. (2015) Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms, *Photosynth. Res.*, **125**, 51–63, doi: 10.1007/s11120-015-0088-y.
4. Tikhonov, A. N. (2014) The cytochrome  $b_6f$  complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways, *Plant. Physiol. Biochem.*, **81**, 163–183, doi: 10.1016/j.plaphy.2013.12.011.
5. Malone, L. A., Proctor, M. S., Hitchcock, A., Hunter, C. N., and Johnson, M. P. (2021) Cytochrome  $b_6f$  – Orchestrator of photosynthetic electron transfer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 148380, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148380.
6. Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717–749, doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.717.

7. Романовский Ю. М., Тихонов А. Н. (2010) Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-синтаза — вращающийся молекулярный мотор, *Успехи физических наук*, **180**, 931-956.
8. Walker, J. E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1-16, doi: 10.1042/BST20110773.
9. Junge, W., and Nelson, N. (2015) ATP synthase, *Annu. Rev. Biochem.*, **83**, 631-657, doi: 10.1146/annurev-biochem-060614-034124.
10. Lemeille, S., and Rochaix, J.-D. (2010) State transitions at the crossroad of thylakoid signaling pathways, *Photosynth. Res.*, **106**, 33-46, doi: 10.1007/s11120-010-9538-8.
11. Foyer, C. H., Neukermans, J., Queval, G., Noctor, G., and Harbinson, J. (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression, *J. Exp. Bot.*, **63**, 1637-1661, doi: 10.1093/jxb/ers013.
12. Rochaix, J.-D. (2014) Regulation and dynamics of the light-harvesting system, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **65**, 287-309, doi: 10.1146/annurev-arplant-050213-040226.
13. Tikhonov, A. N. (2015) Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts: An overview, *Photosynth. Res.*, **125**, 65-94, doi: 10.1007/s11120-015-0094-0.
14. Balsera, M., Schürmann, P., and Buchanan, B. B. (2016) Redox regulation in chloroplasts, in *Chloroplasts. Current Research and Future Trends* (Kirchhoff, H., ed.) Caister Academic Press, pp. 187-208, doi: 10.21775/9781910190470.09.
15. Staehelin, L. A. (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supramolecular architecture of thylakoid membranes, *Photosyn. Res.*, **76**, 185-196, doi: 10.1023/A:1024994525586.
16. Höhner, R., Pribil, M., Herbstová, M., Lopez, L. S., Kunz, H.-H., et al. (2020) Plastocyanin is the long-range electron carrier between photosystem II and photosystem I in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 15354-15362, doi: 10.1073/pnas.2005832117.
17. Munekage Y., Hashimoto, M., Miyake, C., Tomizawa, K.-I., Endo, T., et al. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis, *Nature*, **429**, 579-582, doi: 10.1038/nature02598.
18. Strand, D. D., Fisher, N., and Kramer, D. M. (2016) Distinct energetics and regulatory functions of the two major cyclic electron flow pathways in chloroplasts, in *Chloroplasts: Current Research and Future Trends* (Kirchhoff Helmut, ed.) Caister Academic Press, pp. 89-100, doi: 10.21775/9781910190470.04.
19. Kirchhoff, H. (2014) Diffusion of molecules and macromolecules in thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 495-502, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.11.003.
20. Tikhonov, A. N. (2018) The cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex: biophysical aspects of its functioning in chloroplasts, in *Membrane Protein Complexes: Structure and Function, Subcellular Biochemistry* (Harris, J.R., Boekema, E.J., eds.) **87**, Springer Nature, Singapore Pte Ltd., pp. 287-328, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9\_10.
21. Kramer, D. M., Sacksteder, C. A., and Cruz, J. A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.*, **60**, 151-163, doi: 10.1023/A:1006212014787.
22. Tikhonov, A. N. (2013) pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **116**, 511-534, doi: 10.1007/s11120-013-9845-y.
23. Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. S., and Crofts, A. R. (2000) Structure and function of cytochrome *bc* complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, **69**, 1005-1075, doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.1005.
24. Crofts, A. R. (2004) The cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex: function in the context of structure, *Annu. Rev. Physiol.*, **66**, 689-733, doi: 10.1146/annurev.physiol.66.032102.150251.
25. De Vitry C., Ouyang, Y., Finazzi, G., Wollman, F.-A., and Kallas, T. (2004) The chloroplast Rieske iron-sulfur protein: at the crossroad of electron transport and signal transduction, *J. Biol. Chem.*, **279**, 44621-44627, doi: 10.1074/jbc.M406955200.
26. Cramer, W. A., Zhang, H., Yan, J., Kurisu, G., and Smith, J. L. (2006) Transmembrane traffic in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex, *Annu. Rev. Biochem.*, **75**, 769-790, doi: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142756.
27. Cramer, W. A., and Hasan, S. S. (2016) Structure-function of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* lipoprotein complex, in *Cytochrome Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling* (Cramer, W. A., and Kallas, T., eds) Springer, Dordrecht, pp. 177-207, doi: 10.1007/978-94-017-7481-9\_9.
28. Sarewicz, M., Pintscher, S., Pietras, R., Borek, A., Bujnowicz, Ł., et al. (2021) Catalytic reactions and energy conservation in the cytochrome *bc<sub>1</sub>* and *b<sub>6</sub>f* complexes of energy-transducing membranes, *Chem. Rev.*, **121**, 2020-2108, doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00712.
29. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.-L., and Picot, D. (2003) An atypical heme in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex, *Nature*, **426**, 413-418, doi: 10.1038/nature02155.
30. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (2003) Structure of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity, *Science*, **302**, 1009-1014, doi: 10.1126/science.1090165.
31. Yamashita, E., Zhang, H., and Cramer, W. A. (2007) Structure of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex: Quinone analogue inhibitors as ligands of heme *c<sub>n</sub>*, *J. Mol. Biol.*, **370**, 39-52, doi: 10.1016/j.jmb.2007.04.011.
32. Malone, L. A., Qian, P., Mayneord, G. E., Hitchcock, A., Farmer, D. A., et al. (2019) Cryo-EM

- Structure of the spinach cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex at 3.6 Å resolution, *Nature*, **575**, 535-539, doi: 10.1038/s41586-019-1746-6.
33. Samoilova, R. I., Kolling, D., Uzawa, T., Iwasaki, T., Crofts, A. R., et al. (2002) The interaction of the Rieske iron sulfur protein with occupants of the Q<sub>o</sub>-site of the *bc<sub>1</sub>* complex, probed by 1D and 2D electron spin echo envelope modulation, *J. Biol. Chem.*, **277**, 4605-4608, doi: 10.1074/jbc.C100664200.
34. Zu, Y., Couture, M. M.-J., Kolling, D. R. J., Crofts, A. R., Eltis, L. D., et al. (2003) The reduction potentials of Rieske clusters: the importance of the coupling between oxidation state and histidine protonation state, *Biochemistry*, **42**, 12400-12408, doi: 10.1021/bi0350957.
35. Hsueh K.-L., Westler W. M., and Markley J. L. (2010) NMR investigations of the Rieske protein from *Thermus thermophilus* support a coupled proton and electron transfer mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 7908-7918, doi: 10.1021/ja1026387.
36. Iwaki, M., Yakovlev, G., Hirst, J., Osyczka, A., Dutton, P. L., et al. (2005) Direct observation of redox-linked histidine *bc<sub>1</sub>* complex by ATR-FTIR spectroscopy, *Biochemistry*, **44**, 4230-4237, doi: 10.1021/bi047533v.
37. Lin, I.-J., Chen, Y., Fee, J. A., Song, J., Westler, W. M., et al. (2006) Rieske protein from *Thermus thermophilus*: <sup>15</sup>N NMR titration study demonstrates the role of iron-ligated histidines in the pH dependence of the reduction potential, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 10672-10673, doi: 10.1021/ja0627388.
38. Lhee, S., Kolling, D. R. J., Nair, S. K., Dukatov, S. A., and Crofts, A. R. (2010) Modifications of protein environment of the [2Fe-2S] cluster of the *bc<sub>1</sub>* complex: effects on the biophysical properties of the Rieske iron-sulfur protein and on the kinetics of the complex, *J. Biol. Chem.*, **285**, 9233-9248, doi: 10.1074/jbc.M109.043505.
39. Postila, P.A., Kaszuba, K., Sarewicz, M., Osyczka, A., Vattulainen, I., et al. (2013) Key role of water in proton transfer at the Q<sub>o</sub>-site of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex predicted by atomistic molecular dynamics simulations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 761-768, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.02.005.
40. Barragan, A. M., Schulten, K., and Solov'yov, I. A. (2016) Mechanism of the primary charge transfer reaction in the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *J. Phys. Chem. B*, **120**, 11369-11380, doi: 10.1021/acs.jpcc.6b07394.
41. Sarewicz, M., Dutka, M., Pintscher, S., and Osyczka, A. (2013) Triplet state of the semiquinone-Rieske cluster as an intermediate of electronic bifurcation catalyzed by cytochrome *bc<sub>1</sub>*, *Biochemistry*, **52**, 6388-6395, doi: 10.1021/bi400624m.
42. Sarewicz, M., Bujnowicz, Ł., Satarupa, B., Singh S. K., Cramer W. A., et al. (2017) Metastable radical state, nonreactive with oxygen, is inherent to catalysis by respiratory and photosynthetic cytochromes *bc<sub>1</sub>/b<sub>6</sub>f*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1323-1328, doi: 10.1073/pnas.1618840114.
43. Pietras, R., Sarewicz, M., and Osyczka, A. (2016) Distinct properties of semiquinone species detected at the ubiquinol oxidation Q<sub>o</sub> of cytochrome *bc<sub>1</sub>* and their mechanistic implications, *J. R. Soc. Interface*, **13**, 20160133, doi: 10.1098/rsif.2016.0133.
44. Sarewicz, M., Bujnowicz, Ł., and Osyczka, A. (2018) Generation of semiquinone-[2Fe-2S]<sup>+</sup> spin-coupled center at the Q<sub>o</sub> site of cytochrome *bc<sub>1</sub>* in redox-poised, illuminated photosynthetic membranes from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 145-153, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.11.006.
45. Zhang, Z. L., Huang, L. S., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., et al. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc<sub>1</sub>*, *Nature*, **392**, 677-684, doi: 10.1038/33612.
46. Brandt, U. (1996) Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex by proton-gated charge transfer, *FEBS Lett.*, **387**, 1-6, doi: 10.1016/0014-5793(96)00436-x.
47. Link, T. A. (1997) The role of the "Rieske" iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q<sub>p</sub>) site of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex: the "proton-gated affinity change" mechanism, *FEBS Lett.*, **412**, 257-264, doi: 10.1016/s0014-5793(97)00772-2.
48. Cramer, W. A., Hasan, S. S., and Yamashita, E. (2011) The Q cycle of cytochrome *bc* complexes: a structure perspective, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 788-802, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.02.006.
49. Zito, F., Finazzi, G., Joliot, P., and Wollman, F. A. (1998) Glu78, from the conserved PEWY sequence of subunit IV, has a key function in the cytochrome *b<sub>6</sub>f* turnover, *Biochemistry*, **37**, 10395-10403, doi: 10.1021/bi980238o.
50. Osyczka, A., Zhang, H., Mathe, C., Rich, P. R., Moser, C. C., et al. (2006) Role of the PEWY glutamate in hydroquinone-quinone oxidation-reduction catalysis in the Q<sub>o</sub> site of cytochrome *bc<sub>1</sub>*, *Biochemistry*, **45**, 10492-10503, doi: 10.1021/bi060013a.
51. Victoria, D., Burton, R., and Crofts, A. R. (2013) Role of the -PEWY-glutamate in catalysis at the Q<sub>o</sub>-site of the Cyt *bc<sub>1</sub>* complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 365-386, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.10.012.
52. Hasan, S. S., Yamashita, E., Baniulis, D., and Cramer, W. A. (2013) Quinone-dependent proton transfer pathways in the photosynthetic cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 4297-4302, doi: 10.1073/pnas.1222248110.
53. Crofts, A. R. (2004) Proton-coupled electron transfer at the Q<sub>o</sub>-site of the *bc<sub>1</sub>* complex controls the rate of ubihydroquinone oxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 77-92, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.10.012.
54. Ustynuk, L. Yu., and Tikhonov, A. N. (2018) The cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex: DFT modeling of



- the first step of plastoquinol oxidation by the iron-sulfur protein, *J. Organomet. Chem.*, **867**, 290-299, doi: 10.1016/j.jorganchem.2018.01.023.
55. Ustynyuk, L. Y., Trubitsin, B. V., and Tikhonov, A. N. (2018) DFT modeling of the first step of plastoquinol oxidation by the iron-sulfur protein of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex, *Mendeleev Commun.*, **28**, 170-172, doi: 10.1016/j.mencom.2018.03.020.
  56. Laikov, D. N. (1997) Fast evaluation of density functional exchange-correlation terms using the expansion of the electron density in auxiliary basis sets, *Chem. Phys. Lett.*, **281**, 151-156, doi: 10.1016/S0009-2614(97)01206-2.
  57. Perdew, J. P., Burke, K., and Ernzerhof, M. (1996) Generalized gradient approximation made simple, *Phys. Rev. Lett.*, **77**, 3865-3868, doi: 10.1103/PhysRevLett.77.3865.
  58. Siegbahn P. E. M., and Blomberg, M. R. A. (1999) Density functional theory of biologically relevant metal centers, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **50**, 221-249, doi: 10.1146/annurev.physchem.50.1.221.
  59. Noodleman, L., Peng, C. Y., Case, D. A., and Mouesca, J.-M. (1995) Orbital interactions, electron delocalization, and spin coupling in iron-sulfur clusters, *Coor. Chem. Rev.*, **144**, 199-244, doi: 10.1016/0010-8545(95)07011-L.
  60. Noodleman, L., Lovell, T., Liu, T., Himo, F., and Torres, R. A. (2002) Insights into properties and energetics of iron-sulfur proteins from simple clusters to nitrogenase, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **6**, 259-273, doi: 10.1016/S1367-5931(02)00309-5.
  61. Palmer, G. (1985) The electron paramagnetic resonance of metalloproteins, *Biochem. Soc. Trans.*, **13**, 548-560, doi: 10.1042/bst0130548.
  62. Hagen, W. R. (1992) Spectroscopy of iron-sulfur proteins, in *Advances in Inorganic Chemistry, Iron-Sulfur Proteins*, Academic Press, Inc., San Diego, pp. 165-222, doi: 10.1016/S0898-8838(08)60064-1.
  63. Link, T. A. (1999) The structures of Rieske and Rieske-type proteins, *Adv. Inorg. Chem.*, **47**, 83-157, doi: 10.1016/S0898-8838(08)60077-X.
  64. Hirshfeld, F. L. (1977) Bonded-atom fragments for describing molecular charge densities, *Theoret. Chim. Acta (Berl.)*, **44**, 129-138, doi: 10.1007/BF00549096.
  65. Frolov, A. E., Sviryaeva, I. V., Ruuge, E. K., Trubitsin, B. V., and Tikhonov, A. N. (2010) EPR Spectra of the trimethyl-1,4-benzoquinone anion-radical: results of calculations by the density functional method and their comparison with experiment, *Rus. Zhurn. Phys. Chem. A*, **83**, 1543-1547, doi: 10.1134/S0036024410090189.
  66. Crofts, A. R., Hong, S., Wilson, C., Burton, R., Victoria, D., et al. (2013) The mechanism of ubihydroquinone oxidation at the Q<sub>o</sub>-site of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1362-1377, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.01.009.
  67. Zhu, J., Egawa, T., Yeh, S.-R., Yu, L., and Yu, C.-A. (2007) Simultaneous reduction of iron-sulfur protein and cytochrome *b<sub>L</sub>* during ubiquinol oxidation in cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4864-4869, doi: 10.1073/pnas.0607812104.
  68. Osyczka, A., Moser, C. C., and Dutton P. L. (2005) Fixing the Q cycle, *Trends. Biochem. Sci.*, **30**, 176-182, doi: 10.1016/j.tibs.2005.02.001.
  69. Reece, S. Y., and Nocera, D. G. (2009) Proton-coupled electron transfer in biology: results from synergetic studies in natural and model systems, *Annu. Rev. Biochem.*, **78**, 673-699, doi: 10.1146/annurev.biochem.78.080207.092132.
  70. Hasan, S. S., Proctor, E. A., Yamashita, E., Dokholyan, N. V., and Cramer, W. A. (2014) Traffic within the cytochrome *b<sub>6</sub>f* lipoprotein complex: gating of the quinone portal, *Biophys. J.*, **107**, 1620-1628, doi: 10.1016/j.bpj.2014.08.003.
  71. Hasan, S. S., and Cramer, W. A. (2012) On rate limitations of electron transfer in the photosynthetic cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **14**, 13853-13860, doi: 10.1039/c2cp41386h.
  72. Ness, J., Naurin, S., Effinger, K., Stadnytskyi, V., Ibrahim, I. M., et al. (2019) Structure-based control of the rate limitation of photosynthetic electron transport, *FEBS Lett.*, **593**, 2103-2111, doi: 10.1002/1873-3468.13484.
  73. Hasan, S.S., Cramer, W.A. (2014) Internal lipid architecture of the hetero-oligomeric cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex, *Structure*, **22**, 1008-1015, doi: 10.1016/j.str.2014.05.004.
  74. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5th Edn., Oxford University, Oxford, doi: 10.1093/acprof:oso/9780198717478.001.0001.
  75. Mubarakshina, M., Khorobrykh, S., and Ivanov, B. (2006) Oxygen reduction in chloroplast thylakoids results in production of hydrogen peroxide inside the membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1496-1503, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.09.004.
  76. Ivanov, B. N., Borisova-Mubarakshina, M. M., and Kozuleva, M. A. (2018) Formation mechanisms of superoxide radical and hydrogen peroxide in chloroplasts, and factors determining the signalling by hydrogen peroxide, *Funct. Plant Biol.*, **45**, 102-110, doi: 10.1071/FP16322.
  77. Pierre, Y., Breyton, C., Kramer, D., and Popot, J.-L. (1995) Purification and characterization of the cytochrome *b<sub>6</sub>f* complex from *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 29342-29349, doi: 10.1074/jbc.270.49.29342.

## PLASTOQUINOL OXIDATION: THE RATE-LIMITING STEP IN THE CHAIN OF ELECTRON TRANSPORT IN CHLOROPLASTS

L. Yu. Ustynyuk<sup>1</sup> and A. N. Tikhonov<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: an\_tikhonov@mail.ru

This work is devoted to theoretical study of functioning of the cytochrome (Cyt)  $b_6f$  complex (plastoquinol:plastocyanin oxidoreductase) of the electron transport chain (ETC) of oxygenic photosynthesis. The composition of the chloroplast ETC and molecular mechanisms of functioning the cytochrome  $b_6f$  complex, which is positioned between photosystems 2 and 1 (PS2 and PS1), are briefly overviewed. The Cyt  $b_6f$  complex oxidizes plastoquinol (PQH<sub>2</sub>) molecules formed in PS2, and reduces plastocyanin, electron donor to PS1. Plastoquinol oxidation is the rate-limiting step in the ETC between PS2 and PS1. Using the density function theory (DFT) method, we have analyzed the two-electron (bifurcated) processes of PQH<sub>2</sub> oxidation in the Q<sub>o</sub> center of the Cyt  $b_6f$  complex. Results of DFT calculations are consistent with the fact that the first step of PQH<sub>2</sub> oxidation, the electron transfer to the Fe<sub>2</sub>S<sub>2</sub> cluster of the iron-sulfur protein (ISP), is the endergonic (energy-accepting) process ( $\Delta E \sim 15 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) that would limit the turnover of the Cyt  $b_6f$  complex. The second stage of bifurcated oxidation of quinol – the electron transfer from semiquinone (PQH<sup>•</sup>, formed after the first stage of electron transfer) to heme  $b_6^L$ , is the exergonic (energy-donating) process ( $\Delta E < 0$ ). DFT modeling of this stage revealed that semiquinone oxidation was accelerated after the PQH<sup>•</sup> displacement towards heme  $b_6^L$  (an electron acceptor) and the carboxy group of Glu78 (a proton acceptor). The data obtained are discussed within the framework of the Mitchell Q-cycle model describing the plastoquinol oxidation at the Q<sub>o</sub> site of the Cyt  $b_6f$  complex.

*Keywords:* photosynthesis, cytochrome complex, plastoquinol oxidation, modelling