

ПРЯМОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПЛАСТОЦИАНИНА С ЦИТОХРОМОМ f В РАСТВОРЕ

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

(Россия, Москва)

Работа посвящена разработке метода прямого компьютерного моделирования диффузии белков-подвижных переносчиков электрона и их взаимодействия с другими белками и белковыми комплексами в трехмерном пространстве. Метод является развитием метода прямого моделирования электронного транспорта в тилакоидной мембране, описанным ранее в [10, 9]. Построена трехмерная компьютерная модель взаимодействия подвижного переносчика электрона белка пластоцианина с белком цитохромом f (одним из компонентов цитохромного комплекса) в растворе. Построенная модель позволила изучить влияние ионной силы на кинетические характеристики взаимодействия пластоцианина и цитохрома f .

Введение. Необходимость прямого моделирования взаимодействия P_680 и комплексов. В зеленых растениях и водорослях первичные процессы фотосинтеза (поглощение кванта света и разделение зарядов в фотосинтетических реакционных центрах) и последующий транспорт электронов и протонов с образованием градиента протонов и синтезом АТФ происходят в фотосинтетической мембране хлоропластов. В мембрану встроены белковые комплексы фотосистемы 1, фотосистемы 2, цитохромный b_6f комплекс и АТФ-синтаза. Перенос электронов между фотосистемой 1 и цитохромным b_6f комплексом осуществляет подвижный переносчик пластоцианин. Пластоцианин является небольшим белком, который диффундирует в люмене — узком замкнутом пространстве между тилакоидными мембранами (рис. 1).

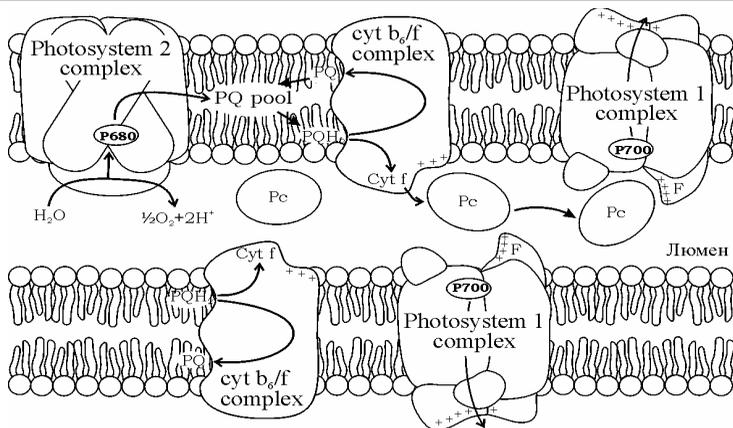


Рис. 1. Схема фотосинтетического электронного транспорта. Показаны две тилакоидные мембраны и люминальное пространство между ними. В мембранах встроены мультиферментные комплексы фотосистема 1, фотосистема 2, цитохромный b_6/f комплекс. В люминальном пространстве диффундирует белок пластоцианин (Pc), в мембране – пластохинон (PQ). Стрелками изображен транспорт электронов

Молекулы пластоцианина окисляют цитохром f и восстанавливают реакционный центр фотосистемы 1, диффундируя в люминальном пространстве на довольно большие расстояния (сотни нм) и перенося электроны между гранальными и стромальными областями в тилакоидах [11, 4, 3]. В нативном хлоропласте толщина люмена (4–10 нм [6]) сравнима с размерами пластоцианина (40x28x30 Å). Поэтому в люмене диффузия пластоцианина сильно затруднена выступающими частями трансмембранных мультиферментных комплексов и другими молекулами пластоцианина [5]. Известно, что электростатические взаимодействия играют ключевую роль при связывании пластоцианина с мультиферментными комплексами: благодаря наличию электростатических сил притяжения и отталкивания диффузия пластоцианина к сайту связывания с белковым комплексом имеет направленный характер, а молекула пластоцианина ориентируется в электрическом поле комплекса.

В связи с этим представляется целесообразным построение модели переноса электрона пластоцианином в люмене, которая, с одной стороны, учитывает сложную геометрию люминального пространства, а с другой стороны достаточно подробно описывает электростатические взаимодействия белков — участников электронного транспорта.

В данной работе мы разработали метод прямого компьютерного моделирования диффузии и взаимодействия белков-подвижных переносчиков электрона и белковых комплексов в сложном трехмерном пространстве (например, люмене тилакоида). Этот метод применен для построения компьютерной модели взаимодействия подвижного переносчика электрона белка пластоцианина с белком цитохромом *f* (одним из компонентов цитохромного комплекса) в растворе. В настоящем методе взаимодействующие молекулы представляются как твердые тела с определенным распределением зарядов на них. Движение молекул осуществляется под действием стохастической броуновской силы и электростатических сил взаимодействия между молекулами. Метод является развитием метода прямого моделирования электронного транспорта в тилакоидной мембране, описанным ранее в [10].

Описание прямой модели. Модельная сцена. В модели мы ставили перед собой задачу описания зависимости константы взаимодействия P_s и $\text{сyt } f$ от ионной силы в растворе, поэтому модельная сцена представляет собой трехмерный реакционный объем, имеющий кубическую форму, в нем диффундируют молекулы пластоцианина и цитохрома *f* (рис. 2).

Движение подвижных переносчиков. В модели молекулы пластоцианина рассматриваются как броуновские частицы, совершающие поступательное и вращательное движение в вязкой среде под действием случайной силы, возникающей из-за столкновений с молекулами среды, и внешней электростатической силы. Как показано в [8], для описания такого процесса можно использовать уравнение Ланжевена, описывающее изменение каждой координаты со временем под действием случайной и внешней сил.

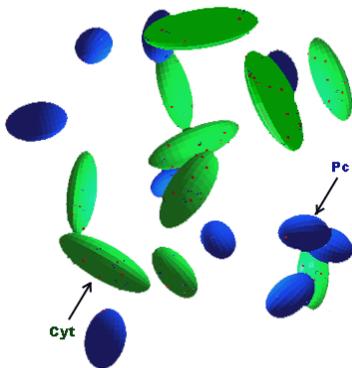


Рис. 2. Визуализация модельной сцены прямой модели взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома *f* в растворе. Молекулы белков изображены с помощью эллипсоидов вращения

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

Для упрощения расчетов коэффициентов вязкого трения в модели молекулы пластоцианина и цитохрома *f* представлялись как эллипсоиды вращения с осями $2a$, $2b$ и $2c$ ($2a$ — ось вращения, $b = c$). Трехмерная модель молекулы строилась по данным Protein Data Bank. Оси и размеры эллипсоидов выбирались таким образом, чтобы момент инерции относительно оси вращения (оси $2a$) был минимальным и моменты инерции исходной молекулы и соответствующего ей эллипсоида совпадали при условии однородной плотности эллипсоида. Получившиеся эллипсоиды вращения хорошо описывают форму рассматриваемых объектов (рис. 3).

Уравнение Ланжевена для поступательного движения имеет вид:

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

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

Уравнение Ланжевена для вращательного движения:

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

Коэффициенты вязкого трения для эллипсоида вращения при движении вдоль осей эллипсоида определяются по формулам [1]:

$$\xi_{tr}^a = \frac{8\pi\eta R \cdot (p^2 - 1)^{3/2}}{\sqrt[3]{p} \cdot [(2p^2 - 1) \cdot \ln(p + \sqrt{p^2 - 1}) - p \cdot \sqrt{p^2 - 1}]},$$

$$\xi_{tr}^b = \frac{16\pi\eta R \cdot (p^2 - 1)^{3/2}}{\sqrt[3]{p} \cdot [(2p^2 - 3) \cdot \ln(p + \sqrt{p^2 - 1}) + p \cdot \sqrt{p^2 - 1}]},$$

$$\xi_{rot}^a = \frac{16\pi\eta R^3 \cdot (p^2 - 1)^{3/2}}{3p \cdot [p \cdot \sqrt{p^2 - 1} - \ln(p + \sqrt{p^2 - 1})]},$$

$$\xi_{rot}^b = \frac{16\pi\eta R^3 \cdot (p^2 - 1)^{3/2} (p^2 + 1)}{3p \cdot [(2p^2 - 1) \cdot \ln(p + \sqrt{p^2 - 1}) - p \cdot \sqrt{p^2 - 1}]}$$

Здесь ξ_{tr}^a , ξ_{tr}^b и ξ_{rot}^a , ξ_{rot}^b — коэффициенты трения относительно осей a и b для поступательного и вращательного движения, соответственно, η — вязкость среды, $2a$ — ось вращения, $b = c$, $p = a/b$, $R = \sqrt[3]{a * b * b}$.

Для описания рассматриваемой области моделирования (модельной сцены) задается ортогональная система координат модельной сцены. На границах области моделирования используются зеркальные граничные условия. С каждым объектом модельной сцены (т.е. с белками — подвижными переносчиками электрона) связывается отдельная (собственная) система координат. Собственная система координат любого объекта совмещена с осями соответствующего эллипсоида. Выбор такой системы координат обусловлен тем, что в ней известны коэффициенты вязкого трения для эллипсоида. Уравнение Ланжевена решается численно в собственной ортогональной системе координат, совмещенной с осями эллипсоида: на каждом шаге в модели вычисляются смещения эллипсоида вдоль его осей и повороты вокруг его осей под действием броуновской силы.

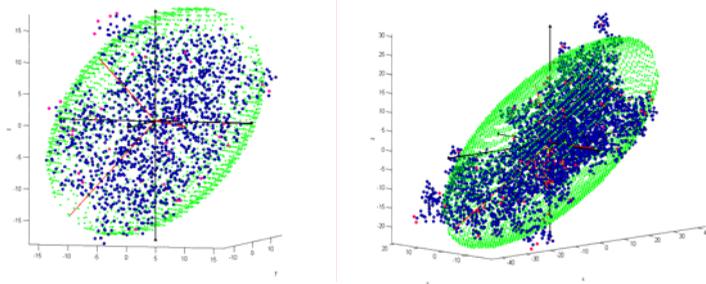


Рис. 3. Аппроксимация молекул пластоцианина (слева) и цитохрома f (справа) эллипсоидами вращения

Взаимодействие белков. Описание формы белков, столкновений. В модели взаимодействие белков-переносчиков электрона включает в себя электростатическое взаимодействие, столкновения и стыковку молекул (докинг) с последующей передачей электрона. При расчете столкновений белков использовалось описание формы белков с помощью набора сфер. Для того чтобы проверить факт столкновения двух молекул, необходимо определить, пересекаются соответствующие им наборы сфер или нет. 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 проверить столкновение двух сфер просто — достаточно знать их радиусы и координаты центров.

Электростатическое взаимодействие белков. Электростатическое взаимодействие играет ключевую роль в процессах связывания (докинга) белков [3, 5, 12]. Заряженные аминокислотные остатки и парциальные заряды белков создают вокруг них неоднородное электрическое поле. Если белок находится далеко от других белков, то его движение определяется только свободной броуновской диффузией. При приближении к другим белкам и комплексам белок ориентируется в электрическом по-

ле, создаваемом этими белками, и может занять выгодную позицию для последующего связывания.

В нашей модели белок считается областью с диэлектрической проницаемостью $\varepsilon = 2$ с пространственно-распределенными фиксированными зарядами. Раствор считается областью с диэлектрической проницаемостью $\varepsilon = 80$ с мобильными зарядами (ионами). При значительных расстояниях между белками (больше 100 \AA) 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.

Для описания электростатических взаимодействий в модели необходимо рассчитать электростатическую силу и ее момент, действующие на белок со стороны других белков, находящихся ближе расстояния электростатического взаимодействия. Для этого в модели в некоторой прямоугольной трехмерной области вокруг каждого белка (в окисленном и восстановленном состояниях) заранее 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 любых белков внутри расстояния взаимодействия. В этой области задается прямоугольная трехмерная сетка с шагом 2 \AA . Ячейкам этой сетки присваиваются значения заряда, диэлектрической проницаемости и ионной силы. Значения зарядов на атомах вычислялось в программе MacroDox. 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.

Потенциал в ячейках сетки рассчитывается по итерационной формуле (1), которая получена из линейризованного уравнения Пуассона-Больцмана (2) [7]: потенциал в данной ячейке на данном шаге вычисляется в зависимости от потенциалов в соседних

ячейках на предыдущем шаге и суммарного заряда данной ячейки. На n -ной итерации значение потенциала в ячейке

$$\varphi_0 = \frac{\left(\sum_{i=1}^6 h\varepsilon_i \varphi_i\right) + 4\pi q_0}{\left(\sum_{i=1}^6 h\varepsilon_i\right) + h^3 \kappa_0^2}, \quad \kappa^2 = \frac{8\pi N_A e^2 I}{k_B T} \quad \text{и} \quad I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^K c_i^{\text{bulk}} Z_i^2$$

$$\nabla \varepsilon \nabla \varphi = -4\pi \rho + \kappa^2 \varphi \quad (2)$$

Здесь φ — потенциал, ε — диэлектрическая проницаемость, ρ — плотность зарядов в белке, c_i^{bulk} — концентрация i -иона в растворе, Z_i — заряд i -иона, e — заряд электрона, T — температура в К, N_A — число Авогадро, I — ионная сила раствора, h — сторона ячейки сетки.

На рис. 4 изображен белок пластоцианин и эквипотенциальные поверхности вокруг него. Потенциал рассчитывался по описанной выше процедуре.

Таким образом, для каждого типа объектов (белок в восстановленном и окисленном состояниях) в некоторой области вокруг объекта известно значение потенциала электрического поля. Теперь для нахождения силы и ее момента, действующих на отдельный заряд в белке, необходимо вычислить градиент потенциала, создаваемого другими белками, в той точке, где находится заряд. По известному градиенту поля и величине заряда вычисляется сила, действующая на заряд. Для того чтобы рассчитать силу и момент, действующие в целом на молекулу, надо просуммировать силу и момент, действующие на каждый из зарядов данной молекулы.

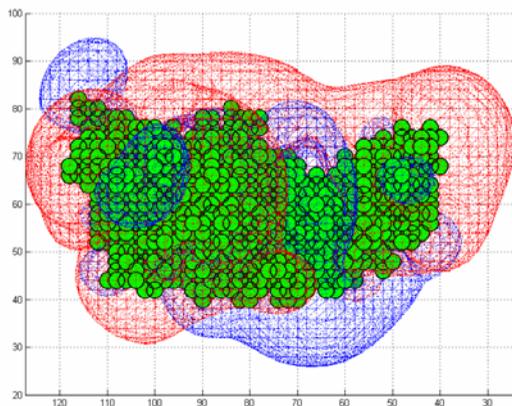


Рис. 4. Эквипотенциальные поверхности -6.5 мВ и $+6.5$ мВ для восстановленного цитохрома f при ионной силе 300 мМ, pH = 7, $\epsilon_{p-pa} = 80$

Результаты прямого моделирования. Оценка параметров модели. Связывание белков, занявших выгодную позицию, происходит в модели с некоторой вероятностью. После связывания восстановленная молекула цитохрома f передает электрон на находящийся с ней в комплексе пластоцианин за некоторое время. 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. Положив вероятность докинга равной 1, — расстояние докинга. Оказывается, что экспериментальное [5] и полученное на прямой модели значения бимолекулярной константы связывания пластоцианина и цитохрома f совпадают при расстоянии докинга 25 Å.

Вычислительный эксперимент по зависимости бимолекулярной константы взаимодействия белков от ионной силы в растворе. 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. 5 показаны модельная и экспериментальная [2] зависимости константы скорости реакции взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f в растворе от ионной силы. Вероятность докинга выбиралась равной 0.02, временной шаг 100 пс, радиус докинга 14 Å. Видно хорошее совпадение модельной и экспериментальных кривых.

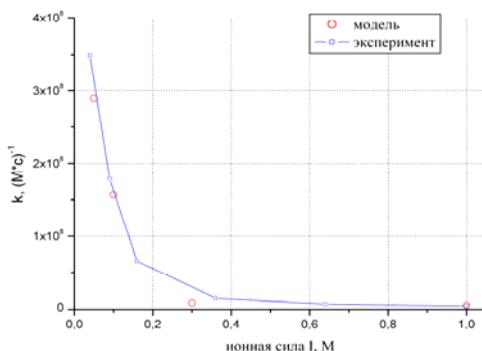


Рис. 5. Зависимость константы скорости реакции взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f в растворе от ионной силы. Кружки — модельные значения, линия — экспериментальные из работы [2]

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 в растворе, что говорит об адекватности описания электростатического взаимодействия белков. В дальнейшем планируется применить разрабатываемый метод к описанию переноса электрона между фотосистемой 1 и цитохромным комплексом в люмене тилакоида.

Благодарности. Авторы благодарны И.В. Упорову за ценные замечания и внимание к работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты № 03-04-49048 и № 04-07-90278.

Список литературы:

1. Bloomfield V.A. Chapter 1. Survey of Biomolecular Hydrodynamics // On-Line Biophysics Textbook. Separations and Hydrodynamics. / Edited by T. M. Schuster, 2000.
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 // Biochemistry & Molecular Biology of Plants. V. V. / Edited by R. Jones, Kluwer Academic Publishers, 1996. P.413–429.
4. Hope A.B. The chloroplast cytochrome bf complex: a critical focus on function // Biochim. Biophys. Acta. 1993. V.1143. P.1–22.
5. 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. Mehta M., Sarafis V., Critchley C. Thylakoid membrane architecture // Aust. J. Plant Physiol. 1999. V.26. P.709–716.
7. Ullmann G.M. Macromolecular Electrostatics — University Heidelberg, 2004.
8. Дой, Эдвардс Динамическая теория полимеров — М.: Мир, 1999.
9. Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Джалал К.М., Устинин Д.М., Ризниченко Г.Ю., Грачев Е.А., Рубин А.Б. Прямое моделирование процессов взаимодействия пластоцианина с фотосистемой 1 в фотосинтетической мембране // Сб. научных

- трудов "Математика. Компьютер. Образование". — М.–Ижевск: Изд-во "Регулярная и хаотическая динамика", 2004.
10. 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.
11. Мокроносов А.Т., Гавриленко В.Ф. Фотосинтез. Физиолого-экологические и биохимические аспекты — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1992.
12. Рубин А. Б. Биофизика — М.: Книжный дом "Университет", 2000.

**DIRECT SIMULATION OF INTERACTION OF THE
PROTEINS
PLASTOCYANIN AND CYTOCHROME F**

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

(Russia, Moscow)

The paper is devoted to a novel approach for direct computer simulation of protein diffusion and interaction in a 3D space. The interacting molecules are considered as rigid bodies with spatial fixed partial charges. We consider 3D translational and rotational Brownian motion of proteins and electrostatic interactions. This approach is a further development of the method of direct 3D simulation of electron transport in photosynthetic membrane [1, 2]. We built a 3D computer model for the interaction of mobile electron carrier protein plastocyanin with cytochrome f, one of the subunits of cytochrome bf complex, in solution. Using this model we studied the dependence of the kinetic parameters of protein-protein interactions on the ionic strength.