

## МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ ПЛАСТОЦИАНИНА И ЦИТОХРОМА $f$ В РАСТВОРЕ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИОННОЙ СИЛЫ И pH СРЕДЫ

Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Громов П. А., Грачев Е. А.,  
Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б.

(Россия, Москва)

*Работа посвящена компьютерной имитационной модели диффузии и взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома  $f$  в растворе. Модель является многочастичной и позволяет моделировать несколько сотен белков в растворе. С помощью данной модели мы изучали кинетические характеристики образования комплекса пластоцианин-цитохром  $f$  для мутантов пластоцианина для различных значений pH и ионной силы раствора.*

Пластоцианин и цитохром  $f$  — небольшие белки, участвующие в переносе электронов в цепи электронного транспорта при фотосинтезе. Пластоцианин является подвижным белком, цитохром  $f$  представляет собой часть цитохромного  $b_6-f$ -комплекса. Экспериментально взаимодействие  $P_680$  и  $cyt\ f$  изучают на выделенных белках в растворе. Измеряется бимолекулярная константа скорости взаимодействия этих белков, а также зависимость этой константы от ионной силы, pH раствора, различных мутаций белков.

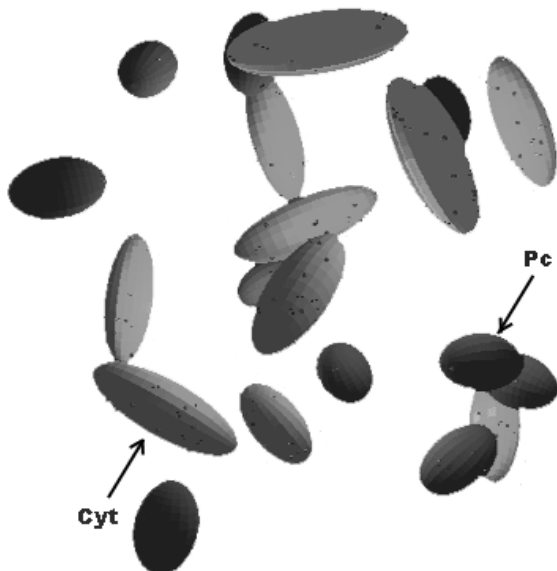
Известно, что электростатические взаимодействия играют ключевую роль при связывании пластоцианина и цитохрома  $f$ : благодаря наличию электростатических сил притяжения и отталкивания диффузия пластоцианина и цитохрома  $f$  имеет направленный характер, молекулы ориентируются в электрическом поле.

В предыдущей работе [6] описаны основы разработанного нами метода прямого компьютерного моделирования диффузии

и взаимодействия белков — подвижных переносчиков электрона. Этот метод применен для построения компьютерной модели взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f в растворе. В данной работе с помощью построенной модели мы изучаем влияние ионной силы и pH раствора на константу скорости взаимодействия белков.

### **Описание прямой модели**

Модельная сцена представляет собой трехмерный реакционный объем, имеет кубическую форму, в нем диффундируют молекулы пластоцианина и цитохрома f (рис. 1).



**Рис. 1.** Визуализация модельной сцены прямой модели взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f в растворе. Молекулы белков изображены с помощью эллипсоидов вращения

В модели молекулы пластоцианина рассматриваются как броуновские частицы, совершающие поступательное и враща-

тельное движение в вязкой среде под действием случайной силы, возникающей из-за столкновений с молекулами среды, и внешней электростатической силы. Для описания такого процесса используется уравнение Ланжевена, описывающее изменение каждой координаты со временем под действием случайной и электростатической сил.

Уравнение Ланжевена для поступательного движения имеет вид:

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

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

Уравнение Ланжевена для вращательного движения:

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

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

Для упрощения расчетов коэффициентов вязкого трения в модели молекулы пластоцианина и цитохрома *f* представлялись как эллипсоиды вращения. Трехмерная модель молекулы строилась по данным Protein Data Bank. Оси и размеры эллипсоидов выбирались таким образом, чтобы момент инерции относительно оси вращения был минимальным. Получившиеся эллипсоиды вращения хорошо описывают форму рассматриваемых объектов.

Коэффициенты вязкого трения для эллипсоида вращения при движении вдоль осей эллипсоида определяются по формулам, приведенным в предыдущей работе [6].

### **Взаимодействие белков**

Модель взаимодействия белков — переносчиков электрона включает в себя электростатическое взаимодействие, столкновения и стыковку молекул с последующей передачей электрона.

При расчете столкновений белков использовалось описание формы белков с помощью набора сфер. Геометрическая интерпретация молекулы с помощью небольшого количества (10–50) сфер, с одной стороны, обеспечивает достаточно реалистичное представление поверхности молекулы для расчета столкновений с другими молекулами, а с другой стороны приемлемое время счета, так как сфер мало (на два порядка меньше, чем атомов) и рассчитать геометрическое пересечение набора сфер просто — достаточно знать их радиусы и координаты центров.

Электростатическое взаимодействие играет ключевую роль в процессах связывания (докинга) белков [3; 4; 7]. Заряженные аминокислотные остатки и парциальные заряды белков создают вокруг них неоднородное электрическое поле. В нашей модели белок считается областью с диэлектрической проницаемостью  $\epsilon = 2$  с пространственно-распределенными фиксированными зарядами. Раствор считается областью с диэлектрической проницаемостью  $\epsilon = 80$  с мобильными зарядами (ионами).

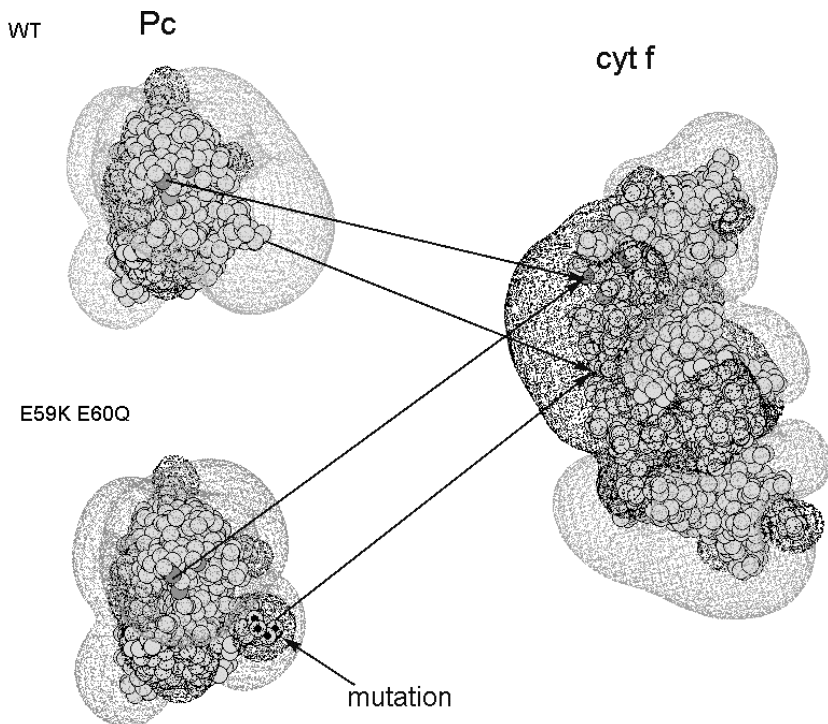
При значительных расстояниях между белками (больше 100 Å) электростатические взаимодействия очень слабы из-за экранирования электрического поля молекулами воды. Поэтому в модели электростатическое взаимодействие между белками учитывается только при сближении их на некоторое расстояние, которое мы назвали расстоянием электростатического взаимодействия.

В модели в некоторой прямоугольной трехмерной области вокруг каждого белка (в окисленном и восстановленном состояниях) рассчитывается значение потенциала электрического поля

для заданной ионной силы и рН раствора. Размер области зависит от расстояния взаимодействия и выбирается автоматически таким, чтобы возможно было рассчитать взаимодействие белков внутри расстояния взаимодействия. В этой области задается прямоугольная трехмерная сетка с шагом 2 Å. Ячейкам этой сетки присваиваются значения заряда, диэлектрической проницаемости и ионной силы. Диэлектрическая проницаемость ячеек, полностью находящихся внутри белка, считалась равной 2; находящихся в окружающем растворе — 80; на границе белок — раствор — 40; значение ионной силы внутри белка считается равным нулю. На рис. 2 изображены белки пластоцианин и цитохром f с эквипотенциальными поверхностями вокруг них.

### **Результаты прямого моделирования**

В прямой модели молекулы пластоцианина и цитохрома f совершают хаотическое броуновское движение. В результате броуновского движения может происходить сближение двух или большего количества белков на расстояние электростатического взаимодействия. При этом белки ориентируются в суммарном электрическом поле других белков и могут занять выгодную позицию для связывания (докинга). В модели такое занятие белком выгодной для связывания позиции означает, что расстояния между взаимодействующими частями молекул становятся меньше некоторых величин, являющихся параметрами модели. В модели в качестве взаимодействующих частей мы выбрали пять пар аминокислотных остатков, находящихся в непосредственном контакте при связывании. Если оказывалось, что в процессе хаотического броуновского движения данные пять расстояний меньше заданных параметров модели, то это означало, что молекулы достаточно сблизились и имеют подходящую для связывания взаимную ориентацию. Связывание белков, занявших выгодную позицию, происходит в модели с некоторой вероятностью (значение вероятности, равное 0.01, подбиралась таким образом, чтобы вычисленное на модели значение константы совпадало с экспериментальным значением).



**Рис. 2.** Эквипотенциальные поверхности  $-6.5$  мВ (светло-серый) и  $+6.5$  мВ (темно-серый) для восстановленного цитохрома f и окисленного пластоцианина (дикого типа и мутанта E59K/E60Q) при ионной силе 300 мМ,  $\text{pH} = 7$ ,  $\epsilon_{\text{p-ра}} = 80$ . Линии соединяют аминокислотные остатки на поверхностях молекул, которые находятся в непосредственном контакте при докинге

После связывания восстановленная молекула цитохрома f передает электрон на находящийся с ней в комплексе пластоцианин. При этом происходит изменение редокс-состояния молекул. Время передачи электрона в комплексе, вероятность связывания белков и расстояние докинга являются параметрами прямой модели. В модели на каждом шаге подсчитывается суммарное количество восстановленных и окисленных молекул пластоцианина

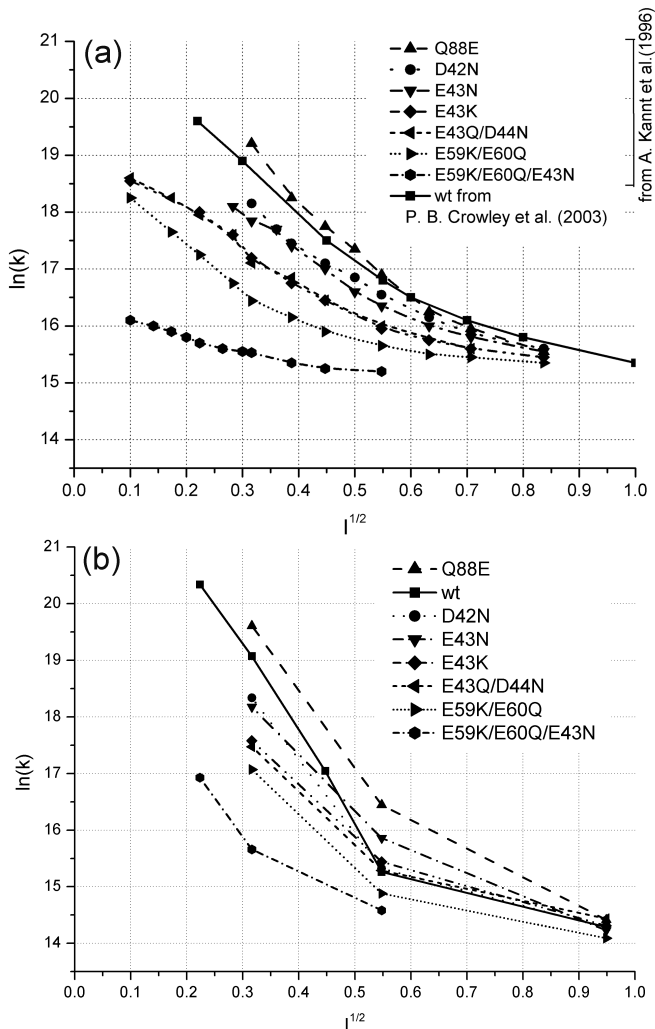
и цитохрома f; таким образом, имеется возможность строить кинетические кривые изменения редокс-состояния белков. Аппроксимируя полученную кинетическую кривую законом действующих масс, получим значение константы скорости реакции второго порядка связывания молекул пластоцианина и цитохрома f.

### ***Зависимости скорости взаимодействия белков от ионной силы и рН раствора***

В работе исследовалась зависимость константы взаимодействия пластоцианина и цитохрома f от ионной силы в растворе. В численном эксперименте изменяли ионную силу от 100 мМ до 1000 мМ. На рис. 3 показаны модельная и экспериментальная [2] зависимости константы скорости реакции взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f в растворе от ионной силы. Вероятность докинга выбиралась равной 0.01, временной шаг 100 пс. Видно хорошее совпадение модельной и экспериментальных кривых. Это указывает на то, что для моделирования взаимодействия пластоцианина и цитохрома f в первом приближении достаточно рассматривать только электростатические взаимодействия и броуновское движение белков, и пренебречь гидрофобными, ван-дер-ваальсовыми и атомными взаимодействиями белков.

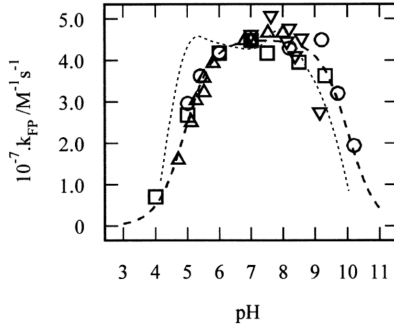
В работе также исследовалась зависимость константы взаимодействия пластоцианина и цитохрома f от рН раствора. Полученная на модели зависимость сравнивалась с экспериментальной зависимостью из работы [1].

Характер модельной зависимости качественно совпадает с экспериментальной. Количественное несоответствие появляется по нескольким причинам. Во-первых, экспериментальные значения константы связывания белков зависят от условий проведения эксперимента, способа выделения белков и т. д. Во-вторых, заряды на белках могут немного различаться в эксперименте и модели, т.к. в модели заряды на аминокислотных остатках выбираются формально в соответствии рК. Также не учитывается изменение конформации белка при изменении рН раствора.



**Рис. 3.** Зависимость логарифма константы скорости связывания белков от квадратного корня из ионной силы раствора для дикого типа и мутантных форм пластоцианина: а — экспериментальные данные из работы [5]; б — результаты моделирования. Константа скорости  $k$  имеет размерность  $(\text{M}\cdot\text{c})^{-1}$ , ионная сила  $I$  имеет размерность М





**Рис. 4.** Зависимость константы скорости связывания белков от рН раствора. Пунктирная линия — усредненная экспериментальная кривая из работ [1; 4], штриховая линия — результаты моделирования

### Заключение

Построена модель взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома *f*, учитывающая сложную геометрию среды, затрудненность диффузии из-за столкновений с белками и белковыми комплексами, а также электростатическое взаимодействие между пластоцианином и цитохромом *f*. Проведена оценка параметров модели по экспериментальным данным. На прямой модели изучено влияние ионной силы раствора на кинетические характеристики взаимодействия пластоцианина и цитохрома *f*. Модель корректно описывает зависимость бимолекулярной константы связывания белков от ионной силы и рН в растворе, что говорит об адекватности описания электростатического взаимодействия белков.

Авторы благодарны Д.М.Устину и И.В.Упову за ценные замечания и внимание к работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 04-07-90278.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Christensen H., Conrad L., Ulstrup J. Effects of NO<sub>2</sub>-modification of Tyr83 on the reactivity of spinach plastocyanin with cytochrome *f* // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1992. — V. 1099. — P. 35–44.

2. Crowley P., Hunter D., Sato K., McFarlane W., Dennison C. The complex of parsley plastocyanin and turnip cytochrome f – a structurally distorted but kinetically functional acidic patch. // *Biochem. J.*— 2003. — V. 1423.
3. Gross E. L. Plastocyanin: structure, location, diffusion and electron transfer mechanisms // *Оxygenic photosynthesis: the light reactions. V. 4.* / Edited by C. F. Yocum. — Dordrecht, Kluwer Academic Publishers, 1996. — P. 413–429.
4. Hope A. B. Electron transfers amongst cytochrome f, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms // *Biochim. Biophys. Acta.* — 2000. — V. 1456. — P. 5–26.
6. Kaant A., Young S., Bendall D. S. The role of acidic residues of plastocyanin in its interaction with cytochrome f // *Biochim. Biophys. Acta*, 1996. — V. 1277. — P. 115–126.
7. Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Громов П. А., Грачев Е. А., Ризниченко Г., Рубин А. Б. Прямое моделирование процессов взаимодействия пластоцианина с цитохромом f в растворе // *Математика. Компьютер. Образование*, 2005. — Т. 12. — № 3. — С. 955–966.
8. Рубин А. Б. *Биофизика.*- Москва, Книжный дом «Университет», 2000.

## **SIMULATION OF PLASTOCYANIN AND CYTOCHROME F PROTEINS INTERACTION IN SOLUTION AT VARIOUS IONIC STRENGTH AND pH**

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

(Russia, Moscow)

*The paper describes a computer 3D simulation model of diffusion and interaction of proteins plastocyanin and cytochrome f in solution. The model is multiparticle, it can describe the interaction of several hundreds of proteins. Using this model we studied kinetic characteristics of plastocyanin-cytochrome f complex formation for plastocyanin mutants at a variety of pH and of ionic strength values.*