АНАЛИЗ И МОДЕЛИРОВАНИЕ СЛОЖНЫХ ЖИВЫХ СИСТЕМ

УДК: 577.322

Анализ траекторий броуновской и молекулярной динамики для выявления механизмов белок-белковых взаимодействий

В. А. Федоров^а, С. С. Хрущев^b, И. Б. Коваленко^с

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биофизики, Россия, 119992, г. Москва, Ленинские горы, 1-12

E-mail: a xbgth@yandex.ru, b styx@biophys.msu.ru, c ikovalenko78@gmail.com

Получено 13.12.2022, после доработки — 28.03.2023. Принято к публикации 26.04.2023.

В работе предложен набор достаточно простых алгоритмов, который может быть применен для анализа широкого круга белок-белковых взаимодействий. В настоящей работе мы совместно используем методы броуновской и молекулярной динамики для описания процесса образования комплекса белков пластоцианина и цитохрома f высших растений. В диффузионно-столкновительном комплексе выявлено два кластера структур, переход между которыми возможен с сохранением положения центра масс молекул и сопровождается лишь поворотом пластоцианина на 134 градуса. Первый и второй кластеры структур столкновительных комплексов отличаются тем, что в первом кластере с положительно заряженной областью вблизи малого домена цитохрома f контактирует только «нижняя» область пластоцианина, в то время как во втором кластере — обе отрицательно заряженные области. «Верхняя» отрицательно заряженная область пластоцианина в первом кластере оказывается в контакте с аминокислотным остатком лизина К122. При образовании финального комплекса происходит поворот молекулы пластоцианина на 69 градусов вокруг оси, проходящей через обе области электростатического контакта. При этом повороте происходит вытеснение воды из областей, находящихся вблизи кофакторов молекул и сформированных гидрофобными аминокислотными остатками. Это приводит к появлению гидрофобных контактов, уменьшению расстояния между кофакторами до расстояния менее 1,5 нм и дальнейшей стабилизации комплекса в положении, пригодном для передачи электрона. Такие характеристики, как матрицы контактов, оси поворота при переходе между состояниями и графики изменения количества контактов в процессе моделирования, позволяют определить ключевые аминокислотные остатки, участвующие в формировании комплекса и выявить физико-химические механизмы, лежащие в основе этого процесса.

Ключевые слова: броуновская динамика, белок-белковые взаимодействия, кластерный анализ, матрица контактов аминокислотных остатков, пластоцианин, цитохром f

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-2931.2022.1.4.

^{© 2023} Владимир Андреевич Федоров, Сергей Сергеевич Хрущев, Илья Борисович Коваленко Статья доступна по лицензии Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Unported License. Чтобы получить текст лицензии, посетите веб-сайт http://creativecommons.org/licenses/by-nd/3.0/ или отправьте письмо в Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.

Ки&М)

UDC: 577.322

Analysis of Brownian and molecular dynamics trajectories of to reveal the mechanisms of protein-protein interactions

V. A. Fedorov^a, S. S. Khrushchev^b, I. B. Kovalenko^c

Lomonosov Moscow State University, School of Biology, Biophysics Department, 1-12 Leninskie Gory, Moscow, 119992, Russia

E-mail: a xbgth@yandex.ru, b styx@biophys.msu.ru, c ikovalenko78@gmail.com

Received 13.12.2022, after completion – 28.03.2023. Accepted for publication 26.04.2023.

The paper proposes a set of fairly simple analysis algorithms that can be used to analyze a wide range of protein-protein interactions. In this work, we jointly use the methods of Brownian and molecular dynamics to describe the process of formation of a complex of plastocyanin and cytochrome f proteins in higher plants. In the diffusion-collision complex, two clusters of structures were revealed, the transition between which is possible with the preservation of the position of the center of mass of the molecules and is accompanied only by a rotation of plastocyanin by 134 degrees. The first and second clusters of structures of collisional complexes differ in that in the first cluster with a positively charged region near the small domain of cytochrome f, only the "lower" plastocyanin region contacts, while in the second cluster, both negatively charged regions. The "upper" negatively charged region of plastocyanin in the first cluster is in contact with the amino acid residue of lysine K122. When the final complex is formed, the plastocyanin molecule rotates by 69 degrees around an axis passing through both areas of electrostatic contact. With this rotation, water is displaced from the regions located near the cofactors of the molecules and formed by hydrophobic amino acid residues. This leads to the appearance of hydrophobic contacts, a decrease in the distance between the cofactors to a distance of less than 1.5 nm, and further stabilization of the complex in a position suitable for electron transfer. Characteristics such as contact matrices, rotation axes during the transition between states, and graphs of changes in the number of contacts during the modeling process make it possible to determine the key amino acid residues involved in the formation of the complex and to reveal the physicochemical mechanisms underlying this process.

Keywords: Brownian dynamics, protein-protein interactions, cluster analysis, amino acid contact matrix, plastocyanin, cytochrome f

Citation: Computer Research and Modeling, 2023, vol. 15, no. 3, pp. 723–738 (Russian).

The work was supported by the grant of the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists – PhD MK-2931.2022.1.4.

1. Введение

Проблема исследования белок-белковых взаимодействий чрезвычайно актуальна. Взаимодействие белков — необходимый этап большинства процессов, протекающих в клетке. Мобильные белки взаимодействуют со своими редокс-партнерами, перенося электроны в фотосинтетической и дыхательной электрон-транспортных цепях. Высокая эффективность работы электронтранспортной цепи достигается за счет быстрой работы всех входящих в нее компонентов, в том числе за счет высокой скорости переноса электронов между крупными малоподвижными белковыми комплексами, осуществляемого мобильными переносчиками. В процессе образования комплекса белков определяющую роль играют такие факторы, как дальнодействующие электростатические взаимодействия между поверхностями белков, геометрическая и химическая комплементарность областей связывания, молекулярная подвижность в белок-белковом интерфейсе, гидрофобные взаимодействия [Kleanthous, 2000].

Для изучения взаимодействия белков применяются различные экспериментальные и теоретические методы. Для получения структур отдельных белков и стабильных комплексов уже несколько десятков лет используется метод рентгеноструктурного анализа. В настоящее время основным экспериментальным методом, позволяющим исследовать структурные особенности взаимодействия белков в короткоживущих комплексах, является спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [Díaz-Moreno et al., 2005]. Развитие современных методов микроскопии (криоэлектронная, атомно-силовая, конфокальная) позволяет применять их для исследования взаимодействий единичных молекул [Мауneord et al., 2019]. Универсальным методом изучения кинетики образования комплексов является метод остановленного потока, однако его временное разрешение весьма невысоко и не позволяет детально исследовать быстрые процессы. Разработано значительное количество компьютерных методов моделирования, при помощи которых можно предсказать как структуру белок-белковых комплексов, так и кинетику и термодинамику их образования. Метод молекулярного докинга [Siebenmorgen, Zacharias, 2020] основан на геометрической и физико-химической комплементарности молекул. Методы биоинформатики помогают предсказать константы скорости взаимодействия белков исходя из их аминокислотных последовательностей [Zhang et al., 2012]. В последнее время популярностью пользуются методы предсказания структур белков и их комплексов, основанные на применении нейросетей [Bryant, Pozzati, Elofsson, 2022].

В последние несколько лет появились работы, в которых методом ЯМР не только определяют структуру образовавшегося комплекса белков, но также изучают столкновительные (encounter) комплексы и промежуточные состояния, образующиеся на пути формирования финального комплекса [Ubbink, 2009]. ЯМР-исследования комплекса белков пластоцианина и цитохрома f из цианобактерии Nostoc показали, что большая часть поверхности молекулы цитохрома f находится в контакте с молекулой пластоцианина, в то время как пластоцианин всегда ориентирован своей гидрофобной областью к цитохрому f [Scanu et al., 2013]. Показано также, что диффузионно-столкновительный комплекс стабилизируется как электростатическими, так и гидрофобными взаимодействиями. Предложена модель образования комплекса пластоцианина и питохрома f. согласно которой происходит предварительная ориентация перед тем. как молекулы контактируют друг с другом, а затем происходит формирование столкновительного комплекса, быстро переходящего в активные электрон-транспортные конформации посредством последовательного увеличения перекрывания неполярных участков поверхностей белков. Однако наблюдать этот процесс экспериментально в настоящее время не удается. Возможно, в будущем станет возможным исследование таких переходов с помощью рентгеноструктурного наблюдения отдельных молекул с использованием рентгеновского лазера на свободных электронах XFEL [Fortmann-Grote et al., 2017], однако в настоящее время молекулярное моделирование является единственным доступным средством детального изучения формирования комплексов белков с высоким временным разрешением.

Метод броуновской динамики широко используется для моделирования белок-белковых взаимодействий и позволяет оценить влияние дальнодействующих электростатических взаимодействий на скорость образования белок-белковых комплексов и, таким образом, корректно описать эффекты мутаций, изменяющих заряд, а также ионной силы и pH раствора. Метод неоднократно применялся для исследования взаимодействия фотосинтетических электрон-транспортных белков пластоцианина и цитохрома f [Riznichenko et al., 2022; Gross, 2007; De Rienzo et al., 2001; Ullmann, Knapp, Kostic, 1997]. Однако метод броуновской динамики не позволяет учесть молекулярную подвижность белков и гидрофобные взаимодействия, которые могут играть важную роль в образовании белок-белковых комплексов и влиять на термодинамику и кинетику этого процесса, а также на структуру формирующегося комплекса. Так, известно, что медный центр пластоцианина смещается при связывании пластоцианина со своими реакционными партнерами [Díaz-Moreno et al., 2006]. Также было показано, что различные конформации пластоцианина из одного и того же вида приводят к различным результатам при моделировании связывания с помощью броуновской динамики [Gross, 2007]. Это указывает, что проведение моделирования без явного учета внутримолекулярной подвижности и поведения молекул растворителя не позволяет корректно воспроизвести процесс образования комплекса и рассчитать термодинамические и кинетические характеристики этого процесса.

Метод молекулярной динамики широко используется для моделирования конформационной подвижности белков и определения термодинамических характеристик образования белокбелковых комплексов, идентификации областей поверхностей белков, которые участвуют в белок-белковых взаимодействиях, а также для улучшения результатов докинга [Rakers, Bermudez, Keller, 2015]. Для фотосинтетических электрон-транспортных белков метод молекулярной динамики также использовался при изучении комплекса белков пластоцианина и цитохрома f цианобактерии Phormidium, однако короткие молекулярно-динамические траектории (14 нс) не позволили проследить процесс формирования финального комплекса [Díaz-Moreno et al., 2009].

В настоящее время не существует универсального метода моделирования процесса образования комплекса белков, учитывающего дальнодействующие электростатические взаимодействия между поверхностями белков, геометрическую и химическую комплементарность областей связывания, молекулярную подвижность в белок-белковом интерфейсе, гидрофобные взаимодействия, одновременно и точно предсказывающего структуру образовавшегося комплекса и кинетику этого процесса. Сложность компьютерного моделирования образования белок-белковых комплексов заключается в том, что необходимо учитывать процессы, происходящие на разных пространственно-временных масштабах, от колебаний отдельных атомов и до диффузии молекул белков, молекулярную подвижность белков и поведение молекул растворителя на временах от фемтосекунд до сотен наносекунд и даже десятков микросекунд.

Ранее нами был разработан оригинальный подход [Fedorov et al., 2019], позволяющий, благодаря совместному использованию методов броуновской и молекулярной динамики, предсказать структуру образовавшегося комплекса и молекулярные механизмы, приведшие к его образованию. В данном подходе метод броуновской динамики используется для моделирования образования двумя белками столкновительного комплекса с учетом процессов диффузии и электростатических взаимодействий, а молекулярная динамика используется для моделирования трансформации предварительного комплекса в финальный с учетом подвижности атомов, конформационных изменений и молекул растворителя.

В результате расчетов молекулярной и броуновской динамики программным обеспечением создаются файлы траекторий, содержащие информацию о положении всех атомов исследуемой

системы либо в заданные моменты времени, либо в состояниях с заданными значениями параметров системы (например, в состояниях с заданным значением энергии электростатического взаимодействия). Таким образом, имеется 3N значений координат на каждом кадре траектории, где N — число атомов системы, которое составляет от сотен тысяч (для систем с небольшими белками) до миллионов и даже миллиардов (для сложных белковых комплексов). Получение из всего этого обилия данных количественных параметров, характеризующих биологические свойства исследуемой системы, представляет собой отдельную задачу.

Одним из способов количественного анализа, используемых для интерпретации таких больших объемов данных, является кластерный анализ [Van Der Spoel et al., 2005], позволяющий выявлять сходства и различия в структурах образовавшихся комплексов молекул белков. Кроме того, для выявления элементарных геометрических преобразований, которые могут приводить к переходу предварительного столкновительного комплекса в финальный или переходам между различными состояниями предварительных комплексов, могут быть проанализированы матрицы ортогональных аффинных преобразований в пространстве. Для выявления принципиальных физико-химических взаимодействий, лежащих в основе функционирования исследуемых белков, могут быть рассчитаны матрицы контактов аминокислот одного белка с аминокислотами другого белка [Jiang et al., 2002; Weigt et al., 2009] и их изменение во времени. Данная статья посвящена разработке подхода к анализу траекторий броуновской и молекулярной динамики для выявления механизмов белок-белковых взаимодействий, основанного на кластерном анализе, построении осей вращения и выявлении межмолекулярных контактов на примере взаимодействия белков пластоцианина и цитохрома f высших растений.

2. Методы

2.1. Получение траекторий броуновской и молекулярной динамики

Мы рассматриваем взаимодействие белков в растворе как многостадийный процесс, включающий в себя: свободную диффузию белков в растворе, их случайное сближение, взаимную ориентацию и дальнейшее сближение противоположно заряженных областей за счет дальнодействующих электростатических взаимодействий, конформационные изменения на белок-белковом интерфейсе и гидрофобные взаимодействия, приводящие к образованию финального комплекса.

Модели молекулярной динамики требуют больших вычислительных ресурсов, и поэтому в настоящее время нецелесообразно только с помощью этого метода рассматривать процесс образования комплекса двух белков, начиная от свободной диффузии молекул в растворе. В настоящей работе мы совместно используем методы броуновской и молекулярной динамики для описания этого процесса.

Процесс свободной диффузии белков и образование энергетически выгодного столкновительного комплекса описываются с использованием метода броуновской динамики и программы ProKSim [Хрущев и др., 2013], разработанной нами ранее. В методе броуновской динамики каждая молекула рассматривается как броуновская частица, совершающая поступательное и вращательное движение в вязкой среде под действием случайной силы, возникающей из-за столкновений с молекулами среды, и внешней электростатической силы. Для математического описания процесса броуновского движения используется уравнение Ланжевена, определяющее изменение каждой координаты со временем под действием случайной и внешней сил [Langevin, 1908]:

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

где m — масса частицы, r — ее положение, t — время, ξ — коэффициент вязкого трения, F(r) — внешняя (электростатическая) сила, а f(t) — стохастический член (случайная сила). Для расчета

электростатического потенциала используется уравнение Пуассона – Больцмана [Князева и др., 2010]. Потенциал рассчитывается один раз перед началом моделирования.

Пространственные структуры белков были взяты из библиотеки данных PDB ID 2PCF (https://www.rcsb.org). Данная структура представляет собой комплекс белков пластоцианина и цитохрома f высших растений, полученный методом ЯМР [Ubbink et al., 1998]. Рассматривается взаимодействие восстановленного цитохрома f и окисленного пластоцианина. Распределение электростатических зарядов на атомах белков соответствует силовому полю CHARMM22(27) [MacKerell et al., 1998], на геме — взято из [Autenrieth et al., 2004]. Заряды на атоме меди пластоцианина и связанных с ним аминокислотных остатках аппроксимированы на основе данных [Zolotareva, Alykov, Kovalenko, 2015]. В начальный момент времени исследуемые молекулы белков располагаются случайным образом в заданном виртуальном объеме $(30 \times 30 \times 30 \text{ нм}^3)$, для них рассчитывается потенциал и моделируется поступательная и вращательная диффузия под действием случайной и электростатической сил. На каждом шаге моделирования рассчитывается энергия электростатического взаимодействия между белками. Расчет продолжается до тех пор, пока либо белки не достигнут заданного значения энергии (8 kT) и финальное положение будет сохранено, либо будет достигнуто ограничение по количеству шагов интегрирования (10⁸ шагов по 100 пс) и расчет будет перезапущен с новыми случайными начальными координатами молекул в реакционной ячейке. Типичная длина траектории броуновской динамики для данной пары белков при заданном значении параметра величины энергии электростатического взаимодействия составляет 100 мкс.

Результатом моделирования процесса взаимодействия двух белков в реакционном объеме (реакционной ячейке) методом броуновской динамики является структура электростатически выгодного диффузионно-столкновительного комплекса, если такой комплекс образуется. Вычислительный эксперимент проводится несколько тысяч раз (в данной работе было получено 2137 структур), а набор структур диффузионно-столкновительных комплексов в дальнейшем используется для кластерного анализа.

Метод кластерного анализа позволяет сравнить структуры энергетически выгодных электростатических комплексов, полученных в результате расчетов броуновской динамики с заданным значением энергии электростатического притяжения и выявить подмножества структур, схожих друг с другом по критерию среднеквадратичного отклонения координат всех атомов в одной конфигурации по сравнению с их положением в другой [Kabsch, 1976]. Целью использования этого подхода к анализу взаимных ориентаций белков является определение ансамблей энергетически выгодных конфигураций, в которых отдельные состояния могут переходить друг в друга. Метод основан на алгоритмах кластеризации по плотности (в смысле частоты встречаемости похожих друг на друга структур, density-based clustering) [Ankerst et al., 1999; Elke, Böhm, Kröger, 2006; Sander et al., 2003]. Под кластером понимается плотная группа, отделенная от смежных групп менее плотными областями. Обнаружение нескольких плотных групп конфигураций, разделенных незаселенными регионами, свидетельствует о существовании нескольких кластеров (ансамблей) энергетически выгодных взаимных расположений молекул. Предполагается, что переход между такими ансамблями требует преодоления энергетического либо энтропийного барьера. Детали реализации метода кластерного анализа подробнее описаны в нашей предыдущей статье [Хрущев и др., 2015]. Для каждой такой группы мы выявляем структуру, наименьшим образом отличающуюся от оставшихся структур этой группы (центральную структуру), которая используется в качестве начальной для расчетов молекулярной динамики [Fedorov et al., 2019].

При описании процесса формирования финального комплекса необходимо учитывать внутримолекулярную подвижность белка, а также влияние молекул растворителя. В нашей работе процесс формирования финального комплекса мы рассматриваем с применением метода полно-

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ

атомной молекулярной динамики с явно заданным растворителем с использованием программного пакета GROMACS [Abraham et al., 2015] с учетом силового поля CHARMM22(27) [MacKerell et al., 1998]. Метод молекулярной динамики позволяет детально описать микроскопическую картину внутренней подвижности макромолекулы. В его основе лежит расчет классических (ньютоновских) траекторий движения макромолекулы в фазовом пространстве координат и импульсов ее атомов, молекула рассматривается как система взаимодействующих классических частиц.

Поведение отдельного атома описывается классическими уравнениями движения:

$$m_i \frac{d^2 r_i(t)}{dt^2} = F_i$$

где i — номер атома ($1 \le i \le n$), n — полное число атомов в системе, m_i — масса атома, r_i — радиус-вектор атома, F_i — равнодействующая сил, действующих на атом.

Белки помещались в виртуальный трехмерный ромбододекаэдрический бокс (с осями 11 нм) с периодическими граничными условиями. Размер виртуальной ячейки был выбран таким образом, чтобы расстояние от поверхности белка до ближайшей границы бокса первоначально не было меньше двух нанометров. Ионную силу раствора устанавливали равной 100 мМ путем добавления ионов Na⁺ и Cl⁻ таким образом, чтобы общий суммарный заряд системы был равен нулю. Общее число атомов в системе составило 93 103. Мы использовали программное обеспечение PROPKA, разработанное исследовательской группой «Дженсен» (кафедра химии) Копенгагенского университета [Olsson et al., 2011], для расчета неизвестной степени протонирования отрицательно заряженных аминокислотных остатков и программу Dowser [Morozenko, Stuchebrukhov, 2016] для определения положения внутримолекулярной воды. Для каждой системы проводилась минимизация энергии с использованием алгоритма градиентного спуска с последующим двухступенчатым уравновешиванием: 1) с фиксированным положением всех тяжелых атомов белка при постоянных давлении (1 бар) и температуре (300 К), поддерживаемых баростатом (постоянная времени — 4,0 фс, сжимаемость — $4.5 \cdot 10^{-5}$ бар⁻¹) и термостатом Берендсена в течение 1 нс; 2) молекулярно-динамический расчет с фиксированным положением атомов белкового остова при постоянных давлении (1 бар) и температуре (300 К), поддерживаемых с помощью баростата Парринелло – Рамана (постоянная времени — 4,0 фс, сжимаемость — $4.5 \cdot 10^{-5}$ Gap⁻¹) и термостатом V-rescale соответственно в течении 5 нс модельного времени. Метод РМЕ (суммирование по Эвальду в обратном фурье-пространстве) использовался для учета дальнодействующих электростатических взаимодействий. Ограничение подвижности всех связей по алгоритму PLINKS и частичный перенос масс по Берендсену [Feenstra, Hess, Berendsen, 1999] использовали для обеспечения корректности работы модели при интегрировании с шагом по времени в 4 фс. Была рассчитана одна траектория молекулярной динамики преобразования структуры столкновительного комплекса в функционально активное состояние продолжительностью одна микросекунда модельного времени.

3. Результаты

3.1. Исследование переходов между состояниями столкновительных комплексов с использованием матриц поворота и определение осей поворота

Метод кластерного анализа выявил центральные структуры двух кластеров столкновительных комплесов пластоцианина и цитохрома f с энергией электростатического притяжения, превышающей 8 kT. Для выявления элементарных геометрических преобразований, приводящих к переходу структуры, принадлежащей одному кластеру, в структуру, принадлежащую другому,

мы использовали матрицы ортогональных аффинных преобразований в пространстве. При моделировании с применением метода броуновской динамики молекулы рассматриваются как жесткие тела, поэтому для перевода одной структуры в другую необходимы и достаточны ортогональные преобразования координат в пространстве. При моделировании методом молекулярной динамики происходят конформационные изменения внутри белка, поэтому никакие аффинные преобразования координат не способны точно перевести одну структуру в другую. Тем не менее мы можем рассчитать матрицу такого ортогонального аффинного преобразования, которое преобразует исходную структуру в структуру, наилучшим образом соответствующую целевой структуре с точки зрения среднего квадрата отклонения положения всех атомов в молекуле. Такая матрица имеет размер 4×4 , причем ее верхний левый угол 3×3 образует матрицу поворота, а четвертый столбец и строка представляют векторы смещения до и после поворота соответственно. Для вычисления такой матрицы два сравниваемых положения молекулы выравниваются между собой с помощью программы Pymol [Schrödinger, DeLano, 2020]. Из полученной матрицы рассчитываются положение оси поворота, величина угла поворота и смещение вдоль оси поворота, необходимое для перевода центра масс молекулы из одного положения в другое. Данный подход реализуется с использованием модернизированного нами программного сценария RotationAxis [Calvo, 2017]. Мы установили, что ось поворота пластоцианина проходит через контактирующие с ним положительно заряженные аминокислотные остатки цитохрома f, что позволяет судить о том, что переход из одного кластера в другой возможен с сохранением положения центра масс молекулы и сопровождается лишь поворотом на 134 градуса (рис. 1).



Рис. 1. Центральные структуры первого (а) и второго (б) кластеров столкновительных комплексов белков пластоцианина и цитохрома f высших растений с энергией электростатического притяжения более 8 kT. Ось поворота для перевода центральной структуры первого кластера в центральную структуру второго кластера и обратно показана красным. Отмечены контактирующие заряженные аминокислотные остатки

3.2. Исследование контактов между взаимодействующими аминокислотными остатками белков в процессе образования ими комплекса с использованием бинаризованной трехмерной матрицы

В результате расчетов броуновской или молекулярной динамики было получено множество конформаций комплекса белков пластоцианина и цитохрома f в различных состояниях, когда белки находятся в тесном контакте друг с другом. Для описания взаимной ориентации белков и выявления физико-химических механизмов, лежащих в основе процесса образования белок-белкового комплекса, мы вычислили матрицы контактов аминокислотных остатков двух

компьютерные исследования и моделирование _

белков, образующих комплекс. Когда белки находятся в контакте друг с другом, отдельные аминокислотные остатки взаимодействующих белков сближаются. Чтобы определить, какие именно остатки взаимодействуют друг с другом, удобно рассчитать матрицу расстояний (прямоугольную матрицу, в которой номеру столбца соответствует номер аминокислотного остатка в последовательности одного белка, а номеру строки соответствует номер аминокислотного остатка в последовательности другого белка). Значением элемента этой матрицы является расстояние между двумя соответствующими аминокислотами (рис. 2).



Рис. 2. Схема расчета матрицы расстояний (слева) по положению белков в комплексах пластоцианина и цитохрома f (справа). Белки представлены в виде элементов вторичной структуры. Пластоцианин окрашен зеленым цветом, цитохром f — фиолетовым, атомы железа и меди показаны оранжевой и голубой сферами. Для аминокислот, между которыми измерены расстояния, визуализированы все атомы и приведены однобуквенные названия. t_1, \ldots, t_n — различные моменты времени

Из матрицы расстояний легко получить матрицу контактов. В данной работе считается, что в контакте находятся аминокислотные остатки, у которых есть атомы, находящиеся ближе 0,5 нм друг от друга. Матрица контактов представляет собой прямоугольную матрицу, равную по размерности матрице расстояний, в каждой ячейке которой находится число 0 или 1 (в зависимости от того, удовлетворяет (1) или нет (0) расстояние между данной парой аминокислотных остатков заданному условию). Если аминокислотные остатки, находящиеся в контакте, имеют противоположные заряды, то такой контакт считается электростатическим. Если оба контактирующих аминокислотных остатка являются гидрофобными (т. е. остатками глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, фенилаланина, метионина, цистеина, тирозина и триптофана), то и сам контакт рассматривается как гидрофобный.

3.3. Анализ контактов белков в столкновительных комплексах, полученных методом броуновской динамики

В результате расчетов броуновской динамики мы получаем тысячи энергетически выгодных конформаций структур диффузионно-столкновительных комплексов, которые с помощью однопараметрического иерархического кластерного анализа группируются согласно критериям кластеризации. Для каждого полученного кластера структур столкновительных комплексов рас-

считывается суммарное количество контактов для каждой пары контактирующих аминокислот путем суммирования матриц контактов по всем событиям образования комплекса в данном кластере. Далее полученное количество контактов для каждой пары контактирующих аминокислот делится на суммарное количество контактов, что позволяет рассчитать долю комплексов, в которых присутствует определенный контакт. Сортируя контакты по степени представленности, получаем ранжированный список контактов по их преобладанию в исследуемом ансамбле (рис. 3). Наиболее часто встречающиеся электростатические контакты пластоцианина в столкновительных комплексах пластоцианина и цитохрома f высших растений образуются с положительно заряженными аминокислотными остатками, находящимися вблизи малого домена цитохрома f (К58, К65, К66, К187 и R209). При этом на пластоцианине можно выделить две отрицательно заряженные области [Young et al., 1997]: D42, E43, D44, E45, D51 («нижняя», или «большая») и E59, E60, D61 («верхняя», или «малая»). Первый (рис. 3, *a*) и второй (рис. 3, *б*) кластеры структур столкновительных комплексов отличаются тем, что в первом кластере с положительно заряженной областью вблизи малого домена цитохрома f контактирует только «нижняя» область пластоцианина, в то время как во втором кластере — обе отрицательно заряженные области. «Верхняя» отрицательно заряженная область пластоцианина в первом кластере оказывается в контакте с аминокислотным остатком лизина К122.



Рис. 3. Центральные структуры первого (а) и второго (б) кластеров столкновительных комплексов белков пластоцианина и цитохрома f высших растений с энергией электростатического притяжения более 8 kT. Белки представлены в виде элементов вторичной структуры. Пластоцианин окрашен зеленым цветом, цитохром f — фиолетовым, атомы железа (оранжевый) и меди (голубой) показаны сферами. Десять пар заряженных аминокислотных остатков, которые чаще других контактировали между собой, отмечены на рисунке и представлены в таблицах

3.4. Анализ контактов белков в процессе образования ими финального комплекса в молекулярно-динамической модели

Ранее нами было показано, что структуры комплексов, входящих во второй кластер, являются непродуктивными, то есть не могут быть быстро преобразованы в состояние функционально активного комплекса [Fedorov et al., 2019]. Поэтому в данной работе мы анализируем трансформацию только центральной структуры первого кластера в функциональное состояние.

Оценить изменение общего числа контактов в белок-белковом интерфейсе в процессе перехода столкновительного комплекса в финальный, а также количество электростатических и гидрофобных контактов по отдельности удобно по графикам изменения количества этих контактов от времени (рис. 4, *a*). Для этого с использованием матрицы контактов на каждом кадре молекулярно-динамической траектории рассчитывается количество электростатических, гидрофобных и всех контактов. В столкновительном комплексе, полученном методом броуновской динамики, гидрофобные контакты отсутствуют. При образовании финального комплекса пластоцианина и цитохрома f при уменьшении расстояния между кофакторами белков появляются гидрофобные контакты и увеличивается число электростатических. Эти контакты стабилизируют образовавшийся финальный комплекс с расстоянием между атомами меди и железа менее 1,5 нм, благодаря чему реакционные центры белков оказываются сближенными в течение достаточного для туннелирования электрона времени.



Рис. 4. (а) Зависимость количества гидрофобных (красный), электростатических (зеленый) и всех (оранжевый) контактов от времени в сравнении с изменением расстояния (синий) между атомами железа и меди. (б) Зависимость числа молекул воды, находящихся в контакте с гидрофобными аминокислотными остатками комплекса белков пластоцианина и цитохрома f (оранжевый), и молекул воды, находящихся в контакте с гидрофобными аминокислотными остатками как пластоцианина, так и цитохрома f (фиолетовый), от времени в сравнении с изменением расстояния (синий) между атомами железа и меди

Образование гидрофобных контактов сопровождается уменьшением количества молекул воды, находящихся в контакте с гидрофобными аминокислотными остатками белков (рис. 4, δ). Под молекулами, находящимися в контакте с гидрофобными аминокислотными остатками, мы подразумеваем те молекулы, атомы кислорода которых находятся на расстоянии менее 0,5 нм от любого атома гидрофобного аминокислотного остатка. Увеличение пятна контакта между белками в комплексе сопровождается увеличением числа молекул воды, находящихся вблизи этого

пятна и одновременно контактирующих с гидрофобными аминокислотными остатками обоих белков. Для дальнейшего анализа мы рассматривали в качестве финального комплекса ансамбль структур, реализованных в траектории молекулярной динамики после сближения кофакторов до расстояния 1,5 нм.

3.5. Сравнение элекстростатических контактов белков в столкновительных и финальных комплексах

В процессе формирования функционально активного комплекса сохраняются электростатические контакты между двумя парами разноименно заряженных областей двух белков: «нижняя» область пластоцианина контактирует с областью вблизи малого домена цитохрома f, а «верхняя» — с аминокислотным остатком лизина K122 цитохрома f (рис. 5). Однако в пределах этих областей происходит перераспределение контактов между отдельными аминокислотными остатками. Это связано с тем, что при формировании финального комплекса происходит поворот молекулы пластоцианина на 69 градусов вокруг оси, проходящей через обе области электростатического контакта. При этом повороте происходит вытеснение воды из областей, находящихся вблизи кофакторов молекул и сформированных гидрофобными аминокислотными остатками (рис. 4, δ), что приводит к стабилизации комплекса в положении, пригодном для передачи электрона.



Рис. 5. Центральная структура первого кластера (а) столкновительных комплексов с энергией электростатического притяжения более 8 kT и финальный комплекс (б) белков пластоцианина и цитохрома f высших растений. Белки представлены в виде элементов вторичной структуры. Пластоцианин окрашен зеленым цветом, цитохром f — фиолетовым, атомы железа (оранжевый) и меди (голубой) показаны сферами. Показаны аминокислотные остатки, образующие 10 наиболее представленных электростатических контактов первого кластера. Ось поворота для перевода центральной структуры первого кластера в финальный комплекс показана красным цветом на панели (а). В таблице слева представлены процент встречаемости 10 наиболее представленных электростатических контактов, рассчитанных по всем структурам столкновительных комплексов с энергией электростатического притяжения более 8 kT, входящих в первый кластер, и их встречаемость в финальном комплексе по данным молекулярной динамики. В таблице справа представлены процент встречаемости 10 наиболее представленных электростатических контактов в финальном комплексе по данным молекулярной динамики и их встречаемость в столкновительных комплексах с энергией электростатического притяжения более 8 kT, входящих в первый комплекса с элергией окранентельных комплексе по данным молекулярной динамики.

4. Заключение

Электростатическое взаимодействие играет ключевую роль в процессах связывания белков пластоцианина и цитохрома f высших растений. Заряженные аминокислотные остатки и парциальные заряды белков создают вокруг них неоднородное электрическое поле. При приближении

КОМПЬЮТЕРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ И МОДЕЛИРОВАНИЕ

к другим белкам и комплексам белок ориентируется в электрическом поле, создаваемом этими белками, и может занять выгодную позицию для последующего связывания. При сближении макромолекул начинают играть заметную роль гидрофобные взаимодействия, возникающие вследствие изменения структуры гидратной оболочки макромолекул. Вандерваальсовы взаимодействия становятся существенными при близком контакте поверхностей белков.

В настоящей работе мы показали, что дальнодействующие электростатические взаимодействия способствуют формированию как столкновительного, так и финального комплекса пластоцианина и цитохрома f высших растений. Образование гидрофобных контактов, в свою очередь, способствует преобразованию столкновительного комплекса в финальный. За счет применения методов анализа, описанных в настоящей статье, нам удалось существенно детализировать предложенный нами ранее сценарий образования комплекса белков пластоцианина и цитохрома f [Fedorov et al., 2019] для высших растений, что позволило установить принципы, лежащие в основе образования белок-белкового комплекса. Ранее мы сделали предположение, что процесс формирования белкового комплекса включает несколько стадий: диффузионное сближение белков, электростатическая ориентация, образование диффузионно-столкновительного комплекса, реорганизация комплекса и превращение его в финальный комплекс. В настоящей работе стадии формирования диффузионно-столкновительного комплекса и превращения его в финальный существенно детализированы и выявлены молекулярные механизмы этих процессов. Такие характеристики, как матрицы контактов, оси поворота при переходе между состояниями и графики изменения количества контактов в процессе моделирования, позволяют определить ключевые аминокислотные остатки, участвующие в формировании комплекса, и выявить физикохимические механизмы, лежащие в основе этого процесса. В данной работе рассматриваемые методы применены только к одному примеру белок-белковых взаимодействий, однако в дальнейшем с использованием предложенного подхода мы планируем провести исследование взаимодействия широкого спектра электротранспортных белков различных организмов. Подробное описание применения методов, предложенных в статье, приведено в файле с дополнительной информацией.

Список литературы (References)

- Князева О. С., Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Ризниченко Г. Ю., Грачев Е. А., Рубин А. Б. Многочастичная модель диффузии и взаимодействия пластоцианина с цитохромом f в электростатическом поле фотосинтетической мембраны // Биофизика. — 2010. — Т. 55, № 2. — С. 259–268.
 - *Kniazeva O. S., Kovalenko G.B., Abaturova A. M., Riznichenko G. Yu., Grachev E. A., Rubin A. B.* Multiparticle computer simulation of diffusion and interaction of plastocyanin with cytochrome f in the electrostatic field of the thylakoid membrane // Biophysics. 2010. Vol. 55, No. 2. P. 221–227. (Original Russian paper: *Knyazeva O. S., Kovalenko I. B., Abaturova A. M., Piznichenko G. Yu., Grachev E. A., Rubin A. B.* Mnogochastichnaya model' diffuzii i vzaimodeistviya plastotsianina s tsitohromom f v elektpostaticheskom pole fotosinteticheskoi membrany // Biofizika. 2010. Vol. 55, No. 2. P. 259–268.)
- Хрущев С. С., Абатурова А. М., Дьяконова А. Н., Устинин Д. М., Зленко Д. В., Федоров В. А., Коваленко И. Б., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса многочастичной броуновской динамики ProKSim // Компьютерные исследования и моделирование. — 2013. — Т. 5, № 1. — С. 47–64. *Khruschev S. S., Abaturova A. M., Diakonova A. N., Ustinin D. M., Zlenko D. V., Fedorov V.A., Kovalenko I. B.,*

Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. Multi-particle Brownian Dynamics software ProKSim for protein-protein interactions modeling // Computer Research and Modeling. -2013. – Vol. 5, No. 1. – P. 47–64 (in Russian).

Хрущев С. С., Абатурова А. М., Федоров В. А., Коваленко И. Б., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б. Идентификация промежуточных состояний в процессе диффузионного сближения электронтранспортных белков пластоцианина и цитохрома f // Биофизика. — 2015. — Т. 60, № 4. — С. 629–638.

Khruschev S. S., Abaturova A. M., Fedorov V. A., Kovalenko I. B., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B. The identification of intermediate states of the electron-transfer proteins plastocyanin and cytochrome f diffusional encounters //

Biophysics. – 2015. – Vol. 60. – P. 513–521. (Original Russian paper: *Khrushchev S. S., Abaturova A. M., Fedorov V. A., Kovalenko I. B., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B.* Identifikatsiya promezhutochnykh sostoyanii v protsesse diffuzionnogo sblizheniya elektron-transportnykh belkov plastotsianina i tsitokhroma f // Biofizika. – 2015. – Vol. 60. – P. 629–638.)

- Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J. C., Hess B., Lindahl E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers // SoftwareX. – 2015. – Vol. 1. – P. 19–25.
- Ankerst M., Breunig M. M., Kriegel H. P., Sander J. OPTICS: ordering points to identify the clustering structure / Proc. ACM SIGMOD, Philadelphia, PA. 1999. P. 49–60.
- *Autenrieth F., Tajkhorshid E., Baudry J., Luthey-Schulten Z.* Classical force field parameters for the heme prosthetic group of cytochrome c // Journal of computational chemistry. 2004. Vol. 25, No. 13. P. 1613–1622.
- Bryant P., Pozzati G., Elofsson A. Improved prediction of protein-protein interactions using AlphaFold2 // Nature communications. 2022. Vol. 13, No. 1. P. 1265.
- *Calvo P. G.* RotationAxis. 2017. [Electronic resource]. http://pymolwiki.org/index.php/RotationAxis (accessed: 10.02.2023).
- Díaz-Moreno I., Díaz-Moreno S., Subías G., De la Rosa M. A., Díaz-Quintana A. The atypical ironcoordination geometry of cytochrome f remains unchanged upon binding to plastocyanin, as inferred by XAS // Photosynthesis research. – 2006. – Vol. 90, No. 1. – P. 23–28.
- Díaz-Moreno I., Muñoz-López F. J., Frutos-Beltrán E., Miguel A., Díaz-Quintana A. Electrostatic strain and concerted motions in the transient complex between plastocyanin and cytochrome f from the cyanobacterium Phormidium laminosum // Bioelectrochemistry. – 2009. – Vol. 77, No. 1. – P. 43–52.
- Diaz-Moreno I., Diaz-Quintana A., Miguel A., Ubbink M. Structure of the complex between plastocyanin and cytochrome f from the cyanobacterium Nostoc sp. PCC 7119 as determined by the balance between electrostatic and hydrophobic interactions within the transient // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Vol. 280, No. 19. – P. 18908–18915.
- *Elke A., Böhm C., Kröger P.* DeLiClu: boosting robustness, completeness, usability, and efficiency of hierarchical clustering by a closest pair ranking / Proc. 10th Pacific-Asian Conf. Adv. Knowl. Discov. Data Min. 2006. P. 119–128.
- Fedorov V.A., Kovalenko I.B., Khruschev S.S., Ustinin D.M., Antal T.K., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B. Comparative analysis of plastocyanin – cytochrome f complex formation in higher plants, green algae and cyanobacteria // Physiologia plantarum. – 2019. – Vol. 166, No. 1. – P. 320–335.
- *Feenstra K. A., Hess B., Berendsen H. J.* Improving efficiency of large time-scale molecular dynamics simulations of hydrogen-rich systems // J. Comput. Chem. 1999. Vol. 20, No. 8. P. 786–798.
- Fortmann-Grote C., Buzmakov A., Jurek Z., Loh N. T., Samoylova L., Santra R., Schneidmiller E. A., Tschentscher T., Yakubov S., Yoon C. H., Yurkov M. V., Ziaja-Motykac B., Mancuso A. P. Start-toend simulation of single-particle imaging using ultra-short pulses at the European X-ray Free-Electron Laser // IUCrJ. – 2017. – Vol. 4, No. 5. – P. 560–568.
- *Gross E. L.* A Brownian dynamics computational study of the interaction of spinach plastocyanin with turnip cytochrome f: the importance of plastocyanin conformational changes // Photosynthesis research. 2007. Vol. 94, No. 2–3. P. 411–422.
- Grove T. Z., Ullmann G. M., Kostic N. M. Simultaneous true, gated, and coupled electron-transfer reactions and energetics of protein rearrangement // J. Inorg. Bio. – 2012. – Vol. 106. – P. 143–150.
- *Haddadian E. J., Gross E. L.* A Brownian dynamics study of the effects of cytochrome f structure and deletion of its small domain in interactions with cytochrome c6 and plastocyanin in chlamydomonas reinhardtii // Biophysical Journal. 2006. Vol. 90. P. 566–577.

- *Haddadian E. J., Gross E. L.* Brownian dynamics study of cytochrome f interactions with cytochrome c6 and plastocyanin in chlamydomonas reinhardtii plastocyanin, and cytochrome c6 mutants // Biophys. J. 2005. Vol. 88. P. 2323–2339.
- Jiang Z., Zhang L., Chen J., Xia A., Zhao D. Effect of amino acid on forming residue–residue contacts in proteins // Polymer. 2002. Vol. 43, No. 22. P. 6037–6047.
- *Kabsch W.* A solution for the best rotation to relate two sets of vectors // Acta Crystallogr. Sect. A. International Union of Crystallography. 1976. Vol. 32, No. 5. P. 922–923.
- Kleanthous C. Protein-protein recognition. New York: Oxford University Press, 2000.
- Langevin P. Sur la théorie du mouvement brownien // Compt. Rendus. 1908. Vol. 146. P. 530-533.
- MacKerell A. D. Jr., Bashford D., Bellott M. L. D. R., Dunbrack R. L. Jr., Evanseck J. D., Field M. J., Fischer S., Gao J., Guo H., Ha S., Joseph-McCarthy D., Kuchnir L., Kuczera K., Lau F. T., Mattos C., Michnick S., Ngo T., Nguyen D. T., Prodhom B., Reiher W. E., Roux B., Schlenkrich M., Smith J. C., Stote R., Straub J., Watanabe M., Wiórkiewicz-Kuczera J., Yin D., Karplus M. Allatom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins // The journal of physical chemistry B. 1998. Vol. 102, No. 18. P. 3586–3616.
- Mayneord G. E., Vasilev C., Malone L. A., Swainsbury D. J., Hunter C. N., Johnson M. P. Singlemolecule study of redox control involved in establishing the spinach plastocyanin-cytochrome b6f electron transfer complex // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 2019. – Vol. 1860, No. 7. – P. 591–599.
- *Morozenko A., Stuchebrukhov A. A.* Dowser++, a new method of hydrating protein structures // Proteins Struct. Funct. Bioinforma. 2016. Vol. 84, No. 10. P. 1347–1357.
- Olsson M. H., Søndergaard C. R., Rostkowski M., Jensen J. H. PROPKA3: consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions // J. Chem. Theory Comput. – 2011. – Vol. 7, No. 2. – P. 525–537.
- *Rakers C., Bermudez M., Keller B. G.* Computational close up on protein-protein interactions: how to unravel the invisible using molecular dynamics simulations? // WIREs Comput. Mol. Sci. 2015. Vol. 5. P. 345–359.
- *De Rienzo F., Gabdoulline R. R., Menziani M. C., De Benedetti P. G., Wade R. C.* Electrostatic analysis and brownian dynamics simulation of the association of plastocyanin and cytochrome f // Biophys. J. 2001. Vol. 81. P. 3090–3104.
- Riznichenko G. Yu., Antal T.K., Belyaeva N.E., Khruschev S.S., Kovalenko I.B., Maslakov A.S., Plyusnina T. Yu., Fedorov V.A., Rubin A.B. Molecular, Brownian, kinetic and stochastic models of the processes in photosynthetic membrane of green plants and microalgae // Biophysical Reviews. – 2022. – Vol. 14, No. 4. – P. 985–1004.
- Sander J., Qin X., Lu Z., Niu N., Kovarsky A. Automatic extraction of clusters from hierarchical clustering representations / Proc. 7th Pacific-Asia Conf. Knowl. Discov. DataMining (PAKDD), Seoul, Korea. – Springer-Verlag, 2003. – P. 75–87.
- Scanu S., Foerster J. M., Ullmann G. M., Ubbink M. Role of hydrophobic interactions in the encounter complex formation of the plastocyanin and cytochrome f complex revealed by paramagnetic NMR spectroscopy // Journal of the American Chemical Society. – 2013. – Vol. 135, No. 20. – P. 7681–7692.
- *Schrödinger L., DeLano W.* The PyMOL molecular graphics system, Version 2.0. Schrödinger, LLC, 2020. Available at: http://www.pymol.org/pymol
- Siebenmorgen T., Zacharias M. Computational prediction of protein-protein binding affinities // Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science. – 2020. – Vol. 10, No. 3. – P. e1448.

- *Ubbink M.* The courtship of proteins: understanding the encounter complex // FEBS letters. 2009. Vol. 583, No. 7. P. 1060–1066.
- *Ubbink M., Ejdebäck M., Karlsson B. G., Bendall D. S.* The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics // Structure. 1998. Vol. 6, No. 3. P. 323–335.
- *Ullmann G. M., Knapp E.-W., Kostic N. M.* Computational simulation and analysis of dynamic association between plastocyanin and cytochrome f. Consequences for the electron-transfer reaction // J. Am. Chem. Soc. 1997. Vol. 119. P. 42–52.
- Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A. E., Berendsen H. J. GROMACS: fast, flexible, and free // Journal of computational chemistry. – 2005. – Vol. 26, No. 16. – P. 1701–1718.
- Weigt M., White R.A., Szurmant H., Hoch J.A., Hwa T. Identification of direct residue contacts in protein–protein interaction by message passing // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106, No. 1. – P. 67–72.
- Young S., Sigfridsson K., Olesen K., Hansson Ö. The involvement of the two acidic patches of spinach plastocyanin in the reaction with photosystem I // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 1997. – Vol. 1322, No. 2–3. – P. 106–114.
- Zhang Q. C., Petrey D., Deng L., Qiang L., Shi Y., Thu C. A., Brygida B., Lefebvre C., Accili D., Hunter T., Maniatis T., Califano A., Honig B. Structure-based prediction of protein-protein interactions on a genome-wide scale // Nature. – 2012. – Vol. 490, No. 7421. – P. 556–560.
- Zolotareva N. V., Alykov N. M., Kovalenko I. B. Supercomputer modeling of active centers redox system of plastocyanin // International Journal of Applied Engineering Research. – 2015. – Vol. 10, No. 5. – P. 12419–12425.