

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Федоров Владимир Андреевич

**Молекулярное моделирование образования комплексов
электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома f**

03.01.09 – Математическая биология, биоинформатика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова»

- Научные руководитель** – *Коваленко Илья Борисович, доктор физико-математических наук*
- Научные руководитель** – *Рубин Андрей Борисович, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН*
- Официальные оппоненты** – *Полежаев Андрей Александрович, доктор физико-математических наук, главный научный сотрудник лаборатории нелинейной динамики и теоретической биофизики в ФГБУН Физического института им. П.Н.Лебедева Российской академии наук*
- Хренова Мария Григорьевна, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник кафедры физической химии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова»*
- Шайтан Алексей Константинович, кандидат физико-математических наук, ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова»*

Защита состоится «__» _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/154444173/>

Автореферат разослан “__” _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук

М.Г. Страховская

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Взаимодействие белков – необходимый этап большинства процессов, протекающих в клетке. Мобильные белки взаимодействуют со своими редокс-партнерами, перенося электроны в фотосинтетической и дыхательной электрон-транспортных цепях. Эти взаимодействия дают начало множеству событий, происходящих в живой клетке на различных пространственных и временных масштабах: от перераспределения электронной плотности на атомах в молекуле (времена порядка фемтосекунд и расстояния доли ангстрема), движения атомов в молекуле (пикосекунды), до диффузии белков в клетке (микросекунды и микрометры). Каждому из этих уровней организации биологической системы соответствуют свои методы экспериментального исследования и компьютерного моделирования, так что целостное понимание требует сопряжения различных подходов.

Механизмы образования комплексов электрон-транспортных белков, в том числе в различных видах организмов, остаются не до конца изученными. Существующие в настоящее время экспериментальные методы не позволяют выявить все характерные стадии образования белок-белковых комплексов и детально изучить динамику этого процесса. Помимо экспериментальных, большую роль в этой области играют методы компьютерного моделирования. Так, метод классической броуновской динамики применялся для моделирования процесса образования комплексов электрон-транспортных белков. Однако, он имеет ряд ограничений, связанных со сложностью учета роли молекул растворителя и конформационных изменений, которые могут существенно влиять на процесс комплексообразования белков и перенос заряда. Современные методы молекулярной динамики являются весьма ресурсоемкими, что накладывает ограничения на размер моделируемой системы и время расчета. Это обстоятельство пока не позволяет использовать их для анализа взаимодействия электрон-транспортных белков на всей пространственно-временной шкале этих процессов.

Разработка комплексного подхода с использованием разных методов компьютерного моделирования взаимодействия макромолекул является фундаментальной проблемой биофизики и математической биологии. Очевидно, для качественного и количественного описания взаимодействия белков на разных стадиях сближения макромолекул и образования комплексов электрон-транспортных белков необходимо использовать различные методические подходы, что и явилось предметом данной работы.

Целью работы является изучение механизмов образования комплекса белков пластоцианина и цитохрома f у разных групп фотосинтезирующих организмов методами молекулярного моделирования. Для достижения этой цели необходимо решить следующие

задачи:

1. Разработать молекулярные компьютерные модели взаимодействия электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома f из высших растений, зеленых водорослей и цианобактерий.
2. Провести компьютерное моделирование поэтапного процесса образования белкового комплекса с использованием вычислительного аппарата броуновской и молекулярной динамики, а также кластерного анализа.
3. Выявить различные энергетически выгодные метастабильные состояния в процессе формирования комплекса белков пластоцианина и цитохрома f из различных организмов.
4. Провести сравнительный анализ формирования комплексов белков пластоцианина и цитохрома f различных организмов.

Основные положения, выносимые на защиту:

Предложена детальная модель молекулярного механизма образования функционально активного комплекса белков пластоцианина и цитохрома f различных организмов. Созданная модель позволяет описать физико-химические процессы, происходящие на разных пространственно-временных масштабах, благодаря сопряжению различных подходов молекулярного моделирования.

С применением предложенной модели показано, что белки пластоцианин и цитохром f из различных организмов по-разному достигают состояния функционально активного комплекса. Показана различная роль конформационных изменений и электростатических взаимодействий при формировании комплексов белков пластоцианина и цитохрома f у организмов, обладающих различными эволюционными формами фотосинтетического аппарата.

В цианобактерии *P. laminosum* образование комплекса происходит по наиболее простому столкновительному типу без предварительной взаимной ориентации молекул. В случае цианобактерии *Nostoc* пластоцианин сближается с молекулой цитохрома f за счет дальнедействующих электростатических взаимодействий уже в ориентации, в которой атом меди обращен к цитохрому f . В высших растениях и зеленой водоросли электростатические взаимодействия сначала способствуют занятию молекулой пластоцианина положения вблизи гема цитохрома f , а дальнейшее сближение кофакторов белков и формирование финального комплекса происходит в результате вращения молекулы пластоцианина.

Научная новизна работы. Предложен комплексный подход компьютерного моделирования процесса формирования функционально активного белок-белкового комплекса в растворе, который включает сопряженное броуновское и молекулярное моделирование. Выявлены физические механизмы, определяющие различные пути образования комплекса белков пластоцианина и цитохрома *f* высших растений, зеленых водорослей и цианобактерий. Показано, что электростатические взаимодействия играют разную роль в процессе образования электрон-транспортных комплексов белков у организмов, обладающих различными эволюционными формами фотосинтетического аппарата.

Научная и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в разработке методического подхода, позволяющего охарактеризовать взаимодействия молекул в процессе образования функционально активного белок-белкового комплекса и раскрыть физические механизмы, обеспечивающие эффективное формирование функционально активного комплекса. Выявлены пути образования функционально активного комплекса и установлены их различия для белков пластоцианина и цитохрома *f* из высших растений, зеленой водоросли и цианобактерий. Показано, что образование комплекса белков из высших растений и зеленых водорослей происходит схожим образом, однако сильно отличается от поведения белков из цианобактерий.

Практическая значимость работы заключается в том, что разработанный подход может использоваться для поиска белковых соединений, обладающих заданными свойствами, в целях применения их в биотехнологии и медицине.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены и обсуждались на: Первом европейском конгрессе по исследованию фотосинтеза (ePS-1), Упсала, Швеция, 2018 г; международной конференции «Биомембраны», Долгопрудный, Россия, 2018; международной конференции "Математическая биология и биоинформатика", Пушкино, Россия, 2018; международной конференции «Исследования методом молекулярного моделирования в науке о материалах и биологии 2017» (MSSMBS 2017), Петергоф, Россия, 2017; международной конференции «Математическое моделирование и вычислительная физика, 2017» (ММСР2017), Дубна, ОИЯИ, Россия, 2017; VII международной конференции «Фотосинтез и устойчивое развитие-2016», Пушкино, Россия, 2016; Первом Российском кристаллографическом конгрессе, Москва, Россия, 2016; международных конференциях серии «Математика. Компьютер. Образование», Дубна, 2014, 2016, 2018 Пушкино, 2013, 2015, 2017; IV и V Съездах биофизиков России, Нижний Новгород, 2013, Ростов-на-Дону, 2015;

Международной школе «Вычислительное и теоретическое моделирование биологических взаимодействий», Дубна, 2013; V Международной конференции «Математическая биология и биоинформатика» (ICMBV14), Пущино, 2014; Международной научно-методической конференции "Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы", Воронеж, 2013; Молодежной научно-практической конференции «Биофизика биоэнергетических процессов», Звенигородская биостанция им. С.Н. Скадовского МГУ им. М.В. Ломоносова, 2013; семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Публикации. Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 46 работах, из них 6 – в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, а также 4 – в сборниках статей и научных трудов конференций и 36 – в сборниках тезисов докладов международных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, трех глав, обсуждения результатов, заключения и выводов. Полный объем диссертации составляет 103 страницы с 28 рисунками и 5 таблицами. Список литературы содержит 95 наименований.

Содержание работы

Во **введении** и **первой главе** («Обзор литературы») обоснована актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель, ставятся задачи работы. Рассматриваются современные методы компьютерного моделирования взаимодействия белков и приведены сведения об электронно-транспортных белках пластоцианина и цитохрома *f*, принимающих участие в переносе электрона при фотосинтезе.

Вторая глава описывает методы компьютерного моделирования взаимодействия белков, которые были использованы для анализа формирования белок-белкового комплекса. Взаимодействие двух белков представляет собой сложный процесс, при котором необходимо учитывать события происходящие на разных пространственно-временных масштабах – от пикосекунд (подвижность атомов) до микро- и миллисекунд (времена диффузии белка в растворе). Для переноса электрона между Cyt *f* и Pс белки должны образовать белок-белковый комплекс. Процесс образования такого комплекса можно условно разделить на две основные стадии: (1) формирование диффузионно-столкновительного комплекса, при котором ключевую роль играют диффузия и дальнедействующие электростатические взаимодействия, и (2) дальнейшее сближение макромолекул и их окончательное связывание, решающую роль в которых играют гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия, а также подвижность атомов в белок-белковом интерфейсе. В работе при описании первой

стадии методом БД белковые молекулы представляются как твердые тела, а для описания второй стадии использовался метод полноатомной молекулярной динамики с явно заданным растворителем, позволяющий учесть подвижность атомов белков и возможную роль гидрофобных взаимодействий.

Трехмерные модели молекул белков были построены на основе пространственных структур, приведенных в базе данных PDB. В начальный момент времени обе молекулы белка помещались в реакционном объеме в случайные положения в случайных ориентациях. Моделирование диффузии и электростатического взаимодействия белков методом БД выполнялось до тех пор, пока энергия электростатического притяжения между белками не достигала заданного порогового значения, и соответствующая структура полученного энергетически выгодного диффузионно-столкновительного комплекса сохранялась для дальнейшего анализа. Для моделирования методом БД использовался программный пакет ProKSim (**Protein Kinetics Simulator**), разработанный сотрудниками кафедры биофизики биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Для анализа полученных энергетически выгодных диффузионно-столкновительных комплексов макромолекул был применен однопараметрический иерархический метод классификации структур. Для каждого кластера определялась так называемая «центральную структура», имеющая минимальное среднее среднеквадратичное отклонение от всех остальных структур кластера. Дальнейшая трансформация центральных структур кластеров исследовалась с применением метода МД моделирования. Расчеты МД проводились с использованием программного обеспечения GROMACS 5, которое позволяет проводить параллельные вычисления на гибридной вычислительной архитектуре с силовым полем CHARMM27.

Третья глава посвящена описанию результатов применения комплексного метода компьютерного моделирования взаимодействия белков.

Пространственная трехмерная структура белков пластоцианина и цитохрома *f* у разных видов весьма сходна (рисунок 1), но их аминокислотные последовательности сильно отличаются. Изменение расположения заряженных аминокислотных остатков в белковых последовательностях приводит к уникальному распределению электростатических точечных зарядов на поверхности белков из различных организмов, которые формируют различные электростатические потенциальные поля вокруг белков, что в свою очередь влияет на характер белок-белковых взаимодействий. На рисунке 1 показаны значения электростатического потенциала на поверхностях белков пластоцианина и цитохрома *f* и общий суммарный заряд белка при pH 7 и ионной силе 100 мМ. Из рисунка 1 видно, что для всех представленных видов организмов распределение электростатического потенциала

уникально и очень неоднородно.

цитохром *f*

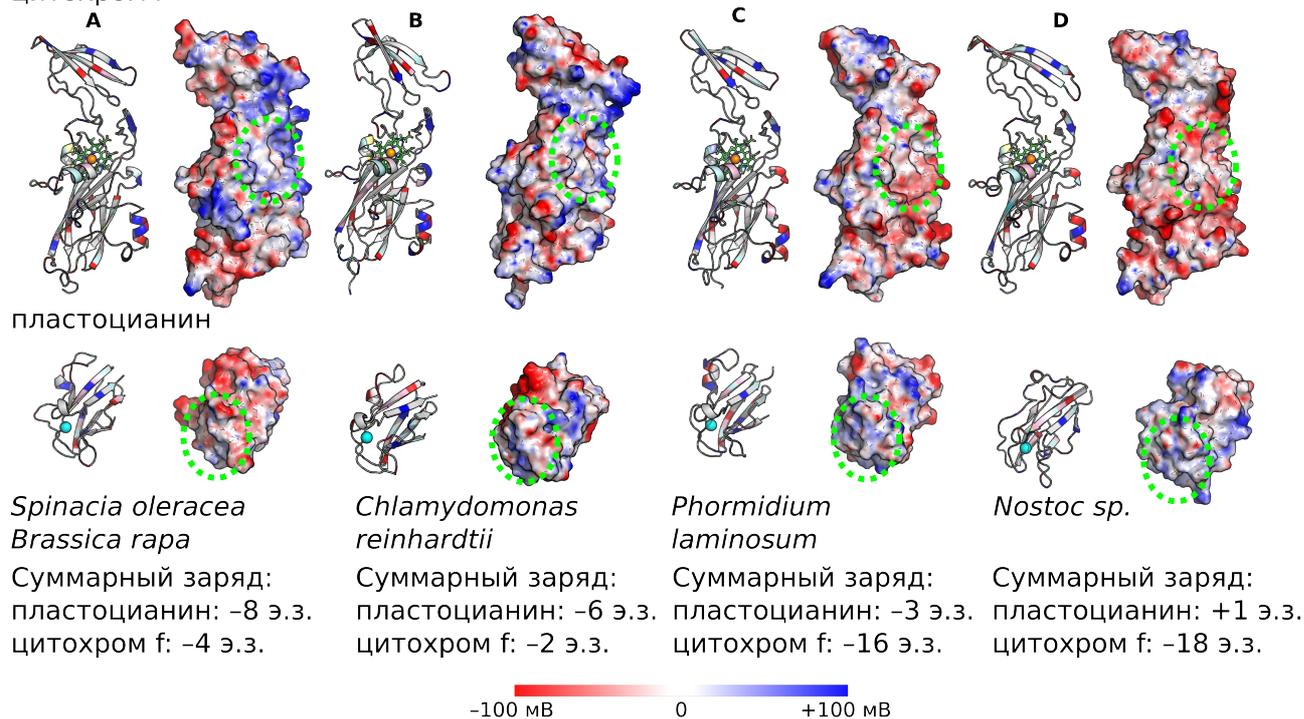


Рисунок 1. Представлены вторичные структуры и поверхности белков. Поверхности окрашены в соответствии с полем электрического потенциала от -100 мВ до 100 мВ, синий показывает положительно заряженные области, красный - отрицательно заряженные. Предполагаемые зоны контакта отмечены зеленым цветом. Структуры белка ориентированы таким образом, чтобы были видны зоны контакта. Вторичные структуры окрашены по типу аминокислотных остатков входящих в состав белков. Гидрофобные остатки окрашены в серый цвет, ароматические в розовый, полярные в светло-голубой, положительные в синий, отрицательные в красный, цистеин в желтый, пролин в зеленый. Сферами представлены атомы железа (оранжевый) и меди (циановый).

Исследование белков из высших растений

Белки из высших растений и зеленой водоросли имеют совершенно противоположное распределение заряда в области контакта по сравнению с белками из цианобактерий. В то же время, комплексы из цианобактерий сильно отличаются друг от друга с точки зрения суммарного заряда на белках.

Для получения структур комплексов пластоцианина и цитохрома *f* с энергией электростатического притяжения выше 4 кТ была проведена серия вычислительных экспериментов с использованием метода броуновской динамики (20000 повторностей). Методом кластерного анализа было показано, что все взаимные ориентации относятся к одному равномерно-плотному ансамблю. Мы предполагаем, что этот ансамбль структур соответствует состоянию диффузионного захвата молекулы пластоцианина цитохромом *f*. В

таком состоянии электростатические взаимодействия не позволяют молекуле пластоцианина покинуть область вблизи гема цитохрома f , однако не затрудняют его свободного вращения вокруг собственного центра масс.

В отличие от структур с энергией электростатического притяжения 4 кТ ансамбль структур с вдвое большей (8 кТ, всего 30000 повторностей) энергией разбивается на два значительно отличающихся кластера. В первом кластере (61% структур) молекулы белка имеют ориентацию, близкую к функционально активному комплексу, с электростатической связью между разноименно заряженными участками двух белков. При этом область молекулы пластоцианина, которая образует электростатическую связь с цитохромом f , имеет низкую подвижность по отношению к цитохрому f , тогда как противоположная сторона молекулы пластоцианина подвержена флуктуациям большей амплитуды. Это подтверждается результатами расчета температурного фактора Дебая–Валлера (В-фактор), показанного на рисунке 2 А1: изумрудный цвет показывает области с наименьшей подвижностью, рубиновый цвет означает максимальную подвижность. Таким образом, в первом кластере молекула пластоцианина за счет вращения под действием тепловых флуктуаций имеет возможность занять выгодную позицию относительно гема цитохрома f , способствующую переносу электрона.

Во втором ансамбле (37% структур) молекула пластоцианина повернута почти на 180° относительно ориентации в функционально активном комплексе, и ее движение значительно затруднено двумя электростатическими связями. Эти стерические ограничения также хорошо видны из распределения значений В-фактора на рисунке 2 В1. Такая ситуация препятствует трансформации структур второго кластера в функционально активный комплекс.

Чтобы исследовать дальнейшую трансформацию диффузионно-столкновительных комплексов из этих двух ансамблей, мы использовали полноатомную молекулярную динамику с явно заданным растворителем для имитации процесса трансформации центральных структур кластеров в финальный комплекс с учетом конформационной подвижности молекул. Центральные структуры первого и второго кластеров показаны в левой части рисунка 2 (А1 и В1). Мы получили две траектории молекулярной динамики около 1 мкс каждая. Расчет, имевший в качестве начальных условий центральную структуру первого кластера, завершился образованием стабильного комплекса с расстоянием между кофакторами около 1,4 нм, которое было достигнуто уже в первые 200 нс расчета (рис. 2 А3). Этот финальный комплекс похож на структуры, полученные экспериментально при помощи ЯМР (PDB ID 2PCF, расстояние между кофакторами 1,1 – 1,3 нм).

Центральная структура второго кластера привела к довольно стабильной, но отличной от экспериментальной структуре комплекса с расстоянием между кофакторами около 3,7 нм.

В полученной структуре пластоцианина находится в перевернутом положении относительно ориентации, которую он имеет в комплексах полученных при помощи ЯМР. Предполагается, что структуры второго кластера являются непродуктивными метастабильными состояниями, которые нельзя легко разрушить действием случайной броуновской силы. В условиях низкой ионной силы, где имеет место слабое экранирование электрических зарядов на поверхностях белков, стабильность таких непродуктивных состояний возрастает. Существование таких неактивных состояний может быть основной причиной снижения скорости образования активных белок-белковых комплексов, наблюдаемого в экспериментах при низких значениях ионной силы. Данная гипотеза также находит свое подтверждение в расчетах с использованием метода броуновской динамики для энергетически выгодных взаимных расположений с энергией 13 кТ и 8 кТ и ионной силе 0 и 100 соответственно. Оказалось, что доля продуктивных ориентаций диффузионно-столкновительных комплексов снижается с 61 до 39 % от общего числа структур.

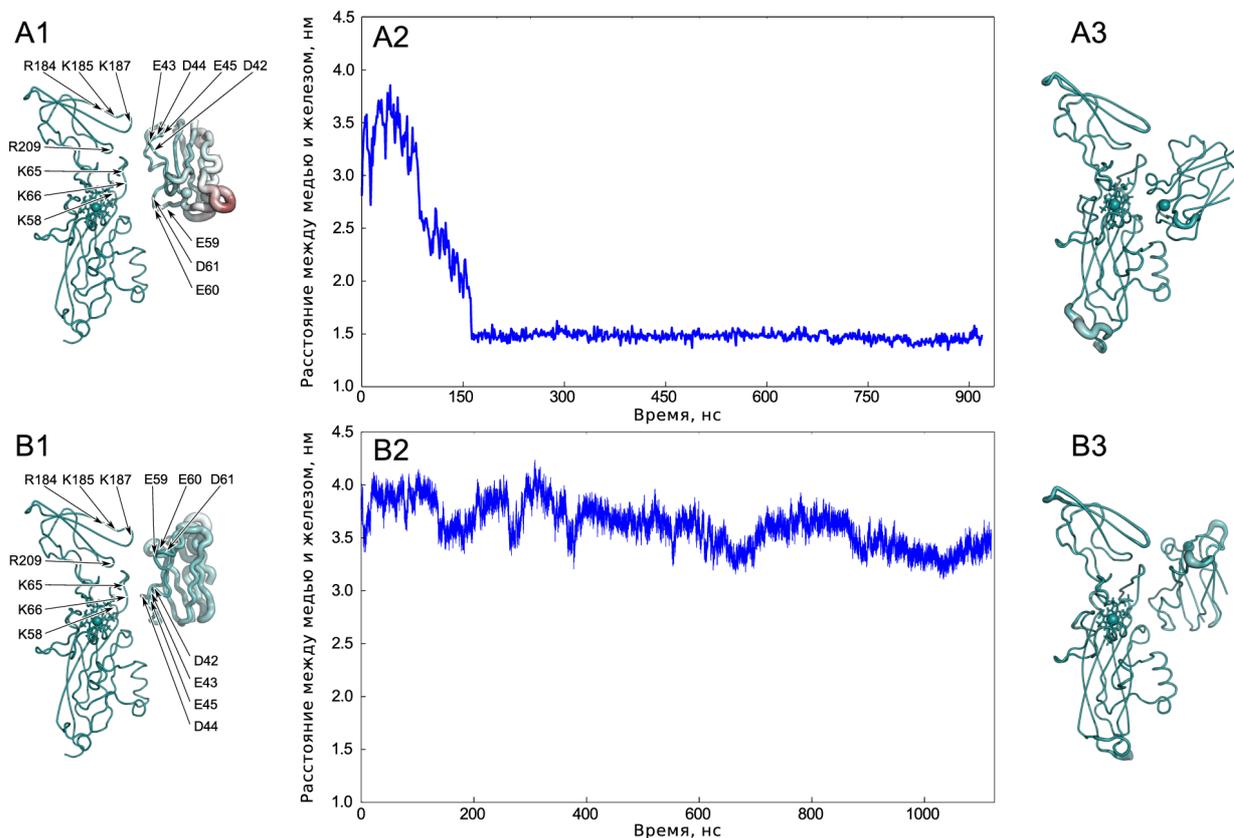


Рисунок 2. A1, B1: центральные структуры первого (A1) и второго (B1) кластеров диффузионно-столкновительных комплексов пластоцианина и цитохрома *f* из высших растений с энергией электростатического притяжения более 8 кТ. A2, B2: расстояние между атомами меди и железа пластоцианина и цитохрома *f*, полученное из расчетов молекулярной динамики, имеющих в качестве начальных центральную структуру первого (A2) и второго (B2) кластеров. A3, B3: структуры первого (A3) и второго (B3) финальных комплексов, полученных из молекулярно-динамических расчетов. Структуры окрашиваются по значению

В-фактора от изумрудного (0) до рубинового (7263 \AA^2 в A1, B1 и 2074 \AA^2 в A3, B3). Толщина линий белковых структур также пропорциональна значению В-фактора.

Зеленая водоросль Chlamydomonas reinhardtii

Для молекул пластоцианина и цитохрома *f* из *C. reinhardtii* также были получены структуры диффузионно-столкновительных комплексов с энергией электростатического притяжения превышающей 4 кТ (20000 структур). Как и в случае высших растений, кластерный анализ выявил равномерно плотный ансамбль энергетически выгодных взаимных ориентаций, в которых пластоцианин расположен вблизи области гема цитохрома *f*, а электростатические взаимодействия не затрудняют его свободного вращения вокруг собственного центра масс.

Этот ансамбль разбивается на три меньших по размеру кластера при выборке структур с вдвое большим (8 кТ) значением энергии электростатического притяжения (20000 структур суммарно). Первый кластер (35% структур) значительно отличается от двух других. Он похож на первый кластер высших растений тем, что его структуры имеют электростатический контакт, образованный противоположно заряженными областями пластоцианина (D43E44D45D54) и цитохрома *f* (K188K189). Область пластоцианина, которая образует электростатическую связь с цитохромом *f*, имеет низкую подвижность относительно цитохрома *f*, в то время как противоположная сторона молекулы пластоцианина претерпевает большие флуктуации, что подтверждается распределением значений В-фактора, показанным на рисунке 3 A1.

Второй кластер (25% структур) также имеет одноточечное соединение, но оно образовано другими областями, отличными от первого случая. Здесь оно создается положительно заряженной петлей (K188K189) цитохрома *f* и отрицательно заряженной петлей (D60D62E86) пластоцианина. В этой ориентации вращательное движение молекулы пластоцианина, которое можно представить из распределения значений В-фактора (рисунок 3 B1), не способно повернуть его в ориентацию с минимальным расстоянием между кофакторами. Третий ансамбль (9% структур) аналогичен второму кластеру высших растений, где пластоцианин перевернут относительно ориентации в функционально активном комплексе, и его движение значительно ограничено электростатическими взаимодействиями, что можно видеть из распределения значений В-фактора, представленного на рисунке 3 C1.

Дальнейшая трансформация центральных структур этих трех ансамблей была исследована методом молекулярной динамики. Подобно ситуации с белками из высших растений, молекулярно-динамический расчет, в котором белки в начальный момент времени

имеют взаимную ориентацию как в центральной структуре первого кластера, завершается образованием стабильного комплекса с расстоянием между кофакторами около 1,2 нм, что происходит в первые 150 нс (рисунок 3 А2). Этот финальный комплекс (рисунок 3 А3) похож на финальный комплекс, образованный центральной структурой первого кластера высших растений, см. рисунок 2 А3. Молекулярно-динамические расчеты с центральными структурами второго (рисунок 3 В3) и третьего (рисунок 3 С3) кластеров привели к образованию стабильных комплексов со сравнительно большими расстояниями (около 3 нм) между кофакторами белков. Исходя из расчетов молекулярной динамики сделан вывод о том, что структуры второго и третьего кластеров не могут легко достигнуть ориентации с расстоянием менее 2,5 нм между кофакторами.

Цианобактерия Nostoc sp.

Для молекул пластоцианина и цитохрома *f* из *Nostoc* методом броуновской динамики были получены структуры диффузионно-столкновительных комплексов с энергией электростатического притяжения более 4 кТ (15214 структур в 17642 расчетов броуновской динамики). Кластерный анализ выявил два больших значительно отличающихся друг от друга кластера (43,1% и 40,5%) и два небольших кластера (по 3%). Остальные десять процентов структур имеют произвольные ориентации. Структуры двух небольших кластеров были исключены из рассмотрения, поскольку такие расположения пластоцианина, при прохождении реакции в фотосинтетической тилакоидной мембране, будут перекрываться с другими субъединицами цитохромного *b₆f* комплекса и липидами.

В первом большом кластере молекулы белка имеют ту же ориентацию, что и в функционально активном комплексе, исследованном экспериментально с использованием ЯМР. Эта ориентация поддерживается взаимодействием положительно заряженного R93 на пластоцианине с отрицательно заряженным остатком D64 на цитохроме *f*. Заряды этих взаимодействующих областей противоположны зарядам соответствующих областей у белков высших растений и зеленой водоросли. Как видно из распределения значения В-фактора (рисунок 4 А1), молекула пластоцианина может слегка колебаться вокруг оси, проходящей между атомами железа и меди. Во втором большом ансамбле молекула пластоцианина также слегка колеблется вокруг оси, проходящей между атомами железа и меди (рисунок 4 В1), но сама молекула находится в перевернутом положении. Промежуточные структуры между этими двумя ансамблями встречаются редко, поэтому предполагается, что переход от одного состояния к другому затруднен.

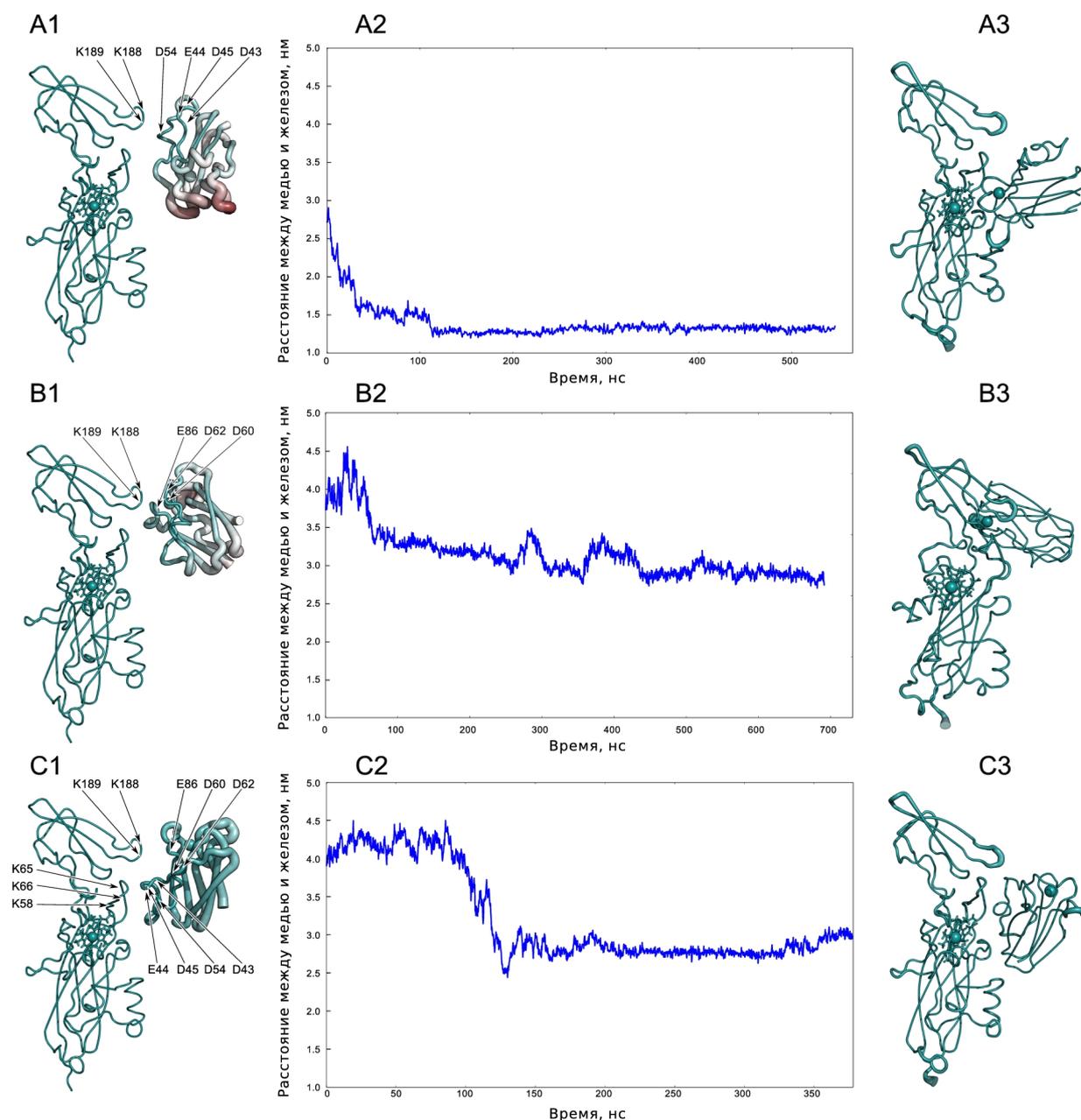


Рисунок 3. A1, B1, C1: центральные структуры первого (A1), второго (B1) и третьего (C1) кластеров диффузионно-столкновительных комплексов пластоцианина и цитохрома *f* из зеленой водоросли *C. reinhardtii* с энергией электростатического притяжения более 8 кТ. A2, B2, C2: расстояние между атомами меди и железа пластоцианина и цитохрома *f*, полученное из расчетов молекулярной динамики, имеющих в качестве начальных центральную структуру первого (A1), второго (B1) и третьего (C1) кластеров. A3, B3, C3: структуры первого (A1), второго (B1) и третьего (C1) финальных комплексов, полученных из молекулярно-динамических расчетов. Структуры окрашиваются по значению В-фактора от изумрудного (0) до рубинового (9198 \AA^2 в A1, B1, C1 и 2074 \AA^2 в A3, B3, C1). Толщина линий белковых структур также пропорциональна значению В-фактора.

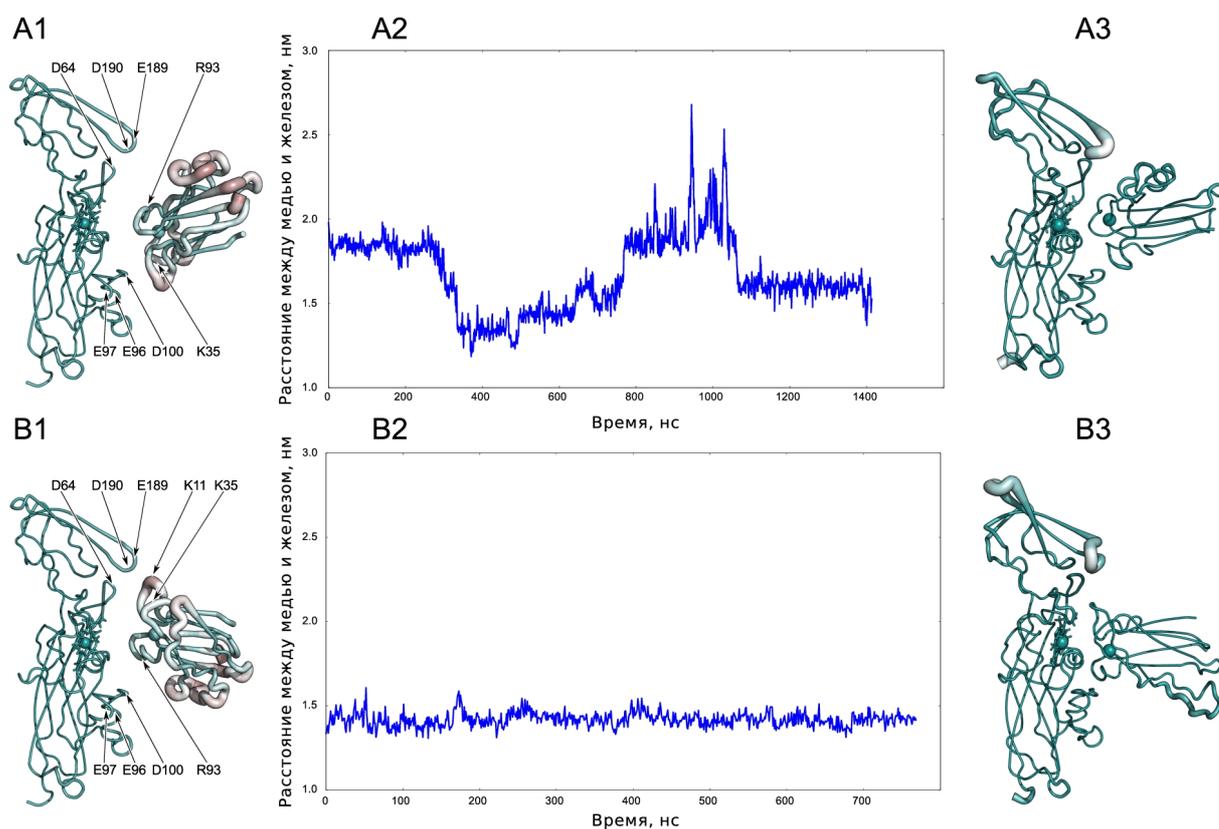


Рисунок 4. A1, B1, C1: центральные структуры первого (A1), второго (B1) и третьего (C1) кластеров диффузионно-столкновительных комплексов пластоцианина и цитохрома *f* цианобактерии *Nostoc* с энергией электростатического притяжения более 4 кТ. A2, B2: расстояние между атомами меди и железа пластоцианина и цитохрома *f*, полученное из расчетов молекулярной динамики, имеющих в качестве начальных центральную структуру первого (A2) и второго (B2) кластеров. A3, B3: структуры первого (A3) и второго (B3) финальных комплексов, полученных из молекулярно-динамических расчетов. Структуры окрашиваются по значению B-фактора от изумрудного (0) до рубинового (13334 \AA^2 в A1, B1 и 2074 \AA^2 в A3, B3). Толщина линий белковых структур также пропорциональна значению B-фактора.

Дальнейшая трансформация центральных структур двух основных кластеров была исследована методом молекулярной динамики. Оба молекулярно-динамических расчета завершились с образованием устойчивых комплексов с расстоянием между кофакторами около 1,5 нм (первый кластер) и 1,4 нм (второй кластер), рисунок 4 (A2 и B2). Финальный комплекс из первого кластера похож на экспериментальную структуру. Финальный комплекс из второго кластера более стабилен, чем из первого кластера, но его ориентация сохраняет перевернутое положение пластоцианина в сравнении с положением молекулы в структуре, полученной экспериментально (рисунок 4 B3).

Цианобактерия *Phormidium laminosum*

Для молекул пластоцианина и цитохрома *f* из *P. laminosum* методом броуновской динамики были получены структуры диффузионно-столкновительных комплексов с энергией электростатического притяжения более 4 кТ (3987 структур в 10505 расчетов броуновской динамики). Кластерный анализ диффузионно-столкновительных комплексов позволил выявить три кластера энергетически выгодных взаимных ориентаций. Ни одна из центральных структур не похожа на структуру функционально-активного комплекса, полученного методом ЯМР. Принимая во внимание этот факт, можно предположить, что образование функционально-активного комплекса для данной пары белков зависит в большей степени от других факторов, нежели от дальнедействующих электростатических взаимодействий, которые в свою очередь не были учтены в данной модели.

Диффузионный захват

Диффузионный захват пластоцианина цитохромом *f* является первой стадией процесса формирования белок-белкового комплекса. Данное метастабильное состояние было выявлено у высших растениях, зеленой водоросли и цианобактерии *Nostoc*, но не обнаружено для белков из цианобактерии *P. laminosum*. Сама стадия диффузионного захвата в высших растениях и зеленой водоросли отличается от диффузного захвата в цианобактерии *Nostoc* ориентацией пластоцианина относительно цитохрома *f* в диффузионно-столкновительном комплексе и количеством электростатических контактов между белками.

Анализ положения центров масс молекулы пластоцианина цианобактерии *Nostoc* в ансамбле его энергетически выгодных взаимных ориентаций с цитохромом *f* с энергией электростатического притяжения больше 4 кТ (рисунок 5 А) показывает, что пластоцианин взаимодействует с довольно обширной частью поверхности своего партнера. Центры масс пластоцианина окрашены в соответствии с расстоянием между атомами меди пластоцианина и железа цитохрома *f* (синий цвет соответствует расстоянию больше 2,2 нм, красный цвет – расстоянию меньше 1,6 нм). Наиболее населенное местоположение близко к месту связывания в финальном комплексе, что показано множеством красных, желтых и зеленых сфер. Этот результат находит свое подтверждение в исследованиях ЯМР-спектроскопии (Scanu S. et al. 2013), где авторы определили, какие из диффузионно-столкновительных комплексов способны к быстрому переносу электронов (рисунок 5В). Структуры с расстоянием между железом и медью менее 1,6 нм (красные точки) расположены исключительно перед гемом, в окрестности положений финальных структуры. Согласно данным ЯМР, наиболее населенными (Scanu S. et al. 2013) являются конфигурации с наименьшим расстоянием между атомами меди и железа.

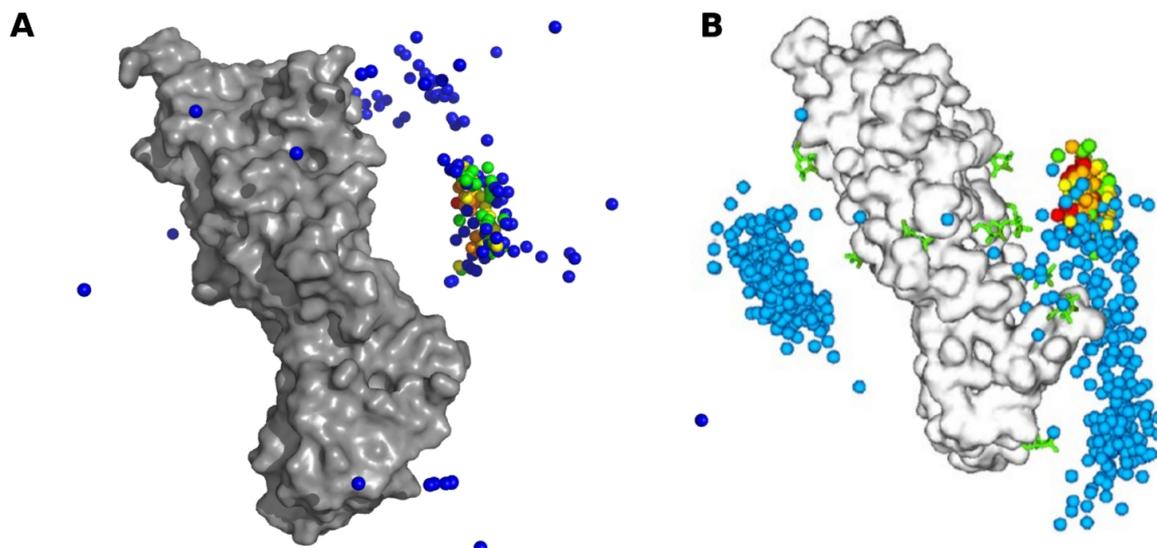


Рисунок 5. Диффузионно-столкновительные комплексы пластоцианина и цитохрома *f*. Цитохром *f* показан как серая поверхность, а центры масс молекул пластоцианина представлены сферами. Центры масс пластоцианина имеют цветовую маркировку, в соответствии с увеличением расстояния между медью пластоцианина и железом цитохрома *f*, от красного к синему (красный $\leq 1,6$ нм, оранжевый $\leq 1,8$ нм, желтый $\leq 2,0$ нм, зеленый $\leq 2,2$ нм; синий $> 2,2$ нм). А — по результатам вычислений методом броуновской динамики; В — по результатам ЯМР-спектроскопии (Scanu et al. 2013).

Пластоцианин и цитохром *f* из цианобактерии *Nostoc* достигают конфигураций, в которых активные центры белков обращены друг к другу, в отличие от высших растений и зеленой водоросли, где при энергии электростатического притяжения между белками, превышающей 4 кТ, пластоцианин может свободно вращаться вокруг своего центра масс, а его поступательное движение ограничено областью, окружающей гем цитохрома *f*. При 8 кТ белки сначала образуют электростатическую односточную шарнирную связь, и только тогда электростатически выгодные взаимные ориентации преобразуются в финальный комплекс путем поворота вокруг этой точки контакта. В случае белков из *P. laminosum*, образование энергетически выгодных взаимных ориентаций является крайне редким событием, и ни одна из конфигураций не имеет расстояния между медью и железом менее 2.18 нм, поэтому можно сделать предположение о том, что роль электростатических взаимодействий в образовании комплекса пластоцианина с цитохромом *f* для данной цианобактерии

пренебрежимо мала.

Направление ориентации контакта (head-on/side-on)

Расчеты показывают, что ориентация пластоцианина боком (side-on) по отношению к цитохрому f является типичной для зеленой водоросли и высших растений. Результат компьютерного моделирования для белков из высших растений согласуется с точки зрения ориентации молекулы пластоцианина с экспериментально полученным методом ЯМР положением в комплексе с цитохромом f . Данное взаимное расположение белков в статье (Irene Díaz-Moreno 2005), трактуется как ориентация боком (side-on).

Почти половина энергетически выгодных взаимных ориентаций пластоцианина и цитохрома f *Nostoc*, полученные в расчетах броуновской динамики (кластер 1, рисунок 4 A1), весьма схожа с экспериментальными структурами, полученными при помощи ЯМР-спектроскопии, а в остальных (кластер 2, рисунок 4 B1) пластоцианин находится в перевернутой ориентации. Авторы (Irene Díaz-Moreno et al. 2005) трактуют положение пластоцианина в экспериментально полученных ЯМР структурах для *Nostoc* как боковое (side-on), тогда как с точки зрения компьютерного моделирования их взаимное расположение можно охарактеризовать как среднее между ориентацией «головой» (head-on) и боком (side-on). В-фактор показывает (рисунок 4 A1), что в ансамбле энергетически выгодных ориентаций первого кластера молекула пластоцианина может оказаться как ориентированная «головой» (head-on) по отношению к цитохрому f , так и боком (side-on). Однако, центральные структуры обоих полученных кластеров приходят в результате расчетов молекулярной динамики к состоянию, в котором пластоцианин ориентирован «головой» (head-on) к цитохрому f (рисунки 4 A3 и B3).

Данные ЯМР для цианобактерии *P. laminosum* показывают, что пластоцианин ориентирован «головой» (head-on) в комплексе с цитохромом f (Irene Díaz-Moreno et al. 2005), однако связывается относительно плохо. Наши расчеты броуновской динамики не показывают какую-либо четко определенную энергетически выгодную ориентацию пластоцианина в комплексе с цитохромом f , которую можно было бы считать ориентированной «головой» (head-on) или боком (side-on).

Особенности формирования функционально активного комплекса у разных видов организмов

В работе (Scanu S. et al. 2013) с использованием метода релаксационной парамагнитной ЯМР-спектроскопии была предложена модель электростатической предориентации молекул пластоцианина и цитохрома f из *Nostoc* перед образованием ими комплекса. На основании этой модели авторы делают вывод о том, что различие между диффузионно-

столкновительным и функционально активными комплексами фактически отсутствуют. Этот вывод для пары белков из цианобактерии *Nostoc* подтверждают расчеты, проведенные в рамках данной диссертационной работы. Диффузионно-столкновительные комплексы переходят в финальные, не претерпевая каких либо существенных взаимных вращений. Таким образом, диффузионно-столкновительные и финальные комплексы пластоцианина и цитохрома *f* для данного вида в наших численных экспериментах выглядят весьма схожими и имеют почти такую же ориентацию пластоцианина «головой» (head-on) по направлению к гему цитохрома *f*, и сохраняют ее в соответствующих финальных комплексах (см. Рисунок 4). Выявлены две устойчивые конфигурации с расстоянием между железом и медью менее 1,4 нм и они рассматриваются как финальные комплексы.

Для белков из высших растений и зеленой водоросли описанный выше процесс реализован иначе. В данном случае пластоцианин в состоянии диффузионно-столкновительного комплекса обращен боком (side-on) к цитохрому *f*, и только потом, в результате вращения относительно односточечной электростатической шарнирной связи образует финальный комплекс. Удастся обнаружить только одну стабильную конфигурацию белков с расстоянием между железом и медью менее 1,4 нм, которое и рассматривается как финальный комплекс. С другой стороны, примерно половина энергетически выгодных взаимных ориентаций пластоцианина и цитохрома *f* приводит к образованию стабильных комплексов со сравнительно большими расстояниями (около 3 нм) между кофакторами белков и, следовательно, не способных к переносу электронов. На пути от диффузионно-столкновительного к финальному комплексу не происходит существенных изменений в структуре белков. Имеет место лишь выход растворителя из белок-белкового интерфейса.

*Схема образования комплекса белков пластоцианина и цитохрома *f**

В соответствии с данными, полученными в результате компьютерного моделирования, рассматриваемый процесс образования белково-белкового электрон-транспортного комплекса в растворе, состоит из пяти этапов (рисунок 6): (1) свободная диффузия молекул, которая может привести к (2) их случайному сближению, дальнейшая взаимная ориентация, обусловленная дальнедействующими электростатическими взаимодействиями; (3) формирование диффузионно-столкновительного комплекса и (4) его трансформация в промежуточное метастабильное энергетически выгодное состояние, из которого (5) происходит формирование финального комплекса (функционально активная конфигурация) путем конформационных изменений в рамках белок-белкового интерфейса.

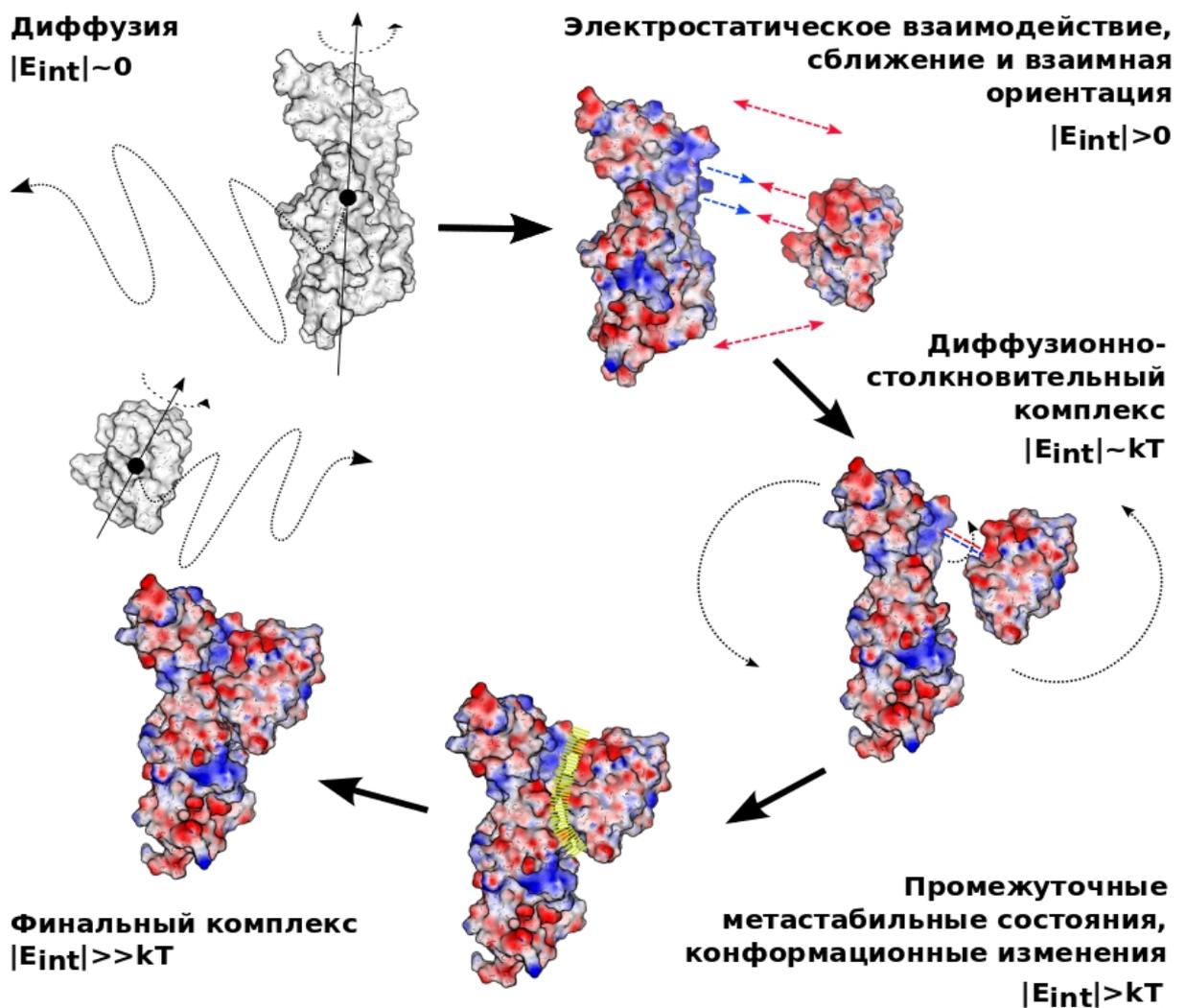


Рисунок 6. Схема образования белково-белкового комплекса для электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f*. Показана на примере белков из высших растений. Поверхности белков окрашены в соответствии с их поверхностным потенциалом в диапазоне от -100 до 100 мВ. Отрицательно заряженные участки показаны красным цветом, положительно заряженные - синим цветом.

Все пять стадий были выявлены для белков из высших растений, зеленой водоросли и цианобактерии *Nostoc*. При этом существуют различия между этими видами уже на стадии сближения белковых молекул и их взаимной ориентации за счет дальнодействующих электростатических взаимодействий. Так, в высших растениях и зеленой водоросли электростатические взаимодействия располагают молекулу пластоцианина вблизи гема цитохрома *f*, и только в результате последующего вращения молекулы пластоцианина происходит сближение атомов меди и железа. В случае цианобактерии *Nostoc*, напротив, пластоцианин сближается с молекулой цитохрома *f* в ориентации, где атом меди уже обращен к цитохрому *f*. Таким образом, диффузионно-столкновительные комплексы в высших

растениях и зеленых водорослях отличаются от таковых для цианобактерии *Nostoc*. В свою очередь, дальнейшая стабилизация комплексов пластоцианина с цитохромом *f* достигается по-разному. У высших растений и зеленой водоросли поворот малого домена вокруг точки соединения доменов происходит без значительных конформационных изменений самого домена (рисунок 2 АЗ&ВЗ). В отличие от этого, в цианобактерии *Nostoc* наблюдается высокоамплитудное направленное движение отрицательно заряженной петли G188E189D190 цитохрома *f* в направлении положительно заряженной молекулы пластоцианина, образующей комплекс с цитохромом *f* (рисунок 4 АЗ&ВЗ). Такое изменение структуры цитохрома *f* в цианобактерии *Nostoc* может стабилизировать комплекс. В высших растениях и зеленой водоросли структуры белков таковы, что уже в диффузионно-столкновительном комплексе энергия их электростатического взаимодействия достигает значений порядка $-8\dots-10$ кТ. Для цианобактерии *P. laminosum* не удалось обнаружить электростатическую предориентацию молекул при формировании диффузионно-столкновительного комплекса, из чего можно сделать предположение о том, что у белков *P. laminosum* стадия взаимной ориентации за счет дальнедействующих электростатических взаимодействий отсутствует, и молекулы приходят к правильной ориентации в процессе случайных флуктуаций.

Заключение

В рамках данной работы был разработан объединенный метод броуновской и молекулярной динамики и кластерного анализа, предназначенный для моделирования взаимодействия макромолекул. Были построены молекулярные компьютерные модели взаимодействия электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f* из различных видов организмов. Метод позволил исследовать влияние видовых изменений в структурах белков на специфику их взаимодействия. Положенные в основу компьютерной модели физические законы позволяют описать наблюдаемые в экспериментах взаимные ориентации белков в функционально активных комплексах, а также позволяют дать физические обоснования процессам, ведущим к комплексообразованию. Метод позволил выявить принципиальные отличия в формировании комплексов пластоцианина и цитохрома *f* разных видов организмов. Для пары белков из цианобактерии *Nostoc* диффузионно-столкновительные комплексы переходят в финальные, не претерпевая каких-либо существенных взаимных вращений. В диффузионно-столкновительном комплексе для данного вида пластоцианин имеет ориентацию «головой» (head-on) по направлению к гему цитохрома *f*, и сохраняет её в соответствующем финальном комплексе. Выявлены две устойчивые конфигурации с расстоянием между кофакторами на белках менее 1,4 нм, в каждой из которых возможен перенос электрона. Для белков из высших растений и зеленой водоросли пластоцианин в

состоянии диффузионно-столкновительного комплекса обращен боком (side-on) к цитохрому *f*. Такие промежуточные состояния в результате вращения вокруг односторонней электростатической шарнирной связи переходят в финальный комплекс.

Выводы

1. Разработан комплексный подход к компьютерному воспроизведению процесса образования функционально активного белок-белкового комплекса в растворе. Он основан на броуновском и молекулярном моделировании с различной степенью детализации в зависимости от расстояния между белками при образовании комплекса. Данный подход позволяет выявить отдельные этапы и различия в путях образования комплексов фотосинтетических электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f* разных организмов.
2. Созданы полноатомные молекулярно-динамические модели взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома *f* высших растений *Brassica rapa* и *Spinacia oleracea*, зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii* и цианобактерий *Nostoc* и *Phormidium laminosum* в явно заданном растворителе.
3. В высших растениях и зеленой водоросли молекула цитохрома *f* проявляет себя как относительно жесткое тело, где не происходит каких-либо значительных конформационных изменений. В случае цианобактерии *Nostoc* цитохром *f* после сближения претерпевает заметные конформационные изменения в области петли G188E189D190, которая приближается к пластоцианину и тем самым стабилизирует комплекс.
4. Для белков из высших растений и зеленой водоросли пластоцианин в состоянии диффузионно-столкновительного комплекса обращен боком (side-on) к цитохрому *f*, и только потом, в результате вращения пластоцианина относительно электростатической шарнирной связи образуется его финальный комплекс с цитохромом *f* за время порядка нескольких сотен наносекунд, в котором расстояние между кофакторами составляет около 1,4 нм. В ходе дальнейшей эволюции это расстояние существенно не изменяется, при этом реализуются различные взаимные расположения двух белков относительно друг друга.
5. Для пары белков из цианобактерии *Nostoc* образованные диффузионно-столкновительные комплексы переходят затем в финальные, не претерпевая каких-либо существенных взаимных вращений. В диффузионно-столкновительных комплексах для вида *Nostoc* пластоцианин имеет ориентацию «головой» (head-on) по направлению к гему цитохрома *f* и сохраняет её в двух финальных конфигурациях с расстоянием между железом и медью менее 1,4 нм.

Основные публикации Федорова Владимира Андреевича по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.09 - Математическая биология, биоинформатика

1. Fedorov V.A., Kovalenko I. B., Khruschev S.S., Ustinin D.M., Antal T. K., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Comparative analysis of plastocyanin-cytochrome *f* complex formation in higher plants, green algae and cyanobacteria // *Physiologia Plantarum*. 2019. № 166. P. 320–335.
2. Fedorov V.A., Kholina E.G., Kovalenko I.B., Gudimchuk N.B. Performance analysis of different computational architectures: molecular dynamics in application to protein assemblies, illustrated by microtubule and electron transfer proteins // *Supercomputing Frontiers and Innovations*. 2018. Vol. 5, No. 4 P. 111–114.
3. Коваленко И.Б., Хрущев С.С., Федоров В.А., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Роль электростатических взаимодействий в процессе диффузионного сближения и докинга электронтранспортных белков // Доклады Академии наук. 2016. Т. 468, № 2. С. 220–224.
4. Хрущев С.С., Абатурова А.М., Федоров В.А., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Идентификация промежуточных состояний в процессе диффузионного сближения электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f* // *Биофизика*. 2015. Т. 60, № 4. С. 629–638.
5. Хрущев С.С., Абатурова А.М., Дьяконова А.Н., Федоров В.А., Устинин Д.М., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование взаимодействий белков фотосинтетической электрон-транспортной цепи фотосинтеза методом броуновской динамики // *Биофизика*. 2015. Т. 60, № 2. С. 270–292.
6. Хрущев С.С., Абатурова А.М., Дьяконова А.Н., Устинин Д.М., Зленко Д.В., Федоров В.А., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса многочастичной броуновской динамики ProKSim // *Компьютерные исследования и моделирование*. 2013. Т. 5, № 1. С. 47–64.

Статьи в сборниках по теме диссертации

1. Федоров В.А., Коваленко И.Б., Хрущев С.С., Устинин Д.М., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Компьютерное моделирование образования комплекса электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома *f* высших растений, зеленых водорослей и цианобактерий // Сборник научных трудов симпозиума "Методы измерения и математическое моделирование физических процессов: биофотоника, оптика и радиолокация". 2018, Т. 2, С. 104–105.
2. Ризниченко Г.Ю., Дьяконова А.Н., Коваленко И.Б., Плюснина Т.Ю., Хрущев С.С., Федоров

В.А. Модели клеточной и молекулярной регуляции фотосинтетической цепи водород-выделяющих микроводорослей // Доклады Международной конференции Математическая биология и биоинформатика, 2018, V. 7, P. 66.

3. Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Knyazeva O.S., Fedorov V.A., Khruschev S.S., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Brownian dynamics study of complex formation of proteins plastocyanin and cytochrome *f* // Computer design for new drugs and materials: molecular dynamics of nanoscale phenomena. Nanotechnology science and technology computer science, technology and applications. Nova Science Publishers, Inc United States, 2017. P. 189–206.

4. Коваленко И.Б., Хрущев С.С., Устинин Д.М., Федоров В.А., Мамонов П.А., Зленко Д.В., Ризниченко Г.Ю., Рубин А.Б. Реконструкция молекулярных процессов в живой клетке // Альманах "Суперкомпьютерные технологии в науке, образовании и промышленности". Издательство МГУ Москва, 2013. С. 85–92.