

На правах рукописи

**КНЯЗЕВА ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА**

**Прямое компьютерное моделирование  
переноса электрона с цитохромного  $b_6f$   
комплекса на фотосистему 1**

Специальность: 03.01.02 – биофизика

**АВТОРЕФЕРАТ**  
на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

Москва – 2010

**Работа выполнена на кафедре компьютерных методов физики  
физического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.**

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук, профессор Г.Ю.Ризниченко.

Научный консультант:

кандидат технических наук, доцент Е.А.Грачев.

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор А.И. Лобанов;

доктор физико-математических наук, профессор А.Н. Тихонов.

Ведущая организация:

Институт математических проблем биологии РАН.

Защита диссертации состоится 28 октября 2010 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 диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. Ломоносова.

Автореферат разослан \_\_\_\_ сентября 2010 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 501.001.96

кандидат биологических наук, с.н.с.

М.Г. Страховская

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность проблемы

Система первичных процессов фотосинтеза является объектом многочисленных исследований в связи с важностью понимания фундаментальных законов регуляции биофизических процессов, прикладными задачами создания технических энергопреобразующих устройств и биотехнологическими проблемами выработки биотоплива.

В основе преобразования энергии света в энергию химических связей лежит последовательность электрон-транспортных процессов, протекающих во встроенных в липидную мембрану мультиферментных комплексах с участием подвижных белков-переносчиков. Хорошо изученная система фотосинтетического электронного транспорта является традиционным объектом математического моделирования (Photosynthesis in Silico, 2009). Для описания процессов электронного транспорта широко используются кинетические модели, которые достаточно хорошо описывают наблюдаемые фотосинтетические характеристики (флуоресценцию, сигнал ЭПР), но не учитывают явно структуру переносчиков и сложную геометрию реакционного объема субклеточной системы.

В последние годы разрабатываются «физические» подходы к описанию взаимодействия белков-переносчиков электронов, позволяющие выявить роль отдельных физических процессов в акте биохимической окислительно-восстановительной реакции. Модели броуновской динамики (БД-модели) описывают взаимодействие двух белков с атомарным разрешением их формы и локальных электрических зарядов (Pearson and Gross, 1998; Haddadian and Gross, 2005). В БД-моделях имитируется взаимодействие пары белков в растворе, но не рассматриваются ансамбли взаимодействующих молекул, не учитывается геометрия реакционного объема и электростатические свойства фотосинтетических мембран. Между тем именно «системные свойства» совокупности процессов обмена электронами между отдельными

молекулами-переносчиками в сформированном в процессе эволюции интерьере субклеточных структур определяют биологическую направленность процессов преобразования энергии в живой клетке.

Развиваемый в диссертационной работе метод прямого многочастичного моделирования рассматривает взаимодействие ансамблей белков-переносчиков в сложном интерьере фотосинтетической мембраны (Коваленко и др., 2008; Князева и др., 2010, Riznichenko et al., 2010). Подход «прямого» моделирования динамики совокупности отдельных объектов системы электронного транспорта позволяет интегрировать структурные данные об организации фотосинтетической мембраны и белков-переносчиков электронов, а также кинетические данные о наблюдаемых окислительно-восстановительных процессах. Модель имитирует процессы броуновского движения подвижных переносчиков и электростатические взаимодействия индивидуальных белковых молекул между собой и со встроенными в фотосинтетическую мембрану мультиферментными комплексами в электрическом поле мембраны.

Разрабатываемый метод позволяет изучать роль отдельных физических процессов: (движения в сложном интерьере субклеточных систем, электростатических взаимодействий и др.) в регуляции направленного потока электронов в биологических системах, являющегося базовым процессом в системах преобразования энергии при фотосинтезе и дыхании в живой клетке.

### **Цели и задачи работы**

Целью является разработка методов многочастичного компьютерного моделирования взаимодействия ансамбля белков, участвующих в процессе переноса электрона по цепи фотосинтетического транспорта с учетом геометрии и электростатических свойств белков-переносчиков, фотосинтетической мембраны и встроенных в нее мультиферментных комплексов. Изучение с помощью модели биофизических механизмов

влияния электростатических свойств белков (с помощью точечных зарядовых мутаций), ионной силы и поверхностного заряда фотосинтетической мембраны на скорость протекания процессов электронного транспорта.

Были поставлены следующие задачи:

1. Разработать метод многочастичного компьютерного моделирования для описания взаимодействия электрон-транспортных белков с трансмембранными белковыми комплексами и фотосинтетической мембраной с учетом электростатических сил.
2. Исследовать влияние поверхностного потенциала мембраны на взаимодействие белков цитохрома  $f$  (Cyt  $f$ ) и пластоцианина (Pc).
3. Построить модель переноса электрона переносчиком электронов белком пластоцианина от цитохромного  $b_6f$  (Cyt  $b_6f$ ) комплекса на фотосистему 1 (PSI).
4. Построить модели взаимодействия в растворе фотосинтетических белков: пластоцианина и цитохрома  $f$ , пластоцианина и PSI цианобактерий.
5. Оценить параметры прямых многочастичных моделей (вероятности и расстояния связывания) с использованием экспериментальных данных по взаимодействию белков в растворе.
6. Исследовать влияние ионной силы раствора и мутаций Pc на кинетические характеристики процессов окисления Cyt  $f$  и восстановления PSI цианобактерий в растворе, сравнить полученные характеристики с экспериментальными данными, провести сравнение полученных зависимостей для цианобактерий с данными для высших растений, на основании результатов моделирования сравнить механизмы окислительно-восстановительных реакций в высших растениях и цианобактериях.

## **Научная новизна**

Построена многочастичная компьютерная модель броуновской динамики фотосинтетических белков, учитывающая электростатические взаимодействия между белками и мембраной, форму белков и их неоднородное распределение. Модель позволяет исследовать направленный перенос электрона белком P<sub>s</sub> от Cyt b<sub>6</sub>f комплекса на PSI. Проведена идентификация параметров отдельных стадий процессов по экспериментальным данным.

Модель демонстрирует немонотонную зависимость скорости реакции связывания P<sub>s</sub> с Cyt f от ионной силы, что соответствует гипотезе о преобладании непродуктивных состояний P<sub>s</sub> в комплексе с Cyt f при низких значениях ионной силы.

С использованием модели впервые показано, что при некоторых значениях поверхностного заряда фотосинтетической мембраны может наблюдаться ингибирование реакции образования комплекса P<sub>s</sub> и Cyt f.

С использованием результатов моделирования установлено существенное преобладание электростатических взаимодействий в связывании P<sub>s</sub> с Cyt f и P<sub>s</sub> с PSI в высших растениях по сравнению с эволюционно предшествующими им цианобактериями.

## **Практическая значимость**

Результаты исследования существенно углубляют современные знания о роли электростатических взаимодействий в связывании подвижных белков-переносчиков с мультиферментными трансмембранными фотосинтетическими комплексами высших растений и цианобактерий. Построенная модель позволяет изучать влияние поверхностного заряда фотосинтетической мембраны на эффективность процессов фотосинтеза. Модель может быть использована для изучения взаимодействия белков различной природы, как между собой, так и с биологическими мембранами.

## **Апробация работы**

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на: 13, 14, 16 и 17 – Международных конференциях “Математика. Компьютер. Образование”, Дубна, 2006, 2010, Пущино 2007, 2009; 4-ой научно-технической конференции “Молодежь в науке” Саров 2005, международной конференции “Ломоносов-2005” Москва 2005, восьмой международной конференции “Проблемы биологической физики” Москва 2009, семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ, семинарах кафедры компьютерных методов физики физического факультета МГУ.

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, из них 2 – в журналах, рекомендованных ВАК для соискателей ученых степеней, 3 – в сборниках научных трудов международных конференций и 8 тезисов – в сборниках тезисов докладов конференций.

## **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, пяти глав, содержащих описание методов и результатов работы, выводов, списка литературы из 155 наименования. Объем диссертации составляет 118 страниц, 48 рисунков и 6 таблиц.

## **Благодарности**

Автор выражает благодарность к.ф.-м.н. Коваленко И.Б. и к.б.н. Абатуровой А. М. за внимание и постоянную помощь в работе, Громову П.А. и к.ф.-м.н. Устинину Д.М. за участие в создании модели. Автор благодарит профессора, д.б.н. Кренделеву Т.Е. и чл.-корр. РАН, д.б.н. Рубина А.Б. за ценные консультации.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Введение

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

### Глава 1. Обзор литературы

В первой главе представлен обзор литературы по структуре и функциям белков, участвующих в процессе переноса электрона по электрон транспортной цепи, в частности трансмембранных белковых комплексов – фотосистемы 1, фотосистемы 2, цитохромного  $b_6f$  комплекса, белка – подвижного переносчика электрона – пластоцианина; по особенностям строения и состава тилакоидной мембраны. Обсуждаются экспериментальные данные по кинетике транспорта электрона белком пластоцианином *in vivo* и *in vitro*. Рассмотрены существующие подходы к моделированию взаимодействия белков, участвующих в процессе переноса электрона, их преимущества и недостатки.

### Глава 2. Прямая многочастичная модель белок-белковых взаимодействий

Вторая глава посвящена разработке прямой многочастичной модели белок-белкового взаимодействия в люмене тилакоида, основанной на методах броуновской динамики. Основные участники электронного транспорта – встроенные в мембрану пигмент-белковые комплексы и мобильные молекулы-переносчики электрона моделируются как отдельные объекты, взаимодействующие друг с другом. Модель учитывает пространственную структуру фотосинтетической мембраны и ее электростатические свойства.

Фотосинтетическая мембрана в модели представляет собой две заряженные плоскости, ограничивающие липидный бислой с двух сторон.



Параметром мембраны в модели является ее поверхностная плотность заряда. Встроенные в мембрану трансмембранные мультиферментные комплексы и подвижные переносчики электрона представлены как отдельные объекты, расположенные в трехмерном пространстве. Каждый объект обладает определенным набором свойств, в модели задается его положение и ориентация в трехмерном пространстве, которые описываются координатами центра масс и матрицей поворота. Расчет электростатического потенциала вокруг белка проводится с использованием его PDB структуры и данных о зарядах на его лигандах и аминокислотных остатках. При моделировании образования комплексов (Pc-Cyt f и Pc-PSI) каждая пара белков, образующих комплекс, характеризуется вероятностями образования и распада комплекса, а также вероятностями изменений редокс-состояния комплекса и расстоянием докинга. Под расстоянием докинга понимается расстояние между определенными аминокислотными остатками молекул, участвующих в образовании комплекса. Для моделирования столкновений белки представлялись в виде набора сфер. При таком подходе проверка на геометрическое пересечение двух белков между собой может быть сведена к попарной проверке на пересечение сфер, аппроксимирующих данные белки.

Перед проведением вычислений с использованием многочастичной модели необходимо сформировать модельную сцену – задать начальное расположение всех объектов на трехмерной модельной сцене. Размеры трехмерной сцены, ширина люмена, а также количество трансмембранных комплексов и подвижных переносчиков являются параметрами модели и задаются в соответствии с экспериментальными данными по определению концентрации белковых комплексов.

В прямой многочастичной модели подвижные объекты (молекулы белка пластоцианина) рассматриваются как броуновские частицы, совершающие поступательное и вращательное движение в вязкой среде под действием случайной и внешней электростатической сил. Движение таких частиц описывается уравнениями Ланжевена:

$$\begin{aligned} \xi_{\Pi}^x \frac{dx}{dt} &= f_x(t) + F_x \\ \xi_{\text{вп}}^x \frac{d\alpha}{dt} &= m_x(t) + M_x \end{aligned} \quad (1)$$

где  $x$  – координата, вдоль которой рассматривается движение,  $\xi_{\Pi}^x$  – коэффициент вязкого трения вдоль этой координаты,  $f_x(t)$  и  $F_x$  – проекции случайной и электростатической сил на ось  $x$ , соответственно,  $\xi_{\text{вп}}^x$  – коэффициент вязкого трения для вращательного движения вокруг оси  $x$ ,  $m_x(t)$  и  $M_x$  – моменты случайной и электростатической сил относительно оси  $x$ , соответственно. В описываемой модели силы, действующие на подвижные белки со стороны неподвижного окружения, и силы взаимодействия подвижных переносчиков между собой, рассматривались отдельно. Электростатическая сила, действующая на  $i$ -ый подвижный объект, рассчитывалась по формуле  $\vec{F}^i = \sum_{j, i \neq j} \vec{F}_{ij} + \vec{F}_{\text{окр}}^i$ , где  $\vec{F}_{ij}$  – сила взаимодействия между  $i$  и  $j$  подвижными белками, и  $\vec{F}_{\text{окр}}^i$  – электростатическая сила, действующая на  $i$ -ый подвижный белок за счет электростатического поля, создаваемого зарядами мембраны, трансмембранными белковыми комплексами и ионами раствора. Электростатическая сила, действующая на  $i$ -ый белок в поле  $j$ -го белка может быть представлена в виде  $\vec{F}_{ij} = -\sum_k q_k^i \frac{\partial \varphi_j(\vec{r}_k)}{\partial x}$ , где  $q_k^i$  –  $k$ -ый заряд  $i$ -ого подвижного белка,  $\varphi_j(\vec{r}_k)$  – электростатический потенциал  $j$ -го белка в точке с координатами  $\vec{r}_k$ . Электрический потенциал  $\varphi(\vec{r}_k)$  рассчитывался из уравнения Пуассона-Больцмана. Случайная сила  $f_x(t)$  имеет нормальное распределение с нулевым средним и дисперсией, равной  $\frac{2kT\xi_{\Pi}^x}{\Delta t}$ , здесь  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура. Для расчетов коэффициентов трения в уравнении Ланжевена подвижные объекты рассматривались в виде эллипсоидов вращения. Уравнение Ланжевена для поступательного и вращательного движения были

решены численно в собственной ортогональной системе координат, совмещенной с осями эллипсоида, аппроксимирующего движущую частицу. Шаг по времени в модели составлял 100 пс. Для расчета электростатического потенциала, создаваемого подвижными белками, трансмембранными белковыми комплексами и тилакоидной мембраной, использовалось уравнение Пуассона-Больцмана (Дерягин, Чураев и др., 1985).

Уравнение Пуассона-Больцмана для мембраны и встроенных в нее трансмембранных комплексов выглядит следующим образом:

$$\nabla(\varepsilon(\vec{r})\nabla\varphi(\vec{r})) = -\frac{1}{\varepsilon_0} \sum_i c_i^{bulk} e_0 z_i e^{-\frac{z_i e_0 \varphi(\vec{r})}{kT}} - \frac{1}{\varepsilon_0} (\rho_{prot} + \rho_{memb}) \quad (2)$$

где  $\varepsilon(\vec{r})$  и  $\varphi(\vec{r})$  – локальные значения диэлектрической проницаемости среды и электростатического потенциала,  $e_0$  – заряд электрона,  $z_i$  – зарядовое число,  $c_i^{bulk}$  – объемная концентрация ионов,  $\rho_{memb}$  – плотность зарядов мембраны,  $\rho_{prot}$  – плотность зарядов трансмембранных белковых комплексов,  $k$  – постоянная Больцмана,  $T$  – температура. Граничные условия для расчета значения потенциала задаются равными нулю на некотором удалении от внешней поверхности мембраны ( $>35$  Å), т.к. из-за экранирования молекулами воды значения потенциала электрического поля вдали от мембраны близко к нулю. На рис. 1 представлены рассчитанные по уравнению Пуассона-Больцмана электростатические потенциалы белков Рс и Сyt f.

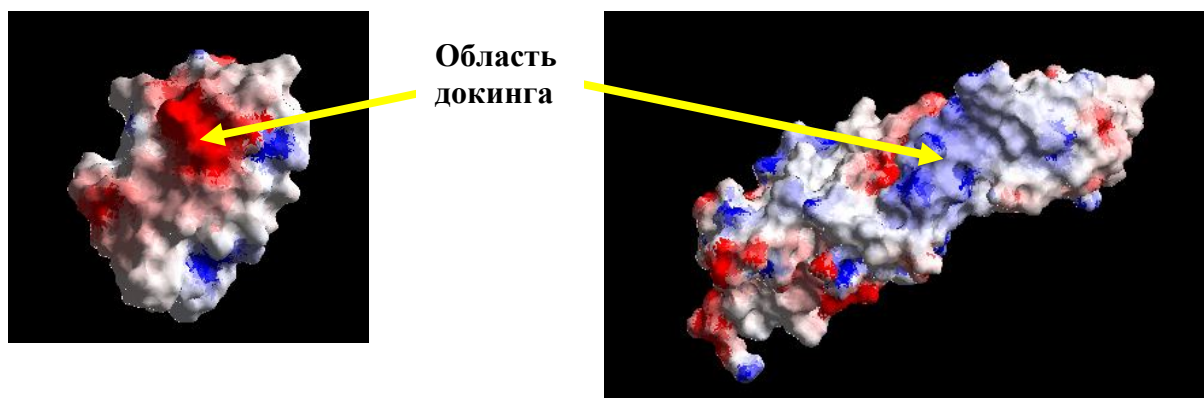


Рис. 1. Поверхности белков Рс (слева) и Сyt f (справа). Синим цветом отображены положительные значения электростатического потенциала, красным – отрицательные.

В отличие от классических моделей броуновской динамики, в которых описывается взаимодействие отдельных пар белковых молекул, многочастичная модель позволяет описывать одновременное взаимодействие и динамику большого количества частиц (белков, белковых комплексов и т.д.) в трехмерном реакционном объеме. Данная модель позволяет также исследовать влияние параметров окружения (например, влияние поверхностного заряда тилакоидной мембраны) на скорость исследуемой реакции, учесть неоднородное распределение белковых комплексов, трехмерную пространственную структуру фотосинтетической мембраны и т.д. Результатом компьютерного эксперимента с использованием такой модели являются непосредственно вычисленные зависимости количества образованных белковых комплексов от времени, а также временные характеристики изменения редокс-состояний участников электронного транспорта. Это дает возможность сравнивать полученные модельные зависимости с данными экспериментов без привлечения дополнительных гипотез о кинетическом механизме протекания реакции. В качестве платформы для программной реализации использовался язык C++, как удобный объектно-ориентированный язык программирования и библиотека OpenGL – для программирования модуля визуализации результатов расчета.

### **Глава 3. Исследование влияния электростатического поля фотосинтетической мембраны на реакцию взаимодействия пластоцианина с цитохромом $f$ в люмене тилакоида**

Третья глава посвящена исследованию влияния электростатического поля фотосинтетической мембраны на связывание Pс-Cyt  $f$  в люмене тилакоида хлоропласта. Известно, что тилакоидная мембрана несет отрицательный поверхностный заряд при нейтральном рН, источником которого являются отрицательно заряженные липиды (фосфолипиды исульфолипиды) и отрицательно заряженные аминокислотные остатки (Glu, Asp) трансмембранных белковых комплексов. Поверхностный заряд

фотосинтетической мембраны может влиять на взаимодействие белков, участвующих в процессах электронного транспорта. В данной главе с помощью прямого многочастичного моделирования исследовалась реакция образования комплекса Pс-Cyt f в люминальном пространстве тилакоида в зависимости от величины поверхностного заряда на мембране при различных значениях ионной силы.

В работе моделировалась люминальная область тилакоидной мембраны размером 100x100x10 нм. Количество белков Cyt f и Pс в модели выбиралось равным 25. Мембрана представляла собой две отрицательно заряженные плоскости, на которой равномерно распределяются точечные отрицательные заряды. Белки Cyt f случайно раскидываются и фиксируются вдоль мембраны. Подвижные белки Pс в начальный момент времени размещались случайным образом в люминальном пространстве. Для моделирования белков Pс из шпината и Cyt f из турнепса использовалась структура образованного ими комплекса (PDB 2PCF).

На рис. 2 представлены рассчитанные зависимости скорости реакции от ионной силы и поверхностного заряда фотосинтетической мембраны. Из семейства кривых на рис. 2 видно, что скорость реакции зависит от ионной силы немонотонным образом: с увеличением  $I$  от 0 до 20-40 моль/м<sup>3</sup> константа скорости увеличивается, достигает максимальных значений при  $I=20-40$  моль/м<sup>3</sup>, и уменьшается при дальнейшем увеличении ионной силы. При малых значениях ионной силы ( $I=0, 10$  моль/м<sup>3</sup>) заряды мембраны слабо экранированы, они мешают молекулам Pс приблизиться к Cyt f, закрепленному на поверхности мембраны, поэтому скорость реакции уменьшается с ростом  $\sigma$  начиная с малых значений плотности заряда. С увеличением ионной силы влияние электростатического потенциала, создаваемого зарядами мембраны, уменьшается из-за экранирования зарядов ионами раствора. При физиологических значениях ионной силы ( $I = 100 - 150$  моль/м<sup>3</sup>) поверхностная плотность заряда мембраны уже практически не оказывает влияния на скорость реакции образования комплекса Pс и Cyt f

при  $-33 < \sigma < 0$  мКл/м<sup>2</sup> из-за экранирования зарядов мембраны большим количеством заряженных ионов в этих условиях. Лишь при  $\sigma < -33$  мКл/м<sup>2</sup> константа начинает уменьшаться, т.к. сильное отрицательное поле мембраны в этом случае уже препятствует подходу отрицательно заряженного Рс к сайту связывания с Сyt f.

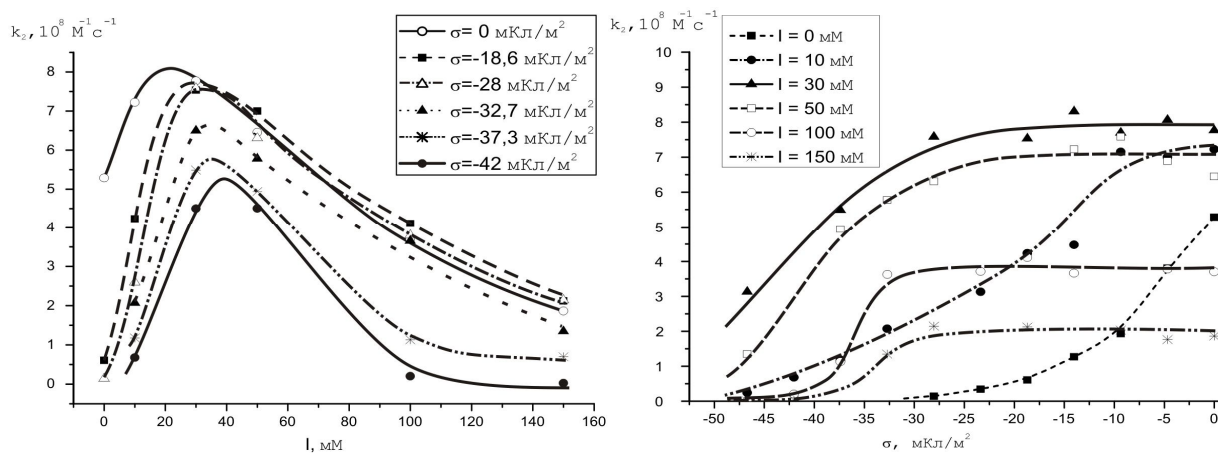


Рис. 2. Слева – зависимость константы скорости реакции связывания цитохрома f и пластоцианина от величины ионной силы для различных значений величины плотности заряда на мембране ( $\sigma = 0, -18.6, -28, -32.7, -37.3, -42$  мКл/м<sup>2</sup>), справа – зависимость константы скорости реакции связывания цитохрома f и пластоцианина от величины плотности заряда на мембране для различных значений величины ионной силы ( $I = 0, 10, 30, 50, 100, 150$  мМ).

Полученные в главе 3 результаты позволяют установить связь между значением плотности заряда на фотосинтетической мембране, ионной силой и скоростью образования комплекса Рс-Сyt f в люмене тилакоида. При нулевой ионной силе наблюдается ингибирование реакции связывания Рс и Сyt f, создаваемое двумя факторами: электрическим полем мембраны, препятствующим подходу отрицательно заряженного Рс к сайту связывания с Сyt f, и сильными электростатическими взаимодействиями между белками, благодаря которым Рс проводит больше времени в непродуктивных ориентациях, в которых не происходит окончательного связывания с Сyt f. Модельный эксперимент показал, что при физиологических значениях ионной силы поле мембраны в областях с плотностью заряда  $\sigma > -33$  мКл/м<sup>2</sup> практически не влияет на скорость образования комплекса Сyt f и Рс, однако, в областях с большими значениями поверхностной плотности

отрицательного заряда может наблюдаться ингибирование реакции образования комплекса Pс и Cyt f. Таким образом, среди существующих различных механизмов регуляции интенсивности фотосинтетического электронного транспорта, таких, как фактор сужения люминального пространства, регуляторную роль также может играть отрицательный поверхностный заряд на мембране.

#### **Глава 4. Компьютерное моделирование переноса электрона по цепи фотосинтетического транспорта подвижным белком переносчиком Pс в люмене тилакоида**

В четвертой главе построена и исследована модель переноса электрона по цепи электронного транспорта от Cyt b<sub>6</sub>f на PSI белком Pс. В качестве объекта моделирования были выбраны белки с известными структурами Cyt b<sub>6</sub>f из *Chlamydomonas reinhardtii*, PDB 1Q90 (субъединица Cyt f взята из турнепса, PDB 2PCF), Pс из шпината (PDB 2PCF), PSI из высших растений (PDB 2O01).

В модели считалось, что в темноте все P700 являются нейтральными, все Cyt f и около половины Pс являются восстановленными. При этом часть молекул Pс находились в комплексе с PSI. После короткой интенсивной вспышки все P700 окислялись. Это состояние системы определяет начальные условия компьютерного эксперимента. В модели молекулы Pс восстанавливают P700 с вероятностью, определяемой константой скорости передачи электрона с Pс<sup>-</sup> на P700<sup>+</sup>. Затем окисленные молекулы Pс под действием броуновской и электростатических сил диффундируют к Cyt b<sub>6</sub>f комплексу, где окисляют Cyt f. На каждом шаге модели рассчитывается количество окисленных Cyt f и восстановленных P700.

Процесс восстановления P700 в компьютерном эксперименте имеет две фазы. Первая фаза (быстрая фаза) связана с теми Pс, которые на момент вспышки находились в комплексе с PSI. Данная фаза не зависит от концентрации белков и определяется только скоростью транспорта

электронов между  $Pc^-$  и  $P700^+$ . Вторая фаза (медленная фаза) определяется теми  $Pc$ , которые находились в свободном состоянии и вынуждены диффундировать для того, чтобы образовать комплекс с  $PSI$ . Как видно из рис. 3, полученная зависимость аппроксимируется суммой двух экспонент с характерными временами  $\sim 30$  и  $200$  мкс, что согласуется с экспериментальными данными в нативном хлороласте (Haehnel, 1980).

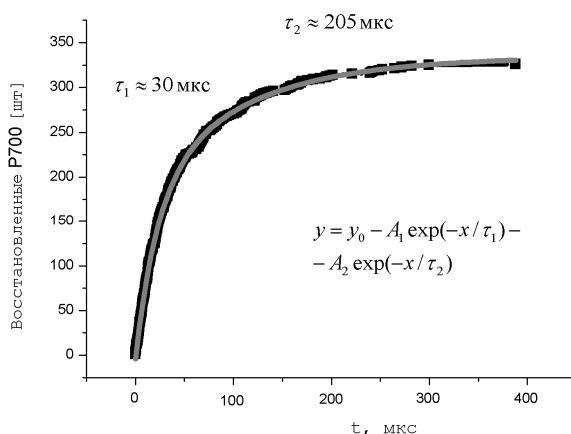


Рис. 3. Кинетическая кривая восстановления  $P700$  после короткой вспышки в компьютерном эксперименте: черным цветом отмечены данные компьютерного эксперимента, серым – кривая аппроксимации двумя экспонентами.

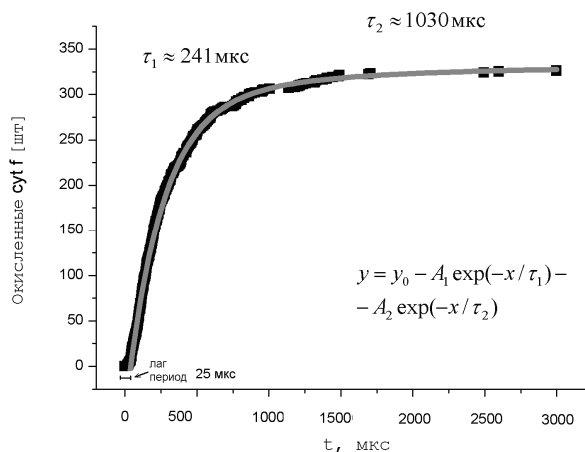


Рис. 4. Кинетическая кривая окисления  $Cyt f$  после короткой вспышки в компьютерном эксперименте: черным цветом отмечены данные компьютерного эксперимента, серым – кривая аппроксимации двумя экспонентами.

Как видно из рис. 4, кинетическая кривая окисления  $Cyt f$  имеет лаг-период порядка  $25$  мкс, определяемый временем передачи электрона с  $Pc^-$  на  $P700^+$ , распада комплекса  $Pc-PSI$ , диффузией  $Pc$  до  $Cyt f$  и передачи электрона с  $Cyt f^-$  на  $Pc$ . Кривая окисления  $Cyt f$  кроме лаг-периода



характеризуется также двумя фазами. Быстрая и медленная фазы в окислении Cyt f связана с фракциями P<sub>c</sub>, вызвавшими, соответственно, быструю и медленную фазы в восстановлении P700. Полученная зависимость окисления Cyt f аппроксимируется суммой двух экспонент с характерными временами около 240 и 1000 мкс, что согласуется с экспериментальными данными в нативном хлоропласте (Haehnel, 1980).

## **Глава 5. Компьютерное моделирование взаимодействий белка пластоцианина с цитохромом f и фотосистемой 1 в цианобактериях**

Пятая глава посвящена исследованию роли электростатических взаимодействий в процессе окисления Cyt f и восстановления P700 белком P<sub>c</sub> в цианобактериях с помощью компьютерного моделирования. В качестве объекта исследования были выбраны трансмембранный белковый комплекс PSI, полученный из *Thermosynechococcus elongatus* (PDB 1JB0) и белок P<sub>c</sub> полученный из *Synechocystis sp. PCC 6803* (PDB 1J5D) и его мутанты (D44A, K33A, D44K), а также водорастворимый домен Cyt f субъединицы трансмембранного белкового комплекса Cyt b<sub>6</sub>f (PDB 1CI3) и белок P<sub>c</sub> (PDB 2Q5B), полученные из *Phormidium laminosum*, и его мутанты (K53A, R93A, D44A).

Скорость переноса электрона от P<sub>c</sub> к PSI у растений на 2 порядка выше, чем у цианобактерий. Это вызвано различиями в структуре и электростатических свойствах этих фотосистем. В высших растениях пластоцианин связывается с люминальными участками субъединиц PsaA, PsaB и PsaF фотосистемы 1, при этом у высших растений N-концевой домен PsaF более длинный и несет положительно заряженные аминокислотные остатки, которые обеспечивают более эффективное связывание P<sub>c</sub>.

На рис. 5 изображены электростатические поверхности фотосистем. Как видно из рисунка PSI высших растений имеет большую область положительного заряда в области связывания с P<sub>c</sub>, который является отрицательно заряженным белком, в то время как область положительного

заряда PSI цианобактерий на много меньше, что не может обеспечить эффективного связывания белков.

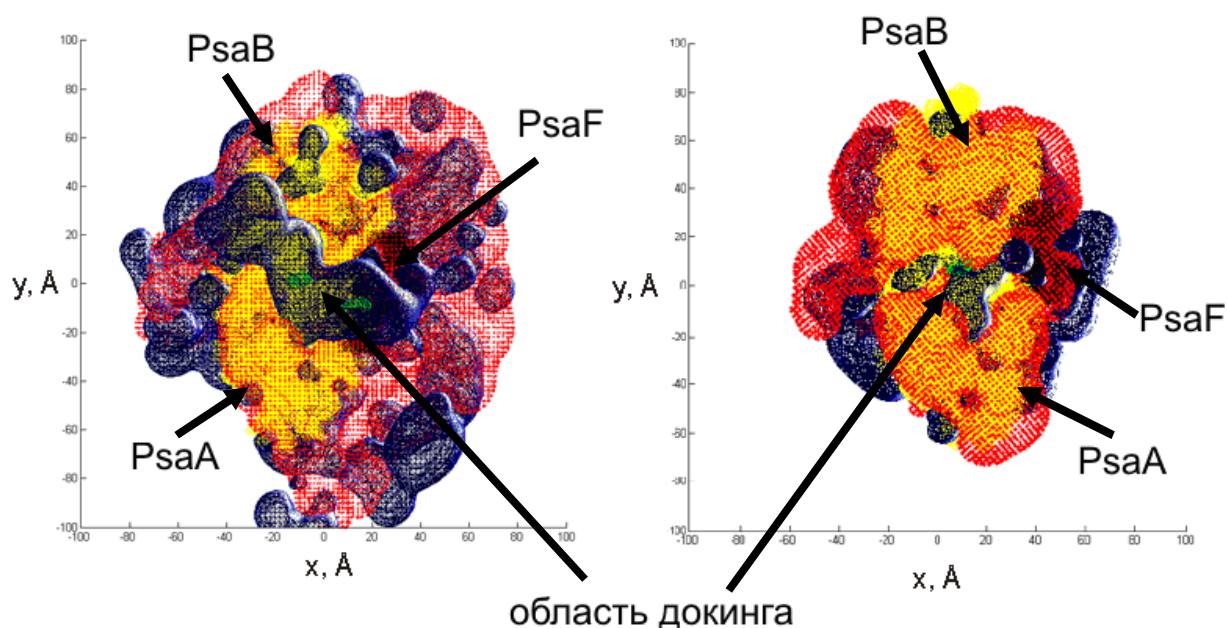


Рис. 5. Слева электростатические поверхности PSI высших растений, справа *Thermosynechococcus elongatus*. Красным цветом показаны электростатические поверхности отрицательного потенциала ( $-6.5\text{мВ}$ ), синим – положительного ( $+6.5\text{мВ}$ ). Черным цветом выделена субъединица PsaF, желтым субъединицы PsaA и PsaB. Зеленым на PSI выделены области докинга белка пластоцианина.

Для расчета констант скоростей реакций PSI и Pс моделировалась бимолекулярная реакция связывания белков в растворе. В модели предполагалось, что передача электрона произошла с некоторой вероятностью, если Pс подошел к сайту связывания с PSI на определенное расстояние. В качестве расстояний связывания были выбраны расстояния между атомами магния в хлорофилловом димере P700 и атомом меди на Pс ( $R=29 \text{ \AA}$ ) и между триптофановыми остатками PsaA (Trp 655) и PsaB (Trp 631) на PSI и His86 на Pс ( $R=16.5 \text{ \AA}$ ). Вероятность образования комплекса была выбрана равной 1. Во всех численных экспериментах на многочастичной компьютерной модели реакционный объем был равен  $160 \times 160 \times 160 \text{ нм}$ , количество белков было одинаковым и равным 100 для каждого типа, рН среды был равен 7.5. Полученные зависимости количества образованных комплексов от времени аппроксимировались гиперболической зависимостью и для каждой такой зависимости рассчитывалась константа скорости бимолекулярной реакции. На рис. 6 приведена зависимость

константы скорости реакции от ионной силы для дикого типа и различных мутантов, полученная в компьютерном эксперименте.

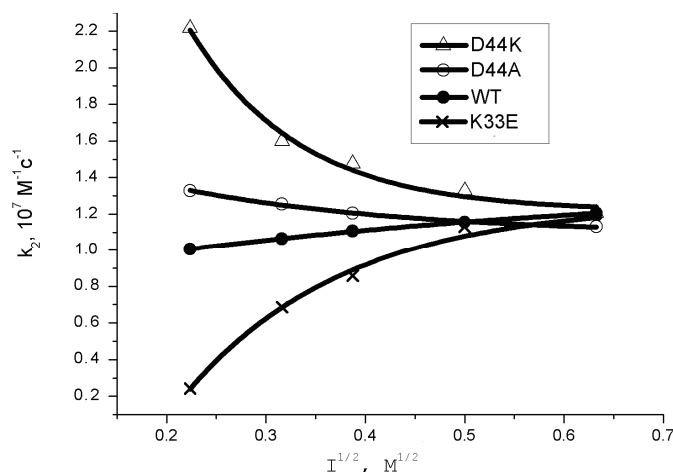


Рис. 6. Зависимость константы скорости реакции  $k_2$  связывания Рс с PSI, полученной в компьютерном эксперименте, от ионной силы  $I$  для дикого типа (WT) и различных мутантов Рс.

Из рисунка 6 видно, что для дикого типа Рс преобладает отталкивание между в целом отрицательно заряженными PSI и Рс, поскольку с увеличением ионной силы скорость реакции связывания Рс-PSI увеличивается. Мутации (D44K, D44A), уменьшающие отрицательный заряд Рс, приводят к увеличению скорости реакции, а также к преобладанию притягивающего взаимодействия между Рс и Cyt f, т.к. с увеличением ионной силы скорость реакции связывания Рс-PSI уменьшается. Замещение положительного Lys в мутации K33E на отрицательно заряженный Glu приводит к уменьшению скорости реакции.

В последней главе моделируется также образование комплекса между Cyt f и Рс из *Phormidium laminosum* в растворе. В качестве расстояний докинга были выбраны расстояние между атомом Fe в геме Cyt f и атом меди Рс ( $R=22 \text{ \AA}$ ), и между Tyr1 остатком Cyt f и His82 Рс ( $R=14 \text{ \AA}$ ). Вероятность образования комплекса Рс-Cyt f была выбрана равной 1. Реакционный объем имел размер  $160 \times 160 \times 160 \text{ нм}$ , количество белков было одинаковым и равным 100 для каждого типа,  $\text{pH} = 6$ .

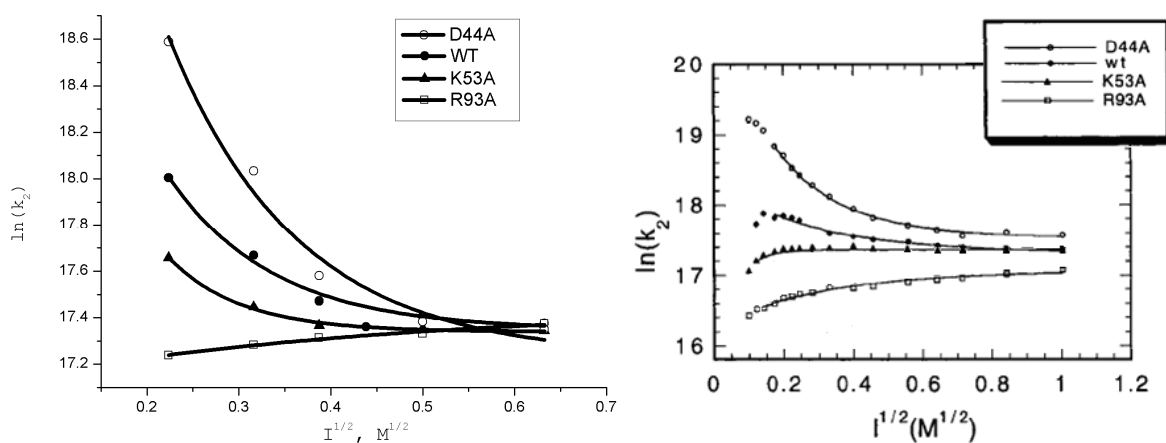


Рис. 7. Зависимость константы скорости реакции  $k_2$  образования комплекса Рс-Cyt f от ионной силы  $I$  для дикого типа (WT) и различных мутантов Рс, слева – компьютерный эксперимент на прямой многочастичной модели, справа – экспериментальные данные (Schlarb-Ridley, Bendall и др., 2002).

Как видно из рисунка 7 для WT и всех мутантов Рс кроме R93 скорость реакции образования комплекса между Cyt f и Рс падает при увеличении ионной силы. Мутация R93A, которая замещает положительно заряженный аминокислотный остаток Arg на нейтральный Ala приводит к преобладанию отталкивающих взаимодействий между Cyt f и Рс, так, что константа скорости реакции растет с увеличением ионной силы. Аминокислотный остаток Arg93 находится наиболее близко к гидрофобному патчу Рс, который является сайтом связывания с Cyt f в цианобактериях, что приводит к тому, что его мутация оказывает большее влияние на константу скорости реакции, чем схожая мутация K53A, которая также замещает положительно заряженный аминокислотный остаток, в данном случае, Lys на нейтральный Ala. Мутация D44A замещает отрицательно заряженный аминокислотный остаток Asp на нейтральный, что как видно из рисунка 7, приводит к ускорению реакции и увеличению зависимости от ионной силы.

Было проведено сравнение зависимости константы скорости реакции образования комплексов Рс-Cyt f и Рс-PSI от ионной силы для цианобактерий и высших растений. Как видно из рисунка 8, константа скорости реакции в цианобактериях, в отличие от высших растений, слабо зависит от ионной силы, что, по-видимому, не позволяет ей выступать в

качестве фактора регуляции фотосинтетического транспорта электрона. Скорость реакции связывания Рс-PSI в цианобактериях на порядки меньше, чем в высших растениях. По-видимому, структурные изменения и изменения электростатических свойств белков, которые появились в результате эволюции высших растений, позволили им использовать электростатические взаимодействия для увеличения скорости реакции переноса электрона.

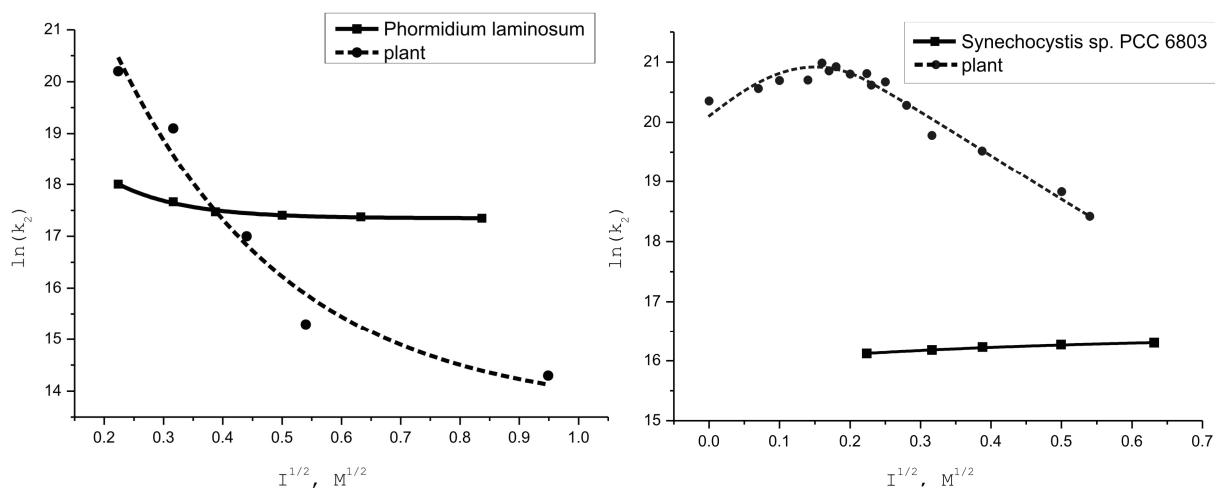


Рис. 8. Сравнение зависимостей констант скоростей реакций образования комплексов Рс-Сyt f (слева) и Рс-PSI (справа) от ионной силы для цианобактерий и высших растений (Kovalenko et al., 2006; Абатурова 2009).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные нами модели взаимодействия белков в фотосинтетической мембране являются развитием метода прямого многочастичного моделирования (Коваленко и др., 2007, 2008, 2009; Kovalenko et al, 2006; Riznichenko, 2009; Riznichenko et al., 2010; Князева и др., 2010). В отличие от классических моделей броуновской динамики, в которых описывается взаимодействие отдельных пар белковых молекул, многочастичная модель позволяет описывать одновременное взаимодействие и динамику большого количества частиц (белков, белковых комплексов и т.д.) в трехмерном реакционном объеме. В данной работе учитывается геометрия тилакоидной мембраны и ее поверхностный потенциал, учитывается неоднородное распределение трансмембранных белковых комплексов, моделируется одновременное взаимодействие нескольких типов

белков (PSI, Cyt  $b_6f$  комплекса, Pс) и тилакоидной мембраны. Данная модель позволяет моделировать транспорт электрона по фотосинтетической цепи от Cyt  $b_6f$  комплекса на PSI с помощью подвижного переносчика белка Pс, рассчитывать кинетические кривые восстановления P700 и окисления Cyt f. На модели можно изучать влияние соотношения концентраций реагентов на кинетику связывания белков, влияние ионной силы, мутаций белков, поверхностного заряда мембраны, pH, температуры, геометрических свойств системы на кинетические характеристики взаимодействия белков. Данная модель позволяет непосредственно исследовать влияние структуры и электростатических свойств белков на их взаимодействие. Результатом компьютерного эксперимента с использованием такой модели являются непосредственно вычисленные зависимости количества образованных белковых комплексов от времени, а также временные характеристики изменения редокс-состояний участников электронного транспорта. Это дает возможность сравнивать полученные модельные зависимости с экспериментальными без привлечения дополнительных гипотез о кинетическом механизме протекания реакции.

На примере данной модели была показана роль ионной силы и поверхностного заряда мембраны на связывание Pс с Cyt f в люмене тилакоида. Показано, что зависимость константы скорости реакции от ионной силы носит немонотонный характер. Показано, что при некоторых значениях ионной силы и поверхностной плотности зарядов может наблюдаться ингибирование реакции связывания Pс с Cyt f.

Модель позволила исследовать направленный перенос электрона белком Pс от Cyt f на P700 в люминальном пространстве тилакоидной мембраны с учетом неравномерного распределения комплексов на мембране. Было проведено сравнение полученных характерных времен реакций с экспериментальными данными в изолированном хлоропласте шпината. Установлено, что кинетические кривые окисления Cyt f имеют 25 мкс лаг-период, обусловленный тем, что белку Pс после вспышки необходимо

передать электрон на P700, затем отстыковаться и дойти до Cyt f. Показано, что кривые восстановления P700 и окисления Cyt f имеют две фазы с характерными временами порядка 30, 200 мкс для P700 и 240, 1000 мкс для Cyt f.

Было промоделировано взаимодействие Pc с Cyt f и Pc с PSI из цианобактерий в растворе. Представленные модели описывают влияние мутаций и ионной силы на взаимодействия Pc с Cyt f и Pc с PSI. Были подобраны параметры модели (расстояния докинга и вероятность образования комплекса) для пар белков Pc-PSI и Pc-Cyt f. Установлено, что скорость связывания Pc с Cyt f и PSI практически не зависит от ионной силы, таким образом, электростатические взаимодействия в реакциях связывания Pc с Cyt f и Pc с PSI в цианобактериях играют намного меньшую роль, чем в высших растениях.

Полученные результаты могут быть использованы для исследования линейной и циклической цепей фотосинтетического электронного транспорта, а также моделирования переноса электрона в дыхательной цепи митохондрий, и описания переноса электрона в тилакоидной мембране цианобактерий, в которых дыхательная цепь объединена с фотосинтетической.

## **ВЫВОДЫ**

1. Построена многочастичная компьютерная модель взаимодействия подвижных белков, мультиферментных комплексов и фотосинтетической мембраны, учитывающая электростатические взаимодействия, сложную форму белков, неоднородность распределения белковых комплексов. Модель описывает перенос электрона от Cyt f на P700 белком Pc.

2. На модели получены кинетические кривые окисления Cyt f и восстановления P700 в тилакоидной мембране высших растений после воздействия короткой вспышки света. Полученные в результате компьютерных экспериментов характерные времена реакций согласуются с экспериментальными данными.

3. На модели показано влияние ионной силы на скорость реакции связывания Pс с Cyt f в люмене тилакоида. Зависимость константы скорости реакции от ионной силы носит немонотонный характер, что соответствует гипотезе о преобладании непродуктивных состояний Pс в комплексе с Cyt f при низких значениях ионной силы.

4. Исследование влияния поверхностной плотности заряда мембраны на скорость реакции связывания Pс с Cyt f показало, что при физиологических значениях ионной силы поле мембраны в областях с плотностью заряда  $\sigma > -33 \text{ мКл/м}^2$  практически не влияет на скорость образования комплекса Cyt f и Pс. В областях с большими значениями поверхностной плотности отрицательного заряда может наблюдаться ингибирование реакции образования комплекса Pс и Cyt f.

5. Проведено исследование взаимодействия Pс с Cyt f и PSI в цианобактериях. Установлено, что скорость связывания Pс с Cyt f и PSI практически не зависит от ионной силы, что обусловлено электростатическими свойствами данных белков. Таким образом, электростатические взаимодействия в реакциях связывания Pс с Cyt f и Pс с PSI в цианобактериях играют намного меньшую роль, чем в высших растениях.



## **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

### **Статьи**

1. Грачева М. Е., Докукина И. В., Петрова О. С., Цуканов А. А., Грачев Е. А. Моделирование сцен в задачах биофизики // Сборник научных трудов "Математика. Компьютер. Образование". - 2005. - Т. - 12. - № 2. - С. 771-779.
2. Князева О. С., Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Ризниченко Г. Ю., Грачев Е. А., Рубин А. Б. Модель электростатических взаимодействий пластоцианина с тилакоидной мембраной и встроенными в нее трансмембранными белковыми комплексами // Сборник научных трудов "Математика. Компьютер. Образование". - 2009. - Т. - 16. - № 2. - С. 212-218.
3. Коваленко И. Б., Князева О. С., Абатурова А. М., Ризниченко Г. Ю., Грачев Е. А., Рубин А. Б. Математическое моделирование электрического поля фотосинтетической мембраны // Сборник трудов 3 международного симпозиума "Симметрии: теоретический и методический аспекты" -2009. С. 89-95.
4. Грачев Н. Е., Князева О. С., Коваленко И. Б. Моделирование фазового и компонентного разделения в биологических мембранах // Вестник Московского Университета. Серия 3. Физика. Астрономия. - 2010. - Т. - 3. С. 69-72.
5. Князева О. С., Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Ризниченко Г. Ю., Грачев Е. А., Рубин А. Б. Многочастичная модель диффузии и взаимодействия пластоцианина с цитохромом  $f$  в электростатическом поле фотосинтетической мембраны // Биофизика. - 2010. - Т. - 55. - № 2. - С. 259-268.

### **Тезисы конференций**

6. Петрова О. С. Модели случайных блужданий для исследования кинетики многофазных многокомпонентных систем. Сборник тезисов 4 научно-технической конференции "Молодежь в науке", Саров-2005. С. 48.

7. Петрова О. С. Теория случайных блужданий в задачах моделирования самосборки макромолекул // Сборник тезисов международной конференции "Ломоносов-2005". - 2005. С. 119.
8. Волков В. Т., Грачёв Н. Е., Николаев А. Н., Петрова О. С., Грачев Е. А. Исследование процессов фазового и компонентного расслоения в липидных пленках // Сб. научных тезисов "Математика. Компьютер. Образование", Дубна. - 2006. С. 207.
9. Петрова О. С., Николаев А. Н., Грачёв Н. Е., Грачев Е. А. Моделирование фазового поведения раствора белковых молекул методом "патчей" // Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных тезисов. - М. - Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». - 2007. - Т. - 14. С. 178.
10. Лукашенко А. Т., Князева О. С., Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Грачев Е. А. Моделирование гидрофобных взаимодействий в биологических системах // Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных тезисов. - М. - Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». - 2009. - Т. 16. С. 267.
11. Грачев Н. Е., Князева О. С., Коваленко И. Б. Моделирование фазового и компонентного разделения в биологических мембранах // Сборник тезисов восьмой международной конференции "Проблемы биологической физики", Москва -2009, С. 18.
12. Князева О. С., Коваленко И. Б., Грачев Е. А., Ризниченко Г. Ю. Моделирование взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома  $f$  в электростатическом поле фотосинтетической мембраны // Сборник тезисов восьмой международной конференции "Проблемы биологической физики", Москва -2009, С. 20.
13. Князева О. С., Коваленко И. Б., Ризниченко Г. Ю. Моделирование диффузии пластоцианина и его взаимодействий с фотосинтетической мембраной и трансмембранными белковыми комплексами // Математика. Компьютер. Образование. Сб. научных тезисов. - М. - Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика». - 2010. - Т. 17. С. 243.