

МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ БЕЛКОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ФОТОСИНТЕЗА МЕТОДОМ БРОУНОВСКОЙ ДИНАМИКИ

© 2015 г. С.С. Хрущев, А.М. Абатурова, А.Н. Дьяконова, В.А. Федоров,
Д.М. Устинин, И.Б. Коваленко, Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин

*Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы*

Поступила в редакцию 06.02.15 г.

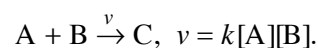
Дан обзор метода броуновской динамики в его приложении к изучению динамических короткоживущих белок-белковых комплексов. Приводится обзор теоретических предпосылок метода и обсуждаются конкретные его реализации. Рассматриваются ограничения этого метода и обсуждаются перспективы его развития. Дано описание основных подходов, используемых при анализе результатов вычислительного эксперимента. Во второй части статьи даны примеры использования метода броуновской динамики для исследования работы фотосинтетической электрон-транспортной цепи. Рассматривается взаимодействие мобильных переносчиков электронов – пластоцианина, цитохрома c_6 и ферредоксина – с их реакционными партнерами: цитохромным b_6f -комплексом, фотосистемой I, ферредоксин:НАДФ-редуктазой и гидрогеназой.

Ключевые слова: взаимодействие белков, броуновская динамика, многочастичное компьютерное моделирование, фотосинтез, электронный транспорт.

Белок-белковые взаимодействия лежат в основе ключевых процессов в живой клетке. Моделирование этих взаимодействий позволяет понять механизмы биологических процессов и имеет важное прикладное значение для фармакологии, биотехнологии и биоэнергетики. Большинство популярных методов молекулярного моделирования ориентировано в первую очередь на корректное воспроизведение термодинамических параметров системы, в то время как кинетические характеристики обычно остаются за кадром либо оцениваются на основе термодинамических. Однако для многих процессов, протекающих в неравновесных условиях, принципиальное значение имеет именно скорость взаимодействия макромолекул. Броуновская динамика является сравнительно простым и в то же время эффективным методом моделирования кинетики белок-белковых взаимодействий. В первой части данной статьи приводится обзор теоретических предпосылок метода броуновской динамики и подходов, используемых при анализе результатов вычислительного эксперимента. Во второй части дается обзор биологически важных результатов, полученных с помощью этого метода при изучении первичных процессов фотосинтеза.

I. МОДЕЛИРОВАНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКОВ

Закон действующих масс. Наиболее простым методом моделирования взаимодействия двух реагентов является кинетическое моделирование на основе закона действующих масс, сформулированного в середине XIX века К. Гульдбергом и П. Вааге [1,2].



Предполагается, что скорость химической реакции пропорциональна произведению концентраций реагентов (обозначаемых прямыми скобками) в степенях, равных стехиометрическим коэффициентам в уравнении реакции. Хотя это предположение является грубым, закон действующих масс достаточно хорошо описывает реакции, протекающие в газовой фазе или в разбавленном растворе, и при описании химических (в том числе биохимических) реакций принято приводить константу скорости реакции как важную характеристику реакции.

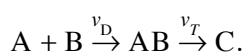
Исследование взаимодействия отдельных молекул. В 1916 году М. Смолуховский предложил аналитическую формулу, позволяющую оценить скорость сближения отдельных молекул в процессе диффузии [3,4]. Для невзаимодейст-

вующих молекул константа скорости их сближения

$$k_D = 4\pi D b, \quad (1)$$

где D – относительный коэффициент диффузии, а b – расстояние между центрами молекул при их контакте. При таком рассмотрении форма молекул не учитывается. Данный подход может быть обобщен для случая взаимодействующих молекул при условии центрально-симметричных взаимодействий [5]. Используя геометрические параметры небольших водорастворимых белков, можно оценить величину константы скорости их диффузионного сближения при отсутствии взаимодействия между молекулами как $6 \cdot 10^9 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ [6].

Оценки константы скорости взаимодействия белков. Принимая во внимание, что молекулы белка имеют сложную пространственную структуру, и образование комплекса белков возможно лишь при определенной взаимной ориентации реакционных партнеров, когда сближаются активные центры двух молекул, константа скорости взаимодействия белков должна быть оценена как 10^4 – $10^5 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$ [7]. В то же время в экспериментах наблюдаются значительно более быстрые белок-белковые взаимодействия: например, константа скорости реакции переноса электрона с участием белков ферредоксина и ферредоксин:НАДФ-редуктазы по разным источникам составляет от $2,2 \cdot 10^8$ до $1,4 \cdot 10^9$ [8–10]. Показано, что такие быстрые реакции являются диффузионно-контролируемыми, и их высокая скорость во многом обусловлена сильными электростатическими взаимодействиями реакционных партнеров, которые способствуют правильной взаимной ориентации активных центров при сближении молекул [11]. Реакции, константа скорости которых не превышает 10^4 – $10^5 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$, принято рассматривать как реакционно-контролируемые, т.е. для них скорость взаимодействия определяется не скоростью сближения молекул v_D , а скоростью процессов активации v_T .



К настоящему времени изучена трехмерная структура многих белков. База данных RCSB Protein Data Bank содержит почти 90 тысяч расшифрованных структур белковых молекул и их комплексов. Большая часть (примерно 79 тысяч) этих структур получена методом рентгеноструктурного анализа, еще 9 тысяч – методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса, около 500 структур получены с помо-

щью методов электронной микроскопии. Эти экспериментальные данные служат основой для создания молекулярных моделей белков.

Принято различать постоянные белок-белковые комплексы, т.е. долгоживущие четвертичные структуры, в составе которых многие белки осуществляют свою биологическую функцию, и короткоживущие (transient) комплексы, многократно образующиеся и распадающиеся в процессе взаимодействия белков. Формирование специфических короткоживущих комплексов происходит при активации и ингибировании ферментативной активности, в процессе рецепции и передачи информации, при окислительно-восстановительных реакциях и др. Во многих случаях такие комплексы являются «динамическими», т.е. физиологическая функция белков осуществляется в широком диапазоне конформаций и взаимных ориентаций макромолекул [12,13].

Учет внутренней структуры биологической клетки. Условия протекания реакций в реальной живой системе значительно отличаются от условий *in vitro*. Белки взаимодействуют между собой внутри субклеточных компартментов, ограниченных мембранами. Количество молекул в компартменте может составлять десятки или сотни. Так, пластоцианин – электрон-транспортный белок, играющий важную роль в окислительно-восстановительных реакциях фотосинтеза, – локализован в люминальном пространстве тилакоида, толщина которого составляет 4–10 нм, что сравнимо с размерами самого белка (3–4 нм). Компартменты могут иметь достаточно сложную форму и быть неоднородными по пространству. Дiskoобразные тилакоиды хлоропластов высших растений (диаметром 300–600 нм) собраны в цилиндрические стопки – граны; люминальное пространство отдельных тилакоидов, вероятно, представляет собой единое целое за счет слияния стромальных областей тилакоидов [14]. Белковый состав стромальных и гранальных областей тилакоида значительно отличается [15].

На долю высокомолекулярных соединений (белков, липидов, сахаров и нуклеиновых кислот) приходится до 30% объема живой клетки [16], поэтому диффузия реагентов затруднена не только сложной формой компартмента, но и взаимодействием с другими макромолекулами (краудинг, абсорбция на мембранах и т.п.). В экспериментах с флуоресцентными белками показано, что скорость диффузии белка в клетке может в несколько раз отличаться от диффузии в разбавленном растворе [17]. В работах [18] и [19] проведено численное моделирование взаимодействия жестких шарообразных молекул и

оценено влияние краудинга на распределение макромолекул в пространстве и скорость реакции взаимодействия. Однако такая оценка является достаточно грубой, так как молекулы белков имеют сложное строение, которое необходимо учитывать при моделировании белок-белковых взаимодействий. Во многих случаях необходимо также учитывать конкуренцию между альтернативными реакциями: например, белок ферредоксин может передавать электрон различным акцепторам, и количество переданных электронов по тому или другому пути будет определяться скоростью его связывания с этими акцепторами.

В связи с вышесказанным применение закона действующих масс, основанного на гипотезе о свободных соударениях молекул-реактивов, едва ли правомерно. Для моделирования процессов в интерьере клетки возникает необходимость в описании движения индивидуальных молекул и их взаимодействий.

Моделирование движения макромолекул.

Сближение белков при формировании комплекса происходит в процессе трехмерной диффузии в водной фазе (матрикс) или двумерной диффузии внутри липидной мембраны или в примембранном слое. Конформационная подвижность большинства водорастворимых глобулярных белков невелика, что позволяет с достаточной степенью достоверности рассматривать их как твердые частицы, находящиеся в вязкой жидкости. За счет соударений с молекулами жидкости такие частицы будут совершать так называемое броуновское движение, названное в честь Р. Броуна, описавшего наблюдаемое им в микроскоп движение частичек пыльцы растений [20]. Исследование количественных закономерностей броуновского движения стало важной вехой в развитии теории случайных процессов [21,22].

Уравнение Ланжевена. Математически броуновское движение может быть описано с помощью уравнения Ланжевена

$$m\ddot{\mathbf{r}} = -\xi\dot{\mathbf{r}} + \mathbf{F}(\mathbf{r}) + \mathbf{f}(t), \quad (2)$$

где m – масса частицы, \mathbf{r} – ее положение, t – время, ξ – коэффициент вязкого трения, $\mathbf{F}(\mathbf{r})$ – внешняя сила, а $\mathbf{f}(t)$ – стохастический член (случайная сила). В линейном приближении коэффициент вязкого трения ξ является постоянной тензорной величиной. Случайная сила $\mathbf{f}(t)$ неявно учитывает тепловое движение молекул среды и их столкновения с макромолекулой. Все направления случайной силы равноправны, и ее характерное время корреляции много меньше времени релаксации за счет трения m/ξ . В нулевом приближении время корреляции при-

нимается равным нулю, и случайная сила рассматривается как дельта-коррелированная случайная величина (белый шум), математическое ожидание которой равно нулю, а автокорреляционная функция равна

$$\langle \mathbf{f}(t)\mathbf{f}(t') \rangle = 2D\delta\delta(t-t'),$$

где t и t' соответствуют двум произвольным значениям независимой переменной, D – коэффициент диффузии, δ – символ Кронекера (единичный тензор), δ – дельта-функция Дирака. Коэффициент диффузии определяется термодинамическим равновесием частицы со средой и равен $D = \xi kT$ (соотношение Эйнштейна), где k – постоянная Больцмана, T – температура.

Гидродинамические параметры модели. Гидродинамические параметры броуновской частицы определяются тензором вязкого трения ξ , вычисление компонентов которого для частицы произвольной формы представляет собой нетривиальную задачу. В частном случае шарообразной частицы коэффициент вязкого трения ξ является скаляром вида $\xi = 6\pi a\eta$, где a – радиус шара, η – динамическая вязкость среды (закон Стокса, [23,24]). Для частиц простой геометрической формы, например для эллипсоидов вращения (вытянутых или сплюснутых), тензор ξ может быть диагонализирован, для этого одна из осей координат должна совпадать с осью вращения эллипсоида [25]. Как уже отмечалось выше, водорастворимые белки, в частности электрон-транспортные, в основном компактно упакованы, поэтому представляется вполне оправданной аппроксимация их гидродинамических свойств свойствами соответствующего шара или эллипсоида вращения [26]. В более сложном случае молекулу белка уже нельзя рассматривать как твердое тело. Для таких белков приходится использовать так называемые «крупнозернистые» (coarse-grain) методы, в которых молекула рассматривается как несколько твердых тел (звеньев) с гибкими связями. При этом тензор вязкого трения уже не может быть диагонализирован из-за гидродинамического взаимодействия звеньев [27].

Решение уравнения Ланжевена. В молекулярном моделировании используются два основных подхода к решению уравнения Ланжевена (2). Характерное время релаксации возмущений в системе определяется постоянной времени m/ξ , которая для небольших белков в водной среде при физиологических условиях имеет порядок 10^{-12} с. В том случае, если необходимо исследовать динамику системы на временах порядка одной пикосекунды и менее, проводится численное интегрирование уравне-

ния (2). При этом шаг интегрирования по времени выбирается небольшим (10^{-15} – 10^{-14} с) и используется один из быстрых алгоритмов интегрирования, например алгоритм Штёрмера–Верле [28–30]. Однако на таких временах колебания отдельных атомов вносят существенный вклад в динамику молекулы, поэтому такой подход едва ли целесообразно использовать при рассмотрении молекулы как твердого тела.

При исследовании диффузии белков можно пренебречь быстрой динамикой системы и использовать шаг по времени Δt , значительно превышающий постоянную времени m/ξ . В этом случае можно пренебречь инерциальным членом (среднее значение $\langle m\ddot{\mathbf{r}} \rangle_{\Delta t} \approx 0$) и перейти к уравнению [27]

$$\xi \dot{\mathbf{r}} = \mathbf{F}(\mathbf{r}) + \mathbf{f}(t). \quad (3)$$

Метод броуновской динамики. В данной работе термин «метод броуновской динамики» применяется к моделям, основанным на применении уравнения к движению твердых тел. Системы, к которым применимо такое описание, принято называть «системами с сильными затуханием» («overdamped systems»). В литературе встречается и более широкое понимание метода, допускающее внутреннюю подвижность броуновской частицы.

Смещение частицы Δx вдоль координатной оси x :

$$\Delta x = \frac{F_x \Delta t}{\xi_{tr}^x} + \sqrt{\frac{2kT\Delta t}{\xi_{tr}^x}} N(0,1),$$

где F_x – проекция внешней силы на соответствующую ось, ξ_{tr}^x – коэффициент вязкого трения для движения вдоль оси, $N(0,1)$ – нормально распределенная случайная величина с нулевым средним и единичной дисперсией [27].

Аналогичным образом для вращательных степеней свободы:

$$\Delta \alpha_x = \frac{M_x \Delta t}{\xi_{rot}^x} + \sqrt{\frac{2kT\Delta t}{\xi_{rot}^x}} N(0,1),$$

где $\Delta \alpha_x$, M_x и ξ_{rot}^x – угол поворота, момент внешней силы и коэффициент вязкого трения для вращения относительно оси, вокруг которой рассматривается вращение, соответственно.

Более подробный разбор теории броуновского движения, в том числе нелинейного, можно найти в обзорах [31,32]. В работах [33,34] рассматриваются различные численные схемы, применяемые для расчетов методом броуновской динамики.

Взаимодействия, рассматриваемые в модели.

Электростатические взаимодействия являются основным фактором, определяющим конформацию белковой макромолекулы и специфичность ее взаимодействий с другими молекулами. Гравитационные взаимодействия (архимедова сила) не зависят от взаимной ориентации взаимодействующих макромолекул, и их эффект усредняется во времени и не вносит вклада в процесс взаимодействия белков. При больших расстояниях между макромолекулами наиболее значителен вклад точечных электрических зарядов, появление которых в основном обусловлено отрывом или присоединением протонов полярными аминокислотными остатками при взаимодействии с молекулами воды. При сближении макромолекул появляются гидрофобные взаимодействия, которые возникают вследствие изменения структуры гидратной оболочки макромолекул и, в конечном счете, также имеют электростатическую природу. При близком контакте начинают играть роль ван-дер-ваальсовы взаимодействия, связанные с поляризацией отдельных атомов.

Электростатические взаимодействия. Молекулы белков обладают сравнительно низкой поляризуемостью, их диэлектрическая проницаемость ϵ составляет порядка 2–4. В то же время окружающая их водная среда хорошо поляризуема ($\epsilon = 80$) и способна значительно ослаблять электростатические взаимодействия белков. Ослаблению электростатических взаимодействий способствуют также ионы растворенных электролитов, которые перераспределяются в пространстве вокруг белков в соответствии с градиентом электрического поля и «экранируют» заряженные аминокислотные остатки.

Степень протонирования полярных аминокислотных остатков зависит от pH среды и может быть рассчитана по уравнению Хендерсона–Хассельбальха [35,36]. Для расчета необходимо знать константы диссоциации pK_a для аминокислотных остатков. Могут быть использованы стандартные значения pK_a для соответствующих аминокислотных остатков (см., например, [37]). Для большей точности вычислений константы диссоциации могут быть рассчитаны для конкретных аминокислотных остатков с учетом их микроокружения [38,39]. Степень ионизации аминокислотных остатков может быть дробным значением, что соответствует вероятности найти данный остаток в ионизированном виде. Это дробное значение может быть непосредственно использовано в качестве величины заряда соответствующего аминокислотного остатка, так как соответству-

ет его усредненному по времени заряду. Также могут быть использованы целочисленные значения, в таком случае моделирование проводится для конкретного состояния аминокислотного остатка. В ряде моделей (например, [40]) используются частичные заряды на всех атомах белка, взятые из параметрического поля молекулярной динамики или рассчитанные методом квантовой химии.

Уравнение Пуассона–Больцмана. Расчет электростатического поля вокруг молекулы белка обычно проводится по уравнению Пуассона–Больцмана:

$$\epsilon_0 \nabla[\epsilon(\mathbf{r}) \nabla \varphi(\mathbf{r})] = -\rho - \sum_i c_i^\infty z_i q_p e^{\left[-\frac{z_i q_p \varphi(\mathbf{r})}{kT} \right]}, \quad (4)$$

где ϵ_0 – электрическая постоянная, $\epsilon(\mathbf{r})$ – диэлектрическая проницаемость среды, $\varphi(\mathbf{r})$ – электростатический потенциал, ρ – объемная плотность фиксированных электрических зарядов в молекуле белка, c_i^∞ – концентрация ионов в отсутствие электростатического поля, z_i – заряд иона, q_p – заряд протона, Σ_i обозначает суммирование по всем типам мобильных зарядов (ионов) в растворе.

Решение уравнения (4) нетривиально и требует значительных вычислительных ресурсов [41], поэтому при расчете электростатических взаимодействий в методе броуновской динамики часто используется его линеаризация подстановкой $e^{\left[-\frac{z_i q_p \varphi(\mathbf{r})}{kT} \right]} = 1 - \frac{z_i q_p \varphi(\mathbf{r})}{kT}$, которая обеспечивает достаточную точность при условии $|z_i q_p \varphi(\mathbf{r})| \ll kT$:

$$\epsilon_0 \nabla[\epsilon(\mathbf{r}) \nabla \varphi(\mathbf{r})] = -\rho + \sum_i \frac{c_i^\infty z_i^2 q_p^2 \varphi(\mathbf{r})}{kT} - \sum_i c_i^\infty z_i q_p. \quad (5)$$

Для решения уравнения (5) на равномерной кубической сетке может быть использована итерационная формула [42]:

$$\varphi_0 = \frac{q_0 - \sum_j h \epsilon_0 \epsilon_j \varphi_j}{h^3 \kappa_0^2 + \sum_j h \epsilon_0 \epsilon_j},$$

где φ_0 , φ_j – электростатический потенциал в ячейке, q_0 – суммарный электрический заряд в ячейке (без учета мобильных ионов электролитов), ϵ_j – диэлектрическая проницаемость среды в ячейке, h – размер ячейки, $\kappa_0 = \sqrt{\frac{2N_A q_p^2 I}{kT}}$ – обратная дебаевская длина для ионной оболоч-

ки, N_A – число Авогадро, $I = \frac{1}{2} \sum_i c_i^\infty z_i^2$ – ионная

сила раствора, Σ_j обозначает суммирование по ячейкам, контактирующим с данной ячейкой одной гранью. При расчете необходимо выбрать размер области, в которой электростатический потенциал предполагается отличным от нуля. Для водной среды с физиологическим значением ионной силы (100–200 мМ) можно пренебречь электростатическими взаимодействиями зарядов, разделенных расстоянием больше 3–5 нм.

Расчет электростатической силы. Расчет электростатических взаимодействий по уравнению Пуассона–Больцмана требует больших вычислительных ресурсов. В связи с этим для повышения производительности расчета используют те или иные упрощения. Обычно расчет (по уравнению Пуассона–Больцмана) электростатического поля для одиночной молекулы белка, окруженной растворителем и мобильными зарядами (ионами), производится один раз при подготовке модели. Изменения электростатического поля каждой молекулы, связанные со сближением с другими макромолекулами, подразумеваются незначительными. В случае многочастичных моделей суммарное поле взаимодействующих молекул рассматривается как суперпозиция полей отдельных молекул с учетом их положения и ориентации.

В методе пробных зарядов силы и моменты сил, действующие на движущуюся молекулу, рассчитываются для тех же зарядов, что используются при расчете электростатического поля молекулы. При этом отличие диэлектрической проницаемости этой молекулы от диэлектрической проницаемости среды и вызванное электрическим полем этой молекулы перераспределение ионов электролитов не учитываются. Для учета поляризации растворителя и неоднородного распределения ионов вокруг белка, для которого рассчитывается сила взаимодействия с окружающими белками, может использоваться метод эффективных зарядов [43]. В этом методе для расчета сил и моментов сил используются эффективные заряды, т.е. такая конфигурация зарядов, которая создает в вакууме такое же электростатическое поле, как молекула белка в растворе. Аналогичный подход использован [44] в методе оптимизации поверхностного заряда DiSCO (discrete surface charge optimization).

Для сохранения корректности вычислений необходимо, чтобы значение действующей на молекулу электростатической силы лишь незначительно менялось в пределах шага интегри-

рования. Это не позволяет выбирать значение Δt слишком большим и, так как значение Δt ограничено снизу значением постоянной времени m/ξ , не позволяет использовать метод броуновской динамики для изучения диффузии белков в областях, где имеются сильные градиенты электростатического поля. При моделировании белок-белковых взаимодействий представляется оправданным выбор шага по времени в диапазоне 10–100 пс. В некоторых моделях шаг по времени не является фиксированной величиной и уменьшается при уменьшении расстояния между взаимодействующими молекулами [45].

Моделирование сближения белков. При сближении белков до расстояния единиц ангстрем многие предположения, лежащие в основе метода броуновской динамики, теряют свою силу. Например, молекулы воды, непосредственно прилегающие к поверхности белка, связаны с его гидрофильными участками достаточно прочными водородными связями, поэтому гидродинамические параметры белков при сближении изменяются. Кроме того, сильные электростатические взаимодействия между заряженными аминокислотными остатками двух белков могут приводить к изменению конформации белков; также возможно образование водородных и ионных связей между молекулами. В связи с этим для моделирования тесного контакта молекул необходимо либо использовать эмпирические параметры, либо переходить на более детальные методы моделирования при сближении белков непосредственно в процессе расчета. Вариант такого переключения реализуется в многомасштабных методах моделирования, которые описаны в разделе «Дальнейшее развитие метода броуновской динамики».

Метод исключенного объема. Если вычислительный эксперимент проводится исключительно методом броуновской динамики в приближении твердых тел, расчетный метод должен учитывать контактные взаимодействия молекул белков. Эти взаимодействия обусловлены взаимным отталкиванием электронных оболочек атомов, и для их описания в молекулярном моделировании обычно применяются эмпирические потенциалы Леннард-Джонса [46] или Букингема [47]. Однако моделирование белок-белковых взаимодействий методом броуновской динамики требует использования шага по времени в диапазоне 10–100 пс, а использование этих потенциалов возможно при шаге интегрирования не более единиц фемтосекунд, в связи с чем при моделировании взаимодействия белков обычно используется метод исключенного объема [48].

Исключенный объем молекулы соответствует области пространства, находящейся «внутри» молекулы. Исключенные объемы двух молекул не могут пересекаться. В том случае, если численное решение уравнения приводит к взаимопересечению двух исключенных объемов, это рассматривается как «столкновение» двух молекул. Такое столкновение может быть рассмотрено как неупругое столкновение двух твердых тел, либо могут быть применены другие алгоритмы разрешения конфликтной ситуации, например многократное повторение шага интегрирования с одними и теми же начальными условиями до тех пор, пока не будет устранено взаимопересечение исключенных объемов.

Для задания формы исключенного объема обычно используется аппроксимация молекулы белка одним шаром [18,19] или набором шаров [26,49–52]. Расположение шаров в пространстве соответствует расположению атомов в молекуле, а в качестве радиуса шара обычно используется ван-дер-ваальсов радиус соответствующего химического элемента. Для оптимизации скорости вычислений группы атомов, расположенные «внутри» молекулы, могут быть эффективно объединены в один шар большего радиуса.

Гидрофобные взаимодействия. Под гидрофобными взаимодействиями принято понимать эффекты, связанные с перестройкой сети водородных связей в гидратной оболочке макромолекул при их сближении. В результате такой перестройки энергетически более выгодными оказываются такие взаимные расположения молекул белков, в которых гидрофобные участки двух макромолекул сближены. Эти взаимодействия играют важную роль в формировании функционально активных белок-белковых комплексов при тесном контакте белков, однако непосредственный их учет в моделях броуновской динамики оказывается затруднительным, так как в методе броуновской динамики растворитель рассматривается как непрерывная среда. Для корректного учета такого типа взаимодействий необходимо при сближении макромолекул производить переключение на модели с явным учетом молекул растворителя. В работе [53] рассмотрены два подхода, позволяющие учесть гидрофобные взаимодействия непосредственно в методе броуновской динамики. Первый из них основан на расчете доступной растворителю поверхности макромолекул, во втором энергия десольватации рассчитывается для каждого атома. Эти же подходы использованы в работе [54]. Перспективным может быть ис-

пользование метода молекулярного гидрофобного потенциала [55].

Начальные и граничные условия. В методе броуновской динамики используются три основных типа пространственных граничных условий: бесконечные, периодические и специальные. В наиболее простом варианте вычислительного эксперимента используются бесконечные граничные условия [56]. Проводится большое число независимых вычислительных экспериментов, в каждом из которых две молекулы размещаются на заданном расстоянии друг от друга с различной начальной взаимной ориентацией. Эксперимент заканчивается, когда расстояние между молекулами оказывается больше некоторого заданного значения. Анализ траекторий движения молекул в таких экспериментах позволяет выявить наиболее часто возникающие при сближении молекул в процессе диффузии варианты их взаимного расположения, оценить время жизни таких сближенных состояний и энергию взаимодействия между молекулами. В том случае, если выбран тот или иной критерий образования белок-белкового комплекса (см. раздел «Анализ траекторий броуновской динамики»), можно оценить также константу скорости реакции ассоциации белков.

Периодические граничные условия дают более реалистичную модель белок-белковых взаимодействий в растворе и позволяют анализировать динамику большого числа частиц. В начале эксперимента заданное число частиц случайным образом распределяется в виртуальном реакционном объеме. В процессе моделирования при столкновении с границей объема молекула проходит через нее, появляясь со стороны противоположной границы. Таким образом, при такой постановке вычислительного эксперимента может быть в явном виде задана концентрация взаимодействующих белков. Благодаря тому, что в реакционном объеме находится большое число молекул каждого типа, в такой модели может быть выявлена роль кооперативных взаимодействий, когда происходит ассоциация сразу нескольких молекул. Соотношение числа молекул разных белков может отличаться от 1:1, что позволяет промоделировать конкретный биохимический эксперимент. В ходе вычислительного эксперимента может быть получена кинетическая кривая изменения концентрации белков и их комплексов во времени. Такая кривая может быть непосредственно сопоставлена с полученными биохимическими методами результатами даже в том случае, если в данных условиях закон действующих масс не выполняется. Кроме того, в реакционный объем можно поместить молекулы трех и

более типов и исследовать конкуренцию между несколькими молекулами за участие в реакции образования комплекса.

Специальные граничные условия позволяют промоделировать взаимодействие белков в тех условиях, в каких оно происходит в живой клетке. Так, в работе [57] при моделировании взаимодействия локализованного в люмене хлоропласта белка пластоцианина с трансмембранным цитохромным b_6/f -комплексом диффузия пластоцианина ограничена узкой областью шириной 4–10 нм, а молекулы цитохрома f экспонированы по краям этой области в соответствии с данными рентгеноструктурного анализа. На краях области, соответствующих тилакоидным мембранам, может быть задан электростатический потенциал, обусловленный зарядом на липидах [58]. Для связанных с мембранами белков может использоваться двухмерная диффузия.

В экспериментах по многочастичной броуновской динамике при моделировании взаимодействия белков в растворе в качестве начальных условий обычно используют случайное расположение молекул в реакционном объеме. При моделировании функционирования субклеточной системы вычислительный эксперимент должен начинаться в равновесных условиях, в таком случае подвижные белки случайно распределяются по объему компартмента, после чего выполняется некоторое число шагов модели, и полученное в результате моделирования распределение используется в качестве начальных условий модели.

Анализ траекторий броуновской динамики. Критерии образования белок-белковых комплексов. Важной проблемой при исследовании белок-белковых взаимодействий является установление критерия, позволяющего определить, является ли данная конфигурация молекул комплексом или нет. Так как образование белок-белковых комплексов не сопряжено с установлением химических связей, очевидно, что любой критерий будет в достаточной мере условным. Принято различать комплексы промежуточные (диффузионно-столкновительные, encounter) и финальные, в которых осуществляется биологическая функция белков, в частности перенос электрона [13,59,60]. Превращение диффузионно-столкновительного комплекса в финальный связано с вытеснением молекул воды из белок-белкового интерфейса и конформационными перестройками молекул белков. В случае диффузионно-контролируемых реакций эти перестройки незначительны и происходят достаточно быстро по сравнению со временем, которое затрачивается на диффузионное сближение мо-

лекул; для реакционно-контролируемых реакций конформационные перестройки значительны, и затрачиваемое на них время лимитирует общую скорость реакции.

Белки, участвующие в окислительно-восстановительных реакциях, обычно содержат в своем составе четко идентифицируемые активные центры. У пластоцианина это – ион меди, у ферредоксина – железо-серный кластер, у цитохромов – гем, у флаводоксина – флавинонуклеотид, у ферредоксин:НАДФ:редуктазы – флавинадениндинуклеотид и т.д. Вероятность окислительно-восстановительной реакции, т.е. переноса электрона между активными центрами белков, увеличивается при сближении активных центров молекул. Несмотря на то, что в реальности зависимость скорости окислительно-восстановительной реакции от расстояния между активными центрами может быть достаточно сложной из-за вовлечения в реакцию переноса электрона соседних аминокислотных остатков (т.е. появления так называемой электронной тропы), это позволяет использовать естественный критерий образования функционально-активного комплекса. Исследование энергетического ландшафта для конфигураций, в которых происходит перенос электрона с участием небольших белков-переносчиков, показало, что во многих случаях отсутствует выраженный энергетический минимум, и функционально активный комплекс может быть охарактеризован как ансамбль быстро превращающихся друг в друга конфигураций [13].

Под диффузионно-столкновительным комплексом понимают ансамбль таких взаимных расположений макромолекул, в которых междумолекулярные взаимодействия, с одной стороны, приводят к уменьшению свободной энергии системы по сравнению с несвязанным состоянием белков, и белки не отдаляются друг от друга, а с другой стороны, они не препятствуют вращательному движению белков относительно друг друга. Такое состояние принято описывать как «диффузионный захват» (diffusive entrapment, [61]). Обычно диффузионно-столкновительный комплекс способен трансформироваться в финальный и находится в динамическом равновесии с финальным, однако в некоторых случаях приходится вводить понятие непродуктивного (futile) комплекса, т.е. такой конфигурации макромолекул, для которой трансформация в финальный невозможна [62]. При анализе траекторий молекулярного моделирования в качестве критерия образования диффузионно-столкновительного комплекса может выступать похожесть взаимного рас-

положения белков на их положение в финальном комплексе (определяемая по расстояниям между какими-то конкретными атомами или по среднеквадратичному отклонению всех атомов), уменьшение суммарной доступной растворителю поверхности белков, образование водородных связей между молекулами или достижение минимума свободной энергии системы [63]. В работе [52] используется «буквальное» понимание диффузионно-столкновительного комплекса как ансамбля образующихся в процессе диффузии структур, в котором макромолекулы сближены друг с другом.

Анализ диффузионно-столкновительного комплекса. Так как диффузионно-столкновительный комплекс является ансамблем структур, представляет интерес отбор и визуализация отдельных характерных структур, а также отображение степени «размытости» этого ансамбля. Наиболее часто используется отображение зарегистрированных в процессе моделирования, либо полученных методом спектроскопии ядерного магнитного резонанса, положений центра масс одной молекулы в виде «облака» точек, окружающих вторую молекулу (и наоборот) [60,62,64]. Такой способ позволяет визуально обнаружить сайты связывания белков друг с другом, однако информация о взаимной ориентации молекул оказывается потерянной. Иерархический кластерный анализ [52] учитывает все степени свободы системы и позволяет выявить один или несколько типичных вариантов взаимного расположения макромолекул. Более подробно охарактеризовать ансамбль структур диффузионно-столкновительного комплекса позволяет применение методов факторного анализа.

Другим подходом к анализу диффузионно-столкновительного комплекса является изучение ландшафта энергии электростатического взаимодействия двух молекул или их свободной энергии и поиск соответствующих минимумов. Такой анализ позволяет выявить пути трансформации диффузионно-столкновительных комплексов в функционально активные и обнаружить непродуктивные комплексы [62].

Вычисление константы скорости реакции ассоциации k_a . Установление критерия формирования белок-белкового комплекса дает возможность использовать метод броуновской динамики для определения константы скорости ассоциации белков. Способ определения k_a зависит от условий проведения вычислительного эксперимента.

Метод броуновской динамики с бесконечными граничными условиями наиболее прост в реализации, однако использование его для

определения константы реакции требует привлечения дополнительных теоретических соображений. Исторически первым подходом был предложенный в работе [56] метод коррекции теоретически предсказанной величины константы скорости реакции, известный как NAM (Northrup-Allison-McCammon). Проводится большое число вычислительных экспериментов, в которых две молекулы размещают на расстоянии b друг от друга, и рассматривается диффузия одной из молекул в окрестности другой. Величину расстояния b выбирают таким образом, чтобы на расстоянии, большем b , силы, действующие на подвижную молекулу, были пренебрежимо малы, либо, по крайней мере, центрально симметричны относительно неподвижной молекулы. Это позволяет аналитически рассмотреть процесс сближения молекул до расстояния b . Эксперимент заканчивают, если удовлетворен критерий образования комплекса белков, либо если расстояние между молекулами превысило $c \gg b$ (белки разошлись). Для расчета k_a используется формула [56]

$$k_a = \frac{k_D(b)\beta}{1 - (1 - \beta)\frac{k_D(b)}{k_D(c)}} \approx k_D(b)\beta,$$

где β – доля траекторий, в которых произошло образование комплекса, а $k_D(r)$ – константа скорости реакции диффузионного сближения двух частиц на расстояние r , которую в случае отсутствия взаимодействия между молекулами на расстоянии r можно оценить как $k_D(r) = 4\pi rD$ [3]. Эта формула обобщена для взаимодействующих частиц в работах [65,66].

Доля траекторий β , в которых произошло образование комплекса, обычно очень мала, поэтому для оценки величины константы скорости ассоциации белков необходимо проводить большое число вычислительных экспериментов (сотни тысяч и больше). Уменьшить число экспериментов позволяет применение более сложных методов, таких как метод броуновской динамики со смещающим потенциалом (biased Brownian dynamics) [67,68], метод взвешенных ансамблей (Weighted-Ensemble Brownian Dynamics) [69,70], метод оценивания времени «выживания» реакционно-способного состояния [71] и анализ концентрационной плотности [72].

При использовании периодических граничных условий существует несколько сценариев проведения вычислительного эксперимента, позволяющих вычислить константу ассоциации. В одном из вариантов проводится большое

число экспериментов, в каждом из которых в реакционный объем помещают по одной молекуле каждого белка. Каждый эксперимент завершается по прошествии фиксированной длительности модельного времени t_{\max} (в том случае, если молекулы не образовали комплекс за это время), либо после образования комплекса. Константа ассоциации k_a определяется по формуле $k_a = \frac{1}{\tau c}$, где τ – среднее время ассоциации молекул, концентрация реагентов $c = \frac{1}{V}$, V – объем ячейки, в которой проводится моделирование. При оценке среднего времени ассоциации τ предполагается, что ассоциация молекул может быть описана процессом Пуассона, т.е. процессом с независимыми приращениями. Время ассоциации является случайной величиной, имеющей экспоненциальное распределение. Для каждой выборки экспериментальных данных гипотеза об экспоненциальности должна быть проверена с помощью того или иного статистического критерия. Например, может быть использован критерий Смирнова–Краммера–фон Мизеса для цензурированных данных [73]. Максимально правдоподобная оценка для τ может быть рассчитана по формуле

$$\tau = \frac{(n - m)t_{\max} + \sum_i^m t_i}{n},$$

где n – общее число вычислительных экспериментов, m – число экспериментов, в которых произошла реакция ассоциации молекул, t_i – время, за которое произошла ассоциация молекул в i -м эксперименте.

При многочастичном моделировании для вычисления константы ассоциации k_a достаточно одного вычислительного эксперимента. В реакционный объем помещают равное число молекул одного и другого белка. Реакция между белками рассматривается как необратимая, и уже объединившиеся в комплекс молекулы исключаются из рассмотрения. Зависимость количества образовавшихся комплексов $C(t)$ от времени аппроксимируется функцией

$$C(t) = C_0 \left(1 - \frac{1}{C_0 k_a t + 1} \right),$$

где C_0 – начальная концентрация каждого из реагентов [26].

Моделирование процессов электронного транспорта. Константы ассоциации белков, оцененные с помощью метода броуновской динамики, обычно больше экспериментально по-

лученных значений [74], в частности, для констант скорости реакций электронного транспорта. Метод броуновской динамики не позволяет промоделировать события, происходящие при тесном контакте белков, в первую очередь – их молекулярную подвижность. В большинстве случаев это не является принципиальной проблемой, так как показано, что данный метод позволяет корректно воспроизвести изменение константы скорости при изменении электростатических свойств белков вследствие мутации или при изменении ионного окружения. В то же время предложен ряд подходов, позволяющих оценить с помощью метода броуновской динамики константу скорости физиологически значимой реакции.

В работе [26] в дополнение к геометрическому критерию образования диффузионно-столкновительного комплекса вводится стохастический параметр. Этот параметр позволяет неявным образом учесть конформационные перестройки в белках при образовании функционально-активного комплекса и получить согласующиеся с экспериментальными данными значения константы скорости электронного транспорта с помощью модели многочастичной броуновской динамики.

В работе [54] для моделирования переноса электрона между молекулами пластоцианина и цитохрома *f* использован квантово-химический подход, основанный на теории Р. Маркуса [75]. На каждом шаге броуновской динамики рассчитывается вероятность переноса электрона между активными центрами молекул через пространство либо по цепи ковалентных связей. При этом в расчет принимаются 500 наиболее вероятных путей переноса электрона.

Реализации метода броуновской динамики. Классическими реализациями метода броуновской динамики с бесконечными граничными условиями являются программные пакеты UHBD (University of Houston Brownian Dynamics [49,50]) и MacroDox [51]. Многочастичная броуновская динамика с периодическими граничными условиями реализована в программных пакетах SDA (Simulation of Diffusional Association) [76] и ProKSim (Protein Kinetics Simulator) [52]. Реализация специальных граничных условий обычно требует создания специализированного программного обеспечения, ориентированного на моделирование конкретной биологической структуры. В программном пакете ProKSim реакционный объем может быть разделен на несколько компартментов, ограничивающих область диффузии различных реагентов. В программном пакете Meredys [77] взаимодействующие молекулы представлены

набором простых геометрических фигур (сфер и цилиндров), реакционный объем может быть разделен на компартменты, для описания которых используется язык NeuroML.

Дальнейшее развитие метода броуновской динамики. Важным развитием метода броуновской динамики является создание так называемых «крупнозернистых» (coarse-grain) методов моделирования, в которых молекула состоит из нескольких взаимодействующих частей. По уровню детализации такие модели являются промежуточными между классическими моделями броуновской динамики и полноатомными молекулярно-механическими моделями. Детальный обзор «крупнозернистых» методов молекулярного моделирования приведен в работе [78]. В работе [79] рассмотрены наиболее важные результаты, полученные этим методом при моделировании белок-белковых взаимодействий. Поддержка «крупнозернистых» методов молекулярного моделирования включена во многие программные пакеты броуновской и молекулярной динамики. Среди специализированных пакетов «крупнозернистой» броуновской динамики можно отметить Browndye [80], BD_BOX [81], Brownmove [82] и SOP-GPU [83].

Перспективным направлением является созданием гибридных моделей, в которых используется несколько уровней детализации. В работе [84] представлена модель участка фотосинтетической мембраны, в которой метод многочастичной броуновской динамики используется для моделирования переноса электрона между трансмембранными мультиферментными комплексами, дифференциальные уравнения в частных производных – для моделирования диффузии протонов, и обыкновенные дифференциальные уравнения (master equations) – для моделирования реакций, связанных с переносом электрона между окислительно-восстановительными центрами одного мультиферментного комплекса. В работе [85] предложен подход к созданию гибридных молекулярных моделей, который позволяет согласовать «крупнозернистое» и полноатомное описание отдельных частей сложной системы. Еще одним подходом к созданию гибридных моделей является переключение уровня детализации в процессе моделирования: так, метод броуновской динамики может использоваться, когда расстояние между взаимодействующими молекулами достаточно велико, а при их сближении будет использован метод полноатомной молекулярной динамики.

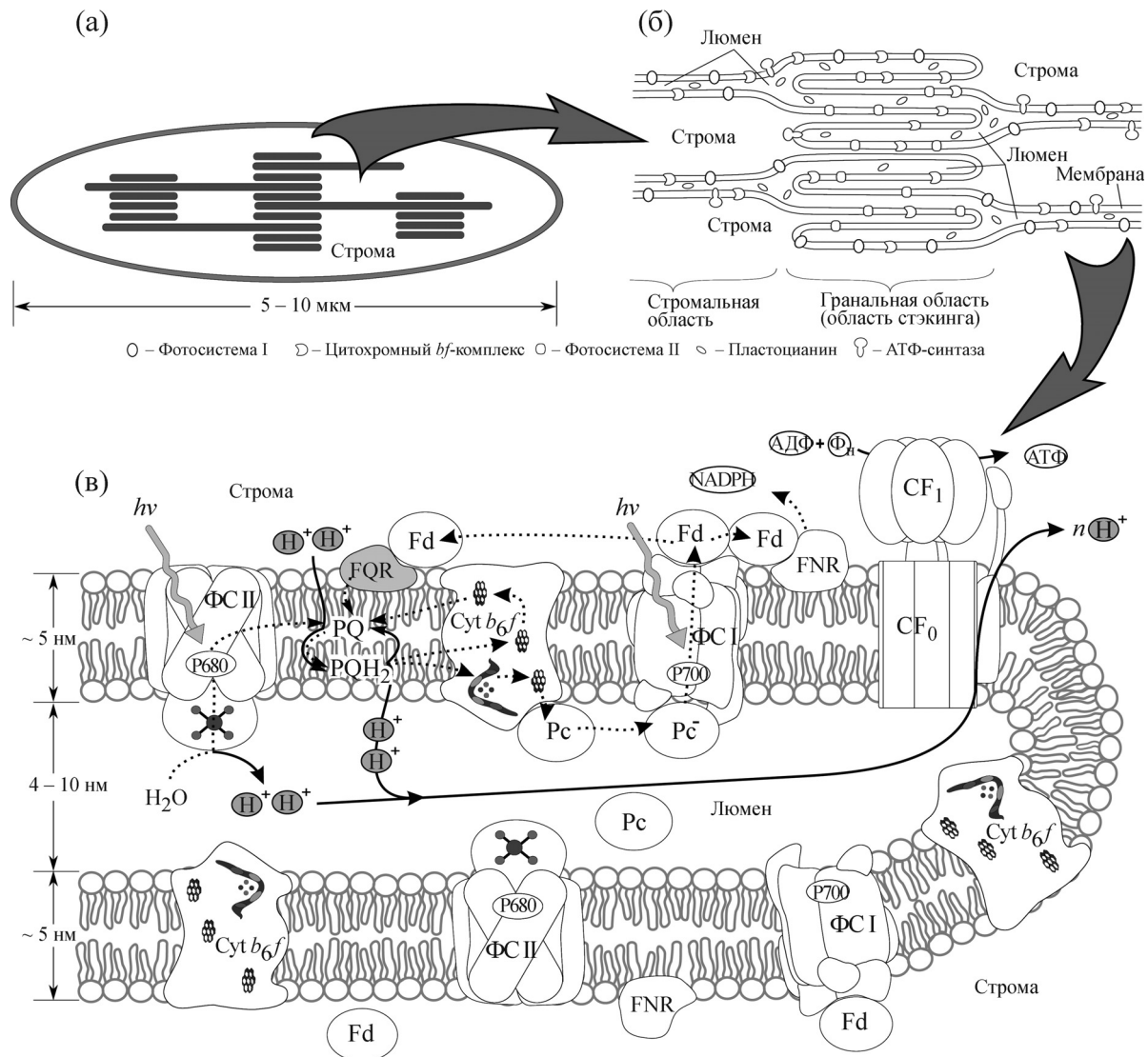


Рис. 1. Организация фотосинтетического аппарата у высших растений. (а) – Схематическое изображение хлоропласта. (б) – Схематическое изображение грани тилакоидов. Показано неравномерное распределение трансмембранных мультиферментных комплексов в тилакоидной мембране. (в) – Схема фотосинтетического электронного транспорта. Показаны две тилакоидные мембраны и люминальное пространство между ними. В мембраны встроены мультиферментные комплексы: фотосистема I, фотосистема II, цитохромный *b₆f*-комплекс, АТФ-синтаза. Вблизи наружной поверхности мембраны располагаются ферредоксин:НАДФ-редуктаза и ферредоксин:пластохинон-редуктаза. В люминальном пространстве диффундирует подвижный переносчик – белок пластоцианин; в строме – ферредоксин. Пунктирными стрелками показан транспорт электронов, сплошными – протонов.

II. ДИНАМИКА МОБИЛЬНЫХ ПЕРЕНОСЧИКОВ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ФОТОСИНТЕЗА

В электрон-транспортной цепи фотосинтеза важную роль играют водорастворимые белки пластоцианин и цитохром *c₆*, локализованные в люмене тилакоида у растений и цианобактерий. Эти белки являются мобильными переносчиками заряда между трансмембранными ци-

тохромным *b₆f*-комплексом и фотосистемой I. Белок ферредоксин является терминальным акцептором электронов для фотосистемы I, у высших растений он локализован в строме хлоропласта (рис. 1). Моделирование взаимодействия мобильных переносчиков электрона с их партнерами позволяет понять механизмы регуляции фотосинтетического электронного транспорта [86–91].

Фотосинтетические электрон-транспортные белки являются удобной моделью для исследо-

вания общих закономерностей белок-белковых взаимодействий. Реакции с участием этих белков могут быть исследованы с помощью очень широкого спектра биофизических методов, и к настоящему времени накоплен богатейший экспериментальный материал. Важной особенностью комплексов электрон-транспортных белков является их нестабильность: эффективное функционирование электронтранспортной цепи фотосинтеза напрямую зависит от их способности быстро образовать комплекс, передать электрон следующему переносчику в цепи и снова диссоциировать.

Комплекс пластоцианина и цитохрома *f*.

Пластоцианин – небольшой водорастворимый белок, основная функция которого заключается в переносе электронов от цитохромного *b₆f*-комплекса к фотосистеме I. В активный центр пластоцианина входит атом меди, который в окисленном (II) состоянии связан координационными связями с четырьмя консервативными аминокислотными остатками – метионина, цистеина и двумя остатками гистидина, один из которых (H87 в большинстве структур пластоцианина высших растений) экспонирован на поверхности белка. Методами рентгеноструктурного анализа показано, что в восстановленном (I) состоянии связь атома меди с этим остатком гистидина значительно ослабевает, что может приводить к изменению конформации активного центра белка [92]. Экспериментальное изучение структуры комплекса пластоцианина с его окислительно-восстановительными партнерами в настоящее время невозможно – метод рентгеноструктурного анализа не может быть использован из-за нестабильности этих комплексов, а метод спектроскопии ядерного магнитного резонанса – из-за их чрезвычайно больших размеров. В настоящее время экспериментально изучен короткоживущий комплекс пластоцианина и цитохрома *f* – экспонированной в люмен субъединицы цитохромного *b₆f*-комплекса, являющейся его терминальным акцептором и передающей электроны на пластоцианин. В состав цитохрома *f* входит гем типа С, ковалентно связанный с двумя консервативными аминокислотными остатками цистеина. Атом железа в геме связан координационными связями с N-концевым остатком тирозина и с остатком гистидина. Предполагается, что взаимодействие пластоцианина с цитохромным *b₆f*-комплексом аналогично его взаимодействию с изолированным цитохромом *f*.

В 1998 г. с помощью метода спектроскопии ядерного магнитного резонанса было исследовано взаимодействие пластоцианина шпината с цитохромом *f* репы (атом меди пластоцианина

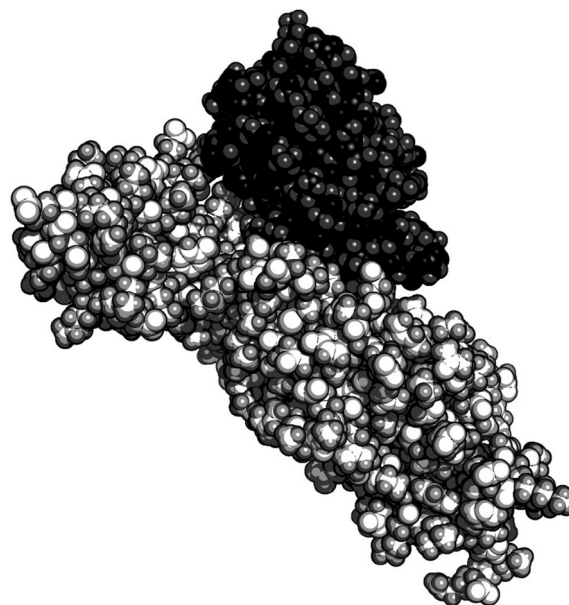


Рис. 2. Строение комплекса пластоцианина шпината (сверху, более темный) и цитохрома *f* репы (снизу, более светлый) по данным спектроскопии ядерного магнитного резонанса (PDB ID 2PCF, модель 4 [93]). Белки показаны с атомным разрешением, используемым при моделировании методом броуновской динамики.

был замещен на атом кадмия для предотвращения окислительно-восстановительных реакций) [93]. Была установлена структура образующегося в растворе белок-белкового комплекса и показано, что эта структура вполне однозначно определена, было предложено 10 моделей, различающихся между собой по параметру среднеквадратичного отклонения атомов на величину порядка 1 Å (рис. 2). В предложенной структуре в тесном контакте находятся отрицательно заряженная область пластоцианина (аминокислотные остатки D42, E43, D44, D51, E59, E60 и D61) и положительно заряженная область цитохрома *f* (K58, K65, K66, K185, K187 и R209). При этом непосредственно прилегающий к атому меди гидрофобный участок (L12, F35, V40, L62, C84 и V93) контактирует с окружающей гем гидрофобной областью цитохрома *f* (I3, F4, L61, L69, I115 и V118).

Было исследовано еще несколько комплексов пластоцианина и выполняющего аналогичную роль у некоторых цианобактерий цитохрома *c₆* с цитохромом *f* [94–97]. В структуре пластоцианина петрушки [95] отрицательно заряженная область несколько меньше, чем у шпината (отсутствуют аминокислотные остатки, гомологичные E60 и D61). Показано, что в физиологических условиях скорость реакции

этого пластоцианина с цитохромом *f* репы такая же, как и для пластоцианина шпината, но снижение скорости реакции при увеличении ионной силы раствора менее выражено. Еще меньше эта заряженная область у зеленых водорослей, а у многих цианобактерий она полностью отсутствует [94,98]. В экспериментах по направленному мутагенезу пластоцианина шпината [99] было показано, что мутации полярных заряженных аминокислот D42, E43, D44, E59, E60 значительно замедляют перенос электрона с цитохрома *f* на пластоцианин, но не приводят к изменению равновесия этой реакции; в то же время мутация глутамина Q88E не приводит к значительному изменению скорости реакции, однако смещает ее равновесие. Мутации в гидрофобной области пластоцианина [100] также лишь незначительно изменяют скорость электронного транспорта, причем замены A90 более крупными остатками, как и замена L12A, замедляет реакцию, а замена G10 более крупными остатками – ускоряет ее. Остаток тирозина Y83 расположен в непосредственной близости от атома меди, и естественным является предположение об его непосредственном участии в передаче электрона между активными центрами двух белков, однако данные по влиянию мутаций в этом сайте на скорость переноса электрона противоречивы: так, данные работ [101,102] говорят о многократном (до 40 раз) снижении скорости при мутации, в то время как в работе [100] наблюдается значительно меньшее влияние (порядка двукратного снижения скорости переноса электрона), которое может быть объяснено без привлечения представлений о включении этого остатка в «электронную тропу».

В экспериментах по перекрестному сшиванию этих белков с помощью карбодимида EDC [103] показано, что сшивание происходит в области полярных участков пластоцианина и цитохрома *f*, однако в образующихся ковалентно связанных комплексах перенос электрона между гемом цитохрома *f* и медью пластоцианина невозможен. На основании этих фактов было сделано предположение о том, что, по крайней мере, у высших растений процесс образования электрон-транспортного комплекса пластоцианина и цитохрома *f* проходит в два этапа [93]. Сначала происходит сближение белков в диффузионном режиме под действием дальнедействующих электростатических сил, при этом электростатические взаимодействия формируют своего рода «воронку», направляющую диффузию пластоцианина. После того, как взаимодействие комплементарных электрически заряженных участков двух белков приведет к

диффузионному захвату (т.е. такому состоянию, когда межмолекулярные взаимодействия препятствуют отдалению белков друг от друга, но не препятствуют их вращательному движению относительно друг друга), происходит вытеснение молекул воды из белок-белкового интерфейса, и гидрофобные участки двух белков приходят в непосредственный контакт. Именно в этом состоянии происходит перенос электрона между активными центрами двух молекул. При этом лимитирующей стадией реакции является диффузионное сближение молекул, а последующая перестройка диффузионно-столкновительного комплекса в функционально-активное состояние практически не влияет на ее скорость.

Показано, что у таких организмов, как цианобактерий *Phormidium laminosum* [94,104,105] и *Prochlorothrix hollandica* [106], электростатические взаимодействия мобильных переносчиков электрона (пластоцианина и цитохрома c_6) с цитохромным комплексом значительно слабее, чем у высших растений. Это связано с тем, что у пластоцианина этих цианобактерий отрицательно заряженная область практически отсутствует, так как соответствующие аминокислоты заменены на незаряженные, либо их вообще нет. В результате отличается и структура комплексов – если у высших растений область контакта включает как гидрофобные, так и заряженные участки (боковая ориентация, side-on), то у цианобактерий она существенно меньше и включает только гидрофобный участок, прилегающий к атому меди (фронтальная ориентация, head-on) [107]. Равновесие реакции ассоциации у цианобактерий существенно более сдвинуто в сторону свободных белков, чем в случае белков из высших растений, однако наблюдаемая скорость реакции электронного транспорта между этими белками в физиологических условиях сравнима с таковой у высших растений. Предполагается, что это связано с различными механизмами образования финального комплекса: у цианобактерий основную роль играет не электростатический диффузионный захват молекулы пластоцианина, а сильные диполь-дипольные взаимодействия, помогающие правильной его ориентации относительно цитохромного комплекса при тесном сближении молекул. Благодаря этому получается, что реакция и в этом случае имеет диффузионно-контролируемый характер, однако ее скорость значительно меньше зависит от ионной силы раствора.

В работах [96,108] исследовалось взаимодействие белков пластоцианина и цитохрома *f* у цианобактерии *Nostoc* sp. PCC 7119 (ранее известной как *Anabaena variabilis*). Показано,

что структура комплекса этих белков занимает промежуточное положение между структурой комплекса высших растений (боковая ориентация) и цианобактерий *Phormidium laminosum* и *Prochlorothrix hollandica* (фронтальная ориентация). В формировании комплекса значительную роль играют электростатические взаимодействия, но расположение электрических зарядов инвертировано по сравнению с высшими растениями: положительно заряженная область находится на пластоцианине (аминокислотные остатки K11, K35, K51, K57, K62 и R93), а отрицательно заряженные – на цитохроме *f* (D64, D100, E108, E165, E189 и D190). В комплексе в непосредственном контакте находятся аминокислотные остатки K57 и K62 пластоцианина и, соответственно, E189 и D64 цитохрома *f*. Кинетические и термодинамические параметры взаимодействия белков близки к таковым у высших растений.

Моделирование взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома *f* высших растений методом броуновской динамики. В первой работе по моделированию взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома *f* методом броуновской динамики [109] за основу были взяты известные структуры пластоцианина тополя и цитохрома *f* репы. Численное моделирование производилось методом броуновской динамики в пакете программ MacroDox. Рассматривалось движение молекулы пластоцианина в электростатическом поле, создаваемом молекулой цитохрома *f*. В качестве основного критерия связывания рассматривается расстояние между атомом железа цитохрома *f* и атомом меди пластоцианина, при этом дополнительно анализируются контакты между аминокислотными остатками двух белков. Определена доминантная ориентация белков в комплексе при расстоянии 16–17 Å между атомами Cu и Fe. Использование этого расстояния в качестве критерия реакции приводит к хорошему совпадению рассчитанных значений константы скорости с экспериментальными данными: данная модель хорошо воспроизводит наблюдаемое в эксперименте уменьшение константы скорости реакции с увеличением ионной силы раствора. Однако теоретически предсказанная структура комплекса не совпала с экспериментально полученной в том же году [93].

Работа [110] посвящена исследованию влияния конформации белков на результаты моделирования их взаимодействия методом броуновской динамики. Было промоделировано взаимодействие различных вариантов трехмерной структуры белка пластоцианина, экспериментально полученных методами рентгено-

структурного анализа и спектроскопии ядерного магнитного резонанса, с одной и той же структурой цитохрома *f*. В качестве критерия образования комплекса использовалось расстояние между атомами меди пластоцианина и железа цитохрома *f*. В работе получено три типа комплексов, в которых пластоцианин по-разному ориентирован относительно цитохрома *f*. Было показано, что оценка константы скорости ассоциации белков весьма чувствительна даже к очень небольшим различиям в конформации пластоцианина.

Константы скорости связывания пластоцианина дикого типа и его мутантных форм из шпината с цитохромом *f* из турнепса были рассчитаны с помощью программы броуновской динамики SDA [111]. Критерием реакции было образование контакта (расстояние < 5 Å) между любыми двумя независимыми парами аминокислотных остатков. Была получена хорошая корреляция между рассчитанными и экспериментальными значениями констант для различных форм пластоцианина при различных ионных силах раствора. В то же время абсолютные значения рассчитанных констант оказались на порядок выше экспериментальных. Авторы объясняют такой эффект тем, что в модели не учитывается стадия перестройки комплекса, которая может замедлять общую скорость реакции. Разброс величины отношения рассчитанных и экспериментальных значений констант авторы объясняют тем, что разные мутации могут по-разному изменять скорость перестройки комплекса.

Метод многочастичной броуновской динамики использован для оценки скорости переноса электрона с цитохрома *f* на пластоцианин в растворе [26] и с учетом геометрии тилакоида [57]. Трансформация предварительного (диффузионно-столкновительного) комплекса в финальный и собственно перенос электрона рассматриваются как случайные процессы, что соответствует химической реакции первого порядка. Параметрами модели являются критерий формирования предварительного комплекса (использованы пять пар расстояний между активными центрами белков и непосредственно примыкающими к ним аминокислотными остатками) и вероятность превращения предварительного комплекса в финальный за один шаг модели. Полученные в работе зависимости константы скорости реакции между пластоцианином дикого типа и его мутантными формами и цитохромом *f* от ионной силы раствора хорошо согласуются с экспериментальными данными [99] (рис. 3).

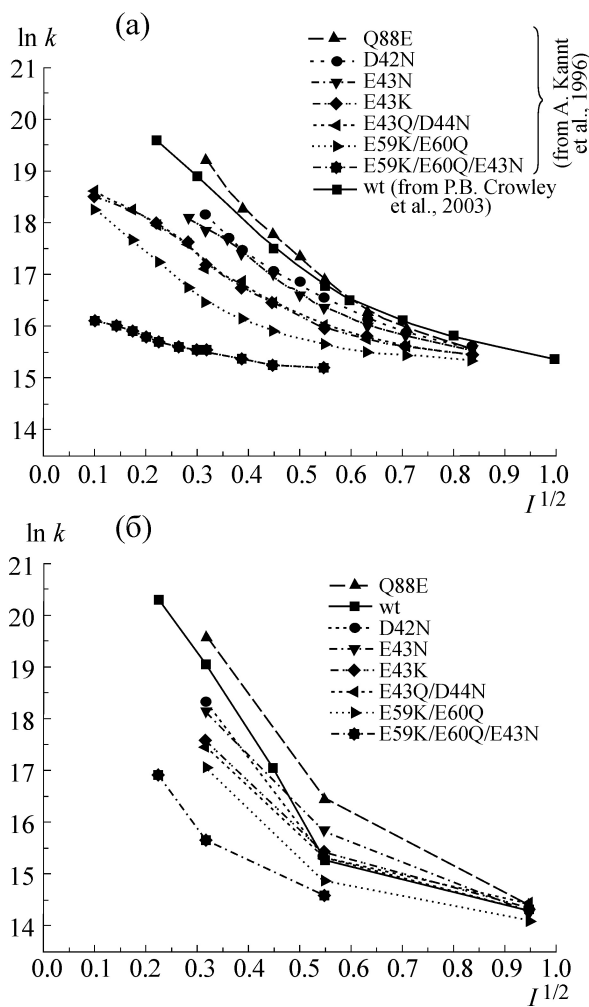


Рис. 3. Зависимость натурального логарифма константы скорости реакции ассоциации цитохрома *f* различных форм пластоцианина в растворе: (а) – экспериментальные данные [95,99], (б) – результаты моделирования методом многочастичной броуновской динамики. Перепечатано из [26] с разрешения IOP Publishing.

В работе [57] молекулы цитохрома *f* были закреплены по краям реакционного объема, имитируя их расположение в составе цитохромного *b_f*-комплекса. В работе показана зависимость скорости реакции от расстояния между мембранами тилакоида, при этом скорость максимальна при ширине люминального пространства 8–10 нм и значительно снижается в связи с затрудненной диффузией пластоцианина при уменьшении этого расстояния менее 7 нм (рис. 4). Это снижение скорости согласуется с экспериментально изученными эффектами осмотического стресса [112]. В работе [58] исследовано влияние на кинетику взаимодействия пластоцианина и цитохрома *f* электростатического поля, создаваемого полярными группами

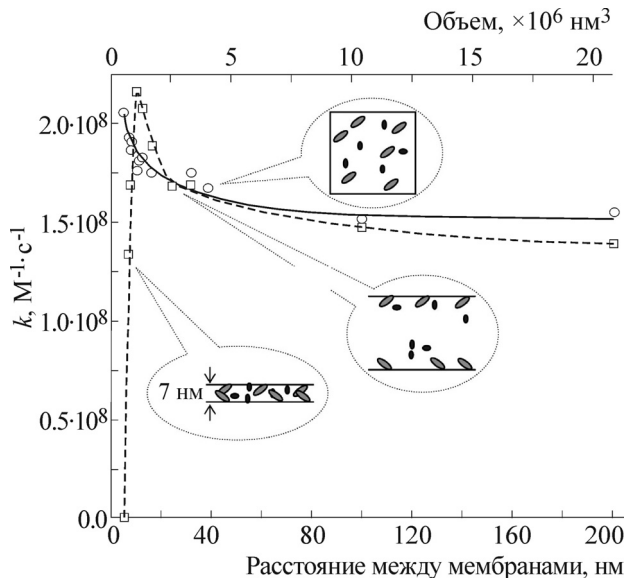


Рис. 4. Изменение константы скорости реакции ассоциации пластоцианина и цитохрома *f* в зависимости от формы и размеров реакционного объема при одинаковом количестве молекул белков. Сплошная линия – зависимость от объема реакционного пространства для реакции в растворе, пунктирная линия – зависимость от расстояния между мембранами в люмене тилакоида [57].

содержащихся в тилакоидной мембране фосфолипидов и сульфолипидов. Их отрицательный заряд препятствует приближению молекул пластоцианина к мембране и в то же время дестабилизирует непродуктивные комплексы, снижающие эффективность переноса электрона с цитохрома *f* на пластоцианин. Показано, что электростатический потенциал мембраны лишь незначительно влияет на кинетику переноса электрона в стромальных участках (где плотность заряда не превышает -10 мКл/м^2), однако может ингибировать этот процесс в гранальных участках, где плотность заряда может достигать -70 мКл/м^2 (рис. 5).

В работе [52] определено наиболее характерное для диффузионно-столкновительного комплекса взаимное расположение белков пластоцианина и цитохрома *f* в растворе. Показано, что в диффузионном режиме происходит сближение полярных аминокислотных остатков (D51 и E59 пластоцианина и K58, K65 и K187 цитохрома *f*). Предполагается, что такое сближение соответствует состоянию диффузионного захвата молекулы пластоцианина цитохромом *f*, а для формирования активного электрон-транспортного комплекса необходим поворот молекулы пластоцианина вокруг области захвата и сближение гидрофобных участков молекул (рис. 6).

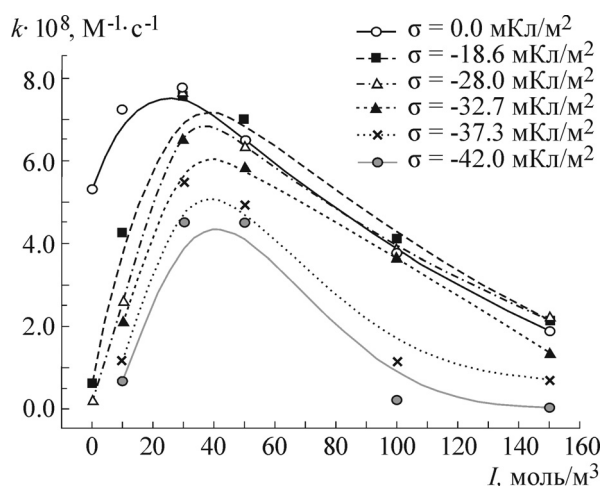


Рис. 5. Зависимости константы скорости реакции ассоциации пластоцианина и цитохрома f в люмене тилакоида от величины ионной силы для различных значений плотности заряда на мембране. Перепечатано из [58] с разрешения Springer Science + Business Media.

Моделирование электронного транспорта у зеленых водорослей и цианобактерий. Система фотосинтетического электронного транспорта зеленых водорослей и цианобактерий во многом схожа с таковой у высших растений, однако имеются некоторые особенности. У многих видов наряду с пластоцианином (или даже вместо него) в качестве мобильного переносчика электрона между цитохромным комплексом и фотосистемой I выступает водорастворимый цитохром c_6 .

Большой цикл работ [113–115] посвящен моделированию взаимодействия различных форм пластоцианина и цитохрома c_6 с цитохромом f зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Предсказана структура комплексов, в которых происходит электронный транспорт, и проанализировано влияние мутаций цитохрома f на скорость его связывания с пластоцианином и цитохромом c_6 . Показано, что белки пластоцианина и цитохром c_6 , несмотря на отсутствие какой-либо гомологии друг с другом, являются полными функциональными аналогами. В работе [116] была исследована роль других экспонированных в люмен субъединиц цитохромного b_6f -комплекса в его взаимодействии с пластоцианином и цитохромом c_6 . Полученные в вычислительном эксперименте значения скорости связывания подвижных переносчиков электрона с субкомплексом цитохрома f и железосерного белка Риске меньше, чем соответствующие скорости для отдельно взятого цитохрома f .

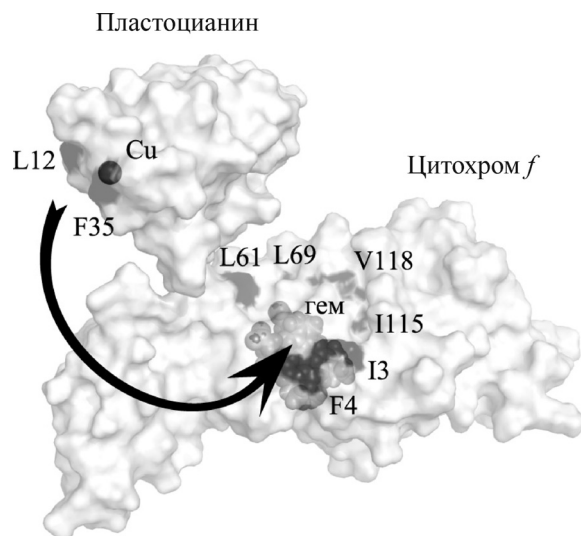


Рис. 6. Взаимное расположение белков пластоцианина и цитохрома f при диффузионном захвате [52]. Сближены аминокислотные остатки D51 и E59 пластоцианина и K58, K65 и K187 цитохрома f . Стрелкой показан поворот молекулы пластоцианина, приводящий к сближению выделенных на рисунке гидрофобных аминокислотных остатков молекул.

В работах [117,118] было исследовано взаимодействие этих же белков у цианобактерии *Phormidium laminosum*, а также промоделировано взаимодействие цитохрома f *Phormidium laminosum* с различными вариантами пластоцианина из других цианобактерий (*Prochlorothrix hollandica*, *Nostoc* sp. PCC7119, *Synechocystis* sp. PCC6803 и *Synechococcus* sp. PCC7922). Для цианобактерий *Phormidium laminosum* и *Nostoc* sp. PCC 7119 оценен вклад диффузионных процессов и собственно переноса электрона между активными центрами белков [54]. Показано, что для обоих видов и диффузионная, и активационная составляющие вносят существенный вклад в наблюдаемую кинетику реакции. Дальнейшие электростатические взаимодействия приводят к ускорению электронного транспорта в 20 раз при уменьшении ионной силы раствора с 500 до 100 мМ для белков *Nostoc* sp. PCC 7119 и практически не оказывают влияния на кинетику взаимодействия белков *Phormidium laminosum*.

В работах [119,120] в вычислительном эксперименте показано, что у цианобактерий (*Phormidium laminosum*, *Synechocystis* sp. PCC 6803), в отличие от высших растений, изменение константы скорости реакции ассоциации пластоцианина с цитохромом f и с фотосистемой I при изменении ионной силы раствора незначительно (рис. 7). У цианобактерий при физиологических значениях ионной силы электро-

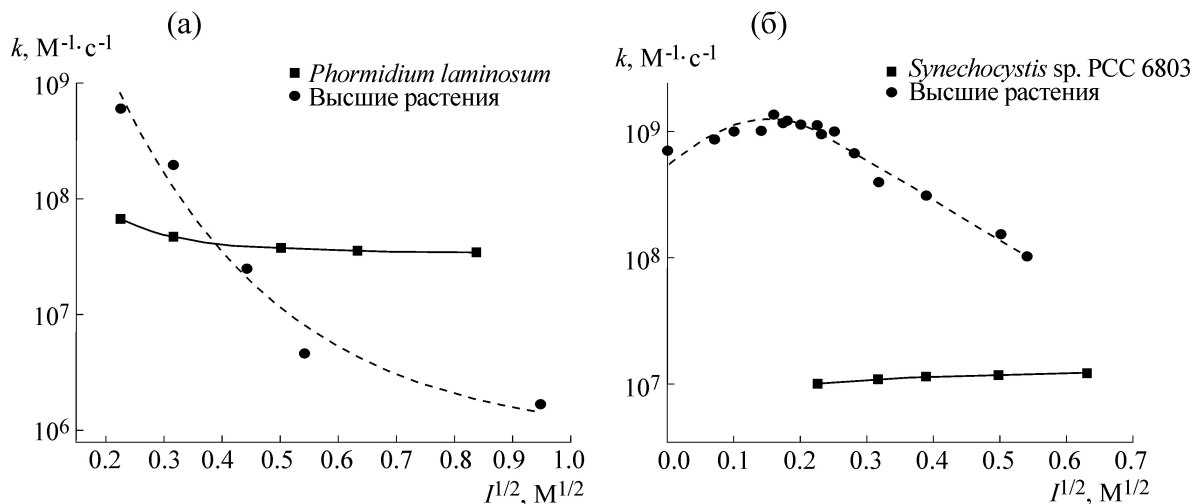


Рис. 7. Зависимости константы скорости реакции ассоциации белков от ионной силы раствора для разных видов организмов: (а) – взаимодействие пластоцианина и цитохрома f , (б) – взаимодействие пластоцианина и фотосистемы I. Перепечатано из [119] с разрешения Springer Science + Business Media.

статические взаимодействия не оказывают существенного влияния на скорость ассоциации этих белков, что связано с различной структурой реакционных центров этих организмов.

Модели взаимодействия фотосистемы I с донорами и акцепторами – мобильными переносчиками электрона. Известно, что донорами и акцепторами электрона для трансмембранного комплекса фотосистемы I служат мобильные белки-переносчики. В качестве доноров выступают белки пластоцианин и цитохром c_6 , в качестве акцепторов – Fe_2S_2 -ферредоксин и флаводоксин. В экспериментах [121] показано, что скорость процесса переноса электрона с цитохромного b_6/f -комплекса на фотосистему I лимитирована взаимодействием пластоцианина и фотосистемы I, а именно скоростью диссоциации окисленного пластоцианина.

Экспериментальными методами до сих пор не удалось исследовать структуры комплексов фотосистемы I с мобильными переносчиками электронов, однако с помощью косвенных методов были установлены сайты связывания пластоцианина и ферредоксина с фотосистемой I [122–130]. Известно, что связывание пластоцианина происходит на плоском люминальном участке донорной части фотосистемы I, образованном петлями, которые соединяют трансмембранные домены субъединиц PsaA и PsaB, и субъединицей PsaF, а ферредоксин связывается со стромальным выступом фотосистемы I, образованном субъединицами PsaC, PsaD и PsaE (рис. 8), однако ориентация белков-переносчиков относительно фотосистемы I в электрон-транспортном комплексе пока не определена. Тем не менее имеющиеся данные позволили

эффективно использовать метод броуновской динамики для моделирования взаимодействия фотосистемы I с ее реакционными партнерами.

Ферредоксин является терминальным акцептором электронов для первичных процессов фотосинтеза. Получаемые от ферредоксина электроны могут быть возвращены в фотосинтетическую электрон-транспортную цепь (в случае циклического электронного транспорта вокруг фотосистемы I) либо переданы в виде восстановительных эквивалентов НАДФ-Н в восстановительный пентозофосфатный цикл через ферредоксин: НАДФ-редуктазу (рис. 9). Кроме того, ферредоксин может служить донором электронов для таких ферментов, как глутамат-синтаза, нитрат-редуктаза, сульфит-редуктаза и гидрогеназа. Понимание механизма перераспределения потока электронов между различными ферментами имеет важное прикладное значение для биотехнологии, в частности, для задачи биологического синтеза молекулярного водорода.

С помощью метода многочастичной броуновской динамики была исследована роль электростатических взаимодействий при образовании комплекса фотосистемы I с ее реакционными партнерами [132]. В вычислительном эксперименте установлена немонотонная зависимость константы скорости ассоциации фотосистемы I с пластоцианином и ферредоксином (рис. 10), что согласуется с экспериментальными данными. Для объяснения этой немонотонности используется представление о формировании непродуктивных комплексов, стабильность которых увеличивается с усилением электростатических взаимодействий между белками.

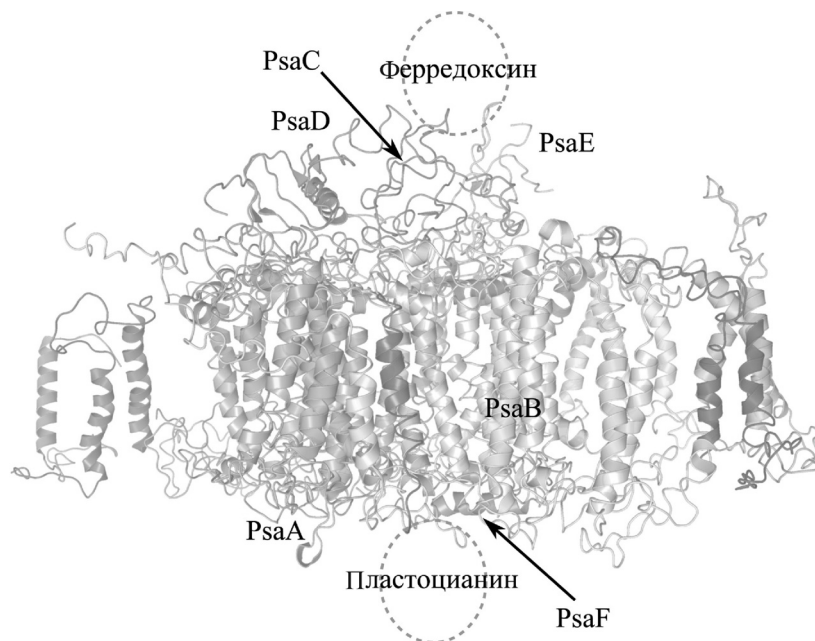


Рис. 8. Строение фотосистемы I высших растений (PDB ID 3LW5, [124]) и предполагаемые сайты связывания пластоцианина и ферредоксина. Показаны элементы вторичной структуры фотосистемы I и обозначены субъединицы, которые, предположительно, участвуют во взаимодействии с мобильными переносчиками.

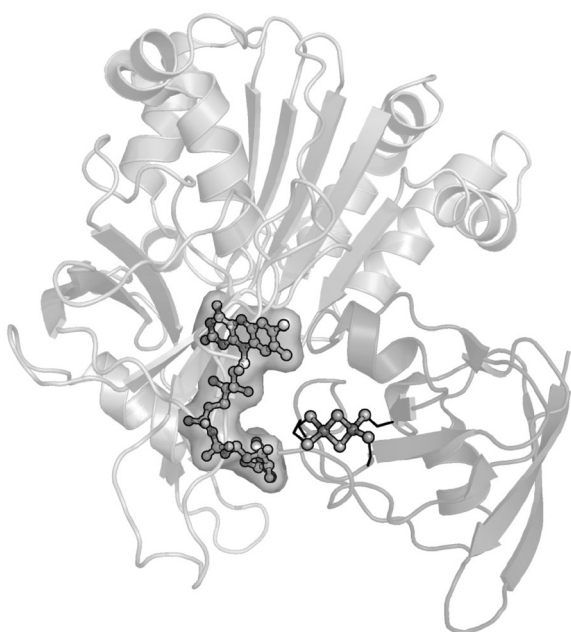


Рис. 9. Ферредоксин:НАДФ-редуктаза (слева) и ферредоксин (справа). Показаны элементы вторичной структуры белков. В виде шаро-стержневых моделей изображены окислительно-восстановительные центры этих белков: входящий в состав ферредоксин:НАДФ-редуктазы ковалентно не связанный флавинадениндинуклеотид и входящий в состав ферредоксина железо-серный кластер Fe_2S_2 , ковалентно связанный с четырьмя остатками цистеина. Взаимное расположение белков соответствует одному из вариантов их ориентации в структуре PDB ID 1EWY, полученной методом рентгеноструктурного анализа [131].

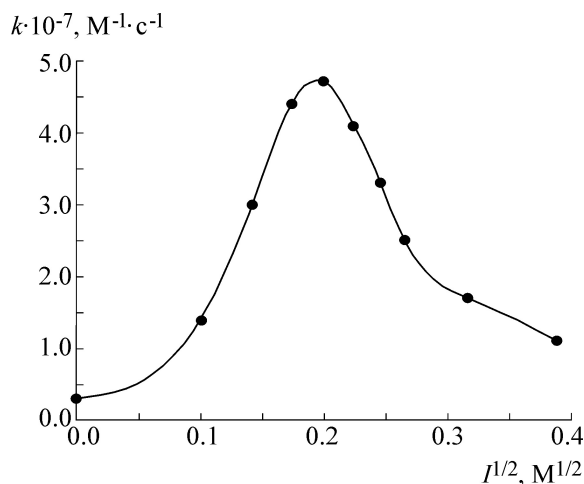


Рис. 10. Зависимость константы скорости реакции ассоциации ферредоксина с фотосистемой I от ионной силы раствора. Перепечатано из [132] с разрешения Elsevier.

В работе [133] используются методы броуновской и молекулярной динамики для анализа взаимодействия ферредоксина с [FeFe]-гидрогеназой зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Было проведено сравнение результатов, полученных методом молекулярного докинга [134] с результатами, полученными методом броуновской динамики с учетом электростатических взаимодействий и эффектов десольватации. На основе полученных методом броунов-

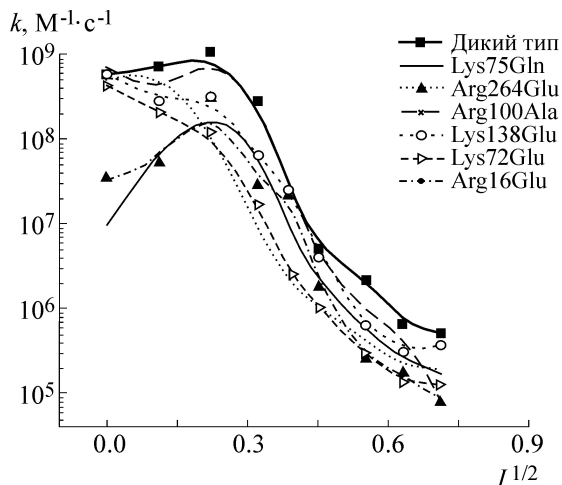


Рис. 11. Зависимости константы скорости реакции ассоциации ферредоксина с нативной и мутантными формами ферредоксин:НАДФ-редуктазы от ионной силы раствора по данным моделирования методом броуновской динамики. Перепечатано из [136] с разрешения EDP Sciences.

ской динамики траекторий были построены карты заселенности для положения и ориентации ферредоксина относительно гидрогеназы при нескольких расстояниях между центрами масс белков. Полученные результаты позволяют предположить, что у гидрогеназы существует только один сайт связывания ферредоксина, для ферредоксина же обнаружено две метастабильных ориентации. Предполагается, что одна из них соответствует состоянию диффузионного захвата, а вторая — состоянию, в котором происходит перенос электрона. Были идентифицированы аминокислотные остатки, отвечающие за формирование соляных мостиков между белками в комплексе. В дальнейшем [135] метод броуновской динамики был использован для оценки свободной энергии взаимодействия этих белков. Было исследовано несколько полученных *in silico* мутантных форм ферредоксина и гидрогеназы. Показано, что для гидрогеназы замена нейтрального или отрицательно заряженного аминокислотного остатка на положительно заряженный (мутанты T99K и D102K) приводит к снижению энергии связывания. Предполагается, что использование таких мутантов в биотехнологии при производстве биотоплива потенциально может увеличить продукцию молекулярного водорода за счет увеличения сродства ферредоксина и [FeFe] гидрогеназы.

В работе [136] рассматривается взаимодействие ферредоксина с нативной и мутантными формами ферредоксин:НАДФ-редуктазы. Исследовано влияние ионной силы раствора на

скорость реакции ассоциации этих белков и показано существование двух различных режимов их взаимодействия. Дикий тип и мутантные формы, способные к эффективному переносу электрона с ферредоксина (R100A, R264E и K75Q) в основном характеризуются колоколообразной зависимостью константы скорости связывания от ионной силы раствора, причем максимум приблизительно соответствует физиологическому значению ионной силы (рис. 11). Для малоактивных мутантов (K75E, R16E и K72E) характерна монотонная зависимость константы скорости реакции ассоциации от ионной силы раствора. Можно предположить, что это связано с изменением характера электростатических взаимодействий молекул. Так, в первом случае они приводят к эффективному диффузионному захвату молекулы ферредоксина молекулой ферредоксин:НАДФ-редуктазы, что способствует образованию функционально-активного комплекса при физиологических значениях ионной силы, однако ограничивает относительную подвижность молекул при ее значительно более низких значениях и способствует образованию непродуктивных комплексов. Во втором случае электростатические взаимодействия слабее и непродуктивные комплексы не образуются.

В работе [137] метод броуновской динамики использован для исследования механизма регуляции потоков электронов с ферредоксина на ферредоксин:НАДФ-редуктазу и на [FeFe]-гидрогеназу. Показано, что изменение степени протонирования аминокислотных остатков ферредоксина и ферредоксин:НАДФ-редуктазы при изменении pH в диапазоне от 5 до 9 лишь незначительно влияет на скорость их взаимодействия. Это косвенно подтверждает предположение о том, что наблюдаемая в эксперименте инактивация переноса электронов на ферредоксин:НАДФ-редуктазу вызвана «заякориванием» этого белка на мембране [138]. В то же время скорость взаимодействия ферредоксина с [FeFe]-гидрогеназой имеет четко выраженный максимум при pH 9. Предполагается, что именно это приводит к росту продукции молекулярного водорода при защелачивании стромы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Традиционный подход к описанию взаимодействия молекул с помощью уравнений действующих масс доказал свою эффективность в определении значений констант скоростей реакций при их взаимодействии в растворе. В большинстве экспериментальных работ по исследованию последовательности реакций фото-

синтетического электронного транспорта в качестве характеристики эффективности реакции приводятся величины констант скоростей реакций в предположении мономолекулярного или бимолекулярного механизма. Однако описание реакций с помощью уравнений химической кинетики имеет ряд недостатков. Кинетический подход, описывающий образование реакционного комплекса двух макромолекул с помощью дифференциальных уравнений, не учитывает в явном виде деталей строения взаимодействующих молекул, влияния электростатических и иных взаимодействий на скорость реакции.

Применяемый в последние десятилетия для моделирования взаимодействия белков метод броуновской динамики описывает индивидуальное движение молекул с помощью широко применяемого в физике уравнения Ланжевена. При этом форма молекул может быть учтена с разной степенью подробности, вплоть до атомного разрешения. Наряду с броуновским движением уравнения учитывают электростатические взаимодействия двух молекул. В соответствии с уравнением Пуассона–Больцмана рассчитывается распределение электрического потенциала вокруг каждой из взаимодействующих молекул, что позволяет оценить роль электростатических взаимодействий в процессе докинга и формирования комплекса. Конечно, такую оценку можно было бы сделать и на основе анализа кинетической модели, но только вводя дополнительные «эффективные» параметры, физическую природу которых трудно однозначно интерпретировать. Детальное моделирование процесса методом броуновской динамики позволяет понять, каким образом реальные физические механизмы молекулярных взаимодействий определяют общую динамику процесса.

В ходе развития метода броуновской динамики разработаны способы учета гидрофобных взаимодействий, связанных с перестройкой сети водородных связей в гидратной оболочке макромолекул при их сближении. Для более детального описания реакции в комплексе взаимодействующих белков (переноса электрона в окислительно-восстановительных реакциях) метод броуновской динамики применяется в сочетании с методами крупнозернистого моделирования (course-grain) и молекулярной механики.

Уравнения действующих масс плохо пригодны для детального описания взаимодействия белков в условиях пространственной гетерогенности и сложной геометрии взаимодействующих макромолекул в ограниченном интерьере фотосинтетической мембраны. В отдельных компартментах хлоропласта в окислительно-

восстановительных реакциях фотосинтетического электронного транспорта принимают участие сравнительно небольшие ансамбли из десятков или сотен молекул, и применение кинетического подхода, основанного на базовых представлениях статистической физики и кинетики химических реакций в растворах, здесь не вполне правомерно.

Для моделирования взаимодействия ограниченных по численности ансамблей макромолекул сложной формы в гетерогенном интерьере развивается подход многочастичного броуновского моделирования. В модели воспроизводятся процессы на трехмерной компьютерной сцене, сконструированной в соответствии с современными знаниями о пространственной организации фотосинтетической мембраны. Моделируемые молекулы перемещаются в соответствии с законами броуновской динамики, ориентируются друг относительно друга и образуют комплексы в электростатическом поле, источником которого являются как поверхностные заряды самих взаимодействующих молекул, так и поле мембран. Адекватность модели проверяется соответствием кинетических характеристик наблюдаемых процессов экспериментальным данным.

Преимуществом многочастичного броуновского моделирования является возможность учета формы и размеров как взаимодействующих молекул, так и элементов реакционного объема. Изменяя в модели форму и геометрические характеристики реакционного объема, число и расположение взаимодействующих молекул, другие характеристики, можно изучать их влияние на скорость изучаемой реакции. Метод позволяет воспроизводить на модели процессы, включающие взаимодействие нескольких типов белков в интерьере клетки. Изучение в рамках единой модели последовательности процессов электронного транспорта дает инструмент для изучения механизмов регуляции работы фотосинтетического реакционного центра со стороны его донорно-акцепторного окружения.

Другим направлением развития многочастичного моделирования является его использование в многомасштабных (multi-scaled) моделях, позволяющих изучать сопряжение процессов разной физической природы в сложных субклеточных комплексах, каковым является система преобразования энергии в ходе первичных процессов фотосинтеза. Методология описана в работе [84], где объединены подходы кинетического моделирования (описание процессов переноса электрона внутри фотосинтетических мультиферментных комплексов с по-

мощью уравнений для вероятностей состояний), прямого многочастичного моделирования для описания переноса электрона подвижными переносчиками и уравнения в частных производных для описания пространственно-временной эволюции электрохимического потенциала.

Использование в исследовании процессов фотосинтеза методов броуновского, в том числе многочастичного броуновского моделирования в сочетании с методами молекулярной динамики и квантовой химии, представляется перспективным для фундаментального изучения механизмов процессов в живой клетке. В сочетании с кинетическими моделями метод многочастичной броуновской динамики может быть плодотворно использован для практических целей диагностики состояния растительной клетки в биотехнологическом и экологическом мониторинге и в решении задач оптимального управления процессами роста микроводорослей в биофотореакторе.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проекты 15-07-08927, 14-04-00302 и 15-04-08681.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. P. Waage and C. M. Guldberg, *Forhandlinger: Videnskabs-Selskabet i Christiania* **35** (1864).
2. P. Waage and C. M. Gulberg, *J. Chem. Educ.* **63** (12), 1044 (1986).
3. M. V. Smoluchowski, *Phys. Zeit.* **17**, 557 (1916).
4. M. V. Smoluchowski, *Z. Phys. Chem.* **92**, 129 (1917).
5. P. Debye, *Trans. Electrochem. Soc.* **82** (1), 265 (1942).
6. G. Schreiber, G. Haran, and H.-X. Zhou, *Chem. Rev.* **109** (3), 839 (2009).
7. C. Kleantous, *Protein-protein recognition* (New York: Oxford University Press, 2000).
8. M. Medina and C. Gómez-Moreno, *Photosynth. Res.* **79** (2), 113 (2004).
9. J. K. Hurley, J. T. Hazzard, M. Martinez-Julvez, et al., *Protein Sci.* **8**, 1614 (1999).
10. M. Martínez-Júlvez, J. Hermoso, J. K. Hurley, et al., *Biochemistry* **37** (51), 17680 (1998).
11. H.-X. Zhou and P. A. Bates, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2013).
12. Q. Bashir, S. Scanu, and M. Ubbink, *FEBS J.* **278** (9), 1391 (2011).
13. J. Schilder and M. Ubbink, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2013).
14. J. R. Austin and L. A. Staehelin, *Plant Physiol.* **155** (4), 1601 (2011).
15. F. E. Callahan, W. P. Wergin, N. Nelson, et al., *Plant Physiol.* **91** (2), 629 (1989).
16. R. J. Ellis, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11** (1), 114 (2001).
17. J. A. Dix and A. S. Verkman, *Annu. Rev. Biophys.* **37**, 247 (2008).
18. H.-X. Zhou and A. Szabo, *J. Chem. Phys.* **95** (8), 5948 (1991).
19. D. J. Bicout and M. J. Field, *J. Phys. Chem.* **100** (7), 2489 (1996).
20. R. Brown, *Phil. Mag.* **4**, 161 (1828).
21. А. Эйнштейн и М. Смолюховский, *Брауновское движение* (ОНТИ, Л., 1934).
22. N. Wiener, *Differential-space* (1923).
23. G. G. Stokes, *Trans. Cambridge Phil. Soc.* **9** (11), 8 (1851).
24. A. Einstein, *Ann. Phys.* **322** (8), 549 (1905).
25. F. Perrin, *J. Phys. Radium* **7** (1), 1 (1936).
26. I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, P. A. Gromov, et al., *Phys. Biol.* **3**, 121 (2006).
27. D. L. Ermak and J. A. McCammon, *J. Chem. Phys.* **69** (4), 1353 (1978).
28. L. Verlet, *Phys. Rev.* **159** (1), 98 (1967).
29. C. Størmer, *Comptes Rendus du Congrès Int. des Mathématiciens* (Strasbg., 1920), p. 243.
30. C. Størmer, *Arch. Sci. Phys. Nat. Genève* **24**, 350 (1907).
31. Ю. Л. Климонтович, *Успехи физ. наук* **164** (8), 811 (1994).
32. R. F. Fox, *Phys. Rep.* **48** (3), 179 (1978).
33. Д. А. Турченков и М. А. Турченков, *Компьютерные исследования и моделирование* **4** (2), 325 (2012).
34. A. Branka and D. Heyes, *Phys. Rev. E* **58** (2), 2611 (1998).
35. L. J. Henderson, *Am. J. Physiol.* **21**, 173 (1908).
36. K. A. Hasselbalch, *Biochem. Z.* **78**, 112 (1917).
37. R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, et al., *Data for Biochemical Research (third edition)* (Clarendon Press, Oxford, 1986).
38. D. C. Bas, D. M. Rogers, and J. H. Jensen, *Proteins* **73** (3), 765 (2008).
39. C. Tanford and J. G. Kirkwood, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5333 (1957).
40. G. M. Ullmann, E.-W. Knapp, and N. M. Kostic, *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 42 (1997).
41. N. A. Baker, D. Sept, S. Joseph, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98** (18), 10037 (2001).
42. G. M. Ullmann and E.-W. Knapp, *Eur. Biophys. J.* **28** (7), 533 (1999).
43. R. R. Gabdouliline and R. C. Wade, *J. Phys. Chem.* **100** (9), 3868 (1996).
44. D. A. Beard and T. Schlick, *Biopolymers* **58** (1), 106 (2001).
45. B. A. Luty, R. C. Wade, J. D. Madura, et al., *J. Phys. Chem.* **97** (1), 233 (1993).
46. J. E. Jones, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **106** (738), 463 (1924).
47. R. A. Buckingham, *Proc. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* **168** (933), 264 (1938).
48. S. Northrup, J. Boles, and J. Reynolds, *J. Phys. Chem.* **91**, 5991 (1987).

49. M. E. Davis, J. D. Madura, B. A. Luty, et al., *Comput. Phys. Commun.* **62** (2), 187 (1991).
50. J. Madura, J. Briggs, R. Wade, et al., *Comput. Phys. Commun.* **91** (1–3), 57 (1995).
51. S. H. Northrup, *MacroDox v.2.0.2: Software for the Prediction of Macromolecular Interaction* (Cookeville, TN: Tennessee Technological University, 1995).
52. С. С. Хрущев, А. М. Абатурова, А. Н. Дьяконова и др., *Компьютерные исследования и моделирование* **5** (1), 47 (2013).
53. C. J. Camacho, S. R. Kimura, C. DeLisi, et al., *Biophys. J.* **78** (3), 1094 (2000).
54. R. R. Gabdouliline and R. C. Wade, *J. Am. Chem. Soc.* **131** (26), 9230 (2009).
55. Т. В. Пурков, А. О. Чугунов, Н. А. Крылов, et al., *Bioinformatics* **25** (9), 1201 (2009).
56. S. H. Northrup, S. A. Allison, and J. A. McCammon, *J. Chem. Phys.* **80** (4), 1517 (1984).
57. И. Б. Коваленко, А. М. Абатурова, П. А. Громов и др., *Биофизика* **53** (2), 261 (2008).
58. О. С. Князева, И. Б. Коваленко, А. М. Абатурова и др., *Биофизика* **55** (2), 259 (2010).
59. M. Ubbink, *FEBS Lett.* **583**, (7), 1060 (2009).
60. C. Tang, J. Iwahara, and G. M. Clore, *Nature* **444** (7117), 383 (2006).
61. S. H. Northrup and H. P. Erickson, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89** (8), 3338 (1992).
62. A. Spaar, C. Dammer, R. R. Gabdouliline, et al., *Biophys. J.* **90** (6), 1913 (2006).
63. R. R. Gabdouliline and R. C. Wade, *J. Mol. Recognit. JMR* **12** (4), 226 (1999).
64. S. Scanu, J. M. Foerster, G. M. Ullmann, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **135** (20), 7681 (2013).
65. S. H. Northrup and J. T. Hynes, *J. Chem. Phys.* **71** (2), 871 (1979).
66. O. G. Berg and P. H. von Hippel, *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **14**, 131 (1985).
67. G. Zou, R. D. Skeel, and S. Subramaniam, *Biophys. J.* **79** (2), 638 (2000).
68. G. Zou and R. D. Skeel, *Biophys. J.* **85** (4), 2147 (2003).
69. G. A. Huber and S. Kim, *Biophys. J.* **70** (1), 97 (1996).
70. A. Rojnuckarin, D. R. Livesay, and S. Subramaniam, *Biophys. J.* **79** (2), 686 (2000).
71. H. X. Zhou and A. Szabo, *Biophys. J.* **71** (5), 2440 (1996).
72. Y. Song, Y. Zhang, T. Shen, et al., *Biophys. J.* **86** (4), 2017 (2004).
73. А. И. Кобзарь, *Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников* (ФИЗМАТЛИТ, М., 2006).
74. R. R. Gabdouliline and R. C. Wade, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12** (2), 204 (2002).
75. R. A. Marcus and N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Bioenerg.* **811** (3), 265 (1985).
76. R. R. Gabdouliline and R. C. Wade, *Methods* **14** (3), 329 (1998).
77. D. P. Tolle and N. Le Novère, *BMC Syst. Biol.* **4** (1), 24 (2010).
78. H. I. Ingólfsson, C. A. Lopez, J. J. Usitalo, et al., *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **4** (3), 225 (2014).
79. M. Baaden and S. J. Marrink, *Curr. Opin. Struct. Biol.* (2013).
80. G. A. Huber and J. A. McCammon, *Comput. Phys. Commun.* **181** (11), 1896 (2010).
81. M. Długosz, P. Zielinski, and J. Trylska, *J. Comput. Chem.* **32** (12), 2734 (2011).
82. T. Geyer, *BMC Biophys.* **4** (1), 7 (2011).
83. A. Zhmurov, R. I. Dima, Y. Kholodov, et al., *Proteins* **78** (14), 2984 (2010).
84. Д. М. Устинин, И. Б. Коваленко, Г. Ю. Ризниченко и др., *Компьютерные исследования и моделирование* **5** (1), 65 (2013).
85. S. Poblete, M. Praprotnik, K. Kremer, et al., *J. Chem. Phys.* **132** (11), 114101 (2010).
86. A. Stirbet, G. Y. Riznichenko, A. V. Rubin, et al., *Biochem. Biokhimiya* **79** (4), 291 (2014).
87. Г. Ю. Ризниченко, Н. Е. Беляева, И. Б. Коваленко и др., в сб. *Современные проблемы фотосинтеза* (2014), т. 2, с. 41.
88. Г. Ю. Ризниченко, И. Б. Коваленко, А. М. Абатурова и др., *Биофизика* **56** (5), 775 (2011).
89. G. Y. Riznichenko, I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, et al., *Biophys. Rev.* **2** (3), 101 (2010).
90. A. Rubin, G. Riznichenko, and Govindjee, *Photosynth. silico Underst. Complex. from Mol. to Ecosyst*, Ed. by Laisk A., Nedbal L., Govindjee **29**, 151 (2009).
91. A. Rubin and G. Riznichenko, *Mathematical Biophysics* (Springer US, Boston, MA, 2014).
92. G. S. Kachalova, A. C. Shosheva, G. P. Bourenkov, et al., *J. Inorg. Biochem.* **115**, 174 (2012).
93. M. Ubbink, M. Ejdebeck, B. G. Karlsson, et al., *Structure* **6**, 323 (1998).
94. P. B. Crowley, G. Otting, B. G. Schlarb-Ridley, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10444 (2001).
95. P. B. Crowley, D. M. Hunter, K. Sato, et al., *Biochem. J.* **378** (Pt 1), 45 (2004).
96. C. Albarran, J. Navarro, M. de la Rosa, et al., *Biochemistry* **46**, 997 (2007).
97. I. Cruz-Gallardo, I. Díaz-Moreno, A. Díaz-Quintana, et al., *FEBS Lett.* **586** (5), 646 (2012).
98. J. A. Navarro, M. Hervás, and M. A. De la Rosa, *J. Biol. Inorg. Chem.* **2** (1), 11 (1997).
99. A. Kannt, S. Young, and D. S. Bendall, *Biochim. Biophys. Acta* **1277**, 115 (1996).
100. J. Illerhaus, L. Altschmied, J. Reichert, et al., *J. Biol. Chem.* **275** (23), 17590 (2000).
101. S. Modi, M. Nordling, L. G. Lundberg, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1102** (1), 85 (1992).
102. S. He, S. Modi, D. S. Bendall, et al., *EMBO J.* **10** (13), 4011 (1991).
103. L. Qin and N. M. Kostic, *Biochemistry* **32** (23), 6073 (1993).

104. S. E. Hart, B. G. Schlarb-Ridley, C. Delon, et al., *Biochemistry* **42** (17), 4829 (2003).
105. B. G. Schlarb-Ridley, D. S. Bendall, and C. J. Howe, *Biochemistry* **21**, 3279 (2002).
106. R. Hulsker, M. V. Baranova, G. S. Bullerjahn, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **130** (6), 1985 (2008).
107. I. Díaz-Moreno, A. Díaz-Quintana, M. A. De la Rosa, et al., *Biochemistry* **44** (9), 3176 (2005).
108. I. Díaz-Moreno, A. Díaz-Quintana, M. A. De la Rosa, et al., *J. Biol. Chem.* **280** (19), 18908 (2005).
109. D. C. Pearson Jr. and E. L. Gross, *Biophys. J.* **75**, 2698 (1998).
110. E. L. Gross, *Photosynth. Res.* **94** (2–3), 411 (2007).
111. F. De Rienzo, R. R. Gabdoulline, M. C. Menziani, et al., *Biophys. J.* **81** (3), 3090 (2001).
112. J. A. Cruz, B. A. Salbilla, A. Kanazawa, et al., *Plant Physiol.* **127**, 1167 (2001).
113. E. J. Haddadian and E. L. Gross, *Biophys. J.* **88**, 2323 (2005).
114. E. J. Haddadian and E. L. Gross, *Biophys. J.* **90**, 566 (2006).
115. E. L. Gross, D. C. Pearson Jr., and D. C. Pearson, *Biophys. J.* **85** (3), 2055 (2003).
116. E. J. Haddadian and E. L. Gross, *Biophys. J.* **91**, 2589 (2006).
117. E. L. Gross, *Biophys. J.* **87**, 2043 (2004).
118. E. L. Gross and I. Rosenberg, *Biophys. J.* **90**, 366 (2006).
119. И. Б. Коваленко, О. С. Князева, Г. Ю. Ризниченко и др., *Докл. РАН* **440** (2), 272 (2011).
120. И. Б. Коваленко, О. С. Князева, Г. Ю. Ризниченко и др., *Биофизика* **59** (1), 5 (2014).
121. G. Finazzi, F. Sommer, and M. Hippler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** (19), 7031 (2005).
122. T. Ueda, N. Nomoto, M. Koga, et al., *Plant Cell* **24** (10), 4173 (2012).
123. T. Shikanai, A. Busch, and M. Hippler, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807** (8), 864 (2011).
124. A. Amunts, H. Toporik, A. Borovikova, et al., *J. Biol. Chem.* **285** (5), 3478 (2010).
125. P. Sétif, N. Harris, B. Lagoutte, et al., *J. Am. Chem. Soc.* **132** (31), 10620 (2010).
126. S. V. Ruffle, A. O. Mustafa, A. Kitmitto, et al., *J. Biol. Chem.* **275** (46), 36250 (2000).
127. P. Sétif, N. Fischer, B. Lagoutte, et al., *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1555** (1), 204 (2002).
128. S. V. Ruffle, A. O. Mustafa, A. Kitmitto, et al., *J. Biol. Chem.* **277** (28), 25692 (2002).
129. A. Ben-Shem, F. Frolow, and N. Nelson, *Nature* **426**, 630 (2003).
130. E. Myshkin and G. S. Bullerjahn, *Biophys. J.* **82**, 3305 (2002).
131. R. Morales, G. Kachalova, F. Vellieux, et al., *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **56** (Pt 11), 1408 (2000).
132. I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, G. Y. Riznichenko, et al., *BioSystems* **103**, 180 (2011).
133. H. Long, C. H. Chang, P. W. King, et al., *Biophys. J.* **95** (8), 3753 (2008).
134. C. H. Chang, P. W. King, M. L. Ghirardi, et al., *Biophys. J.* **93** (9), 3034 (2007).
135. H. Long, P. W. King, M. L. Ghirardi, et al., *J. Phys. Chem.* **113** (16), 4060 (2009).
136. I. B. Kovalenko, A. N. Diakonova, A. M. Abaturova, et al., *Phys. Biol.* **7** (2), 26001 (2010).
137. A. N. Diakonova, S. S. Khrushchev, I. B. Kovalenko, et al., *Photosynth. Res.* (Submitted).
138. S. Jurić, K. Hazler-Pilepić, A. Tomasić, et al., *Plant J.* **60** (5), 783 (2009).

Brownian Dynamics Simulations of Protein-Protein Interactions in Photosynthetic Electron Transport Chain

S.S. Khrushchev, A.M. Abaturova, A.N. Diakonova, V.A. Fedorov, D.M. Ustinin, I.B. Kovalenko, G.Yu. Riznichenko, and A.B. Rubin

Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia

The application of Brownian dynamics for simulation of transient protein-protein interactions is reviewed. The review focuses on theoretical basics of Brownian dynamics method, its particular implementations, advantages and drawbacks of the method. The outlook for future development of Brownian dynamics-based simulation techniques is discussed. Special attention is given to analysis of Brownian dynamics trajectories. The second part of the review is dedicated to the role of Brownian dynamics simulations in studying photosynthetic electron transport. Interactions of mobile electron carriers (plastocyanin, cytochrome c_6 , and ferredoxin) with their reaction partners (cytochrome b_6/f complex, photosystem I, ferredoxin:NADP-reductase, and hydrogenase) are considered.

Key words: protein-protein interactions, Brownian dynamics, multiparticle computer simulation, photosynthesis, electron transport