

Простой эмпирический подход к моделированию электронного переноса между белковыми переносчиками в растворе

Хрущев С.С., Федоров В.А., Коваленко И.Б., Ризниченко Г.Ю.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова,
биологический факультет, кафедра биофизики

styx@biophys.msu.ru

Предложен простой эмпирический подход к описанию окислительно-восстановительных реакций между белковыми молекулами в моделях броуновской динамики. В основе подхода лежит предположение об экспоненциальной зависимости скорости переноса электрона от расстояния между реакционными центрами молекул. Предложен эффективный способ идентификации параметров модели с использованием экспериментальных данных о зависимости скорости взаимодействия белков от ионной силы раствора. Оценены параметры для взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома *f*. Разработанный подход будет использован в разрабатываемой иерархической модели фотосинтетического электронного транспорта. Также предполагается использовать данный подход для скрининга потенциально важных с биотехнологической точки зрения мутаций белков – переносчиков электрона.

Ключевые слова: молекулярное моделирование, броуновская динамика, белок-белковые взаимодействия, электронный транспорт.

Empirical Simulation of Redox Reactions between Proteins in Solution

Khrushev S.S., Fedorov V.A., Kovalenko I.B., Riznichenko G.Yu.

Lomonosov Moscow State University, School of Biology, Biophysics Department

A simple empirical approach to simulation of redox reactions between protein molecules in Brownian dynamics models is proposed. The approach is based on the assumption of the exponential dependence of the electron transfer rate on the distance between the reaction centers of molecules. An efficient method for identifying model parameters using experimental data on the dependence of the protein-protein reaction rate on the ionic strength of the solution is proposed. Parameters for the interaction of plastocyanin and cytochrome *f* proteins were estimated. The approach will be used in the hierarchical model of photosynthetic electron transport. Another possible application is screening potentially advantageous for biotechnology mutations of electron transport proteins.

Key words: molecular modeling, Brownian dynamics, protein-protein interactions, electron transport.

1. Введение

Современные методы редактирования генома дают широкие возможности для модификации белковых макромолекул, участвующих во всех аспектах жизни живых организмов. В связи с этим чрезвычайно важной становится задача искусственного конструирования белков, обладающих требуемыми для решения тех или иных биотехнологических и биомедицинских задач свойствами. Важную роль в таком конструировании играют методы молекулярного моделирования, позволяющие исследовать свойства разрабатываемых макромолекул без их реального синтеза биологическими организмами.

Как в биотехнологии, так и в медицине часто возникает задача изменения направления протекания окислительно-восстановительных

реакций. Так, переключение потока электронов в фотосинтетической электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) позволяет увеличить выход биотехнологически значимых продуктов, таких как каротиноиды или продуцируемый некоторыми одноклеточными микроводорослями молекулярный водород. В качестве перспективного способа переключения потоков рассматривается модификация структуры водорастворимых белков – мобильных переносчиков электрона, выступающих в роли «хабов», распределяющих поступающие на них электроны по различным «потребителям». Методы молекулярного моделирования могут быть использованы для предсказания структуры белка, способной к эффективной передаче электрона в требуемом направлении.

Количественное описание переноса электрона между активными центрами участников ЭТЦ из

первых принципов представляет сложную задачу. В настоящей работе предлагается простой феноменологический подход к описанию переноса электрона при прямом многочастичном моделировании взаимодействия белков [1–3]. В этом методе молекулы белков рассматриваются как твердые тела (броуновские частицы), движущиеся в вязкой среде. Частицы влияют друг на друга посредством электростатического притяжения и отталкивания. Также на макромолекулы действует случайная сила, обусловленная тепловым движением молекул растворителя. Сближение макромолекул приводит к образованию их комплекса, который стабилизируется за счет электростатических взаимодействий. В комплексе реакционные центры белков оказываются сближены между собой, что делает возможным туннельный транспорт электрона между ними.

2. Описание скорости электронного транспорта в модели броуновской динамики

В данной работе мы рассматриваем минимальную модель, описывающую взаимодействие двух макромолекул, одна из которых находится в окисленном, а другая – в восстановленном состоянии. Экспериментальные измерения показывают, что перенос электрона в белок-белковом комплексе может рассматриваться в соответствии с законом действующих масс как реакция первого порядка, константа скорости которой k_{et} зависит от расстояния между реакционными центрами r . Эта зависимость может быть аппроксимирована экспоненциальной функцией вида $k_{et}(r) = Ae^{-\beta r}$ с показателем экспоненты β в пределах от 0.8 \AA^{-1} [4] до 1.7 \AA^{-1} [5]. На каждом i -ом шаге моделирования длительностью t_{step} вероятность переноса электрона от донора к акцептору составляет $p_i = 1 - e^{-k_{et}(r_i)t_{step}} = 1 - e^{-Ae^{-\beta r_i}t_{step}}$, где r_i – полученное в молекулярной модели расстояние между реакционными центрами на данном шаге [6]. Соответственно, вероятность переноса электрона в процессе, включающем n шагов моделирования, составляет

$$p = 1 - \prod_i^n (1 - p_i) = 1 - \prod_i^n e^{-Ae^{-\beta r_i}t_{step}}.$$

Получаемые в эксперименте данные по кинетике химических реакций обычно анализируются с использованием формализма закона действующих масс. Чтобы сопоставить результаты моделирования с экспериментальными данными, рассмотрим перенос электрона между двумя молекулами как химическую реакцию первого порядка с константой скорости k_1 . В таком случае вероятность переноса электрона от донора к акцептору за время, равное $n \cdot t_{step}$, составляет

$$p = 1 - e^{-k_1 n t_{step}}.$$

Для оценки константы скорости k_1 приравняем правые части:

$$p = 1 - e^{-k_1 n t_{step}} = 1 - \prod_i^n e^{-Ae^{-\beta r_i}t_{step}}.$$

Соответственно,

$$e^{-k_1 n t_{step}} = \prod_i^n e^{-Ae^{-\beta r_i}t_{step}}.$$

И

$$-k_1 n t_{step} = \sum_i^n -Ae^{-\beta r_i}t_{step} = -A t_{step} \sum_i^n e^{-\beta r_i},$$

из чего следует

$$k_1 = \frac{A}{n} \sum_i^n e^{-\beta r_i}.$$

Для диффузионно-контролируемых реакций взаимодействия белков экспериментально определяемый порядок реакции равен двум. Для пересчета экспериментальной константы второго порядка в константу первого порядка ее нужно умножить на концентрацию каждого из белков в виртуальном реакционном объеме: $k_1 = ck_2$.

Для того чтобы численно идентифицировать параметры A и β для конкретного типа молекул, необходимо сопоставить как минимум две полученные в экспериментах *in vitro* оценки константы скорости $k_{1j}^{\text{experiment}}$ с полученными в ходе молекулярного моделирования распределениями расстояний между реакционными центрами $\{r_i\}_j$. Анализируемые системы должны значительно различаться по характеру электростатических взаимодействий между реакционными партнерами – за счет разной ионной силы раствора или точечных мутаций белков. Для получения представительной выборки расстояний между реакционными центрами $\{r_i\}_j$ каждый вычислительный эксперимент должен проводиться в течение достаточно длительного времени.

В качестве невязки для минимизации мы использовали логарифм отношения экспериментальной и модельной констант скорости k_1 :

$$\begin{aligned} L(A, \beta, \{r_i\}_j, k_{1j}^{\text{experiment}}) &= \log \frac{k_{1j}^{\text{estimate}}}{k_{1j}^{\text{experiment}}} = \\ &= \log \left(\frac{A}{k_{1j}^{\text{experiment}} n} \sum_i^n e^{-\beta \{r_i\}_j} \right). \end{aligned}$$

Задача идентификации параметров A и β является нелинейной регрессией относительно β , однако она линейна относительно $\log(A)$. Введем обозначение

$$\begin{aligned} \alpha_j &= \alpha(\beta, \{r_i\}_j, k_{1j}^{\text{experiment}}) = \\ &= \log(k_{1j}^{\text{experiment}} n) - \log \left(\sum_i^n e^{-\beta \{r_i\}_j} \right), \end{aligned}$$

тогда наилучшей оценкой величины параметра A при заданном значении параметра β будет антилогарифм математического ожидания α_j : $\tilde{A}(\beta) = \exp(\bar{\alpha}_j)$. Это позволяет провести однопараметрическую оптимизацию невязки

$$L(\beta, \{r_i\}_j, k_{1j}^{\text{experiment}}) = \log \left(\frac{\tilde{A}(\beta)}{k_{1j}^{\text{experiment}} n} \sum_i^n e^{-\beta \{r_i\}_j} \right) = \bar{\alpha}_j - \alpha_j$$

Вычисление $L(\beta, \{r_i\}_j, k_{1j}^{\text{experiment}})$ занимает достаточно большое время (секунды – десятки секунд), однако наилучшая оценка параметра β находится за небольшое число итераций, поэтому суммарные затраты времени на идентификацию параметров пренебрежимо малы по сравнению со временем, затрачиваемым на получение выборки $\{r_i\}_j$.

При оценке доверительных интервалов для параметров мы предположили, что параметры A и β имеют логнормальное распределение. Доверительные интервалы строились для уровня доверия 68 %. Доверительный интервал для параметра A рассчитывался при фиксированном значении параметра β , равном его наилучшей оценке; доверительный интервал для параметра β – при одновременном варьировании параметра A .

Предложенный метод оценки параметров переноса электрона реализован на языке Python с использованием пакета минимизации `lmfit` [7] и включен в состав программного пакета `ProKSim` [8].

3. Оценка величины параметров A и β для взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f высших растений

Было промоделировано взаимодействие белков пластоцианина и цитохрома f высших растений с использованием экспериментальных данных о скорости окисления цитохрома f пластоцианином из [9]. Для построения молекулярной модели использовали полученную методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) структуру комплекса пластоцианина шпината и цитохрома f турнепса (PDB ID: 2PCF) [10]. Распределение электростатических зарядов на атомах аминокислотных остатков белков было взято из силового поля CHARMM27 [11, 12], на геме – взято из [13]. Заряды на атоме меди пластоцианина и связанных с ним аминокислотных остатках аппроксимированы на основе данных [14].

Для оценки величины параметров переноса электрона A и β мы провели моделирование взаимодействия восстановленного цитохрома f и окисленного пластоцианина дикого типа при ионной силе раствора 100, 200, 300 и 700 мМ. Для каждой величины ионной силы проводили серию из 100 (200 для ионной силы 100 мМ) вычислительных

экспериментов, в которых в виртуальный реакционный объем размером $30 \times 30 \times 30 \text{ nm}^3$ в случайных положениях и ориентациях помещалось по одной молекуле пластоцианина и цитохрома f (концентрация каждого из реагентов $c = 6.15 \cdot 10^{-5} \text{ M}$). В каждом вычислительном эксперименте с помощью программы `ProKSim` [8] проводили моделирование движения молекул под действием случайной силы и электростатических взаимодействий в течение 1 мс (10^7 шагов по 10^{-10} с). В качестве критерия реакции r анализировалось расстояние между атомом меди пластоцианина и атомом железа гема цитохрома f . Поскольку вероятность переноса электрона быстро уменьшается при увеличении расстояния между реакционными центрами, для анализа мы сохраняли только расстояния меньше 50 Å. Для исследованных модельных систем в каждом вычислительном эксперименте мы получали выборку $\{r_i\}_j$ из $\sim 10^5$ значений. На основе полученных выборок были получены оценки величины параметров A и β и доверительные интервалы для этих оценок: Идентифицированные значения параметров: $A = (1.8 \pm 0.3) \cdot 10^{30} \text{ c}^{-1}$ и $\beta = (3.4 \pm 0.6) \cdot 10^{10} \text{ m}^{-1}$.

Для определения качества полученной оценки величины A и β аналогичным образом было промоделировано взаимодействие мутантных форм пластоцианина D42N, Q88E, E43N, E43K, E43QD44N, E59KE60Q и E59KE60QE43N с цитохромом f дикого типа при ионной силе 100 мМ. При моделировании использовались структурные файлы для белка дикого типа, а распределение зарядов на боковых цепях подвергнутых мутации аминокислотных остатков изменялось в соответствии с моделируемой мутацией. Также была проведена серия из 200 вычислительных экспериментов по взаимодействию пластоцианина дикого типа с цитохромом f при ионной силе раствора 50 мМ. Экспериментальные и оцененные с помощью модели значения констант для белков дикого типа и мутантных форм приведены в Таблице 1 и на рисунке 1. Изменение величины функции невязки $L(\beta, \{r_i\}_j, k_{1j}^{\text{experiment}})$ в процессе минимизации показано на рисунке 2.

4. Обсуждение и перспективы

Метод броуновской динамики является весьма грубым приближением для моделирования тесного контакта белков, и, строго говоря, его использование корректно только на этапе сближения макромолекул до контакта их псевдоповерхностей. Тем не менее, с использованием предложенного в работе простого эмпирического подхода нами получены качественно согласующиеся с экспериментальными данными оценки влияния мутаций пластоцианина на скорость окисления цитохрома f в растворе. Полученная с помощью модели оценка показателя экспоненты β близка к оценкам в экспериментах *in vitro* [4, 5].

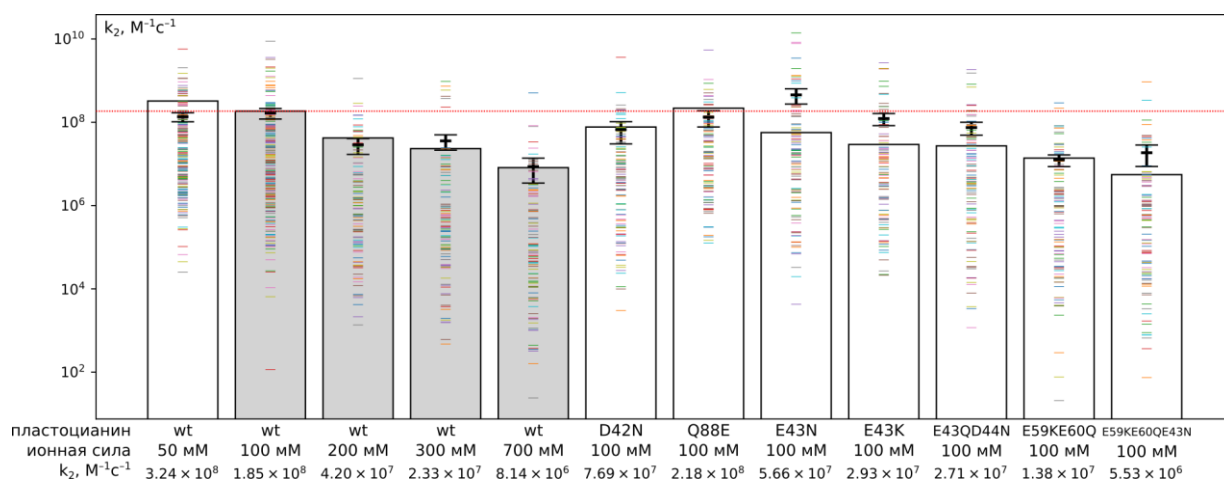


Рис. 1. Экспериментальные [9] и рассчитанные с помощью модели значения константы скорости реакции окисления цитохрома *f* пластоцианином дикого типа (wt) и мутантными формами пластоцианина при различной ионной силе раствора. Экспериментальные значения показаны в виде столбчатой диаграммы, полутонкой заливкой выделены данные, использованные для идентификации параметров модели. Тонкие горизонтальные линии – оценки константы скорости, полученные по отдельным вычислительным экспериментам продолжительностью 1 мс, утолщённые линии – среднее значение константы и соответствующая стандартная ошибка. Пунктирной линией показана величина константы скорости для дикого типа пластоцианина при ионной силе раствора 100 мМ.

Таблица 1. Экспериментальные [9] и рассчитанные с помощью модели значения константы скорости реакции окисления цитохрома *f* пластоцианином дикого типа (wt) и мутантными формами пластоцианина при различной ионной силе раствора. Полужирным шрифтом выделены значения, использованные для идентификации параметров модели

Пластоцианин	Ионная сила	$k_2, [9]$	$k_2, (модель)$
	мМ	$M^{-1} c^{-1}$	$M^{-1} c^{-1}$
wt	50	$3.24 \cdot 10^8$ [15]	$1.34 \cdot 10^8$
wt	100	$1.85 \cdot 10^8$	$1.72 \cdot 10^8$
wt	200	$4.20 \cdot 10^7$	$2.84 \cdot 10^7$
wt	300	$2.33 \cdot 10^7$	$3.50 \cdot 10^7$
wt	700	$8.14 \cdot 10^6$	$8.61 \cdot 10^6$
D42N	100	$7.69 \cdot 10^7$	$8.48 \cdot 10^7$
Q88E	100	$2.18 \cdot 10^8$	$1.47 \cdot 10^8$
E43N	100	$5.66 \cdot 10^7$	$2.64 \cdot 10^8$
E43K	100	$2.93 \cdot 10^7$	$1.28 \cdot 10^8$
E43QD44N	100	$2.71 \cdot 10^7$	$9.73 \cdot 10^7$
E59KE60Q	100	$1.38 \cdot 10^7$	$2.62 \cdot 10^7$
E59KE60QE43N	100	$5.53 \cdot 10^6$	$2.65 \cdot 10^7$

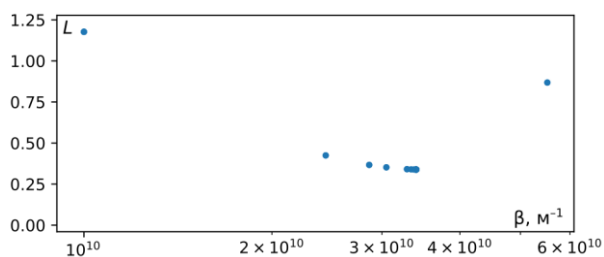


Рис. 2. Значения функции невязки $L(\beta, \{r_j\}_j, k_{i,j}^{experiment})$ для различных значений параметра β в процессе минимизации.

Разброс между оценками константы скорости реакции, получаемыми для отдельного вычислительного эксперимента продолжительностью в 1 мс модельного времени, составляет несколько порядков. Для того, чтобы получить оценку константы скорости с приемлемой для решения практических задач точностью, необходимо использовать серии из не менее 200–300 вычислительных экспериментов для каждого набора условий, либо использовать многократную постановку эксперимента с соответствующим числом молекул каждого типа.

Использование многократных моделей броуновской динамики в сочетании с предложенным в работе подходом позволит исследовать сложные многокомпонентные системы, в которых белки осуществляют челночный перенос электронов между одним типом доноров и разными типами акцепторов. Скорость электронного транспорта в таких системах и соотношение потоков, приходящихся на различные акцепторы, сложным образом зависит от характера взаимодействия мобильного переносчика с каждым из реакционных партнеров: лучшее связывание двух белков может как увеличить поток в этом направлении (потому что перенос электронов между реакционными центрами будет происходить более эффективно), так и уменьшить его (потому что количество актов ассоциации-диссоциации молекул в единицу времени уменьшится из-за устойчивости комплекса). С помощью модели мы предполагаем выявить потенциальные мутации белков – переносчиков электрона, увеличивающие выход полезного продукта в биотехнологических задачах за счет изменения соотношения электронных потоков на разные акцепторы.

В настоящее время нашей группой ведется разработка модели системы гранальных и стромальных ламелл хлоропласта. В модели воспроизводятся геометрия тилакоидов и распределение мультимерных комплексов в соответствии с данными электронной микроскопии, а перенос электрона посредством мобильных переносчиков описывается с использованием рассмотренного в работе подхода.

5. Благодарности

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ, проекты № 19-04-00999 и 20-04-00465.

6. Список литературы

1. Ermak D.L., McCammon J.A. Brownian dynamics with hydrodynamic interactions. *J. Chem. Phys.* 1978. V. 69. № 4. P. 1353–1360. doi: [10.1063/1.436761](https://doi.org/10.1063/1.436761).
2. Mereghetti P., Gabdouliline R.R., Wade R.C. Brownian Dynamics Simulation of Protein Solutions: Structural and Dynamical Properties. *Biophysical Journal*. 2010. V. 99. № 11. P. 3782–3791. doi: [10.1016/j.bpj.2010.10.035](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.10.035).
3. Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Gromov P.A., Ustinin D.M., Grachev E.A., Riznichenko G.Y., Rubин A.B. Direct simulation of plastocyanin and cytochrome f interactions in solution. *Phys. Biol.* 2006. V. 3. P. 121–129. doi: [10.1088/1478-3975/3/2/004](https://doi.org/10.1088/1478-3975/3/2/004).
4. Winkler J.R., Gray H.B. Electron transfer in ruthenium-modified proteins. *Chemical Reviews*. 1992. V. 92. № 3. P. 369–379. doi: [10.1021/cr00011a001](https://doi.org/10.1021/cr00011a001).
5. Ponce A., Gray H.B., Winkler J.R. Electron Tunneling through Water: Oxidative Quenching of Electronically Excited Ru(tpy)₂²⁺ (tpy = 2,2':6,2'-terpyridine) by Ferric Ions in Aqueous Glasses at 77 K. *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. P. 8187. doi: [10.1021/JA000017H](https://doi.org/10.1021/JA000017H).
6. Мамонов П.А., Коваленко И.Б., Хрущев С.С., Рубин А.Б. Усовершенствованный подход к описанию электронного транспорта при прямом многочастичном моделировании фотосинтетических мембран. В: *Математика. Компьютер. Образование*. М.-Ижевск: Регулярная и хаотическая динамика, 2013. С. 25–25.
7. Newville M., Otten R., Nelson A., Ingargiola A., Stensitzki T., Allan D., Fox A., Carter F., Michał, Pustakhod D. et al. lmfit/lmfit-py 1.0.1 (Version 1.0.1). *Zenodo*. 2020. doi: [10.5281/ZENODO.3814709](https://doi.org/10.5281/ZENODO.3814709).
8. Хрущев С.С., Абатурова А.М., Дьяконова А.Н., Устинин Д.М., Зленко Д.В., Федоров В.А., Коваленко И.Б., Ризнichenko Г.Ю., Рубин А.Б. Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса многочастичной броуновской динамики ProKSim. *Компьютерные исследования и моделирование*. 2013. V. 5. № 1. P. 47–64. doi: [10.20537/2076-7633-2013-5-1-47-64](https://doi.org/10.20537/2076-7633-2013-5-1-47-64).
9. Kannt A., Young S., Bendall D.S. The role of acidic residues of plastocyanin in its interaction with cytochrome f. *Biochim. Biophys. Acta*. 1996. V. 1277. P. 115–126. doi: [10.1016/S0005-2728\(96\)00090-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00090-4).
10. Ubbink M., Ejdebeck M., Karlsson B.G., Bendall D.S. The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics. *Structure*. 1998. V. 6. P. 323–335. doi: [10.1016/s0969-2126\(98\)00035-5](https://doi.org/10.1016/s0969-2126(98)00035-5).
11. MacKerell A.D., Bashford D., Bellott M., Dunbrack R.L., Evanseck J.D., Field M.J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S. et al. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *The Journal of Physical Chemistry. B*. 1998. V. 102. № 18. P. 3586–616. doi: [10.1021/jp973084f](https://doi.org/10.1021/jp973084f).
12. Mackerell A.D., Feig M., Brooks C.L. Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*. 2004. V. 25. № 11. P. 1400–15. doi: [10.1002/jcc.20065](https://doi.org/10.1002/jcc.20065).
13. Autenrieth F., Tajkhorshid E., Baudry J., Luthey-Schulten Z. Classical force field parameters for the heme prosthetic group of cytochrome c. *Journal of Computational Chemistry*. 2004. V. 25. № 13. P. 1613–22. doi: [10.1002/jcc.20079](https://doi.org/10.1002/jcc.20079).
14. Zolotareva N.V., Alykov N.M., Kovalenko I.B. Supercomputer modeling of active centers redox system of plastocyanin. *International Journal of Applied Engineering Research*. 2015. V. 10. № 5. P. 12419–12425.
15. Crowley P. B., Hunter D. M., Sato K., McFarlane W., Dennison C. The parsley plastocyanin-turnip cytochrome f complex: a structurally distorted but kinetically functional acidic patch. *Biochem. J.* 2004. V. 378. № 1. P. 45–51. doi: [10.1042/bj20031423](https://doi.org/10.1042/bj20031423).