

## МОДЕЛЬ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПЛАСТОЦИАНИНА С ТИЛАКОИДНОЙ МЕМБРАНОЙ И ВСТРОЕННЫМИ В НЕЕ ТРАНСМЕМБРАННЫМИ БЕЛКОВЫМИ КОМПЛЕКСАМИ

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

*Данная работа посвящена разработке модели электростатических взаимодействий белка пластоцианина с тилакоидной мембраной и встроенными в нее белковыми комплексами. С использованием уравнения Пуассона-Больцмана были рассчитаны электростатические потенциалы белков, участвующих в процессе переноса электрона, и тилакоидной мембраны при различных значениях ионной силы.*

**Введение.** 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, и соединяющие их стромальные ламеллы (Albertsson, 2001). В мембрану встроены белковые комплексы фотосистема 1, фотосистема 2, цитохромный  $b_6f$  комплекс и АТФ-синтаза. Цитохромный  $b_6f$  комплекс расположен равномерно в гранальных и стромальных областях мембраны, в то время как фотосистема 1 располагается только в стромальной части мембраны и в краевых гранальных участках (Albertsson, 2001).

Особенностью тилакоидных мембран является присутствие большого количества гликолипидов: сульфолипидов и галактолипидов, в основном это нейтральные липиды, т.е. галактолипиды: 1,2-diacyl-3-O-( $\beta$ -D-galactopyranosyl)-sn-glycerol (или моногалактозил-диглицерол, MGDG, 50%) и 1,2-diacyl-3-O-( $\alpha$ -D-galactopyranosyl-1(->6)- $\beta$ -D-galactopyranosyl)-sn-glycerol (или дигалактозил-диглицерол, DGDG, 30%) (Joyard, Dource, 1987; Seigenthaler, Rawyler et al. 1987). Около 15-20% составляют заряженные липиды: сульфолипид 1',2'-diacyl-3'-O-(6-deoxy-6-sulfo- $\alpha$ -D-glucopyranosyl)-sn-glycerol (sulfoquinosovyl-diacylglycerol SQDG) и фосфолипид (фосфадитилглицерол, PG), которые формально содержат от-

рицательный заряд при нейтральном pH (Joyard, Dource, 1987; Seigenthaler, Rawyler et al., 1987).

За перенос электрона от цитохромного  $b_6f$  комплекса на фотосистему 1 отвечает подвижный белок пластоцианин. Неравномерное распределение белковых комплексов в мембране приводит к тому, что пластоцианин диффундирует на довольно большие расстояния (до сотен нм (Мокроносов, Гавриленко, 1992; Hope, 1993; Gross, 1996)) в межмембранном пространстве, толщина которого (4–10 нм (Mehta, Sarafis et al., 1999)) сравнима с размерами самого пластоцианина (40x28x30 Å), для того чтобы перенести электрон от цитохромного комплекса на фотосистему 1. Электростатические взаимодействия обеспечивают направленную диффузию пластоцианина к сайту связывания с белковым комплексом (Hope, 2000; Kleanthous, 2000; Malkin, Niyogi, 2000; Kovalenko, Abaturova et al., 2006). Данная работа посвящена разработке модели электростатических взаимодействий белка пластоцианина с трансмембранными комплексами и тилакоидной мембраной и является развитием метода прямого многочастичного моделирования фотосинтетического электронного транспорта, описанного ранее в (Коваленко, Устинин и др., 2003; Kovalenko, Abaturova et al., 2006; Коваленко, Абатурова и др., 2007; Коваленко, Абатурова и др., 2008).

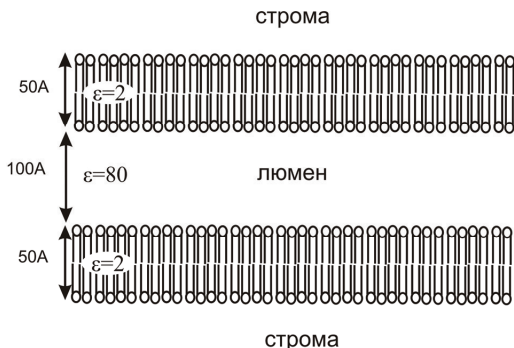
**Модель мембраны.** Модельная сцена представляет собой две фотосинтетические мембраны, заключающие между собой люминальное пространство (рис. 1). В модели фотосинтетическая мембрана представляет собой две плоскости, ограничивающие липидный бислой с двух сторон. Модельная сцена состоит из мембраны и встроенных в нее белковых комплексов. Люминальная часть цитохромного  $b_6f$  комплекса представлена в модели белком цитохромом  $f$ .

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 (PG и SQDG) в бислое по формуле:

$$N_{charges} = \sum_{type} p_i S_i / S_{memb}.$$

где  $p_i$  — процентное количество липидов  $i$ -го типа,  $S_i$  — средняя площадь, приходящаяся на один липид  $i$ -го типа. Модельную сцену формируют четыре построенных таким образом отрицательно заряженные

плоскости, которые представляют собой два внутренних (люминальных) и два внешних (стромальных) участка фотосинтетической мембраны.



**Рис. 1.** Модель фотосинтетической мембраны. На рисунке изображены две тилакоидные мембраны и люминальное пространство.

**Метод расчета потенциала.** Для расчета электростатических взаимодействий белков друг с другом и мембраной было рассчитано электрическое потенциальное поле в люмене тилакоида, которое создается зарядами мембраны и белков. Для этого использовалось уравнение Пуассона-Больцмана (Дерягин, Чураев и др., 1985):

$$\nabla(\varepsilon(r)\nabla\phi(r)) = -\frac{1}{\varepsilon_0}\rho(r),$$

где  $\varepsilon(r)$  — неоднородная по пространству диэлектрическая проницаемость среды;  $\rho(r)$  — плотность зарядов. Диэлектрическая проницаемость  $\varepsilon = 2$  внутри белков и мембран,  $\varepsilon = 80$  в растворе. Плотность зарядов складывается из свободных зарядов ионов в растворе и частичных зарядов на белках и липидах:

$$\rho = \rho_{ion} + \rho_{prot} + \rho_{memb},$$

$$\rho_{ions}(r) = \sum c_i z_i e_0,$$

где  $z_i$  — зарядовое число,  $c_i$  — локальные концентрации ионов, и  $c_i = c_i^{bulk} \exp(W_i/kT)$ , где  $c_i^{bulk}$  — объемная концентрация ионов,  $W_i$  — потенциал средней силы,  $W_i = z_i e_0 \phi(r)$  (Дерягин, Чураев и др., 1985),

$$\rho_{ions}(r) = \sum_i c_i^{bulk} e_0 z_i e^{-\frac{z_i e_0 \phi(r)}{kT}}.$$

При малых потенциалах  $\frac{z_i e_0 \phi}{kT} < 1$  можно разложить  $\rho_{ions}$  в ряд по малым степеням:

$$\begin{aligned} \rho_{ions}(r) &= \sum_i c_i^{bulk} z_i e_0 e^{-\frac{z_i e_0 \phi(r)}{kT}} \approx \sum_i c_i^{bulk} z_i e_0 - \sum_i c_i^{bulk} z_i e_0 \frac{z_i e_0 \phi(r)}{kT} = \\ &= -\sum_i c_i^{bulk} z_i^2 e_0^2 \frac{\phi(r)}{kT}, \end{aligned}$$

ионная сила  $I = \frac{1}{2} \sum_i c_i^{bulk} z_i^2 [1/\text{М}^3]$ , и  $\rho_{ions}(r) \approx -2Ie_0^2 \frac{\phi(r)}{kT}$  (Ullmann, 2004).

Тогда линеаризованное уравнение Пуассона-Больцмана выглядит следующим образом:

$$\nabla(\varepsilon(r)\nabla\phi(r)) = -\frac{1}{\varepsilon_0}(\rho_{prot}(r) + \rho_{memb}(r)) + \phi(r) \frac{2Ie_0^2}{\varepsilon_0 kT}.$$

Интегрируя это уравнение на однородной кубической сетке,

$$\begin{aligned} \int_V \nabla(\varepsilon(r)\nabla\phi(r)) &\approx \sum_{i,j,k} \int_{V_{ijk}} \nabla(\varepsilon(r)\nabla\phi(r)), \\ \int_{V_{ijk}} \nabla(\varepsilon(r)\nabla\phi(r)) &= -h\phi_{i,j,k} \sum_m \varepsilon_m^{ijk} + h \sum_m \phi_m^{ijk} \varepsilon_m^{ijk}, \\ \int_V \left(-\frac{1}{\varepsilon_0}(\rho_{prot}(r) + \rho_{memb}(r)) + \phi(r) \frac{2Ie_0^2}{\varepsilon_0 kT}\right) &\approx \\ \approx \sum_{i,j,k} \left(-\frac{h^3}{\varepsilon_0}(q_{ijk}^{prot}(r) + q_{ijk}^{memb}(r)) + \phi_{ijk} \frac{2h^3 Ie_0^2}{\varepsilon_0 kT}\right), \end{aligned}$$

получим итерационную зависимость для расчета потенциала:

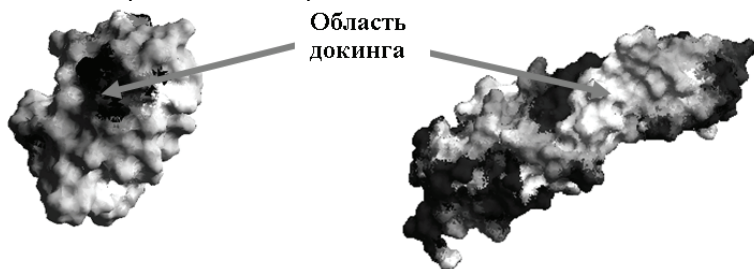
$$\phi_{i,j,k}^n = \frac{h \sum_{m=1}^6 \varepsilon_m \phi_m^{n-1} + \frac{1}{\varepsilon_0 h} (q_{i,j,k}^{prot} + q_{i,j,k}^{memb})}{\sum_{m=1}^6 \varepsilon_m + kh^2},$$

где  $k = \frac{2Ie_0^2}{\epsilon_0 kT}$ ,  $h$  — шаг сетки,  $\varphi_{i,j,k}^n$  — значение потенциала на  $n$ -ом шаге в точке  $i, j, k$ , суммирование идет по шести соседним ячейкам,  $\epsilon_m$  — диэлектрическая проницаемость на границе ячейки  $i, j, k$  с соседними ячейками.

Для задания граничных условий необходимо учесть геометрию тилакоидной мембраны. Для гранальных областей, представляющих собой набор повторяющихся стопок мембран, используются периодические граничные условия. Для стромальных участков мембраны, контактирующих с водой, выбираются нулевые граничные условия, поскольку на некотором удалении от мембраны ( $>50 \text{ \AA}$ ) из-за экранирования молекулами воды напряженность электрического поля близка к нулю.

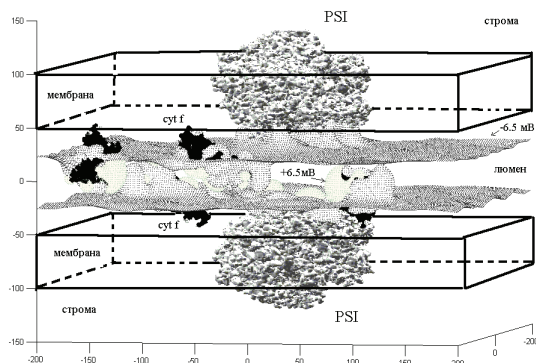
Как видно из формулы для расчета потенциала, кроме граничных условий необходимо знать величины зарядов ( $q^{memb}$ ,  $q^{prot}$ ), ионную силу и диэлектрическую проницаемость в каждой ячейке. Величина заряда в ячейке рассчитывается суммированием всех зарядов (от белков или мембран), попавших в эту ячейку.

**Результаты.** На рис. 2 представлены рассчитанные с помощью уравнения Пуассона-Больцмана электростатические потенциалы для пластоцианина и цитохрома *f*. Для визуализации потенциалов отдельных белков мы использовали построенную по алгоритму Коннолли (Connolly, 1983) молекулярную поверхность белка. В каждой точке этой поверхности оттенками серого цвета изображалось значение потенциала.

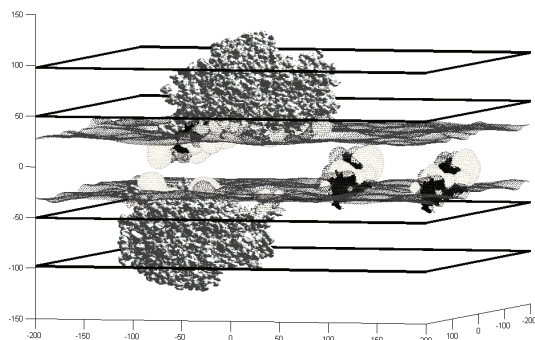


**Рис. 2.** Поверхности белков пластоцианина (слева) и цитохрома *f* (справа). Светло-серым цветом отображены положительные значения потенциала на поверхности белка, темно-серым — отрицательные. Стрелками показаны области докинга, на пластоцианине — область отрицательного потенциала, на цитохроме — положительного.

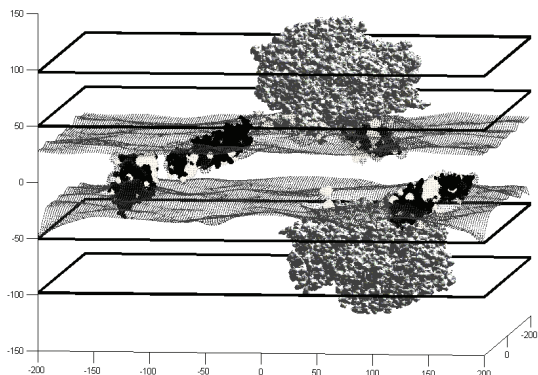
На рис. 3–5 изображены рассчитанные по уравнению Пуассона-Больмана эквипотенциальные поверхности (6.5 мВ) электростатического потенциала в люминальном пространстве тилакоида для стромального участка мембраны, и неподвижных белков при нейтральном pH и различной ионной силе.



**Рис. 3.** Эквипотенциальные поверхности (+6.5 мВ и -6.5 мВ) в люмене тилакоида хлоропласта, pH=7, I=100 мМ.



**Рис. 4.** Эквипотенциальные поверхности (+6.5 мВ и -6.5 мВ) в люмене тилакоида хлоропласта, pH=7, I=150 мМ.



**Рис. 5.** Эквипотенциальные поверхности (+40 мВ и –40 мВ) в люмене тилакоида хлоропласта, pH=7, I=50 mM.

На рис. 3–5 показана люминальная область, размерами  $400 \times 400 \text{ \AA}$  и толщиной  $100 \text{ \AA}$ , ограниченная с двух сторон двумя мембранами, каждая толщиной  $50 \text{ \AA}$ . В мембраны встроены белковые комплексы фотосистемы 1 (PSI). Цитохромный  $b_6f$  комплекс целиком не учитывался, и представлен белком цитохромом  $f$  (cyt  $f$ , черный). Темно-серым изображены отрицательные эквипотенциальные поверхности ( $-6.5 \text{ мВ}$ ), светло-серым – положительные эквипотенциальные поверхности ( $+6.5 \text{ мВ}$ ). Как видно из рис. 3–5, мембрана создает отрицательное электрическое поле, напряженность которого максимальна у поверхности мембран и убывает к центру люмена. При увеличении ионной силы увеличивается экранирование электрического поля ионами раствора, напряженность электрического поля в люмене, создаваемое мембраной и встроенными белками, уменьшается и отрицательные электростатические поверхности сдвигаются ближе к мембране.

**Заключение.** Электростатическое взаимодействие играет ключевую роль во взаимодействии белков — подвижных переносчиков электрона. В данной работе было рассчитано электростатическое поле мембраны и встроенных в нее белковых комплексов при различных значениях состояния тилакоидной мембраны и характера распределения фотосинтетических комплексов на процесс переноса электрона от цитохромного  $b_6f$  комплекса на фотосистему 1 белком пластоцианином.

Работа поддержана грантами РФФИ 07-04-00375, 08-04-00354; ГК 02.512.11.213; ИШ-853.2008.4.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Albertsson P.-A. A quantitative model of the domain structure of the photosynthetic membrane // *TRENDS in Plant Science*. — 2001. — Vol. 6, no. 8. — P. 349–354.
- Connolly M.L. Analytical molecular surface calculation // *Journal of applied crystallography*. — 1983. — Vol. 16. — P. 548–558.
- Gross E.L. Plastocyanin: structure, location, diffusion and electron transfer mechanisms // *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. / Ed. by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. — Kluwer Academic Publishers, 1996. — P. 413–429.
- Hope A.B. The chloroplast cytochrome b<sub>f</sub> complex: a critical focus on function // *Biochim. Biophys. Acta*. — 1993. — Vol. 1143. — P. 1–22.
- Hope A.B. Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta*. — 2000. — Vol. — 1456. — P. 5–26.
- Joyard J., Dource R. Galactolipid biosynthesis. / *Biochemistry of plant. Lipids: Structure and Function*. — New York, Academic Press, 1987. — P. 215–274.
- Kleanthous C. Protein-protein recognition. — New York: Oxford University Press, 2000.
- Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Gromov P.A., Ustinin D.M., Grachev E.A., Riznichenko G.Y., Rubin A.B. Direct simulation of plastocyanin and cytochrome f interactions in solution // *Phys. Biol.* — 2006. — Vol. 3. — P. 121–129.
- Malkin R., Niyogi K. Photosynthesis // *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. / Ed. by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. — Kluwer Academic Publishers, 2000. — P. 413–429.
- Mehta M., Sarafis V., Critchley C. Thylakoid membrane architecture. // *Aust. J. Plant Physiol.* — 1999. — Vol. 26. — P. 709–716.
- Seigenthaler P.A., Rawlyer A., Giroud C. Spatial organization and functional roles of acyl lipids in thylakoid membranes / *Biochemistry of plant. Lipids: Structure and Function*. — New York, Academic Press, 1987. — P. 161–168.
- Ullmann G. M. *Macromolecular Electrostatics*. — University Heidelberg. — 2004. <http://www.iwr.uni-heidelberg.de/>
- Дерягин Б.В., Чураев Н.В., Муллер В.М. Поверхностные силы. — Москва: Наука, 1985.
- Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Громов П.А., Устинин Д.М., Грачев Е.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Компьютерное моделирование образования комплекса между пластоцианином и цитохромом f в люмене тилакоида // *Биофизика*. — 2008. — Т. 53, № 2. — С. 261–270.
- Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Устинин Д.М., Ризниченко Г.Ю., Грачев Е.А., Рубин А.Б. Многочастичное компьютерное моделирование процессов электронного транспорта в мембране тилакоида // *Биофизика*. — 2007. — Т. 52, № 3. — С. 492–502.



- Коваленко И.Б., Устинин Д.М., Грачев Н.Е., Кренделева Т.Е., Кукарских Г.П., Тимофеев К.Н., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Экспериментальное и теоретическое исследование процессов циклического электронного транспорта вокруг фотосистемы 1 // *Биофизика*. — 2003. — Т. 48, № 4. — С. 656–665.
- Мокроносов А.Т., Гавриленко В.Ф. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты. — Москва: Издательство Московского университета, 1992.

### **SIMULATION OF ELECTROSTATIC INTERACTIONS OF PLASTOCYANIN WITH THYLAKOID MEMBRANE AND TRANSMEMBRANE PROTEIN COMPLEXES**

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

*The paper is devoted to design of the method of electrostatic interaction of protein plastocyanin with thylakoid membrane and transmembrane protein complexes. Using Poisson-Boltzmann equation we calculated electrostatic potentials of the thylakoid membrane and the proteins involved in electron transfer at different values of the ionic strength.*