

На правах рукописи

АБАТУРОВА АННА МИХАЙЛОВНА

**Изучение механизмов взаимодействия
компонентов фотосинтетической цепи транспорта
электрона методами компьютерного
моделирования**

Специальность: 03.00.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва - 2008

**Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.**

Научный руководитель:

Доктор физико-математических наук, профессор

Г.Ю. Ризниченко

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук

А.А. Полежаев

Доктор биологических наук

М.Д. Мамедов

Ведущая организация:

Институт математических проблем биологии РАН

Защита диссертации состоится 19 февраля 2009 г. в 14:00 на заседании Диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

С диссертаций можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан __ января 2009 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 501.001.96

доктор биологических наук, профессор

Т.Е. Кренделева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Изучение механизмов взаимодействия белков и мульти-белковых комплексов, участвующих в реакциях первичных процессов фотосинтеза, и механизмов их регуляции представляет большой интерес для современной биологии. Для исследования этих процессов используют методы направленного мутагенеза, исследуют протекание реакций в присутствии различных ингибиторов и солей, при различной ионной силе, рН раствора, температуре, строят математические модели.

Исследования с помощью направленного мутагенеза дороги и требуют больших затрат времени. Поэтому большой интерес представляют модели, описывающие взаимодействия белков. С одной стороны, расчеты на модели не должны занимать много времени, с другой – достаточно реалистично описывать происходящие процессы.

В реакциях первичных процессов фотосинтеза участвуют мембранные комплексы фотосинтетических реакционных центров – фотосистемы 1 (PSI) и фотосистемы 2 (PSII), цитохромный b_6f комплекс и подвижные белки переносчики – пластоцианин и ферредоксин у высших растений и их аналоги у цианобактерий и некоторых водорослей – цитохром c_6 и флаводоксин. Небольшие гидрофобные молекулы пластохинона осуществляют транспорт электрона в мембране.

В кинетических моделях первичных процессов фотосинтеза (Рубин и Шинкарев 1984; Рубин, Ризниченко и др. 1987; Ризниченко 1991) перенос электрона внутри мембранных комплексов описывается с помощью вероятностей состояний комплексов, а стадии транспорта электрона подвижными переносчиками – с помощью закона действующих масс. Эти модели не могут учесть геометрию люминального пространства, в котором происходит транспорт электронов пластоцианином от цитохромного b_6f

комплекса к PSI. Многочастичные модели процессов фотосинтеза (Коваленко, Абатурова и др. 2007), учитывающие особенности диффузионного пространства для подвижных переносчиков и неоднородность распределения комплексов в мембране, хорошо описывают эффекты, связанные с геометрией. Они базируются на экспериментальных кинетических данных и данных о характере распределения комплексов в мембране. Однако эти модели не учитывают электростатические взаимодействия белков и их сложную поверхность. Есть работы по броуновской динамике взаимодействия фотосинтетических белков (Pearson and Gross 1998; Rienzo, Gabdoulline et al. 2001; Gross and Pearson 2003; Haddadian and Gross 2005), учитывающие реальную форму белков и электростатические взаимодействия. Однако в этих работах моделируется взаимодействие только пары белков, не рассматриваются ансамбли взаимодействующих макромолекул и не учитывается форма реакционного объема.

В данной работе метод многочастичного прямого моделирования объединен с методом броуновской динамики и применен к описанию взаимодействия белков в фотосинтетических процессах. Разработанная нами модель учитывает сложную геометрию люминального пространства, электростатические взаимодействия белков и их форму, а также позволяет получать кинетические кривые связывания белков. В модели используются современные данные о структуре фотосинтетических белков. Возможность построения такой модели появилась в последние годы благодаря появлению данных о структуре исследуемых белков и развитию вычислительных ресурсов компьютеров. Метод может быть применен для моделирования взаимодействия белков различной природы.

Цели и задачи работы

Целью работы является изучение с помощью многочастичного компьютерного моделирования роли электростатических взаимодействий, формы фотосинтетических электрон-транспортных белков и геометрии люминального пространства в формировании кинетики связывания белков.

Были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод многочастичного компьютерного моделирования для описания взаимодействия фотосинтетических электрон-транспортных белков с учетом электростатических сил и сложной формы белков.
2. Построить модели взаимодействия в растворе следующих фотосинтетических белков: пластоцианина и цитохрома f , пластоцианина и комплекса PSI, флаводоксина и комплекса PSI.
3. Оценить параметры прямых многочастичных моделей (вероятности и расстояния связывания) с использованием экспериментальных данных по взаимодействию белков в растворе.
4. Построить модель взаимодействия пластоцианина–цитохрома f в люмене тилакоида.
5. Изучить влияние электростатических взаимодействий и геометрии на кинетические характеристики процессов. Сравнить полученный эффект с экспериментальными данными.

Научная новизна

Впервые построена многочастичная компьютерная модель броуновской динамики фотосинтетических белков, учитывающая электростатические взаимодействия, сложную форму белков и геометрию люминального пространства. Разработан метод аппроксимации поверхности белков набором сфер. Проведена идентификация параметров отдельных стадий процессов по экспериментальным данным.

На модели показана важная роль электростатических взаимодействий в связывании пластоцианина с цитохромом f , пластоцианина с фотосистемой 1,

фотосистемы 1 с флаводоксином. На модели впервые показано, что изменение размеров люминального пространства дает возможность регуляции скорости связывания пластоцианина с цитохромом f и фотосистемой 1.

Практическая значимость

Результаты исследования существенно углубляют современные знания о роли электростатических взаимодействий и геометрических ограничений реакционного пространства в связывании подвижных белков переносчиков с мультибелковыми фотосинтетическими мембранными комплексами. Построенная модель позволяет изучать влияние мутаций белков на эффективность процессов фотосинтеза, что имеет большое практическое значение для оптимизации экспериментального поиска мутантов для повышения эффективности выхода фотосинтеза. Данная модель может быть использована для изучения взаимодействия белков различной природы, как в растворе, так и в реакционном объеме сложной формы и с гетерогенным распределением реагентов. Модель будет использована при проведении практикумов по биофизике (темы – «Биологические мембраны» и «Математическое моделирование биологических процессов»).

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на: 13-той – 15-той Международных конференциях «Математика. Компьютер. Образование», Дубна, 2006, 2008, Пущино, 2007; Международной конференции «Photosynthesis in the Post-Genomic Era: Structure and Function of Photosystems», Пущино, 2006; Международном семинаре «Trends in Transient Interactions between Biological Macromolecules», Севилья, Испания, 2007; 16-ом Международном симпозиуме «Flavins and Flavoproteins», Хака, Испания, 2008; семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 16 работ, из них 2 – в журнале, рекомендованном ВАК для соискателей ученых степеней, 1 – в зарубежном рецензируемом журнале, 4 – в сборниках научных трудов международных конференций и 9 тезисов – в сборниках докладов международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, содержащих описание методов и результатов работы, выводов, приложения, списка литературы из __ наименований. Объем диссертации __ страниц, __ рисунка и _ таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность темы диссертации, сформулированы цели и задачи работы, отражены научная новизна и практическая значимость результатов.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

В первой главе представлен обзор литературы по структуре и функциям белковых компонентов электрон-транспортной цепи фотосинтеза, в частности – мультибелковых мембранных комплексов – фотосистемы 1 и цитохромного b_6f комплекса, белков – подвижных переносчиков электрона – пластоцианина и флаводоксина, и по строению и организации тилакоидных мембран в хлоропласте. Проведен обзор работ по экспериментальным данным о кинетике транспорта электрона при фотосинтезе. Рассматриваются существующие подходы по математическому моделированию взаимодействия компонентов фотосинтетической цепи транспорта электрона, их преимущества и недостатки.

ГЛАВА 2. Многочастичная модель броуновской динамики фотосинтетических белков

Во второй главе подробно описан подход к моделированию взаимодействия белков, который был разработан в ходе выполнения диссертационной работы и является объединением методов многочастичного прямого моделирования и броуновской динамики. Проведены подготовительные расчеты для построения моделей взаимодействия белков пластоцианина и флаводоксина с фотосистемой 1 и цитохромным b_6f комплексом. В частности, рассчитаны электростатические потенциалы вокруг белков, белки аппроксимированы эллипсоидами вращения для расчета коэффициентов вязкого трения, проведена аппроксимация поверхностей белков наборами сфер для моделирования столкновений.

Наша модель учитывает электростатические взаимодействия белков, сложную форму реакционного пространства и молекул белков, которые рассматриваются как твердые тела (не учитывается их конформационная подвижность). Молекулы белков совершают поступательное и вращательное движение в вязкой среде под действием случайной броуновской силы, возникающей из-за столкновений с молекулами среды, и электростатической силы. Модель является дискретной по времени и пространству.

Для описания процесса движения мы применяем уравнения броуновской динамики. При расчете столкновений белков используется описание формы белков с помощью набора сфер. Влияние растворителя неявно учитывается через диэлектрическую проницаемость, вязкость и ионную силу раствора. Для построения трехмерной модели молекул используются данные из Protein Data Bank.

Модельная сцена представляет собой трехмерный реакционный объем, имеющий форму прямоугольного параллелепипеда, в котором происходит движение молекул белков. Размеры реакционного объема являются параметрами модели. Если размеры параллелепипеда значительно больше размера молекул белков, и молекулы расположены хаотически в

пространстве, то модель может быть использована для моделирования экспериментов на частицах в растворе. При моделировании реакции в люмене тилакоида вдоль двух противоположных границ параллелепипеда располагаются мембраны, при этом расстояние между этими границами должно быть маленьким (порядка 100 Å), а в мембраны встраиваются белковые комплексы – фотосистема 1 и цитохромный b_6f комплекс.

Взаимодействие двух белков – переносчиков электрона – можно разбить на несколько стадий (Gross 1996): (1) хаотическое движение под действием случайной броуновской силы при больших расстояниях между белками; (2) движение под действием электростатической и броуновской сил при сближении белков; (3) образование промежуточного комплекса; (4) конформационная перестройка промежуточного комплекса в комплекс, в котором возможен транспорт электрона; (5) перенос электрона в комплексе с одного белка-реагента на другой. В нашей модели в явном виде рассматривается броуновское движение, электростатические взаимодействия, столкновения и образование предварительного комплекса белков. Конформационные изменения, гидрофобные и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия учтены неявно с помощью параметра вероятности связывания белков.

В нашей модели, как и в моделях броуновской динамики (Ermaк and McCammon 1978), для описания движения белков используется уравнение Ланжевена без инерционного члена, задающее изменение каждой координаты со временем под действием случайной и внешней сил:

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

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.

Для расчета коэффициентов вязкого трения молекулы белков представляли как эллипсоиды вращения. Для эллипсоидов вращения

известны формулы (Perrin 1936), связывающие коэффициенты вязкого трения со значениями длин осей эллипсоидов и вязкостью среды. Оси и размеры эллипсоидов выбираются таким образом, чтобы момент инерции относительно оси вращения был минимальным, а моменты инерции исходной молекулы и соответствующего ей эллипсоида совпадали при условии однородной плотности эллипсоида.

Электростатические взаимодействия играют ключевую роль в процессах связывания (докинга) многих белков (Gross 1996; Норе 2000; Рубин 2000). 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 поле, создаваемом этими белками, и может занять выгодную позицию для последующего связывания. При значительных расстояниях между поверхностями белков (больше 35 Å) электростатические взаимодействия очень слабы из-за экранирования электрического поля молекулами воды и противоионами. На расстоянии 35 Å в растворе с ионной силой 100 мМ экранирование приводит к уменьшению электростатического потенциала в 80 раз по сравнению с раствором без ионов соли (Финкельштейн и Птицин 2002). Поэтому электростатическое взаимодействие между белками учитывается в модели только при сближении их поверхностей на расстояние менее 35 Å, которое мы назвали расстоянием электростатического взаимодействия.

Для описания электростатических взаимодействий необходимо рассчитать электростатическую силу и ее момент, действующие на белок со стороны других белков, находящихся ближе расстояния электростатического взаимодействия. Для этого перед началом моделирования движения белков вокруг каждого белка в прямоугольной трехмерной области заданного размера, разбитой на ячейки (с шагом h), с помощью линеаризованного уравнения Пуассона–Больцмана рассчитывали значение потенциала электрического поля для заданной ионной силы и pH раствора. Белок

считали областью с диэлектрической проницаемостью $\varepsilon = 2$ с пространственно-распределенными фиксированными зарядами. Раствор считали областью с диэлектрической проницаемостью $\varepsilon = 80$ с мобильными зарядами (ионами). На рис. 1 изображены белки пластоцианин и цитохром *f* и рассчитанные эквипотенциальные поверхности вокруг них.

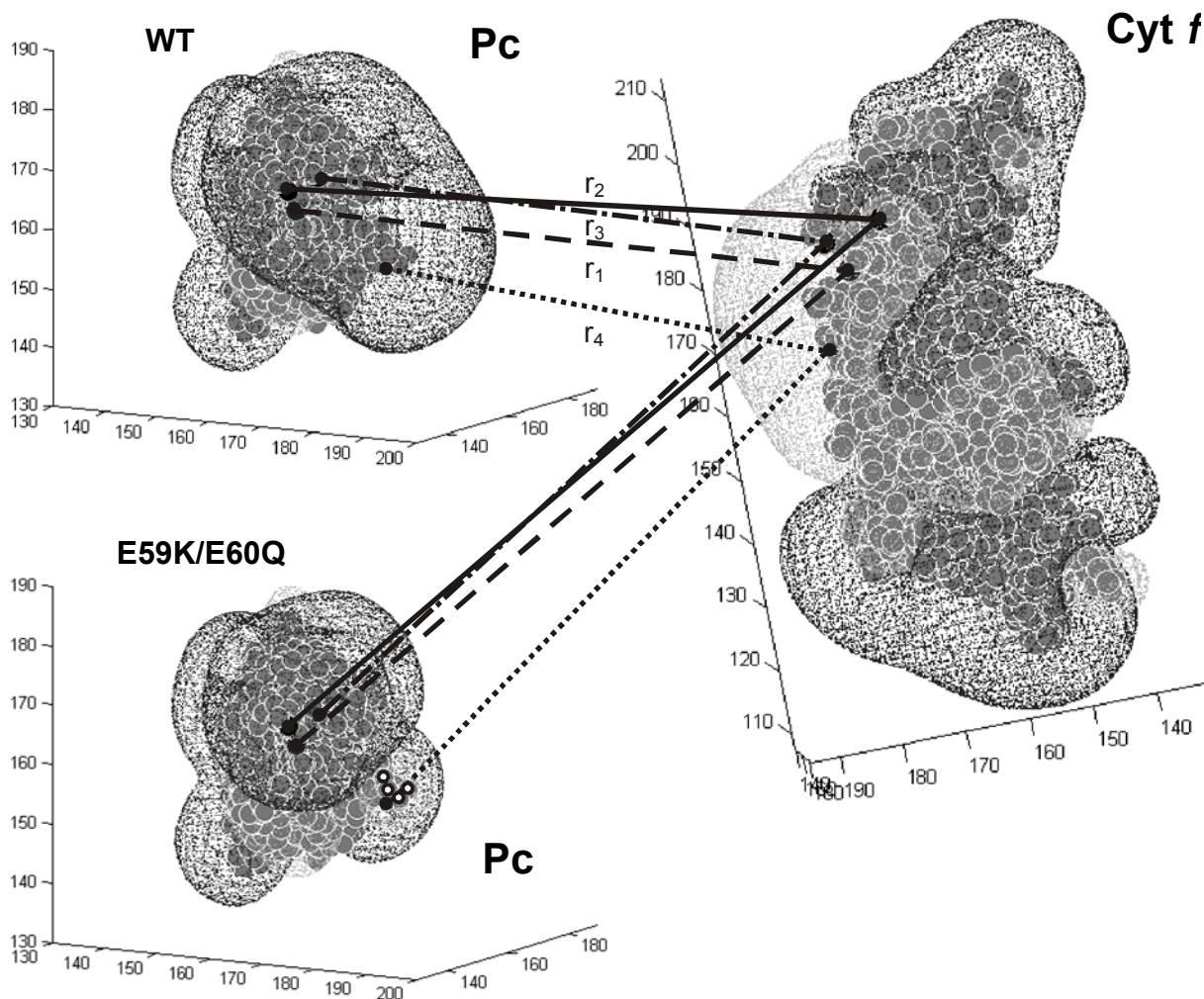


Рис. 1. Эквипотенциальные поверхности -6.5 мВ (темно-серый цвет) и $+6.5$ мВ (светло-серый цвет) вокруг молекул восстановленного цитохрома *f* и окисленного пластоцианина (дикого типа – wt и мутантного E59K/E60Q), рассчитанные по уравнению Пуассона–Больцмана; ионная сила 100 мМ, рН = 7, $\varepsilon_{p-ра} = 80$, $\varepsilon_{белка} = 2$. Аминокислотные остатки Pc и cyt *f*, между которыми в модели измерялось расстояние, соединены линиями. Для мутантного пластоцианина черными окружностями «O» обозначены атомы, отличающиеся зарядами от дикого типа.

При расчете столкновений белков использовали описание формы поверхности белков с помощью набора сфер. Для того, чтобы проверить факт столкновения двух молекул, необходимо определить, пересекаются ли

соответствующие им наборы сфер. Для этого в программе рассчитывается расстояние между центрами сфер и сравнивается с суммой радиусов этих сфер. В диссертации разработан метод автоматической аппроксимации поверхности белка набором сфер. В результате аппроксимации количество сфер получается меньше количества атомов на поверхности белка. Поэтому на проверку столкновения белков при аппроксимации их поверхности набором сфер уходит меньше времени, чем при представлении поверхности белка в виде отдельных атомов.

В результате броуновского движения в модели 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. Занятие белком выгодной для связывания позиции означает, что расстояния между взаимодействующими частями молекул должно быть меньше некоторых расстояний (параметров модели), которые мы называем расстояниями связывания r_i (рис.1).

Последующие процессы образования финального комплекса учтены в модели неявно с помощью параметра вероятности связывания белков: связывание двух белков, расстояния между которыми удовлетворяют расстояниям связывания, происходит с некоторой вероятностью P . Она проверяется на каждом шаге модели: генерируется случайное число от 0 до 1, если оно меньше P , то считается, что комплекс образовался, если больше – то нет. Если комплекс не образовался, то белки могут разойтись или остаться, и на следующем шаге им опять предоставляется возможность образовать комплекс с вероятностью P .

Модель позволяет изучать влияние геометрических свойств системы (расстояния между мембранами и характера распределения комплексов на мембране), ионной силы и распределения зарядов на молекулах, рН, температуры на кинетические характеристики взаимодействия белков.

Модельными параметрами, значения которых нужно подбирать для совпадения результатов моделирования с экспериментом, являются вероятность образования комплекса и расстояния связывания. Другие же параметры модели – шаг по времени и шаг сетки для расчета потенциала – мы оцениваем, исходя из физических принципов, и в дальнейшем не меняем.

В модели на каждом шаге подсчитывается суммарное количество образовавшихся комплексов, таким образом, имеется возможность строить кинетические кривые. Аппроксимируя модельные кинетические кривые законом действующих масс, мы получаем значения констант скорости реакции второго порядка связывания белков и сравниваем их с экспериментальными значениями.

Основным отличием нашей модели от моделей броуновской динамики (Pearson and Gross 1998; Rienzo, Gabdoulline et al. 2001; Gross and Pearson 2003; Haddadian and Gross 2005) является ее многочастичность. Моделируется одновременное взаимодействие большого количества молекул с учетом геометрических особенностей реакционного объема, таким образом учитывается не только взаимодействие двух молекул, но и влияние наличия других молекул и формы реакционного объема на этот процесс. В результате моделирования оценивается не только константа связывания, но и получаются кинетические кривые, которые можно сравнивать напрямую с экспериментальными. На модели можно изучать влияние соотношения концентраций реагентов на кинетику связывания белков и моделировать протекание реакций, отклоняющихся от закона действующих масс.

ГЛАВА 3. Многочастичное компьютерное моделирование взаимодействия пластоцианина и цитохрома f в растворе и люмене тилакоида

В третьей главе построены модели взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f в растворе и люмене тилакоида. Для

построения трехмерной модели молекул использовалась PDB структура их комплекса – 2PCF.

Многочастичное компьютерное моделирование взаимодействия пластоцианина и цитохрома f в растворе

В первой части третьей главы изучены зависимости константы скорости связывания Pc и $cyt\ f$ в растворе от параметров модели – расстояний связывания и вероятности связывания. По экспериментальным данным (Kaant, Young et al. 1996) оценены значения параметров модели для реакции при ионной силе 100 мМ. Получены согласующиеся с экспериментальными зависимости константы связывания Pc и $cyt\ f$ от ионной силы раствора.

Рассматривали реакционный объем кубической формы (рис. 2). В качестве расстояний связывания брали расстояние между атомами Cu и Fe , а также расстояния между четырьмя парами аминокислотных остатков Pc и $cyt\ f$ (рис. 1, таблица 1), которые в комплексе (Ubbink, Ejdebeck et al. 1998) находятся в непосредственном соседстве.

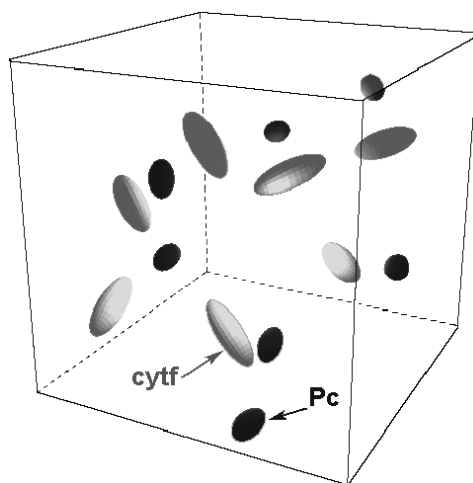


Рис. 2. Визуализация модельной сцены прямой модели взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f в растворе. Молекулы белков изображены с помощью эллипсоидов вращения.

Подбирались значения расстояний связывания и вероятности связывания таким образом, чтобы константы связывания пластоцианина дикого типа и мутантных его форм с цитохромом f соответствовали экспериментальным значениям. В таблице 1 приведены полученные значения расстояний связывания; подобранное значение вероятности связывания равно 0.01, шаг

по времени равен 100 пс. Сравнение модельных значений констант с экспериментальными при ионной силе 100 мМ представлено в таблице 2.

Таблица 1

Расстояния между атомами в комплексе Рс-*cyt f*, определенные методом ЯМР в работе (Ubbink, Ejdebeck et al. 1998) и расстояния, используемые нами в модели в качестве условия образования комплекса.

Аминокислотные остатки Рс и <i>cyt f</i> , расположенные рядом в комплексе Рс- <i>cyt f</i>	Номера и названия атомов, между которыми измеряется расстояние		R, Å расстояние в комплексе (Ubbink, Ejdebeck et al. 1998)	R, Å расстояние в модели
	Рс	<i>cyt f</i>		
D42-R209	591 – OD2	3278 – HH2	4.1	18
E43-K187	607 – HB	2930 – HE	1.34	18
D44-K185	618 – OD2	2895 – HZ	3.56	18
E60-K58	842 – HA	912 – HZ	4.35	25
–	1435 – Cu	3881 – Fe	10.7–11.3	40

Таблица 2

Значения констант скорости реакции Рс с *cyt f* при ионной силе 100 мМ, определенные в работе (Kaant, Young et al. 1996) для различных мутантов Рс при рН=6, и к, полученные нами на модели при значениях расстояний связывания, указанных в таблице 1 и вероятности связывания 0.01.

Название мутации	Изменение заряда на аминокислотных остатках	$k_2, 10^6 (M \cdot c)^{-1}$ из эксперимента	$k_c, 10^6 (M \cdot c)^{-1}$ из модели
wt	–	185 (±20)	198 (±4)
Q88E	0 → -1	220 (±30)	345 (±7)
D42N	-1 → 0	76.5 (±1.5)	94 (±3)
E43N	-1 → 0	56.1 (±1)	80 (±3)
E43K	-1 → +1	29.3 (±0.7)	44 (±2)
E43Q/D44N	-2 → 0	26.9 (±0.6)	40 (±3)
E59K/E60Q	-2 → +1	13.8 (±0.2)	27 (±2)
E59K/E60Q/E43N	-3 → +1	5.56 (±0.01)	6.4 (±0.9)

При оцененных значениях параметров модели мы получили зависимости константы связывания Рс и *cyt f* от ионной силы для дикого и мутантных Рс (рис. 3В). Качественно они совпадают с экспериментальными данными (рис. 3А).

Данные мутации изменяют заряды (таблица 2) и потенциал (рис. 1) вокруг участков молекулы пластоцианина, ответственных за связывание. При

этом облегчается или затрудняется сближение молекул и соответственно увеличивается или уменьшается константа скорости реакции.

Падение константы связывания P_c и $cyt f$ с увеличением ионной силы обусловлено тем, что ионы соли экранируют заряды на белках и понижают силу их электростатического притяжения.

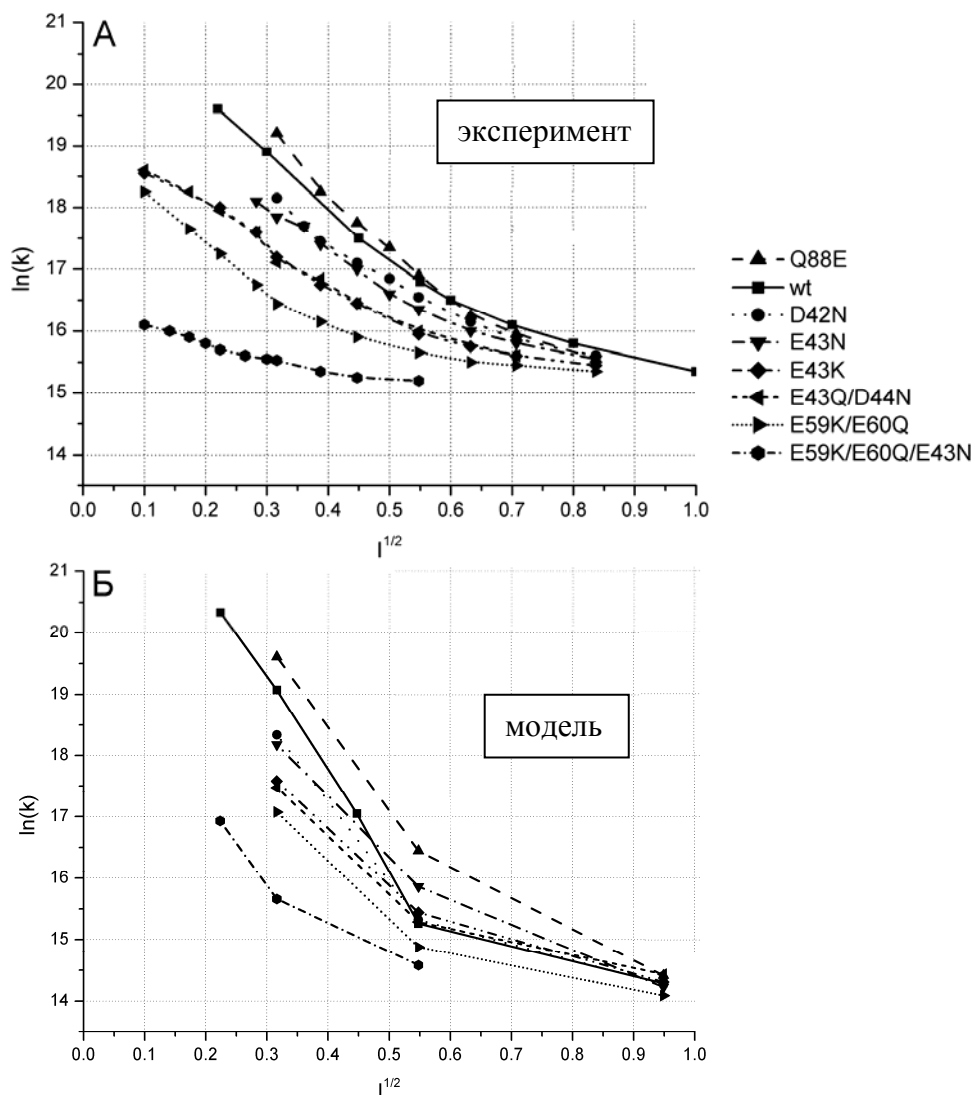


Рис. 3. Зависимость логарифма константы скорости второго порядка k от корня из ионной силы I для реакции различных мутантных и немутантного (wt) P_c с $cyt f$: А – экспериментальные данные из (Kaant, Young et al. 1996) и (P.V. Crowley et al. 2003); Б – результат нашего моделирования (при значениях расстояний связывания, указанных в таблице 1 и вероятности связывания – 0.01). Размерность k в $(M \cdot c)^{-1}$, I – М.

Качественное совпадение модельных и экспериментальных зависимостей бимолекулярной константы связывания белков от ионной силы

в растворе говорит об адекватности описания электростатического взаимодействия белков.

Многочастичное компьютерное моделирование взаимодействия пластоцианина и цитохрома f в люмене

Во второй части третьей главы моделировалась реакция пластоцианина и цитохрома f в люмене тилакоида с использованием оцененных значений параметров модели (расстояний и вероятностей связывания) для образования комплекса Pc и $cyt f$ в растворе. С помощью модели исследовалась зависимость константы связывания белков пластоцианина и цитохрома f от геометрии (длины и ширины) люминального пространства и характера расположения молекул цитохрома f (в люмене и растворе) и молекул пластоцианина (равномерно в люмене или только в стромальной части).

В модели учитывалось наличие мембран, ограничивающих люминальное пространство, молекулы цитохрома f располагались в люмене в соответствии с экспериментальными данными о структуре цитохромного b_6f комплекса, пластоцианин диффундировал под действием случайной и электростатической сил (рис. 4).

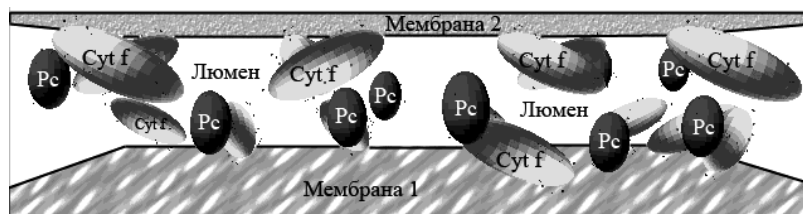


Рис. 4. Визуализация модельной сцены - люмена, ограниченного сверху и снизу тилакоидными мембранами (заштрихованы), и белков пластоцианина и цитохрома f в виде эллипсоидов вращения.

Изучение влияния ширины люминального пространства на константу связывания Pc и $cyt f$

Для моделирования влияния ширины люминального пространства (расстояния между мембранами) на константу скорости реакции образования комплекса Pc и $cyt f$ в люмене тилакоида изменяли расстояние между мембранами от 7 до 200 нм. При этом количество молекул (270 молекул Pc и

270 молекул *cyt f*) и площадь мембран ($322 \times 322 \text{ нм}^2$) оставались постоянными. Таким образом, менялся объем и концентрация молекул. Мы рассматривали два случая: а) молекулы *cyt f* закреплены на мембране в люмене; б) молекулы *cyt f* диффундируют в реакционном объеме кубической формы, при этом объем и количество молекул те же, что и в случае (а). Случай (а) соответствует экспериментальным данным по расположению цитохрома *f* относительно мембраны в тилакоиде; случай (б) соответствует эксперименту на выделенных частицах в растворе.

На рис. 5 представлены полученные на модели зависимости константы связывания P_s и *cyt f* для реакции в люмене тилакоида (толстая серая кривая) от расстояния z между мембранами и от величины реакционного объема v , и для реакции в растворе от величины реакционного объема (тонкая черная кривая).

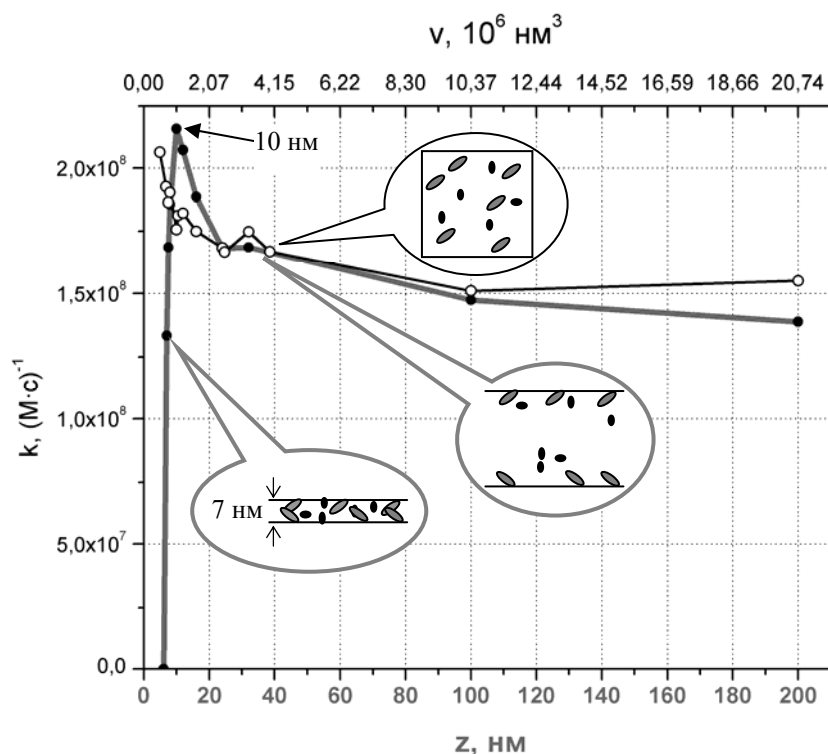


Рис. 5. Зависимость константы связывания P_s и *cyt f* при постоянном количестве молекул: а) для реакции в люмене тилакоида от расстояния z между мембранами и от величины реакционного объема v (толстая серая кривая -●-), б) для реакции в растворе от величины реакционного объема (тонкая черная кривая -○-).

Из рис. 5 видно, что для реакции в люмене (толстая серая кривая) константа связывания Pc и $cyt f$ максимальна ($k = 2.2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$) при расстоянии между мембранами тилакоида 8–10 нм. Если расстояние меньше 7 нм, то константа скорости резко падает до нуля. Это объясняется тем, что молекула цитохрома f с присоединенным к ней пластоцианином выступает из мембраны на 7 нм, и вследствие наличия противоположной мембраны при расстоянии меньше 7 нм образование комплекса Pc – $cyt f$ невозможно. Для случая (б), когда молекулы расположены в кубическом реакционном объеме, уменьшения константы скорости при уменьшении реакционного объема не наблюдается, так как в этом случае образованию комплекса не препятствует противоположная мембрана.

При увеличении реакционного объема больше $10 \cdot 10^6 \text{ нм}^3$ (рис. 5) в случае (б) константа скорости не зависит от величины реакционного объема. В случае же (а) с увеличением реакционного объема больше $10 \cdot 10^6 \text{ нм}^3$ (расстояния между мембранами больше 100 нм) константа скорости уменьшается. Это может быть объяснено тем, что молекулы $cyt f$ закреплены на мембранах, то есть расположены гетерогенно, а не равномерно в растворе, и, как следствие, молекулам пластоцианина для встречи с молекулами $cyt f$ в среднем приходится диффундировать на большие расстояния, чем в растворе.

С уменьшением размеров реакционного объема менее $10 \cdot 10^6 \text{ нм}^3$ наблюдается повышение константы связывания белков как в случае реакции в растворе, так и в случае реакции в люмене (рис. 5). Мы это связываем с эффектом исключенного объема. В случае высокой концентрации реагентов начинает сказываться исключенный объем, занимаемый молекулами (Park, Kim et al. 2003; Litniewski 2008). Его вклад увеличивается при увеличении концентрации молекул и при увеличении их радиуса и проявляется в увеличении константы скорости реакции (Jung and Lee 1997).

Более высокое, чем в растворе, значение константы скорости реакции в люмене при величине реакционного объема около $1 \cdot 10^6 \text{ нм}^3$ мы объясняем

более оптимальной для образования комплекса ориентацией молекул цитохрома f , закрепленных на мембране.

Возрастающий участок модельной зависимости константы связывания пластоцианина с цитохромом f от расстояния между мембранами (рис. 5а) соответствует экспериментам по ингибированию реакции при гиперосмотическом стрессе (Cruz, Salbilla et al. 2001) за счет препятствия мембран формированию комплекса, а убывающий – соответствует экспериментам по увеличению скорости при гиперосмотическом стрессе (Haehnel, Propper et al. 1980) за счет повышения концентрации реагентов, когда еще не происходит затруднения формирования комплекса. Область кривой, которой соответствует эксперимент, зависит от особенностей строения тилакоидов и условий проведения эксперимента.

Взаимодействие пластоцианина и цитохрома f в люмене тилакоида – это пример биохимической реакции, ингибирование которой происходит за счет изменения физических характеристик окружающего пространства, в данном случае – изменения ширины люмена.

Изучение роли электростатических взаимодействий в люмене

Для выяснения роли электростатических взаимодействий при связывании пластоцианина и цитохрома f в люмене тилакоида мы повысили в модели ионную силу раствора со 100 мМ до 1000 мМ. Константа связывания при повышении ионной силы для реакции в люмене, как и в случае реакции в растворе, упала на два порядка.

Так же было промоделировано влияние мутаций пластоцианина на его связывание с цитохромом f в люмене (при толщине люмена 10 нм). Показано, что изучаемые мутации при реакции в люмене оказывают примерно такой же эффект, как и при реакции в растворе.

Исходя из полученных результатов моделирования по влиянию повышения ионной силы и мутаций пластоцианина на константу связывания его с цитохромом f в люмене тилакоида, мы можем сделать вывод о том, что

электростатические взаимодействия при связывании этих белков в люмене так же важны, как и при реакции в растворе.

ГЛАВА 4. Многочастичное компьютерное моделирование взаимодействия фотосистемы 1 с пластоцианином и флаводоксином в растворе

В четвертой главе построены модели взаимодействия белков пластоцианина и флаводоксина в растворе с фотосистемой 1. Показано, что при определенных значениях параметров модель может описывать экспериментальную нелинейную зависимость константы связывания белков от ионной силы. Сделан вывод о том, что для формирования такого вида зависимости в модели достаточно учета только электростатических взаимодействий.

На модели образования комплекса PSI-Fld в растворе показано, что при больших значениях расстояния связывания (36 Å) зависимость k_{on} от ионной силы – убывающая, при меньших значениях расстояния связывания у зависимости появляется начальный возрастающий участок. Наличие убывающего участка как у экспериментальной (рис. 6А), так и у модельной (рис. 6 Б) зависимостей k_{on} от ионной силы говорит о том, что с увеличением ионной силы электростатическое притяжение падает за счет экранирования поля белков противоионами.

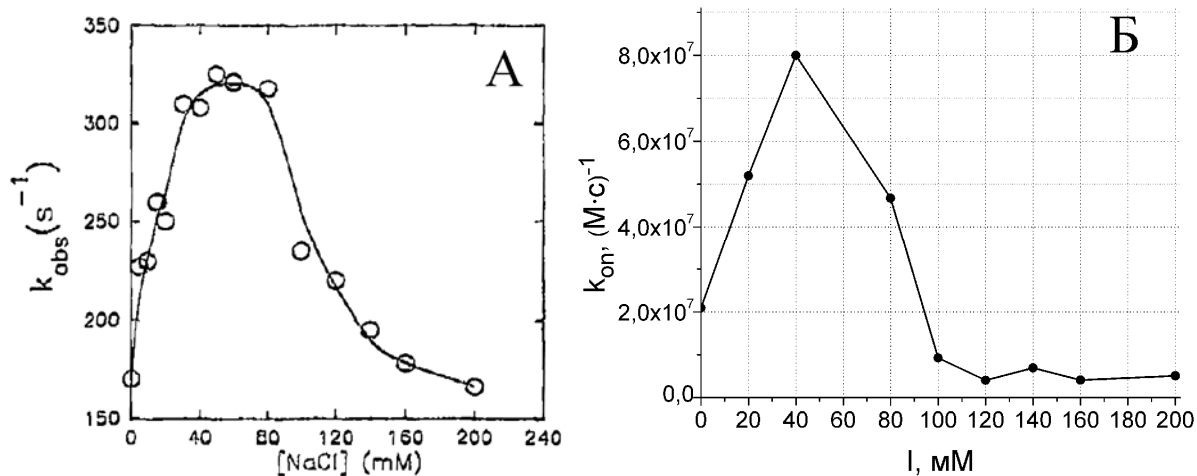


Рис. 6. А – экспериментальная зависимость наблюдаемой константы скорости реакции Fld и PSI от ионной силы раствора из [5]. Б – модельная зависимость константы связывания Fld и PSI от ионной силы раствора, расстояние связывания $r=22$ Å и вероятности связывания $P=0.025$.

Падение константы связывания белков при малых значениях ионной силы мы объясняем тем, что при низкой ионной силе электростатические взаимодействия настолько сильны, что пластоцианин и цитохром *f* значительное время находятся в ориентации, не удовлетворяющей условиям связывания.

Модель связывания пластоцианина и фотосистемы 1 в растворе аналогична модели взаимодействия флаводоксина и фотосистемы 1. Мы подобрали значения параметров модели таким образом, чтобы константа связывания пластоцианина и фотосистемы 1 была порядка $4 \cdot 10^8$ (Hervas et al. 1995), константа скорости для мутанта пластоцианина Glu59Lys/Glu60Gln была ниже, чем для дикого типа, а для мутанта Glu43Lys – еще ниже (Young et al. 1997). При оцененных значениях параметров модели мы получили зависимость константы связывания пластоцианина и фотосистемы 1, аналогичную наблюдаемой в эксперименте (Sigfridsson 1997), с максимум около 40 мМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные прямые многочастичные модели связывания белков представляют новый подход к изучению кинетики образования комплексов в ансамблях взаимодействующих молекул. В моделях учтены электростатические взаимодействия, геометрические особенности молекул и реакционного объема. Модели позволяют изучать влияние ионной силы, распределения зарядов на молекулах, рН, температуры, геометрических свойств системы, концентрации реагентов на кинетические характеристики взаимодействия белков.

На модели показана важная роль электростатических взаимодействий в связывании исследуемых белков, изучено влияние геометрических свойств системы и мутаций белков на их связывание.

ВЫВОДЫ

1. Построена многочастичная компьютерная модель броуновской динамики фотосинтетических белков, учитывающая электростатические взаимодействия, сложную форму белков и геометрию люминального пространства. Модель адекватно описывает экспериментальные данные по влиянию ионной силы раствора на константы связывания белков.

2. На модели показана важная роль электростатических взаимодействий в связывании пластоцианина с цитохромом f , пластоцианина с фотосистемой 1, флаводоксина с фотосистемой 1. Для пластоцианина, выделенного из различных мутантных форм шпината, выявлена роль аминокислотных остатков Glu43, Glu59 и Glu60 в процессе взаимодействия белков.

3. Показано, что для формирования немонотонной зависимости константы связывания пластоцианина и флаводоксина с фотосистемой 1 от ионной силы в модели достаточно учета только электростатических взаимодействий.

4. На модели получена немонотонная зависимость константы связывания пластоцианина и цитохрома f в люмене тилакоида от расстояния между мембранами (с максимумом при 8-10 нм), что согласуется с экспериментальными данными. Изменение размеров люминального пространства обеспечивает возможность регуляции взаимодействия пластоцианина и цитохрома f .

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

СТАТЬИ

1. Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Громов П.А., Устинин Д.М., Грачев Е.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Прямое моделирование процессов взаимодействия пластоцианина с цитохромом f в растворе // Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных трудов. – М.-Ижевск: Научно-издательский центр «Регулярная и хаотическая динамика». – 2005. – Вып. 12. – Ч. 3. – С. 955-967.
2. Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Громов П.А., Грачев Е.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f в растворе в зависимости от ионной силы и рН среды // Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных трудов. – М.-Ижевск: Научно-издательский центр «Регулярная и хаотическая динамика». – 2006. – Вып. 13. – Ч. 2. – С. 323-332.
3. I.V. Kovalenko, A. M. Abaturova, P. A. Gromov, D. M. Ustinin, E. A. Grachev, G. Yu. Riznichenko, A. B. Rubin. Direct simulation of interaction of plastocyanin and cytochrome f in solution // Physical Biology. – 2006. – V. 6. – P. 121-129.
4. Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Громов П.А. Моделирование взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f при различной ионной силе в растворе // Сборник научных трудов первой Всероссийской научно-практической конференции "Образование. Синергетика и новое мировидение". – Астрахань: Изд-во АИПКП. – 2006. – С. 45 - 49.
5. 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. – вып. 3. – С. 492-502.
6. Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Громов П.А., Устинин Д.М., Ризниченко Г.Ю., Грачев Е.А., Рубин А.Б. Компьютерное моделирование образования комплекса между пластоцианином и цитохромом f в люмене тилакоида // Биофизика. – 2008. – том 53. – вып. 2. – С. 261-270.
7. Абатурова А.М., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Прямое многочастичное компьютерное моделирование влияния ионной силы

раствора на константу связывания флаводоксина и фотосистемы 1 // Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных трудов. – М.-Ижевск: Научно-издательский центр «Регулярная и хаотическая динамика». – 2008. – Вып. 15. – Ч. 3. – С. 71-78.

ТЕЗИСЫ КОНФЕРЕНЦИЙ

8. Kovalenko I., Abaturova A., Gromov P., Riznichenko G., Rubin A. Simulation model of diffusion and interaction of proteins plastocyanin and cytochrome *f* // Book of abstracts ECMTB. – Dresden, Germany. – 2005. – P. 53.

9. Абатурова А.М., Коваленко И.Б., Громов П.А., Грачев Е.А., Чуличков А.И. Прямое моделирование процессов взаимодействия пластоцианина с фотосинтетическим реакционным центром фотосистемы 1 и цитохромным b_6f комплексом // XI Междунар. конф. "Математика. Компьютер. Образование" (Пушино). Сб. тезисов. – М.-Ижевск: Изд-во «Регулярная и хаотическая динамика». – 2005. – С. 173.

10. Коваленко И.Б., Абатурова А.М., Громов П.А., Грачев Е.А. Метод прямого многочастичного моделирования процессов взаимодействия пластоцианина с цитохромом *f* в растворе // Нелинейный мир. Тез. докладов. – Н. Новгород: Изд-во ННГУ им. Н.И. Лобачевского. – 2005. – С. 63.

11. Абатурова А.М., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Громов П.А., Грачев Е.А. Модель броуновской динамики взаимодействия многих молекул пластоцианина и цитохрома *f* // Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных тезисов. – М. - Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». – 2006. – Вып. 13. – С. 190.

12. Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Gromov P.A., Grachev E.A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Simulation of plastocyanin and cytochrome *f* proteins interaction in solution at various ionic strength and pH // Photosynthesis in the Post-Genomic Era: Structure and Function of Photosystems. Сб. научных тезисов. – М.: «НИА-Природа». – 2006. – С.166.

13. Абатурова А. М., Коваленко И.Б., Громов П.А., Ризниченко Г. Ю., Грачев Е. А. Взаимодействие молекул пластоцианина и цитохрома *f* в люмене тилакоида – прямое компьютерное моделирование // Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных тезисов. – М. - Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». – 2007. – Вып. 14. – С. 131.

14. Abaturova A., Riznichenko G., Rubin A. Brownian dynamics study of plastocyanin and cytochrome *f* interaction in the thylakoid lumen // Trends in Transient Interactions between Biological Macromolecules. Book of Abstracts of the Workshop. – Sevilla, Spain. – 2007. – P-1.
15. Абатурова А.М., Громов П.А., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Грачев Е.А. Прямое компьютерное моделирование влияние рН среды и редокс-состояния пластоцианина и цитохрома *f* на константу их связывания // Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных тезисов. – М. - Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». – 2008. – Вып. 15. – С. 150.
16. Abaturova A., Kovalenko I., Riznichenko G. Computer simulation of flavodoxin-photosystem 1 complex formation // Abstracts of the 16th International Symposium on Flavins and Flavoproteins, Prensas Universitarias de Zaragoza. – Jaca, Spain. – 2008. – P.37.