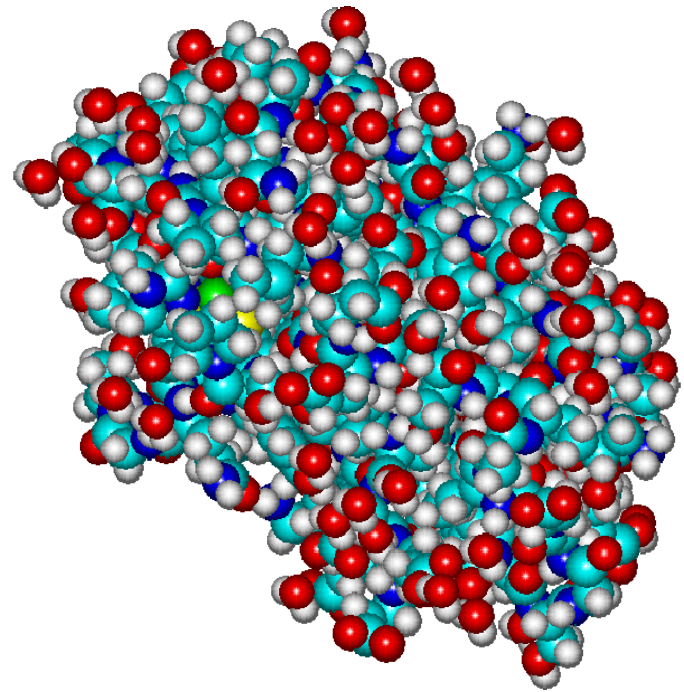


Многочастичное моделирование взаимодействия белков

И.Б. Коваленко,
А.Н. Дьяконова,
А.М. Абатурова,
О.С. Князева,
С.С. Хрущев,
Г.Ю. Ризниченко
А.Б. Рубин



МГУ имени М.В.Ломоносова
Биологический факультет, кафедра биофизики

План

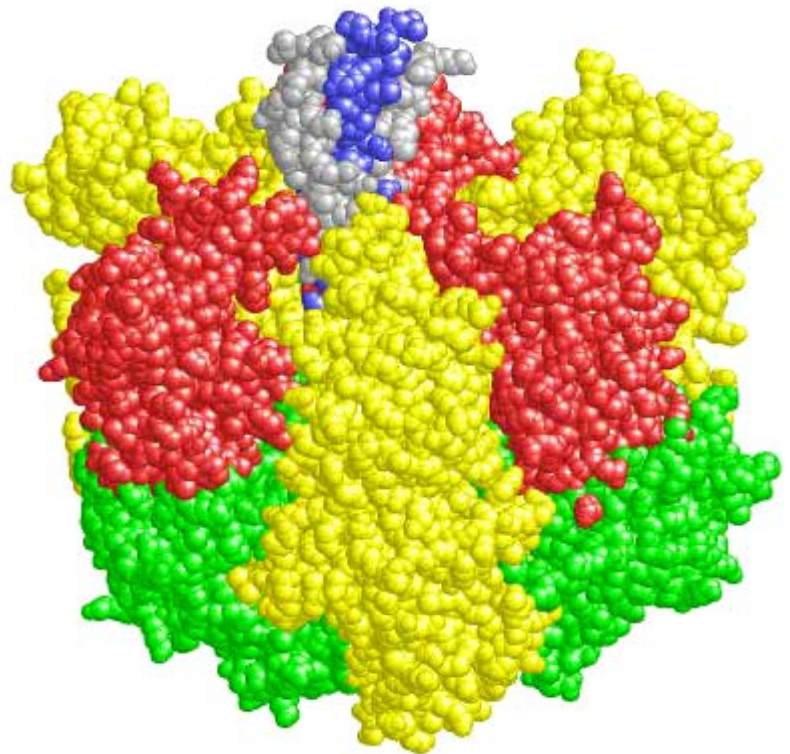
1. Введение
2. Модели броуновской динамики
3. Компьютерная модель взаимодействия белков
4. Имитационная компьютерная модель процессов в фотосинтетической мембране
5. Предсказание областей связывания белков

Белки

Белки - это:

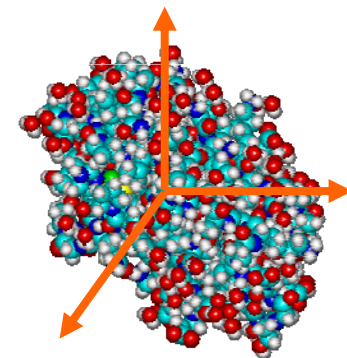
- Молекулярные машины
- Строительные блоки
- Оружие

Живой клетки



Белки обладают стабильной трехмерной структурой

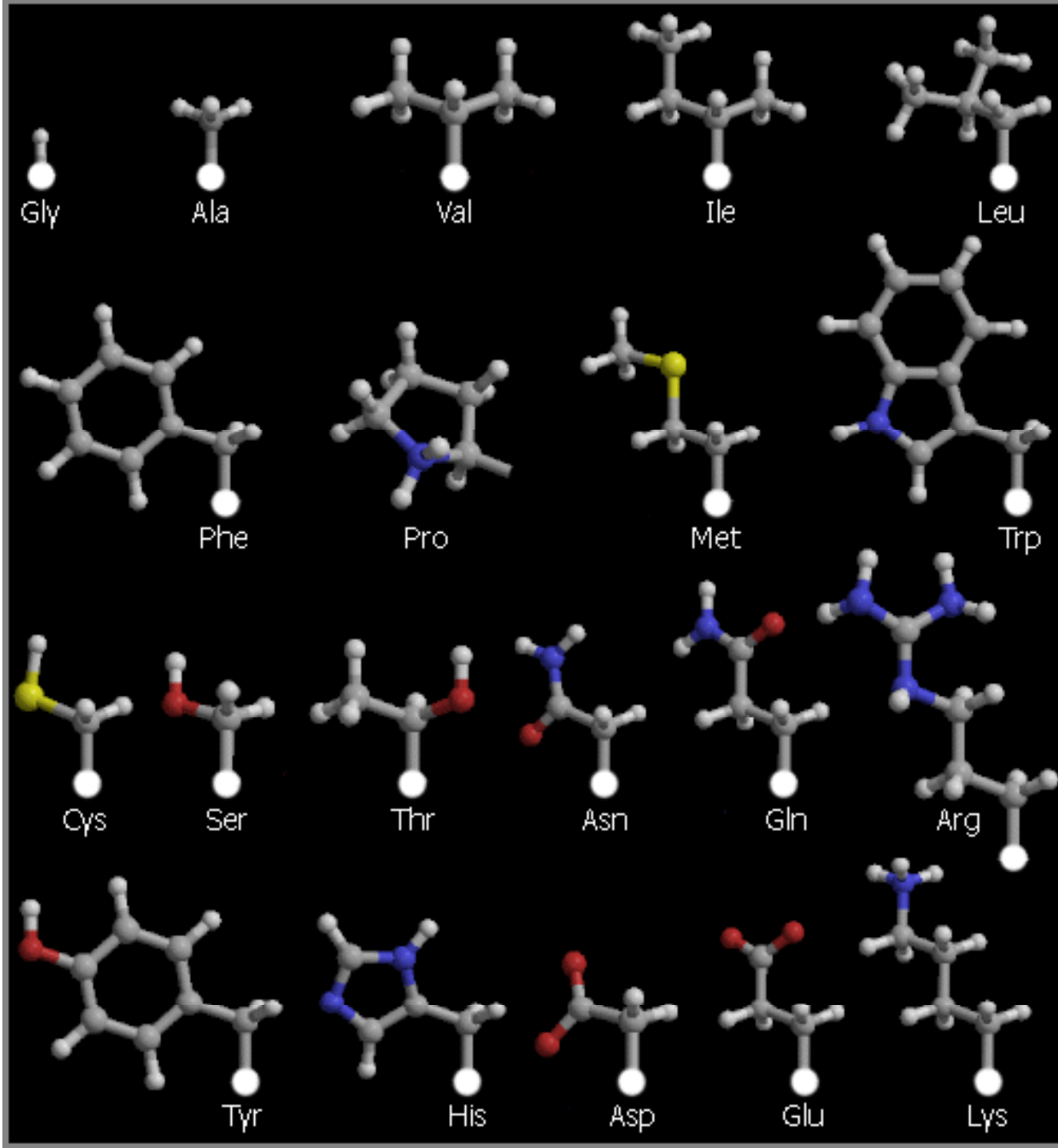
- Биологическая функция белка определяется его трехмерной структурой



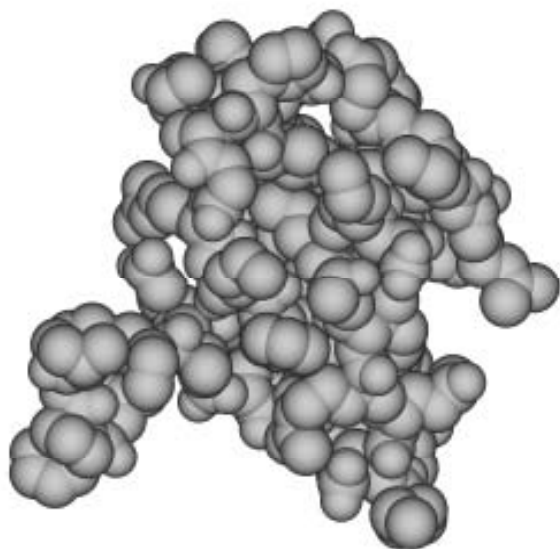
- Protein Data Bank, USA www.pdb.org

ATOM	1	N	VAL	A	1	42.152	117.979	69.904	1.00	15.02
ATOM	2	CA	VAL	A	1	40.996	117.702	70.823	0.00	13.02
ATOM	3	C	VAL	A	1	41.455	117.848	72.295	0.00	12.01
ATOM	4	O	VAL	A	1	40.654	117.821	73.208	0.00	16.00
ATOM	5	CB	VAL	A	1	40.438	116.289	70.485	0.00	13.02
ATOM	6	CG1	VAL	A	1	41.487	115.222	70.816	0.00	15.03
ATOM	7	CG2	VAL	A	1	39.172	116.030	71.306	0.00	15.03
ATOM	8	H	VAL	A	1	42.853	117.364	70.080	0.00	0.00
ATOM	9	H	VAL	A	1	41.845	117.876	68.918	0.00	0.00
ATOM	10	H	VAL	A	1	42.465	118.867	70.050	0.00	0.00

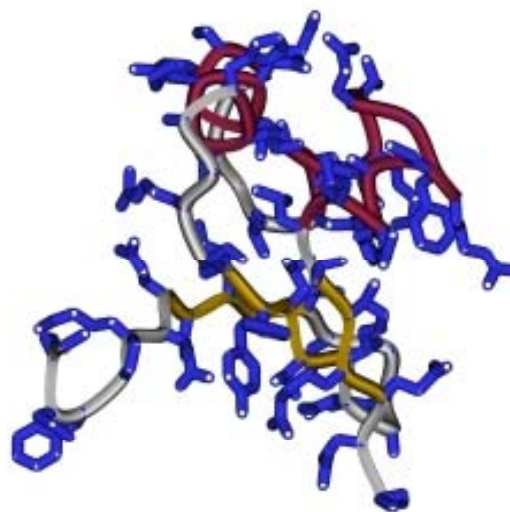
20 амино КИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ



Атомная модель белка

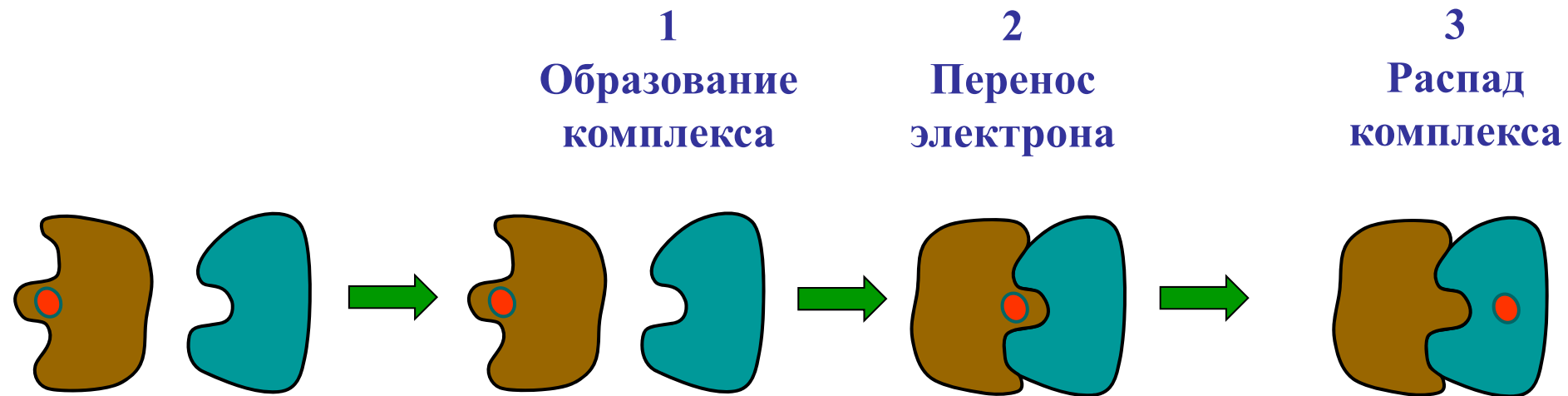


Структурная модель белка



Взаимодействие белков

- **Высокоспецифичное взаимодействие** молекул друг с другом
(Ключ и замок, перчатка и рука)



Реакции второго порядка

- Почти все реакции второго порядка (в особенности биохимические реакции) являются результатом случайного движения молекул реагирующих веществ
- Когда две (реакция второго порядка) или три (реакция третьего порядка) молекулы встречаются, происходит реакция
- $A + B = C$ — пример реакции второго порядка

Образование комплекса белков

- Белок-белковые взаимодействия – неотъемлемая часть множества биологических процессов: передачи сигналов, транскрипции, клеточной регуляции, переноса электронов, ...
- Экспериментальные константы связывания белков: $10^3 \dots 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- Необходимость занятия определенной взаимной ориентации для образования комплекса двух белков сильно ограничивает диффузионно-лимитируемую скорость образования комплекса белков до $10^5 - 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
- Однако электростатические взаимодействия могут на несколько порядков увеличить скорость образования комплексов
- Диффузионно-контролируемые реакции:
 - быстрые ($k > 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
 - существенно зависят от ионной силы
 - чувствительны к условиям диффузии

Броуновская динамика (BD)

- BD используется для моделирования **диффузии** и **связывания** молекул в растворе
- Молекулы рассматриваются как твердые макроскопические объекты
- Моделируются процессы на миллисекундной шкале (в отличие от молекулярной динамики, ограниченной до примерно 10 нс)

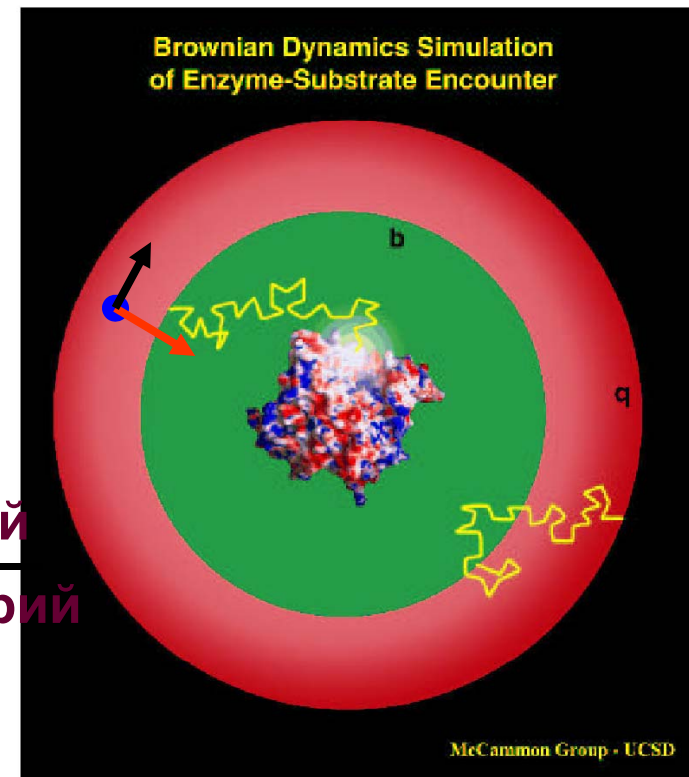
■ *Метод позволил вычислить константы ассоциации ферментов и субстрата*

■ *Моделирование позволяет понять, как изменяется константа ассоциации при мутациях белков, при изменении ионной силы и pH раствора*

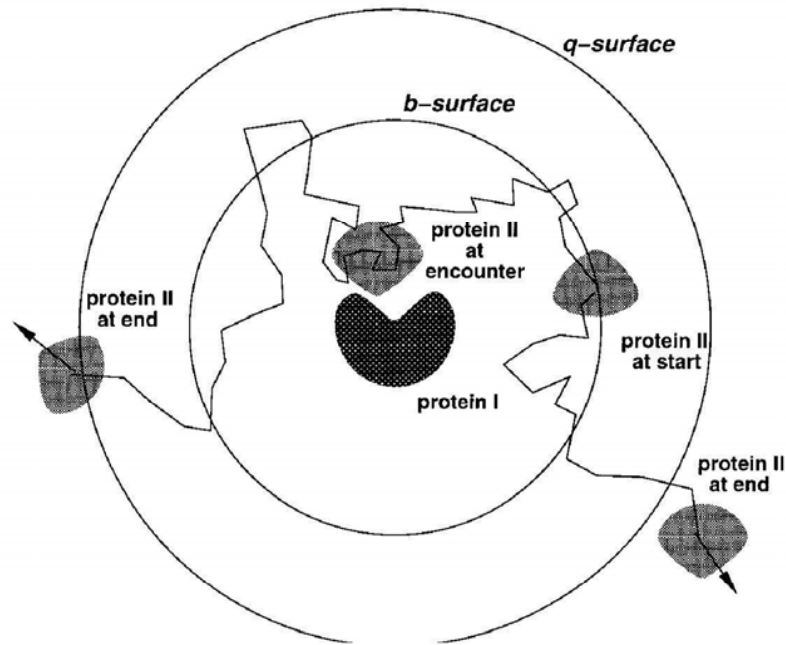
■ *Моделирование процессов белок-белковых взаимодействий*

$$\text{Вероятность связывания} = \frac{\text{Число успешных траекторий}}{\text{Общее количество траекторий}}$$

Бимолекулярная константа связывания



Simulations of Enzyme-Substrate Encounter



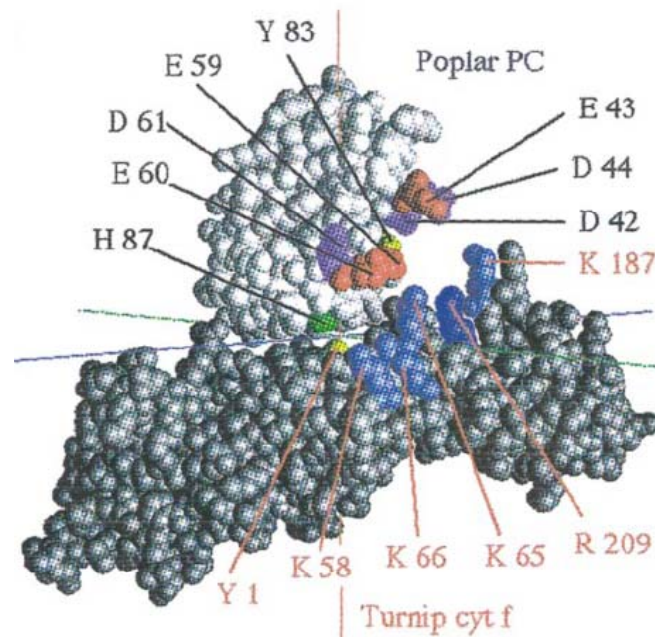
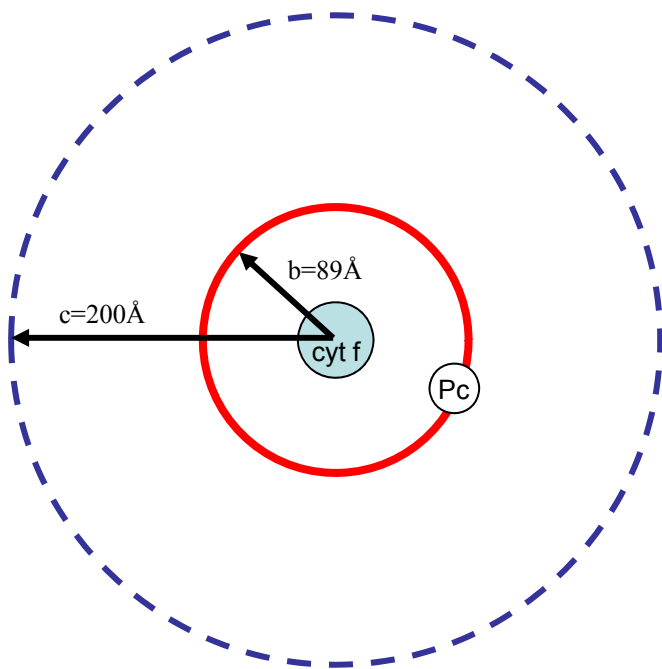
When to stop a Trajectory

- A) when it goes through
- B) when it binds to the target
 - but when does the reactant bind? - a reaction criterion is needed
 - distance between two certain atoms
 - distance between two sets of atoms (reactive patches)



- interaction energy below a certain threshold (not good)
- Brownian Dynamics is thus not really a docking method. Information about the active sites is needed

Модель BD для Рс и cyt f (Pearson, Gross 1998)



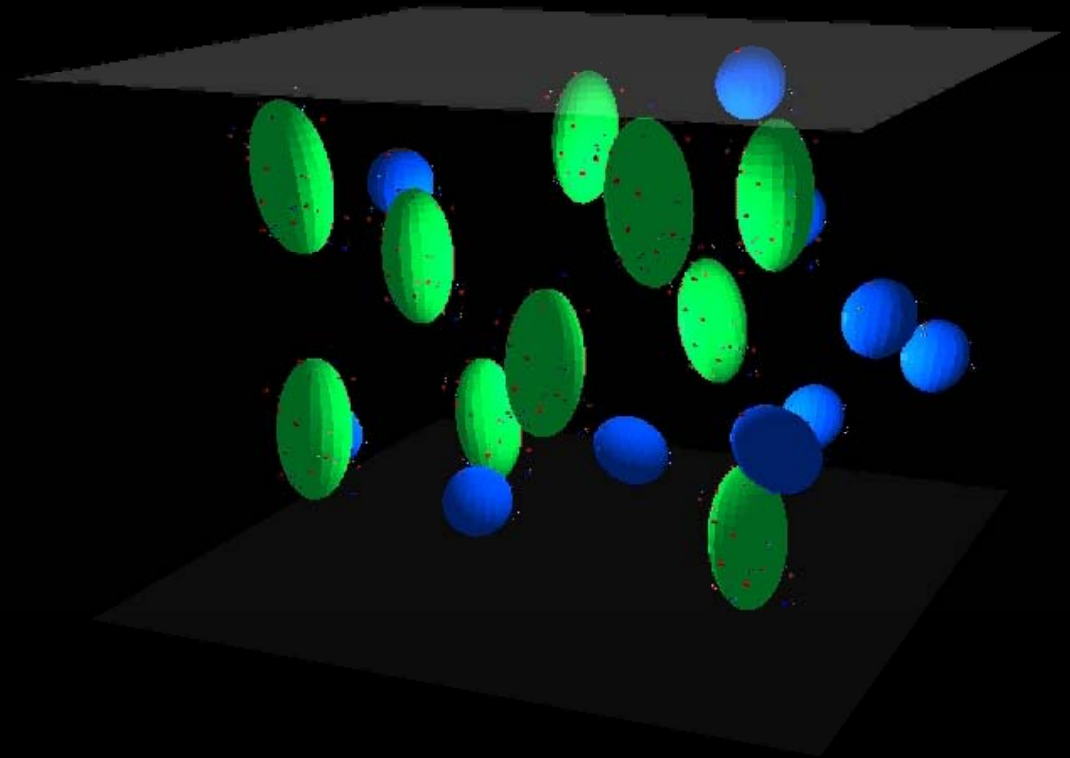
$$k = p k_D(b) / [1 - (1 - p) k_D(b) / k_D(c)]$$

$$k_D(s) = 4\pi s D N_A$$

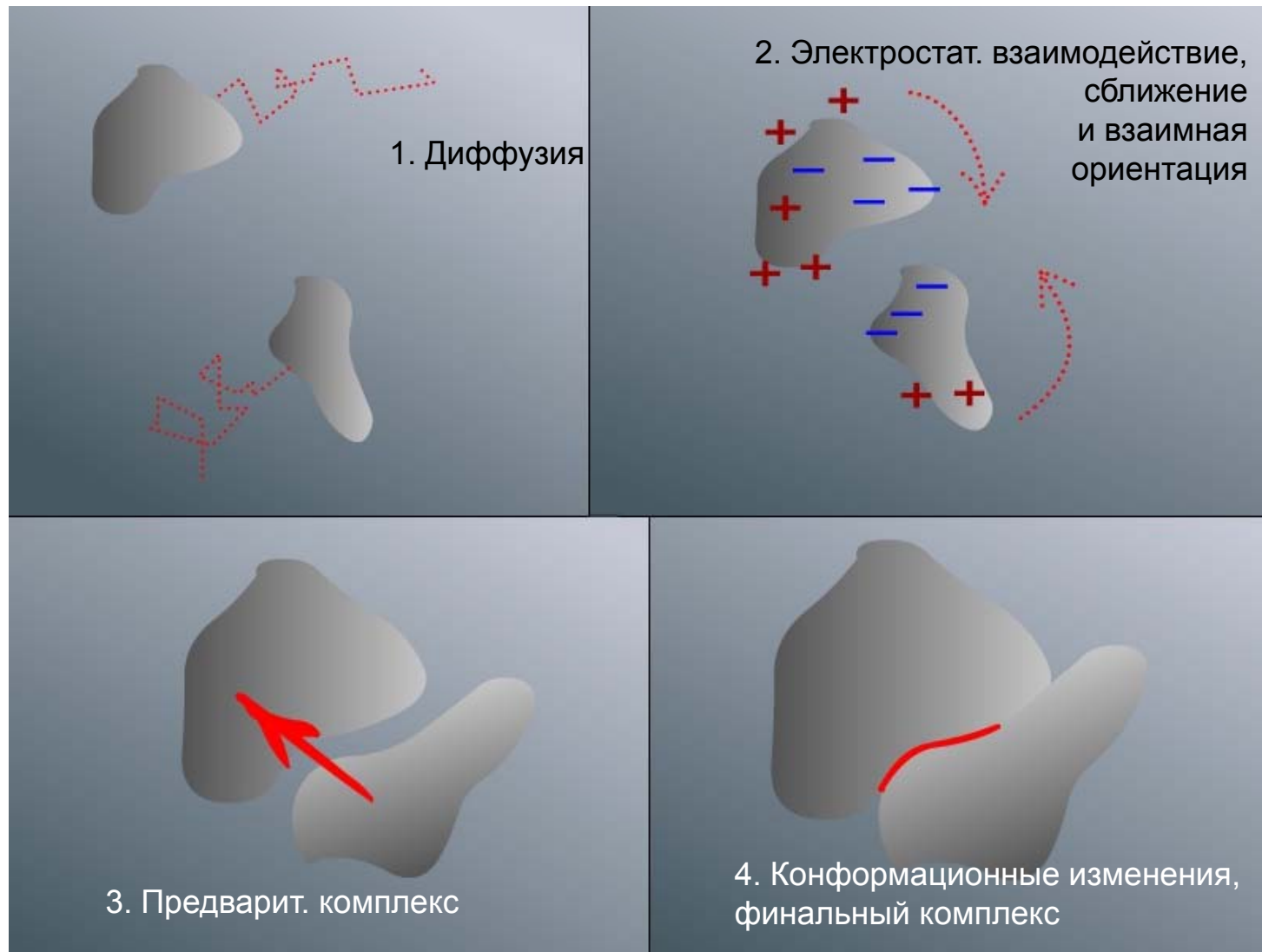
Расстояние между метал. центрами x	17 Å		16 Å	
Ионная сила, mM	вероятность p	$k_{so}, M^{-1}c^{-1}$	вероятность	$k_{so}, M^{-1}c^{-1}$
50	0.02525	8.11×10^8	0.01725	5.57×10^8
100	0.01111	3.61×10^8	0.00333	1.09×10^8
200	0.00225	7.36×10^7	0.00025	8.19×10^6

Модель

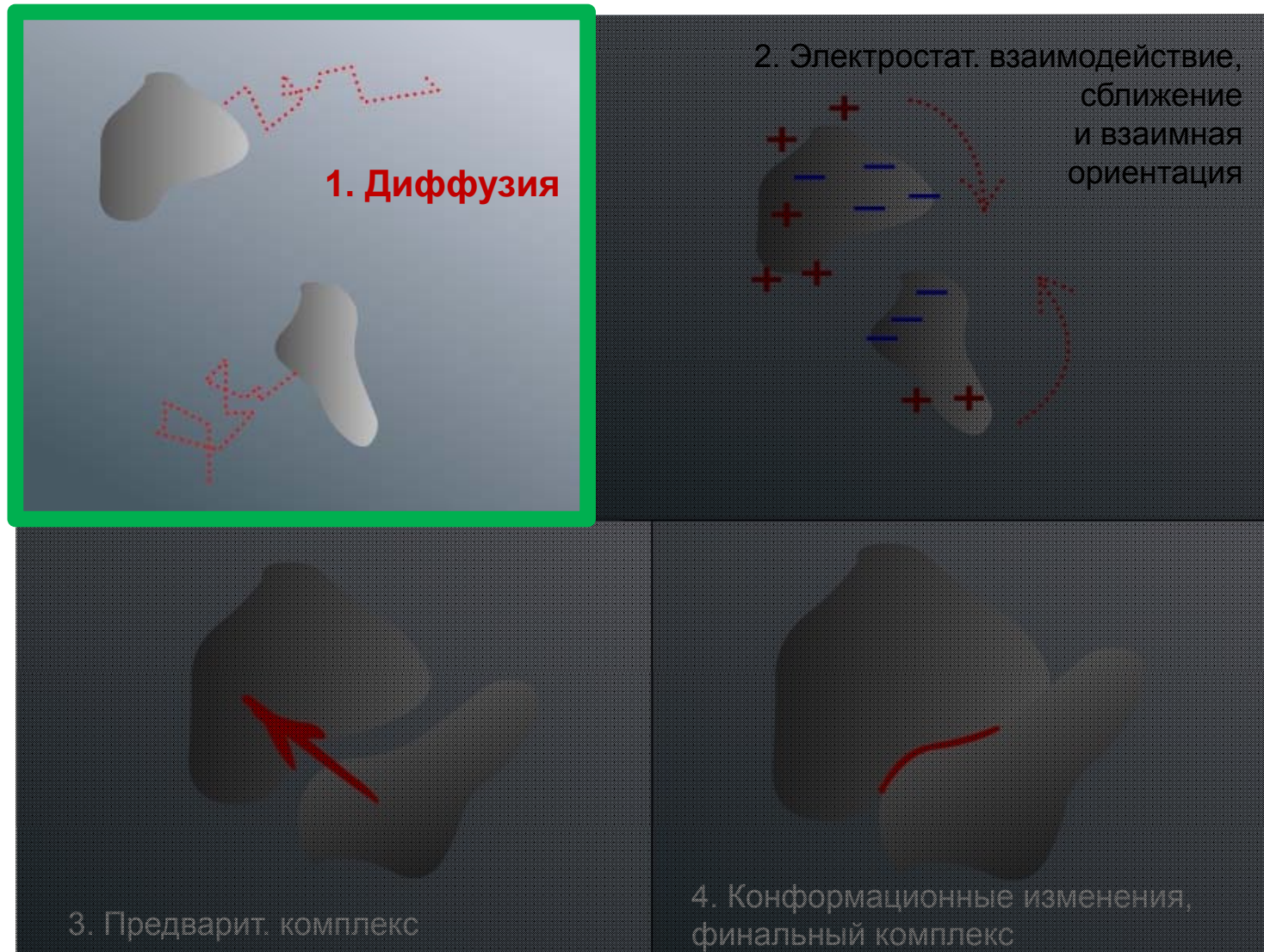
- 3D реакционный объем
- Много частиц
(многочастичная
модель)
- 3D броуновское
движение
белков
- Электростатические
взаимодействия



Взаимодействие белков



Взаимодействие белков: диффузия



Уравнение Ланжевена для
описания броуновского
движения заряженных частиц

$$\xi_t^x \frac{dx}{dt} = f_x(t) + F_x$$

$$\langle f_x(t) \rangle = 0$$

$$\langle f_x(t)^2 \rangle = \frac{2kT\xi_t^x}{\Delta t}$$

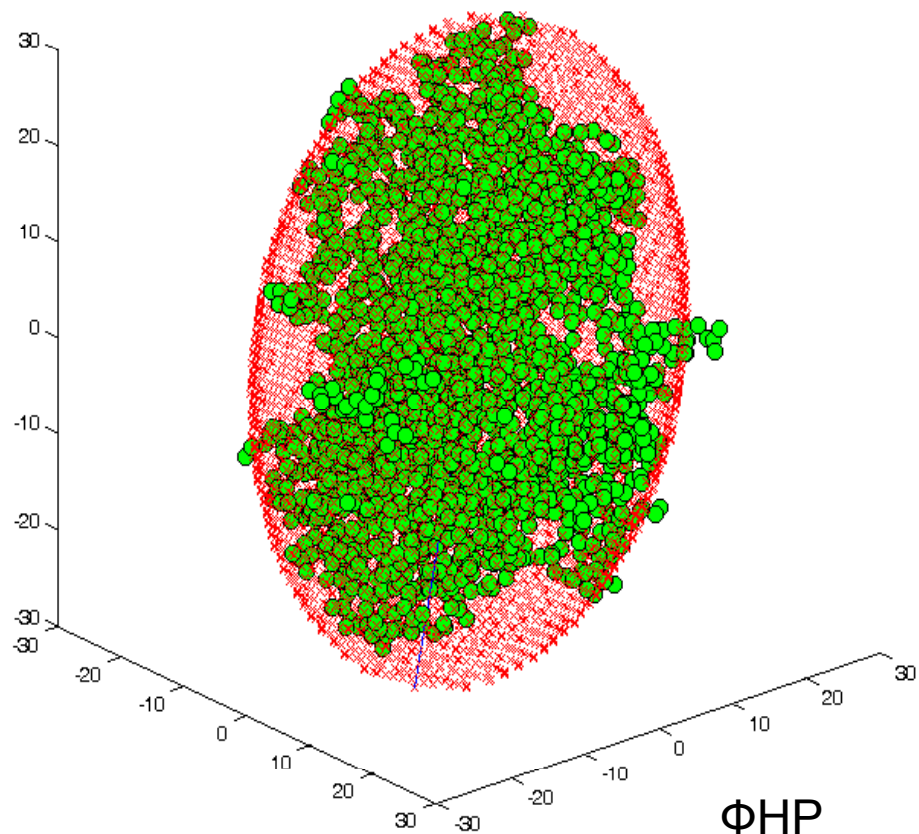
$f_x(t)$ – случайная сила

ξ_t^x – коэффициент вязкого трения

$$F_x = -q \cdot \frac{d\varphi}{dx} \text{ – электростатическая сила}$$

φ – электростатический потенциал

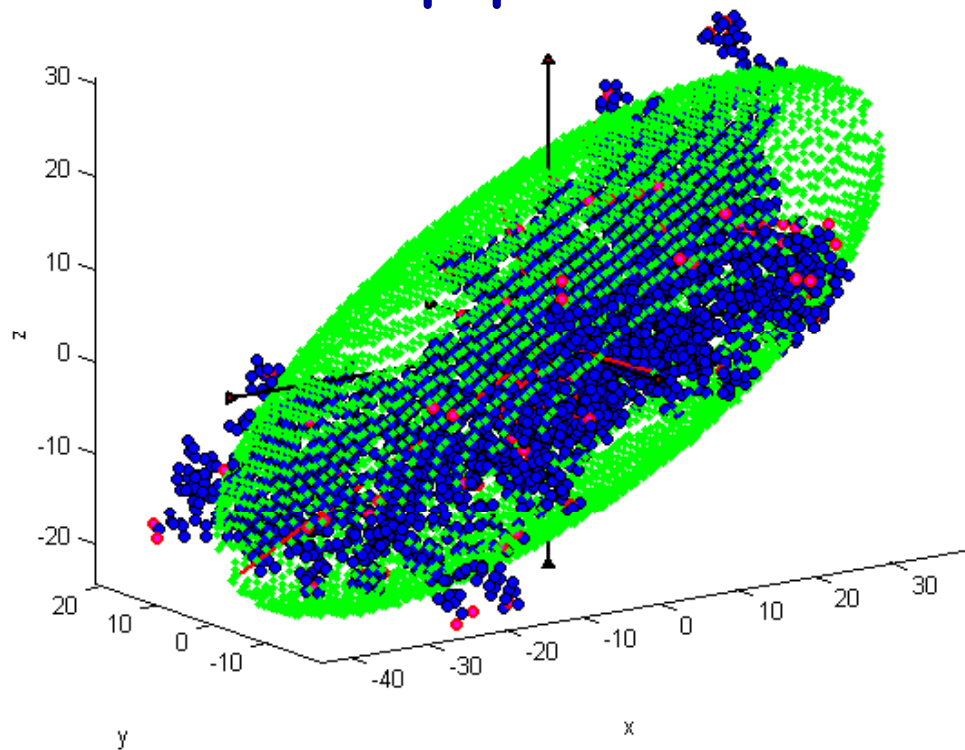
Аппроксимация молекул
белков эллипсоидами
вращения для расчета
коэффициентов вязкого трения



Оси эллипсоида вращения:

$$a=32 \text{ \AA}, b=23 \text{ \AA}$$

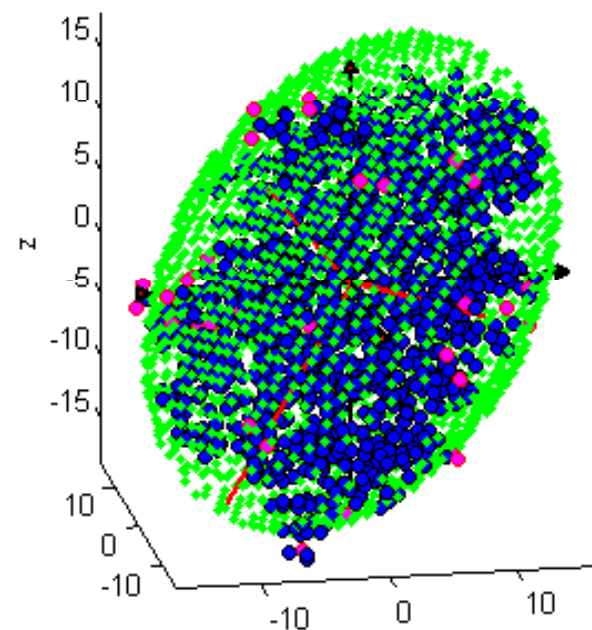
Аппроксимация цитохрома f и Pc эллипсоидами вращения для нахождения коэффициентов вязкого трения



Cyt f

$M = 27.9$ КДа

$a=47$ Å, $b=17$ Å



Pc

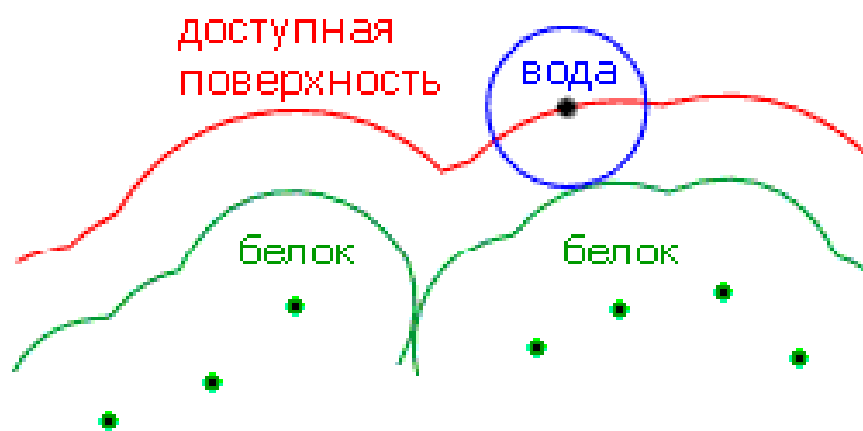
$M = 10.5$ КДа

$a=21$ Å, $b=14$ Å

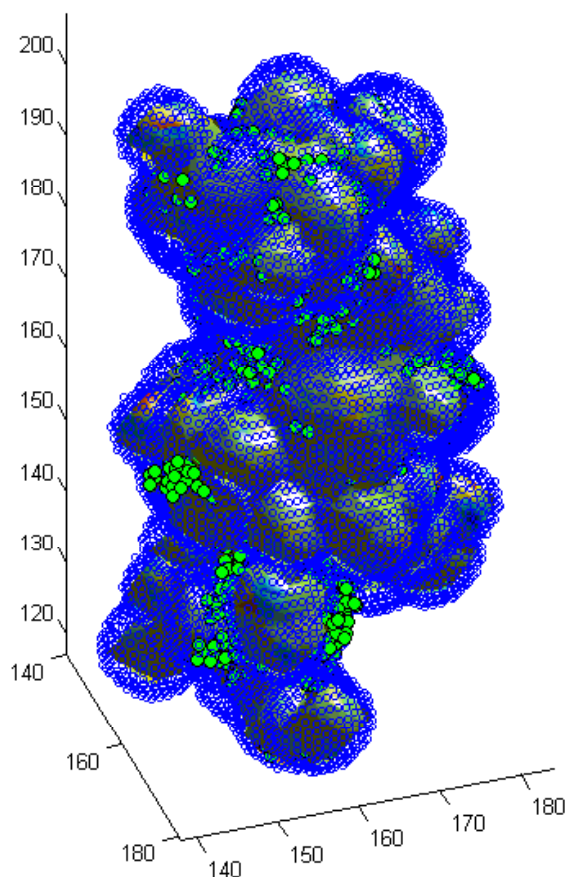
Молекулярная масса

Оси эллипсоида вращения

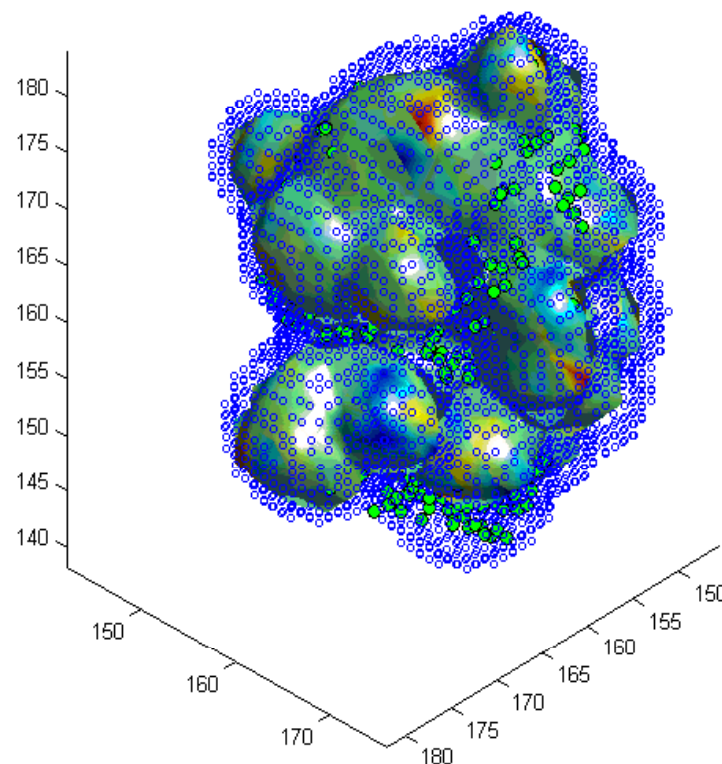
Моделирование поверхности белка



Аппроксимация R_s и σ_{eff} набором сфер для моделирования столкновений



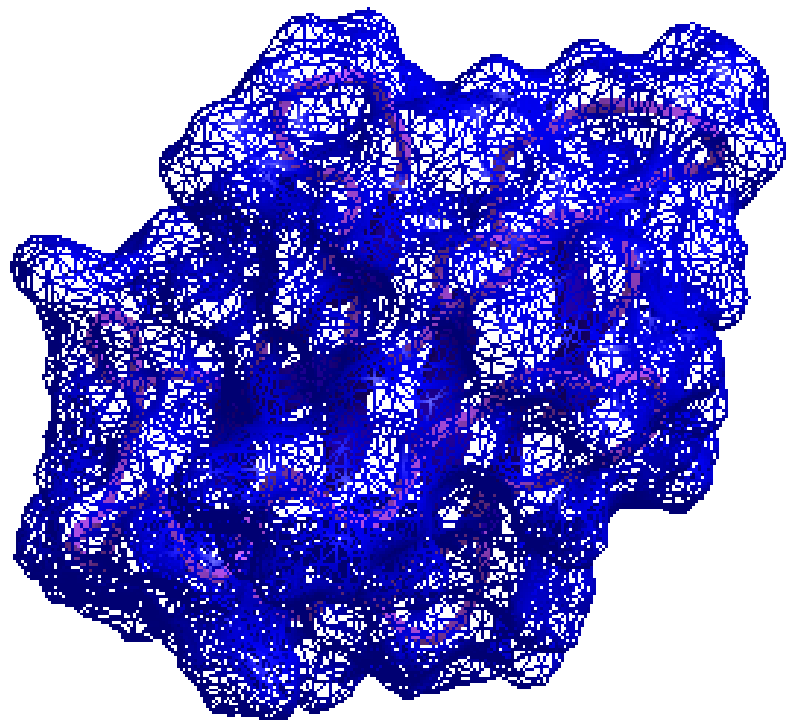
Цитохром f



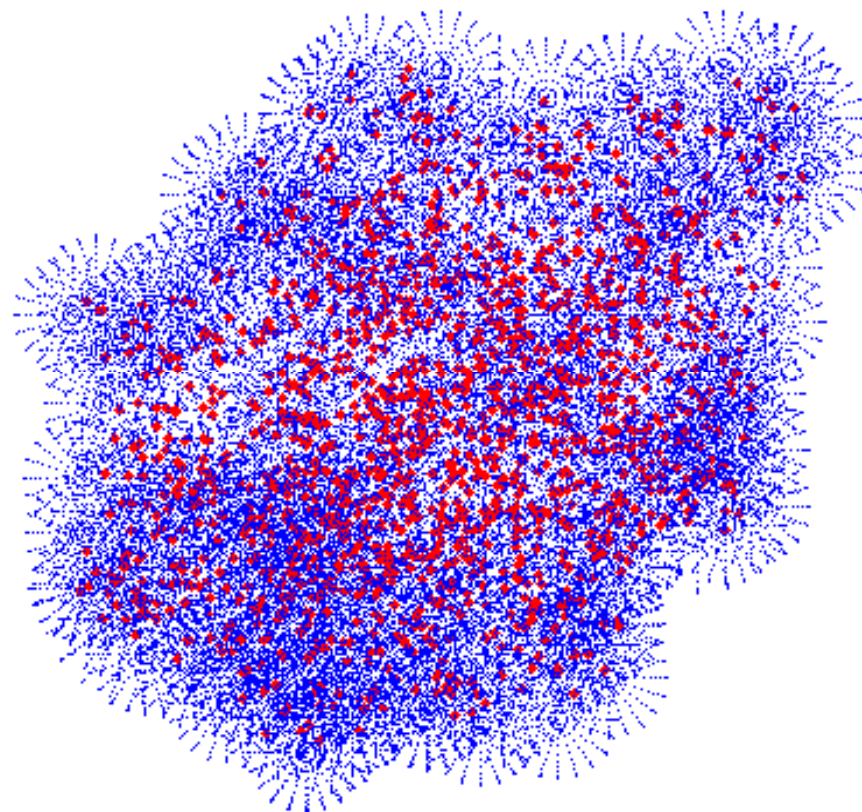
Пластоцианин

Молекулы показаны зеленым, сферы показаны синим

Аппроксимация поверхности P_c

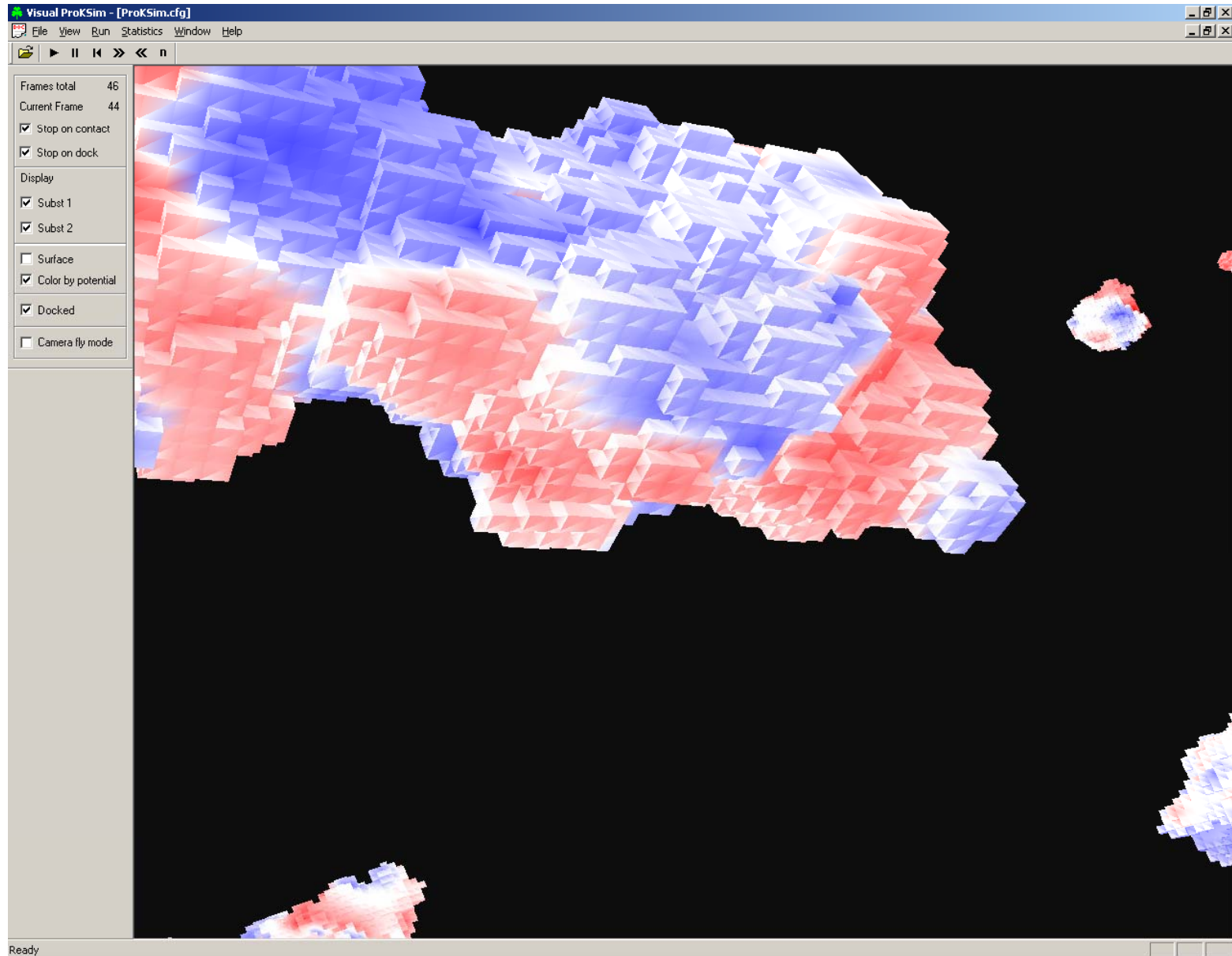


триангуляция



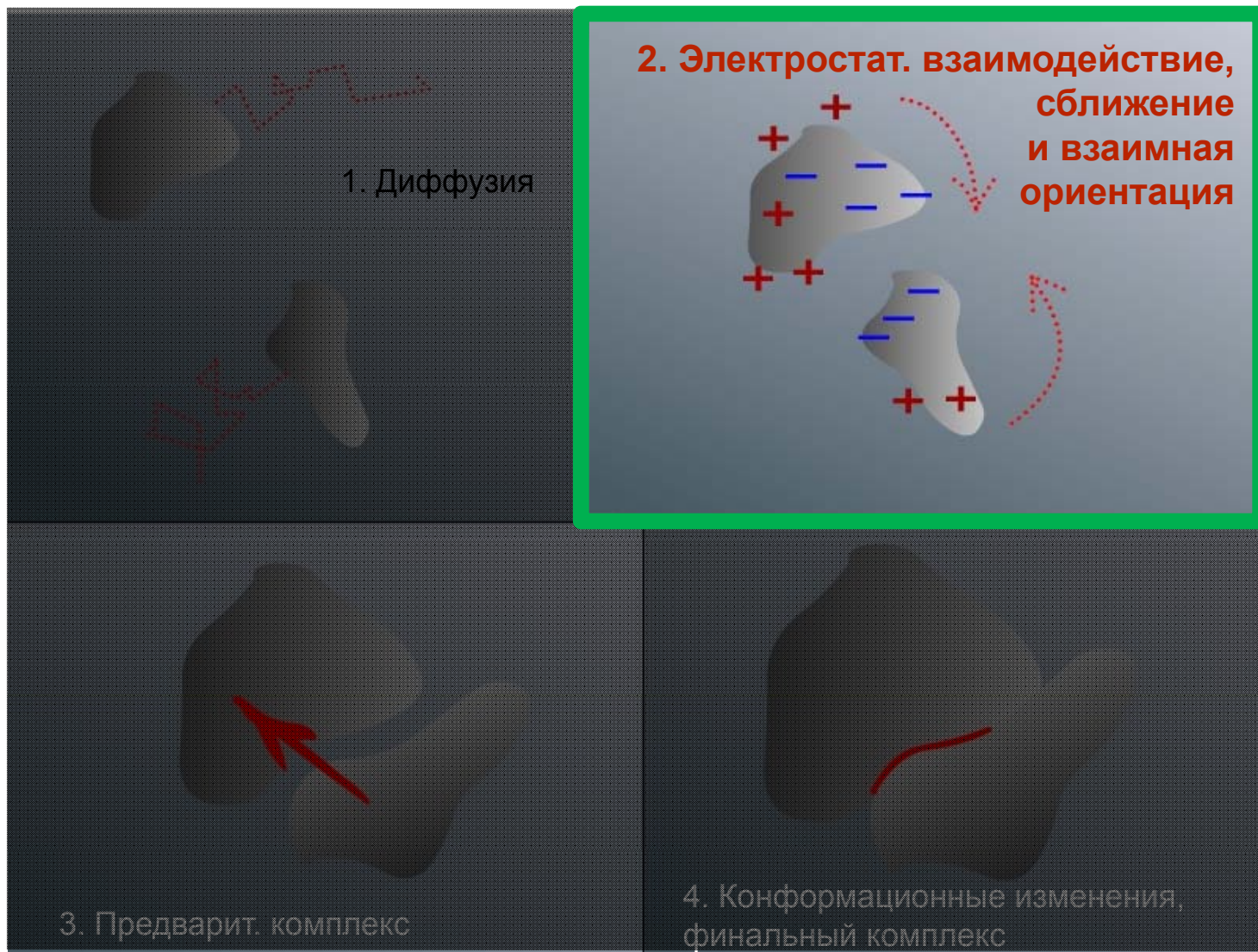
набор сфер

Аппроксимация поверхности ячейками (программа ProKSim)



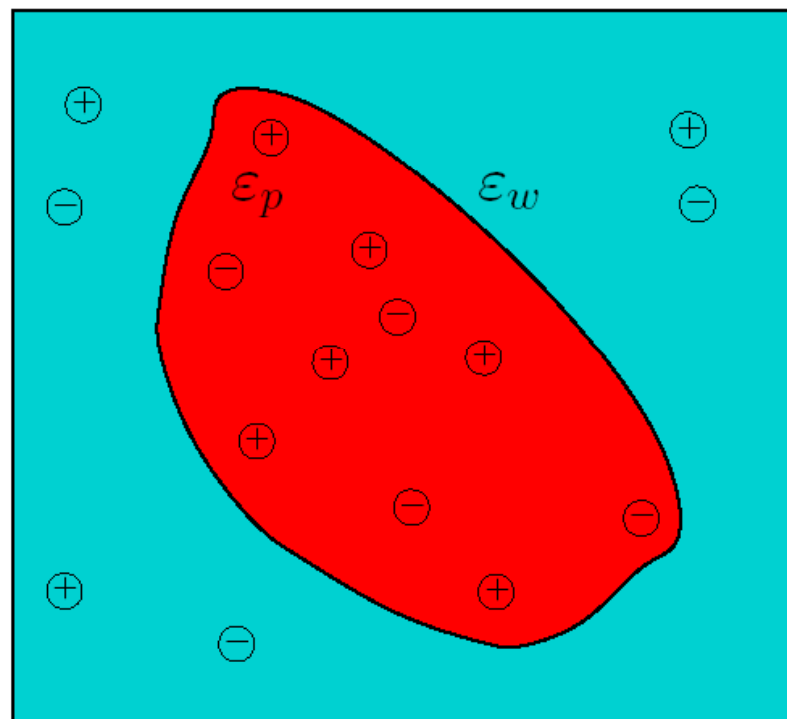
Взаимодействие белков:

электростатические взаимодействия



Электростатическая модель

- Белки представлены как области с низкой диэлектрической проницаемостью
- Раствор представлен как область с высокой диэлектрической проницаемостью с зарядами (ионами)
- Белки рассматриваются как твердые тела



Расчет потенциала по уравнению Пуассона-Больцмана

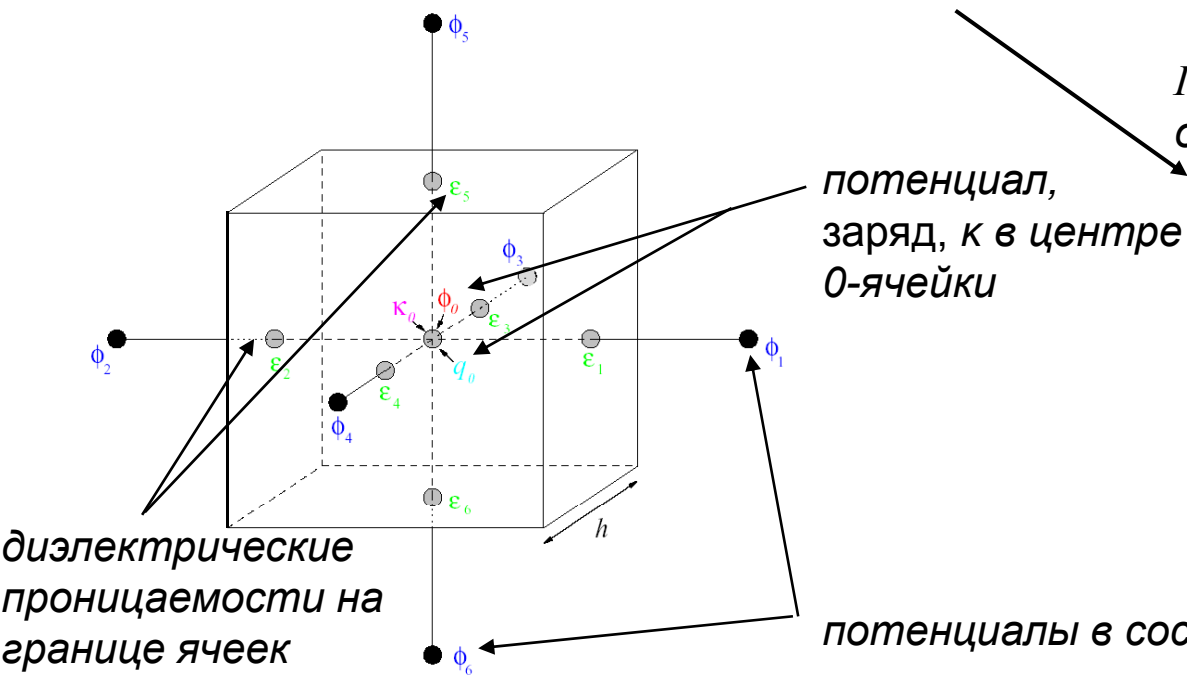
$$\nabla [\varepsilon(\mathbf{r})\nabla\phi(\mathbf{r})] = -4\pi \left(\rho_{prot}(\mathbf{r}) + \sum_{i=1}^K c_i^{bulk} Z_i e \cdot \exp \left(\frac{-Z_i e \cdot \phi(\mathbf{r})}{RT} \right) \right)$$

ϕ – потенциал, ε – диэлектрическая проницаемость, ρ_{prot} – плотность зарядов в белке, c_i^{bulk} – концентрация i -иона в растворе, Z_i – заряд i -иона, e – заряд электрона, R – молярная газовая постоянная, T – температура в К

Линеаризованное уравнение Пуассона-Больцмана

$$\nabla [\varepsilon(\mathbf{r})\nabla\phi(\mathbf{r})] = -4\pi\rho_{prot}(\mathbf{r}) + \bar{\kappa}^2(\mathbf{r})\phi(\mathbf{r}) \quad I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^K c_i^{bulk} Z_i^2; \quad \bar{\kappa}^2 = \frac{8\pi N_A e^2 I}{k_B T}$$

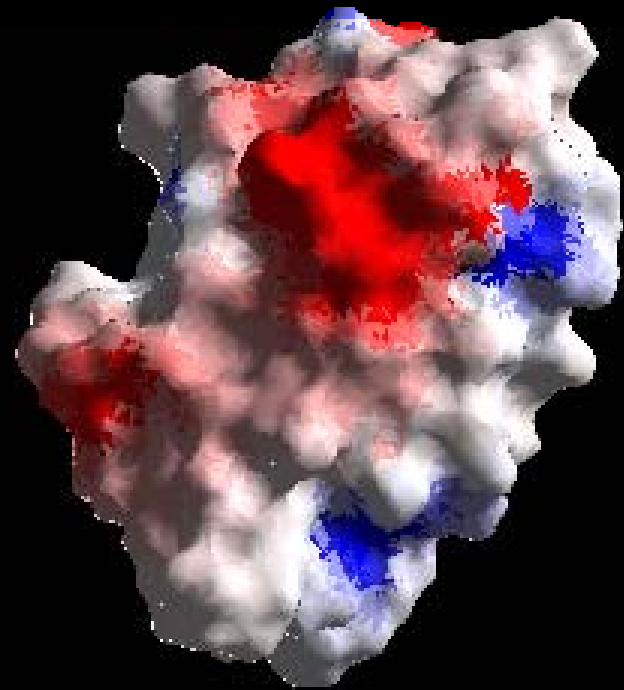
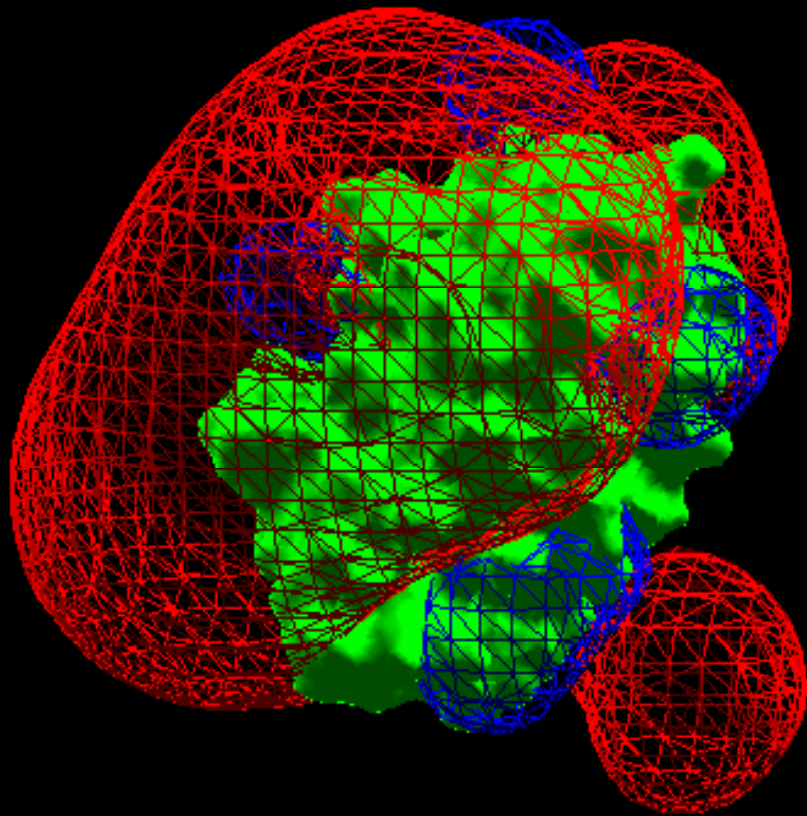
I – ионная сила, $\bar{\kappa}$ – величина, обратная длине экранирования



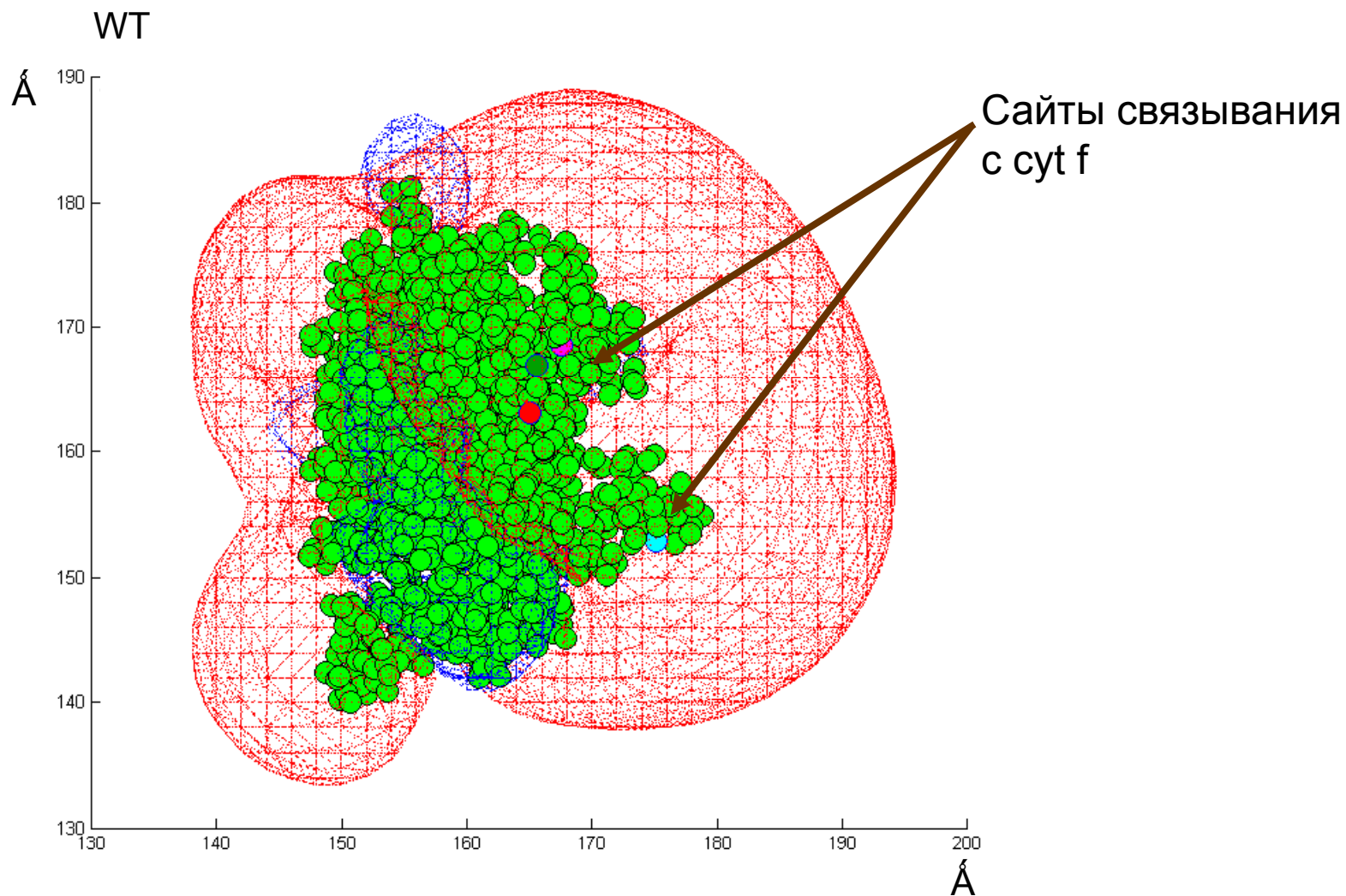
$$\phi_0 = \frac{\left(\sum_{i=1}^6 h \varepsilon_i \phi_i \right) + 4\pi q_0}{\left(\sum_{i=1}^6 h \varepsilon_i \right) + h^3 \bar{\kappa}_0^2}$$

из G. M. Ullmann (2004)

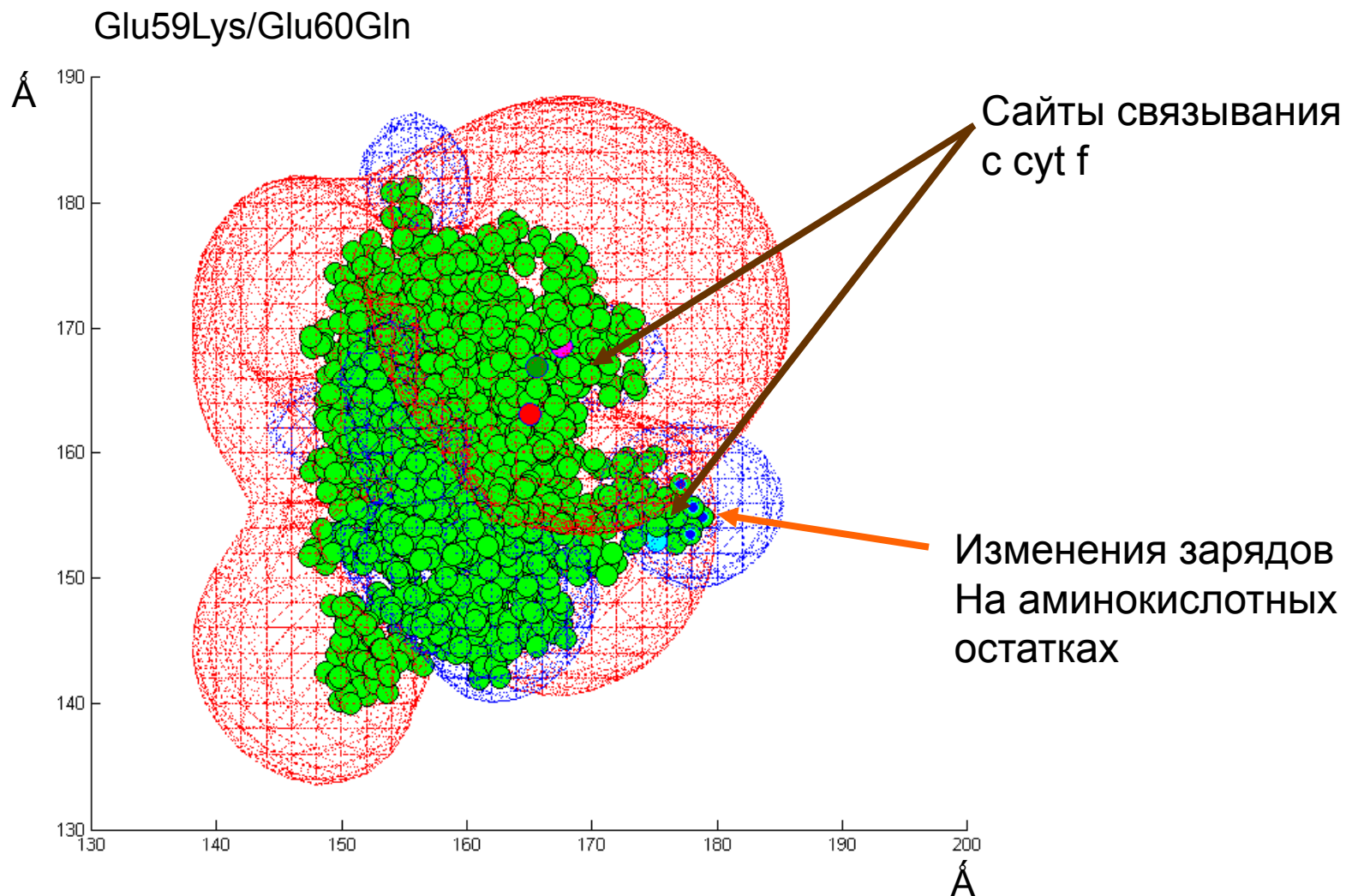
Электростатический поверхностный потенциал
(справа) эквипотенциальные поверхности
(слева) (10мВ) белка пластоцианина, рН=7,
I=100 mM



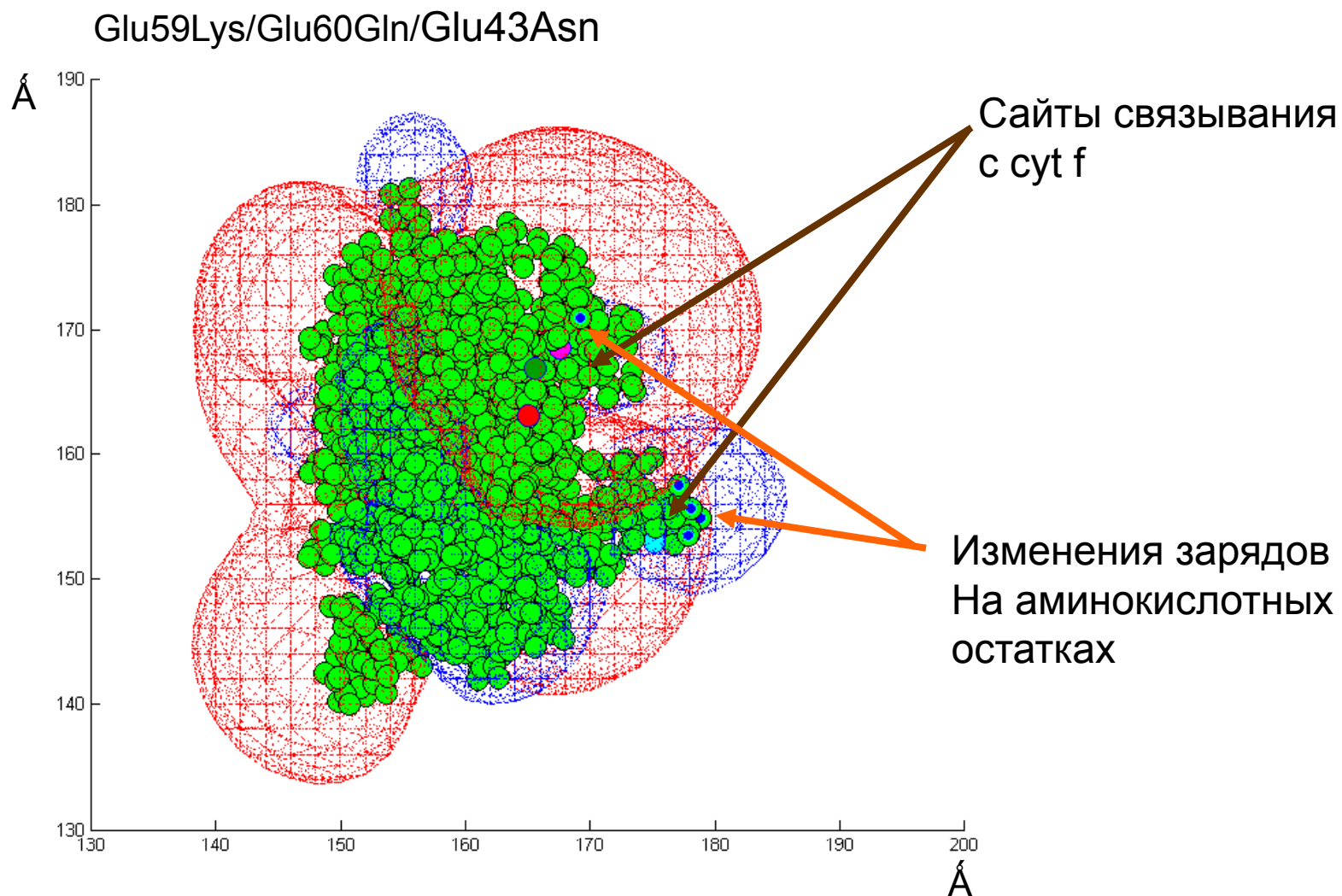
Изменение потенциала ρ_s при мутациях



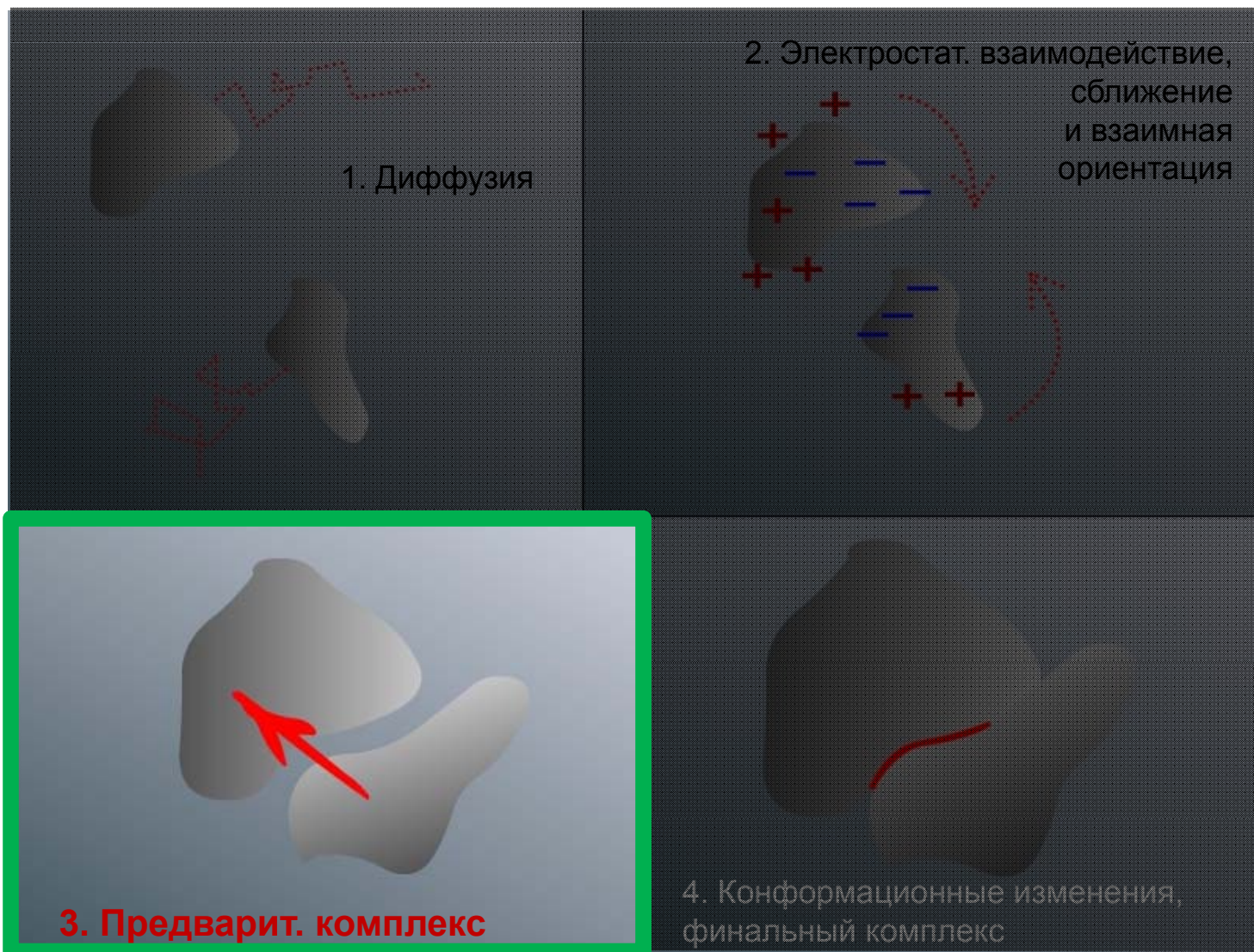
Изменение потенциала Ψ при мутациях



Изменение потенциала Ψ при мутациях



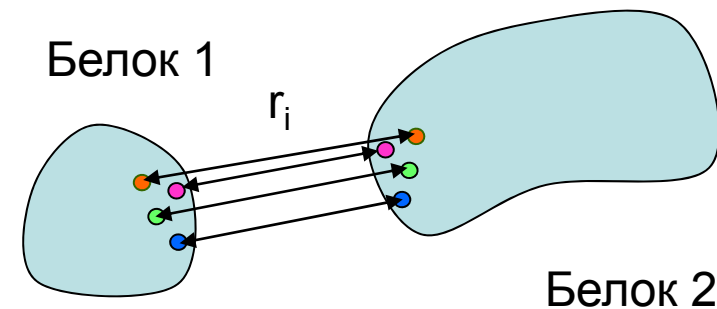
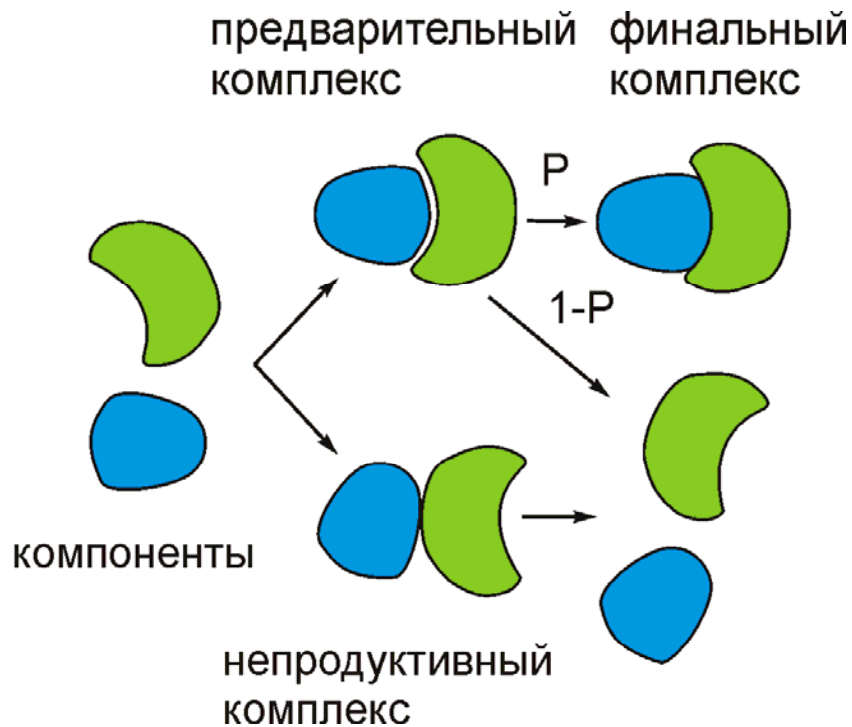
Взаимодействие белков: *предварительный комплекс*



Предварительный комплекс

(переходное состояние, которое быстро переходит в финальный комплекс)

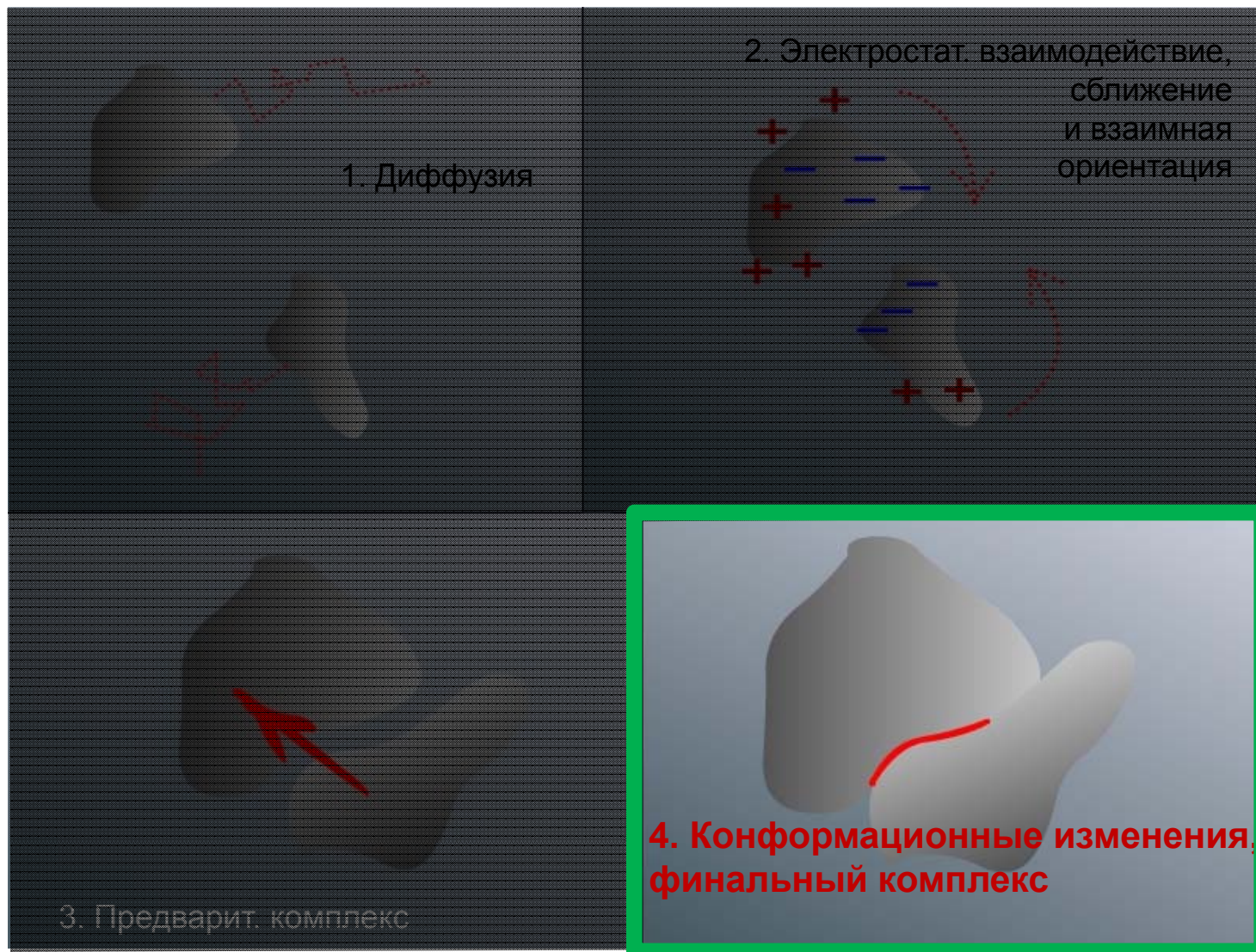
- Заряды на поверхности
- Подвижность аминокислотных остатков на поверхности белков



(Kleanthous, 2000)

Взаимодействие белков:

финальный комплекс



Вычисление константы скорости реакции белков

Реакция, которую мы моделировали:

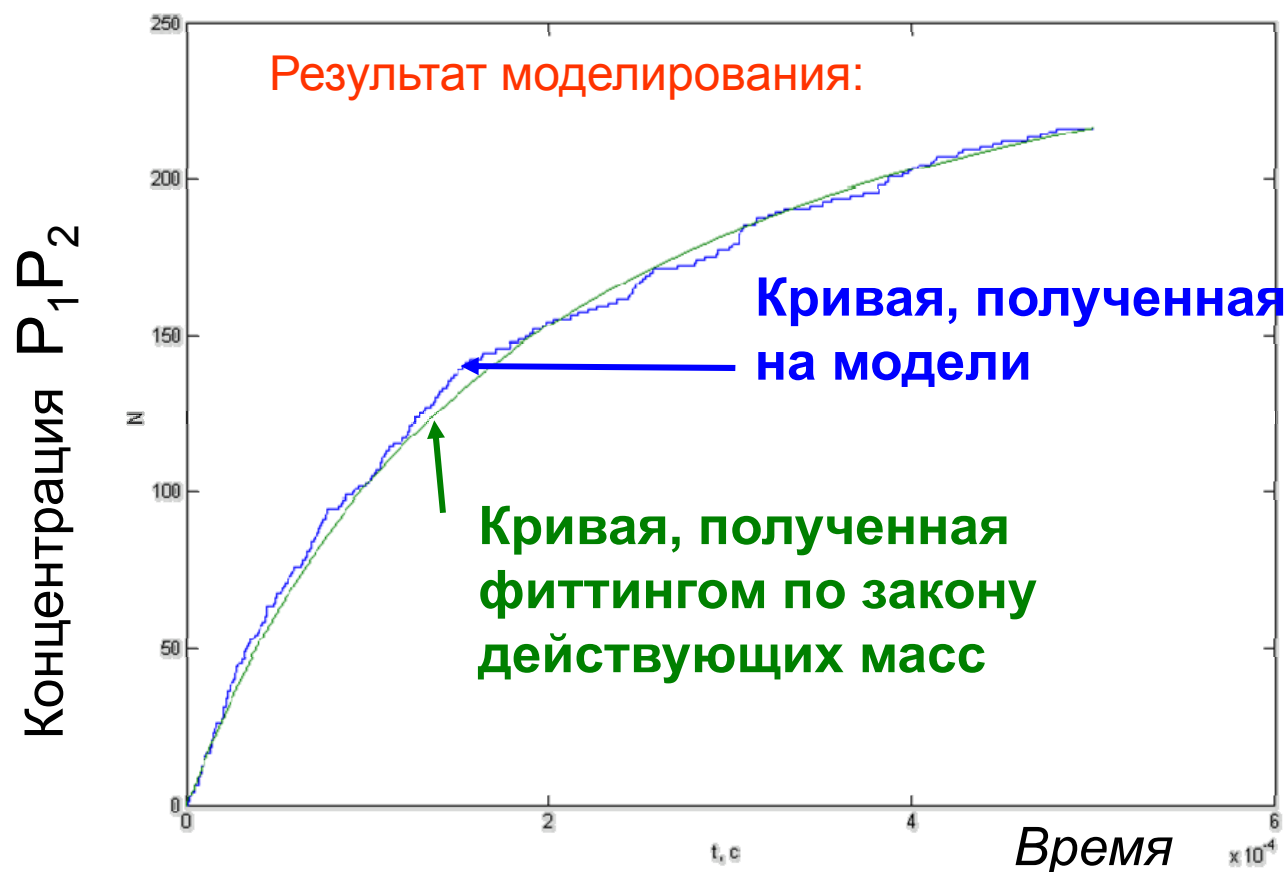


Reaction velocity:

$$V = k[P_1][P_2]$$

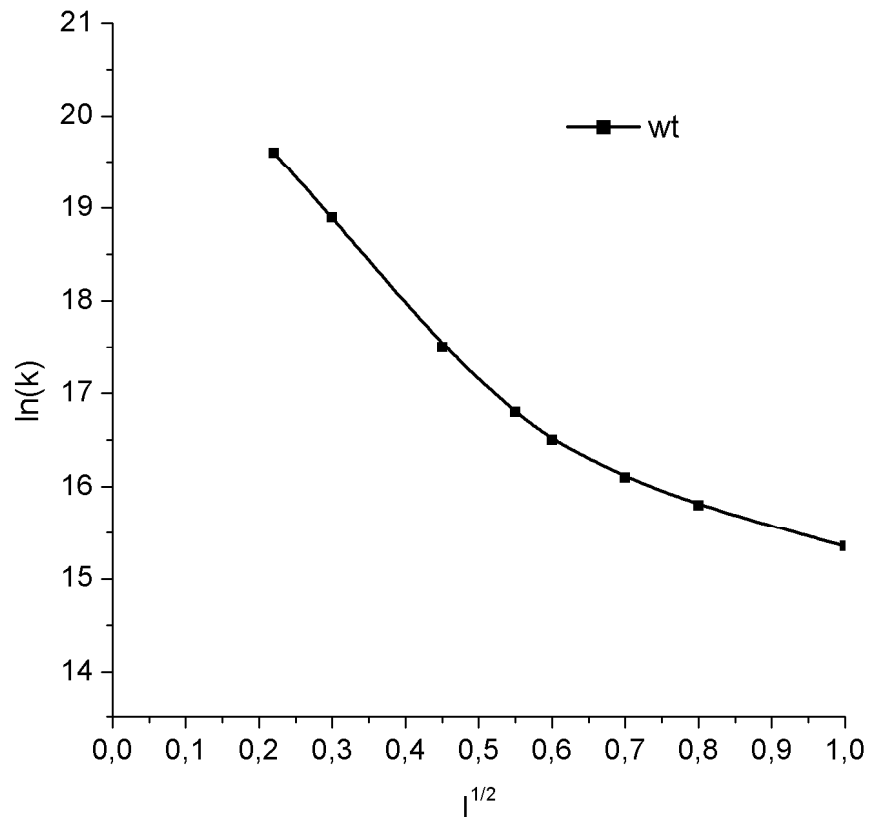
Определение k фиттингом

$$[P_1](t) = [P_1^0] - \frac{[P_1^0]}{k[P_1^0]t + 1}$$

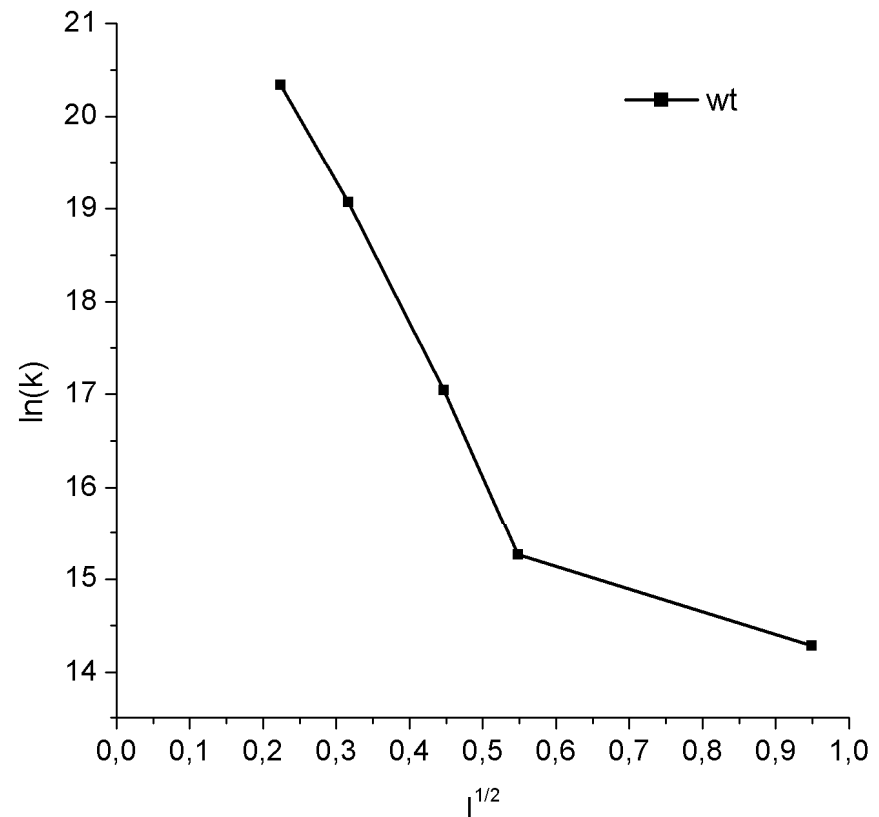


Реакция между сут f и разными мутантными P_c в растворе

экспериментальные данные
из A. Kannt et al. (1996)

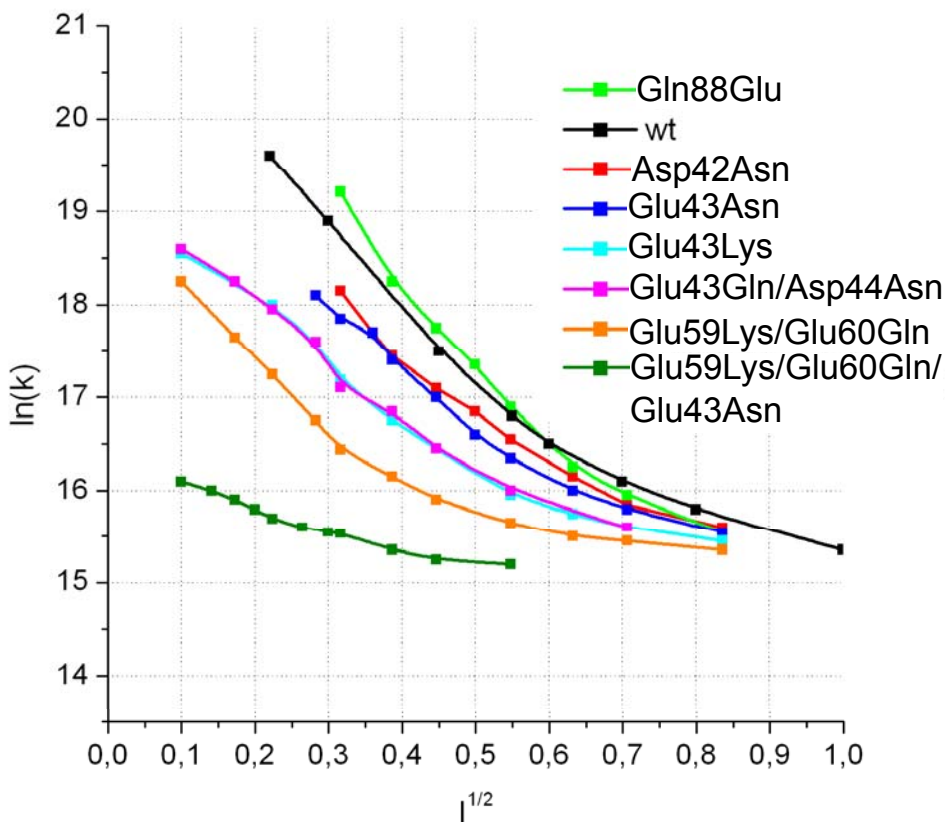


результаты моделирования
I.B. Kovalenko et al. *Phys. Biol.* 3 (2006), 121–129



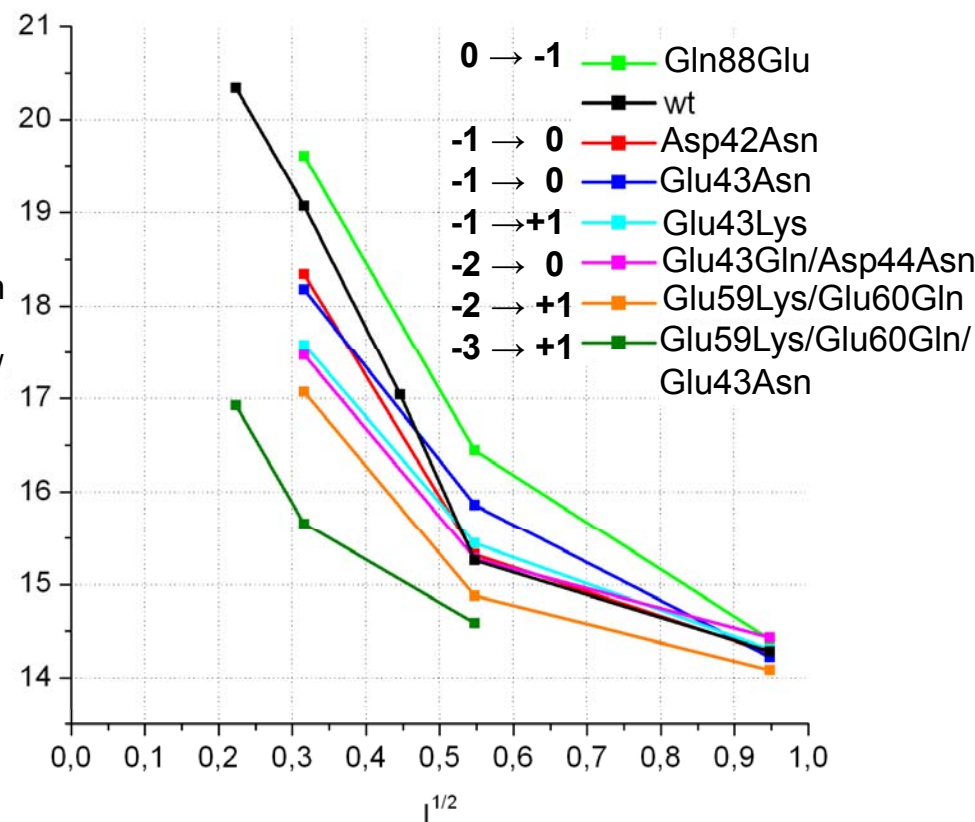
Реакция между сут f и разными мутантными P_c в растворе

экспериментальные данные
из A. Kannt et al. (1996)

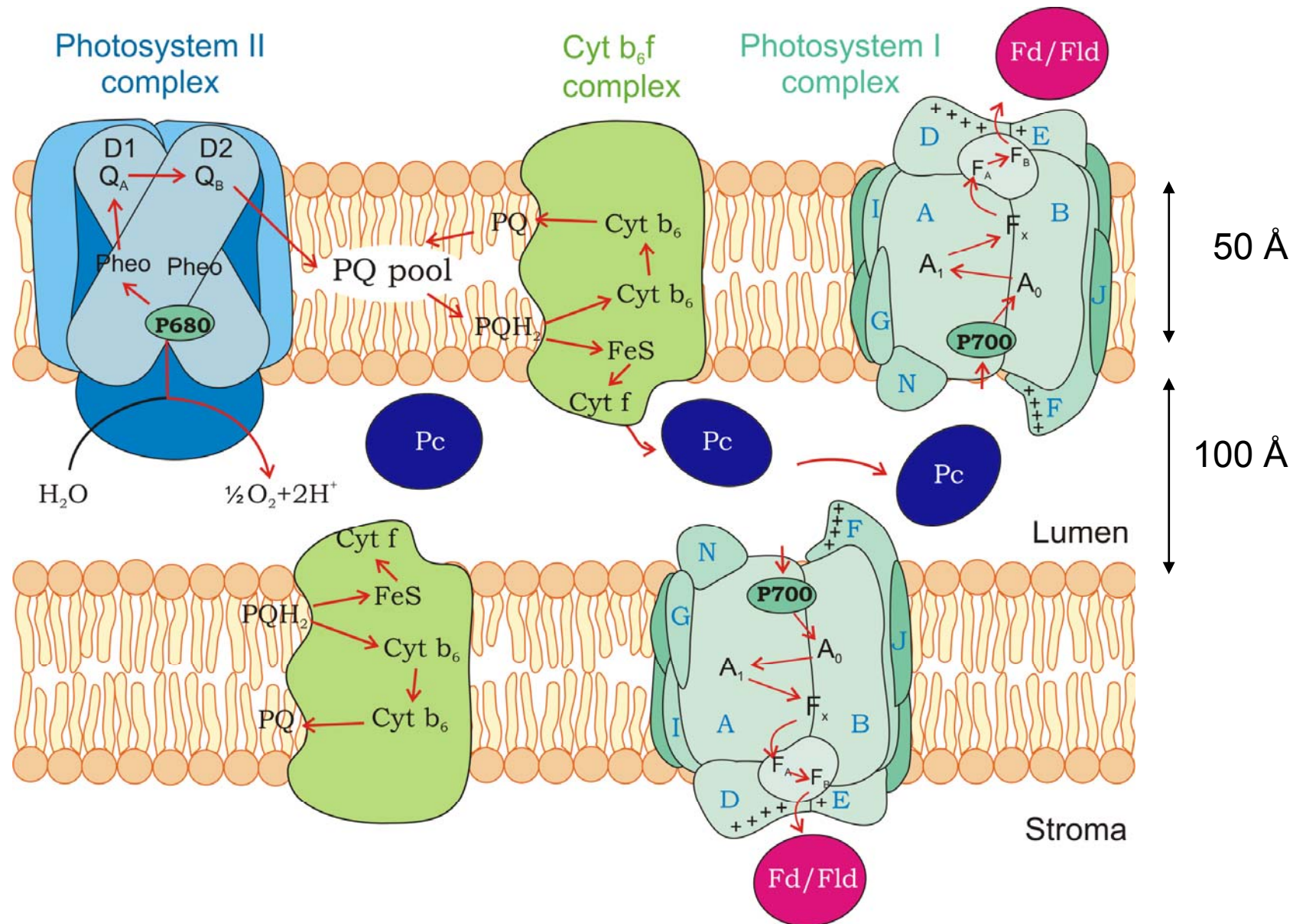


результаты моделирования

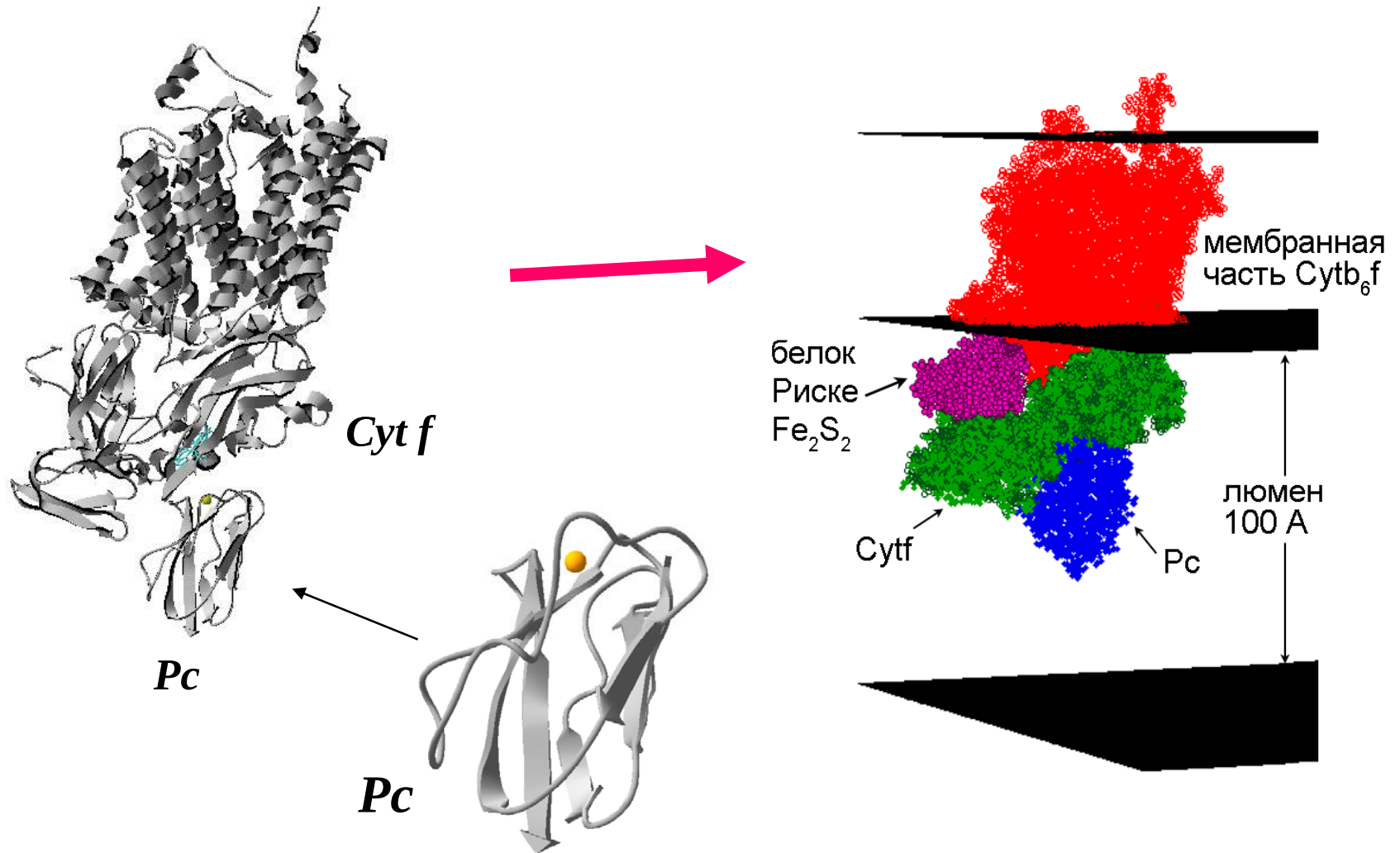
I.B. Kovalenko et al. *Phys. Biol.* 3 (2006), 121–129



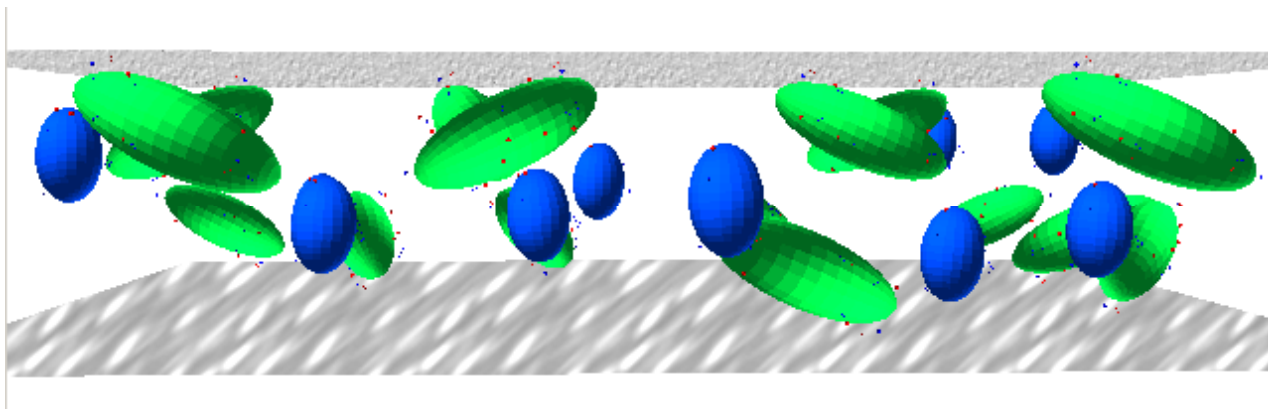
Фрагмент тилакоида: тилакоидная мембрана и люминальное пространство



Расположение $Cytb_6f$ комплекса в мембране и связывание с его субъединицей f (сyt f) белка-подвижного переносчика пластоцианина (Pc)



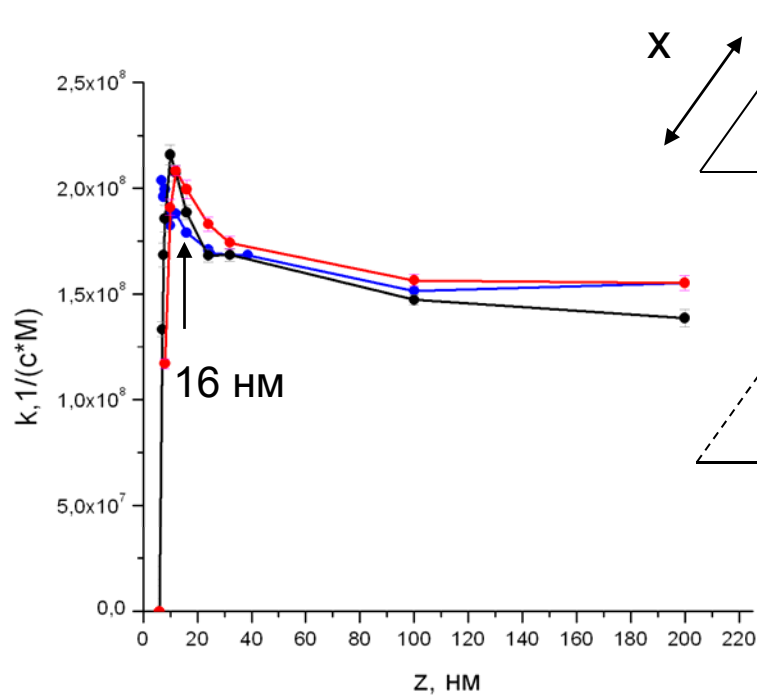
PDB ID – 2PCF; 1Q90



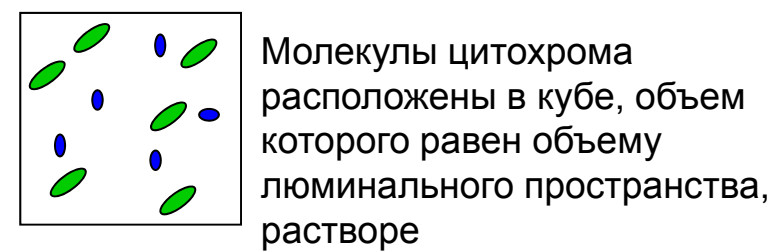
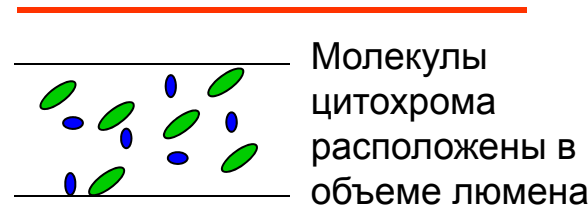
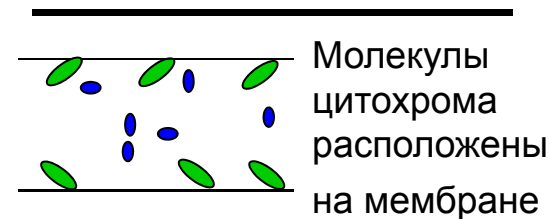
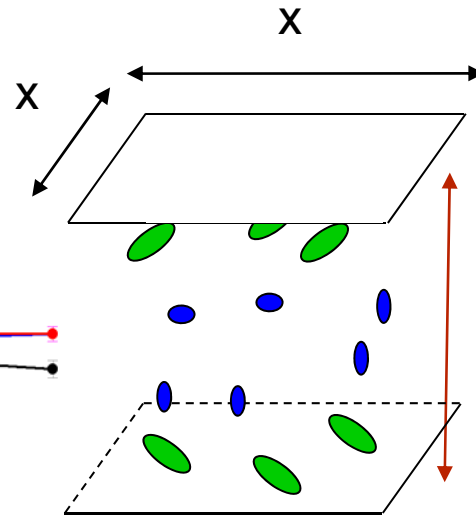
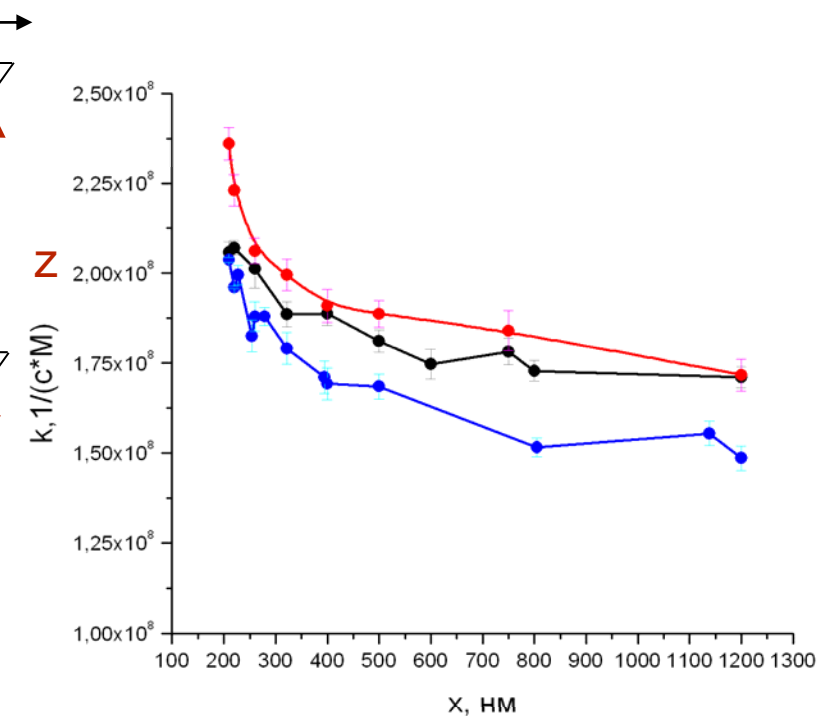
Визуализация люмена, ограниченного сверху и снизу тилакоидными мембранами (заштрихованы) и белков пластоцианина и цитохрома f.

Зависимость константы скорости реакции между P_c и $cytf$ в люмене тилакоида при постоянном количестве молекул P_c и $cytf$

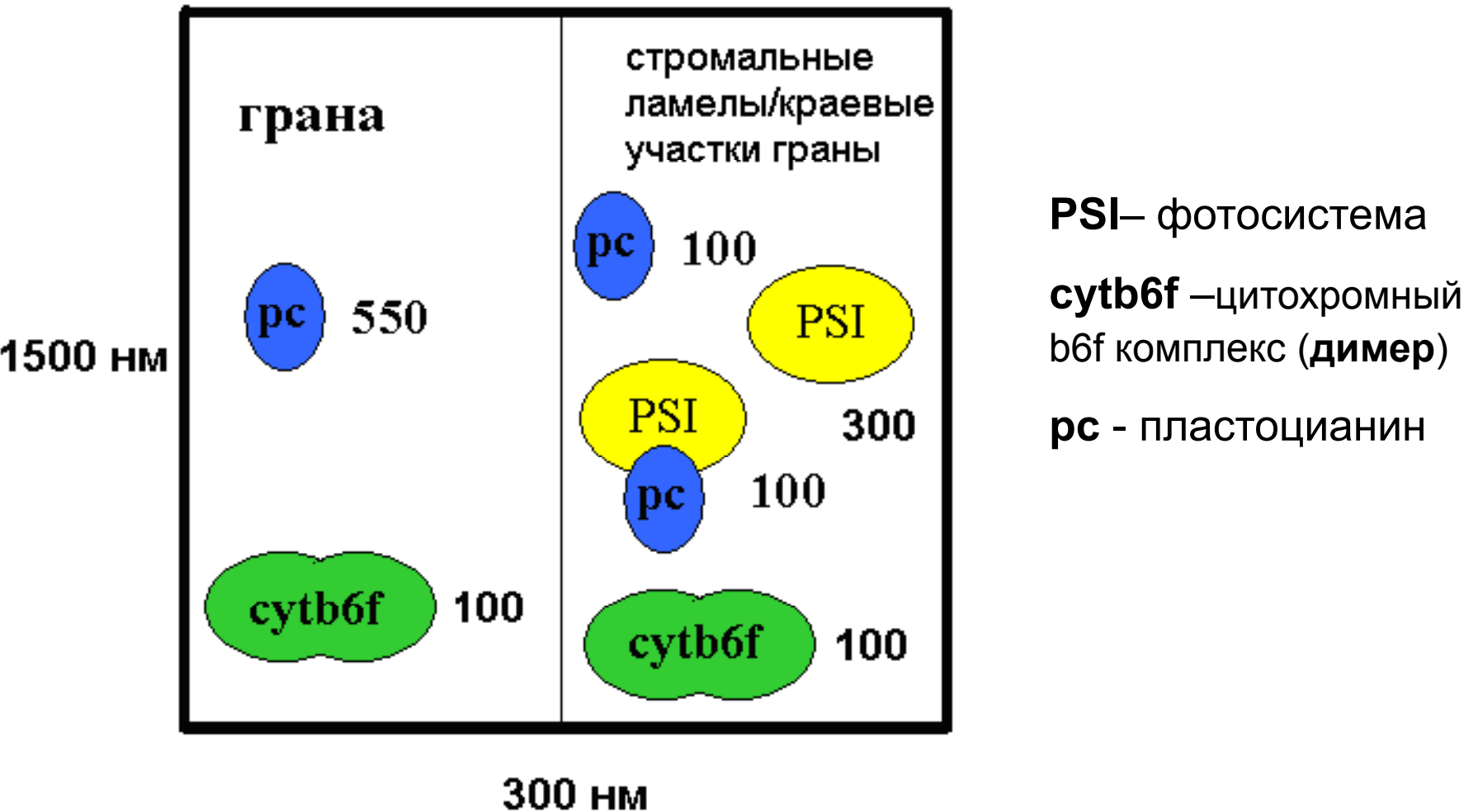
от расстояния между мембранами
(площадь мембран постоянна
 $=322 \times 322 \text{ нм}^2$)



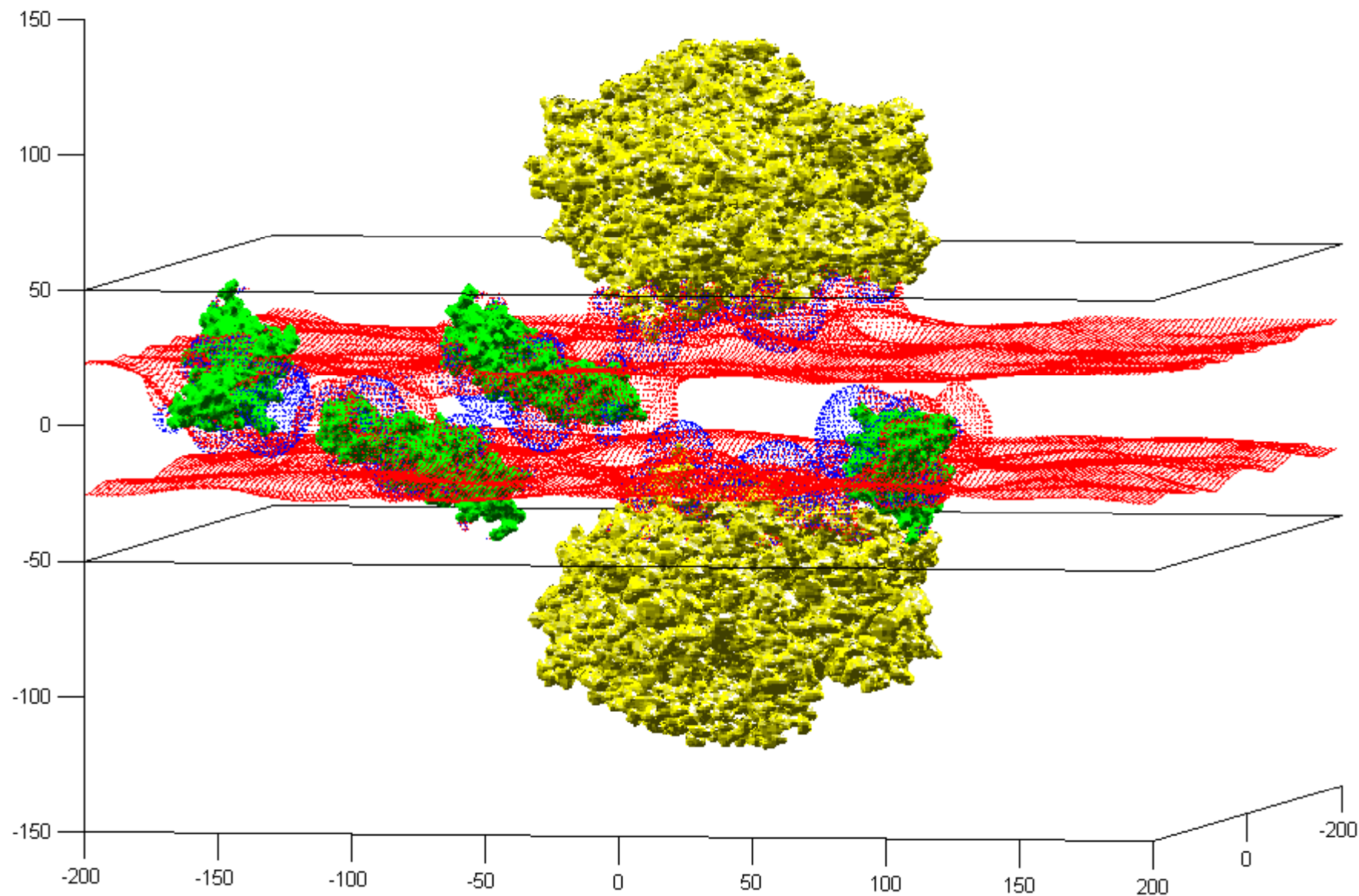
от длины мембраны (корня из площади мембраны) при постоянном расстоянии между мембранами 16 нм



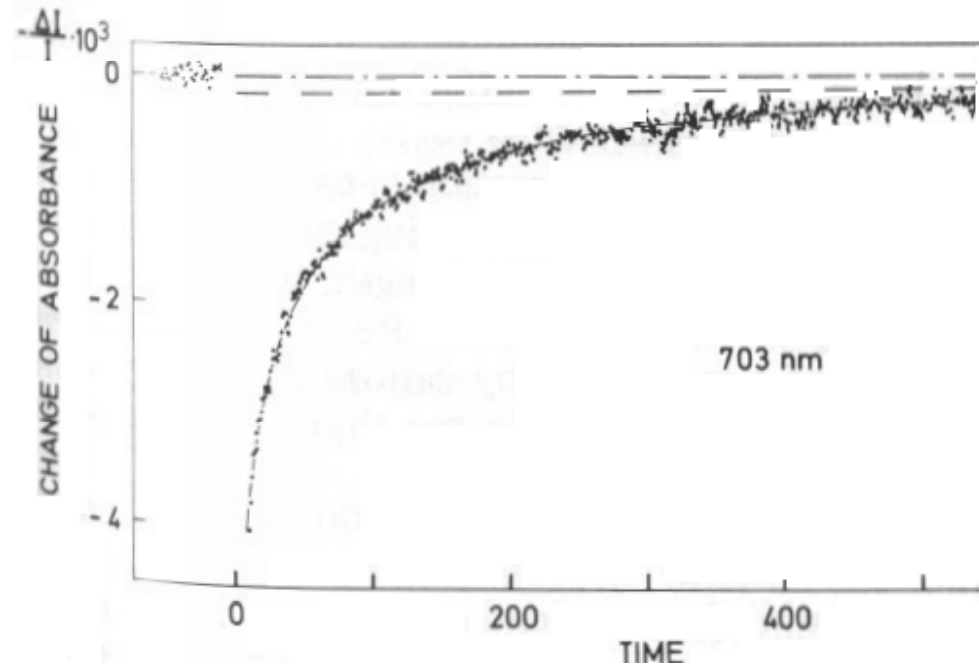
Модельная сцена (схема)



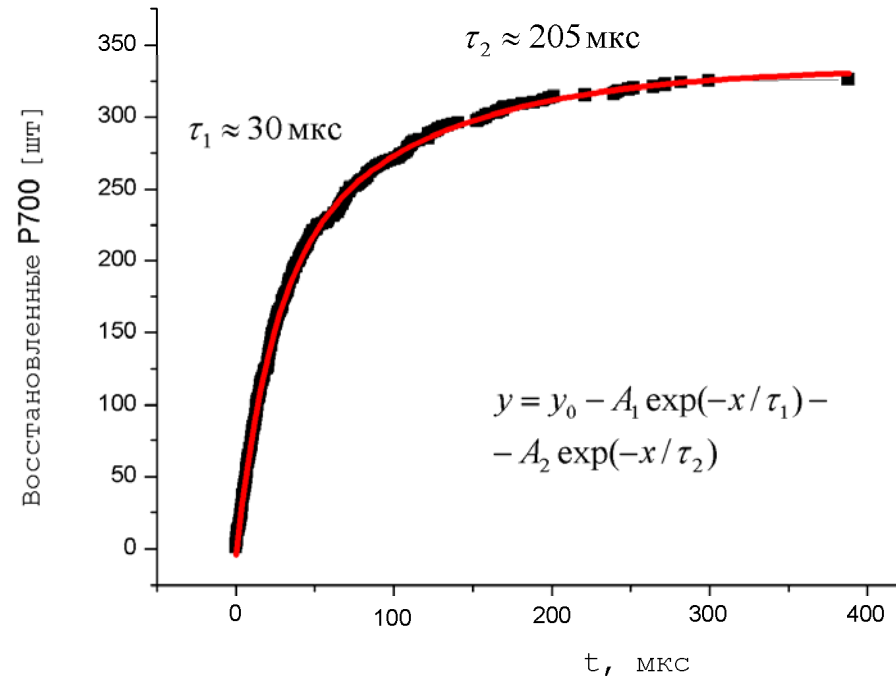
Эквипотенциальные поверхности (6.5 mV) в люмене тилакоида хлоропласта, pH=7, I=100 mM



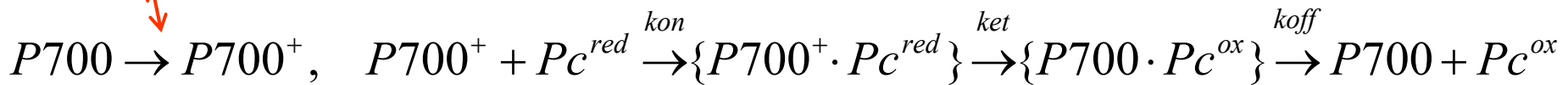
Восстановление фотосистемы I после короткой вспышки света



$\tau_1 \sim 25\text{--}33 \text{ мкс}$, $\tau_2 \sim 202\text{--}332 \text{ мкс}$
(Haehnel 1980)

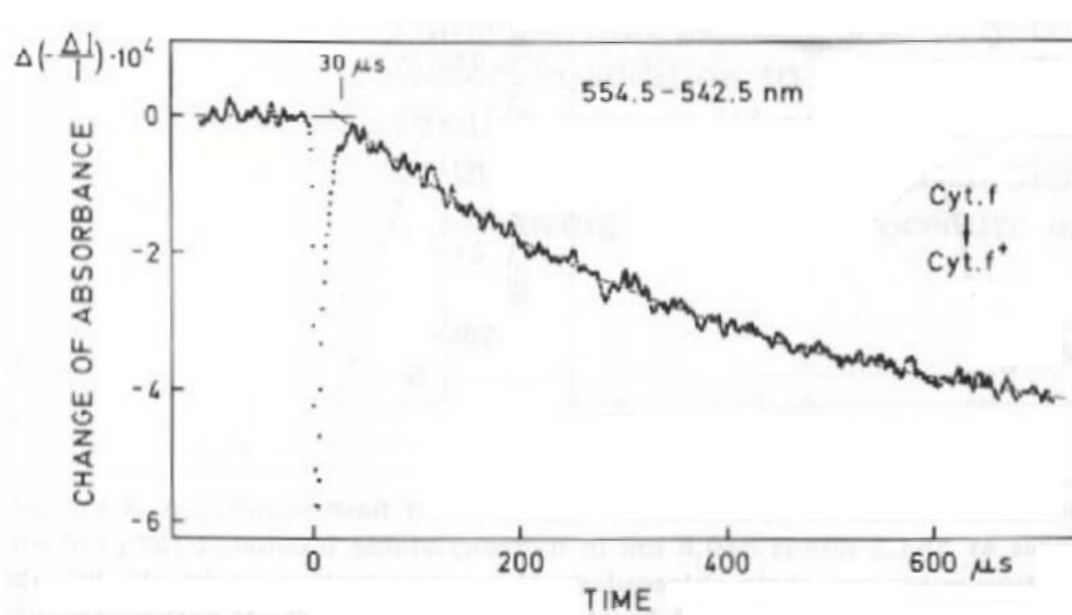


$\tau_1 \sim 30 \text{ мкс}$, $\tau_2 \sim 205 \text{ мкс}$
компьютерный эксперимент

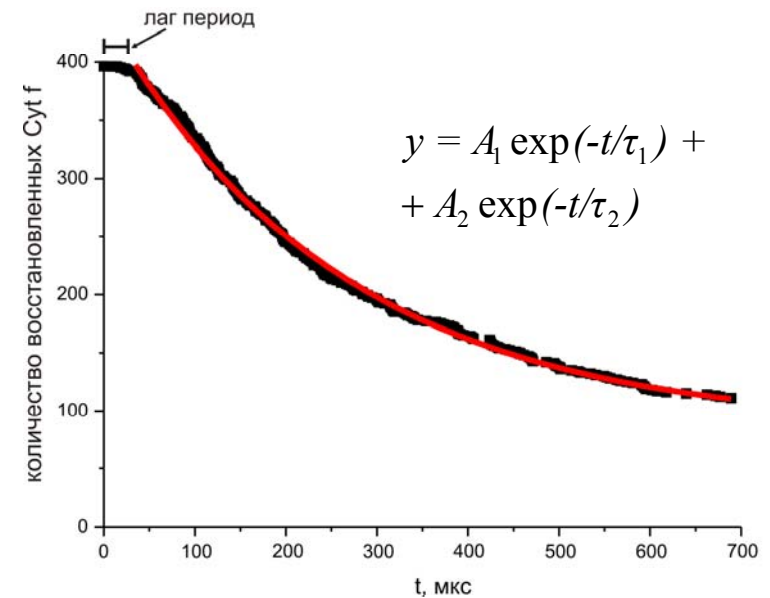


$k_{et} = 8 \cdot 10^3 \text{ [1/c]}$, $k_{off} = 58 \cdot 10^3 \text{ [1/c]}$ (Drepper 1996)

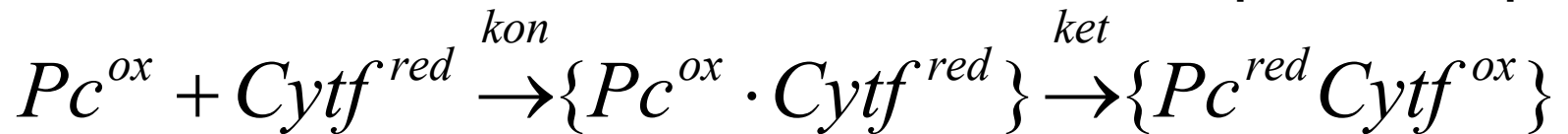
Окисление цитохрома f после короткой вспышки света



$\tau_1 \sim 101\text{--}190$ мкс, $\tau_2 \sim 635\text{--}1240$ мкс,
лаг-период 30–50 мкс (Haehnel 1980)



$\tau_1 \sim 241$ мкс, $\tau_2 \sim 1030$ мкс,
лаг-период 25-30 мкс
компьютерный эксперимент



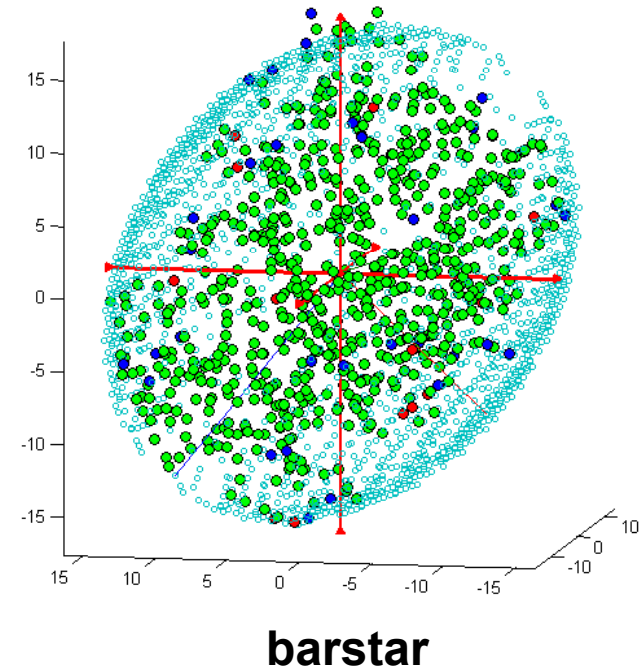
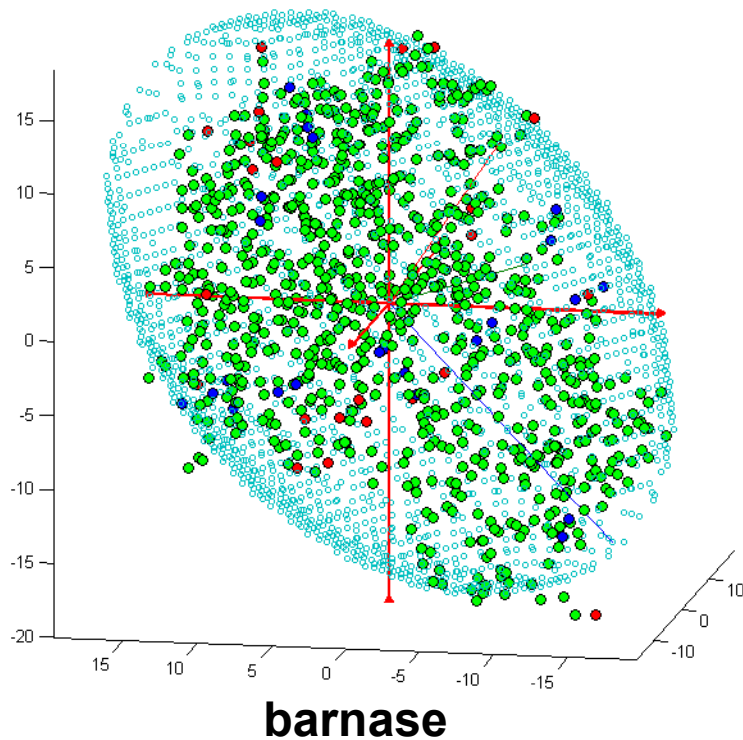
$$k_{et} = 26 \cdot 10^3 \text{ [1/c] (Hope 2000)}$$

Предсказание областей связывания белковых молекул

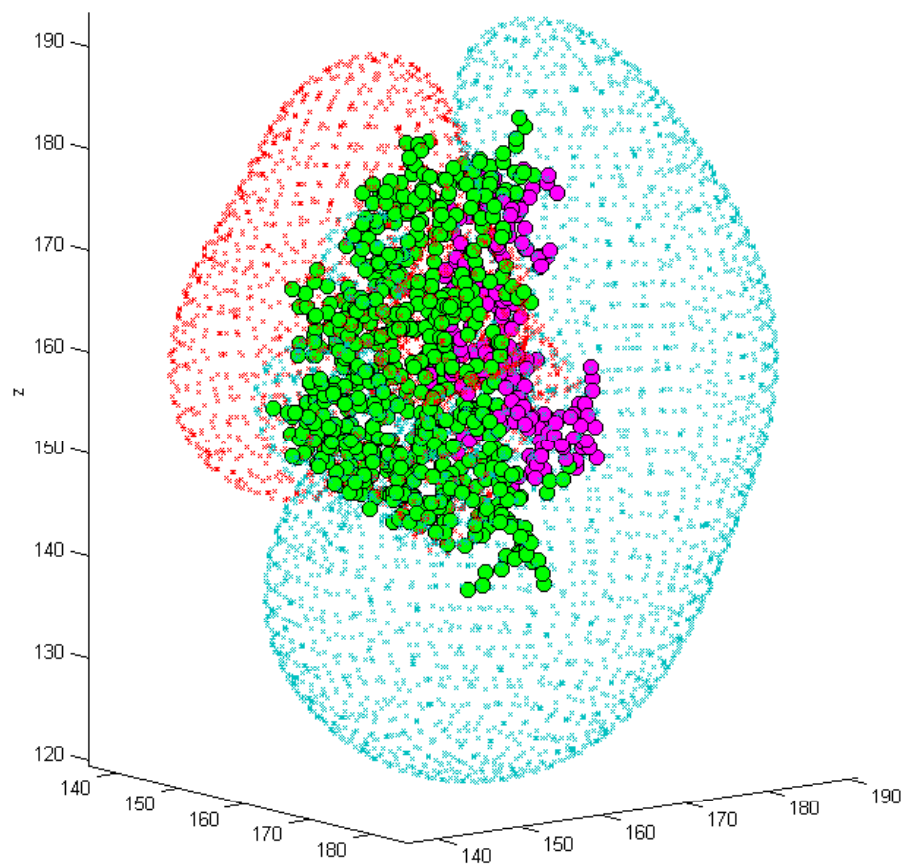
Tested protein pairs

First protein	Second protein	Type of surface	Type of potent
Barnase +	Barstar +	Non-uni/Uniform	Non-uni/Non-uni
Colicin E9 DNase +	Im9 +	Uniform/Non-uni	Non-uni/Non-uni
AChE +	fasciculin2 –	Uniform/Uniform	Non-uni/Uniform
Thrombin + -	Thrombomodulin +-	Uniform/Non-uni	Non-uni/Non-uni
Erythropoietin +	Epo receptor 1 st domen-	Non-uni/Non-uni	Non-uni/Non-uni
Erythropoietin +	Epo receptor 2 nd domen+	Non-uni/Non-uni	Non-uni/Non-uni
Colicin E3 RNase -	Im3 -	Non-uni/Non-uni	Non-uni/Uniform
Interleukin 4+	IL4Binding Protein+	Uniform/Non-uni	Uniform/Non-uni
Lipoprotein (pal)	Transport pro (tolB)	Uniform/Uniform	Non-uni/Non-uni
Plastocyanin+	Cytochrome f+	Non-uni/Non-uni	Non-uni/Non-uni

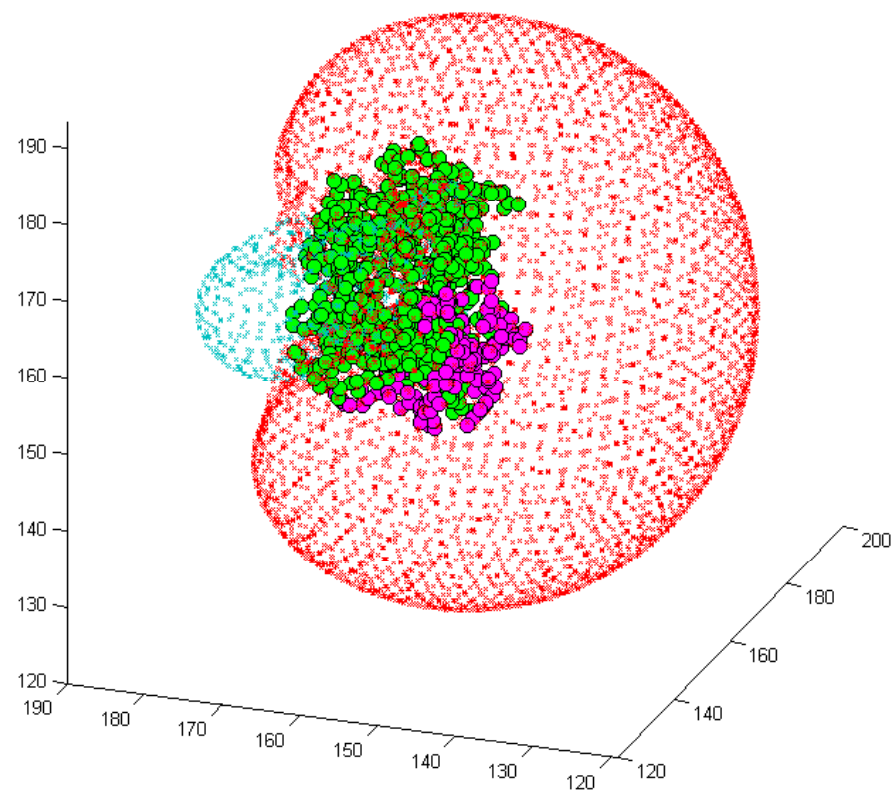
Approximation of the proteins barnase and barstar by ellipsoids for calculation of viscous friction coefficients



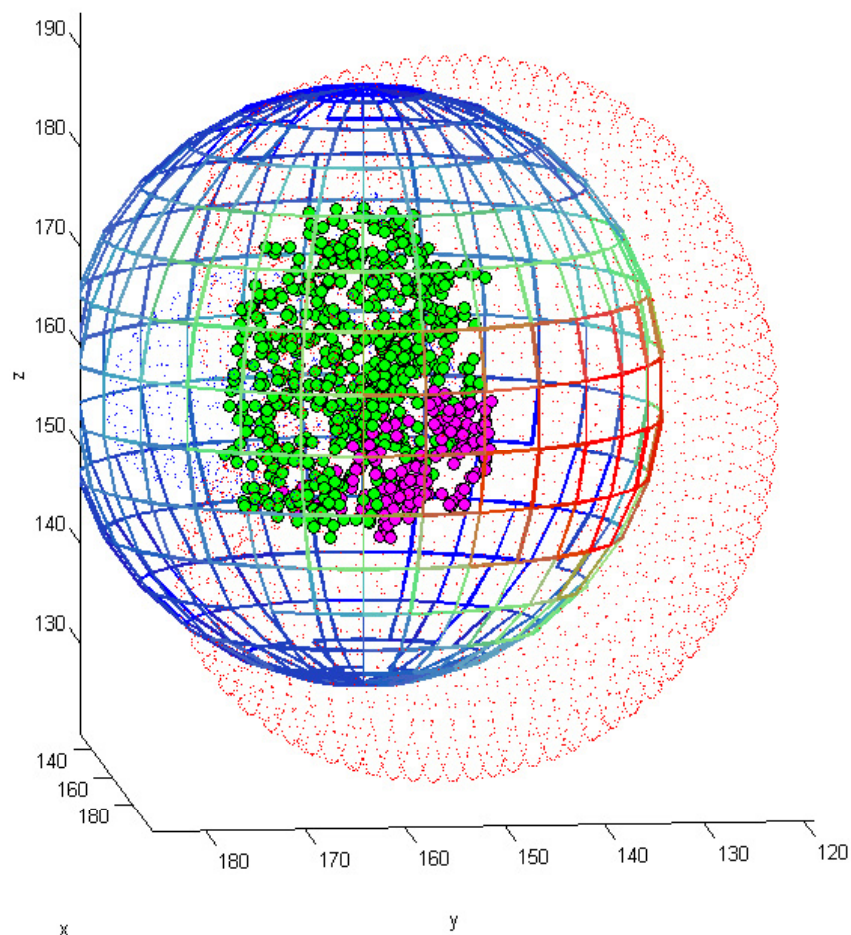
Electrostatic potential of barnase and barstar



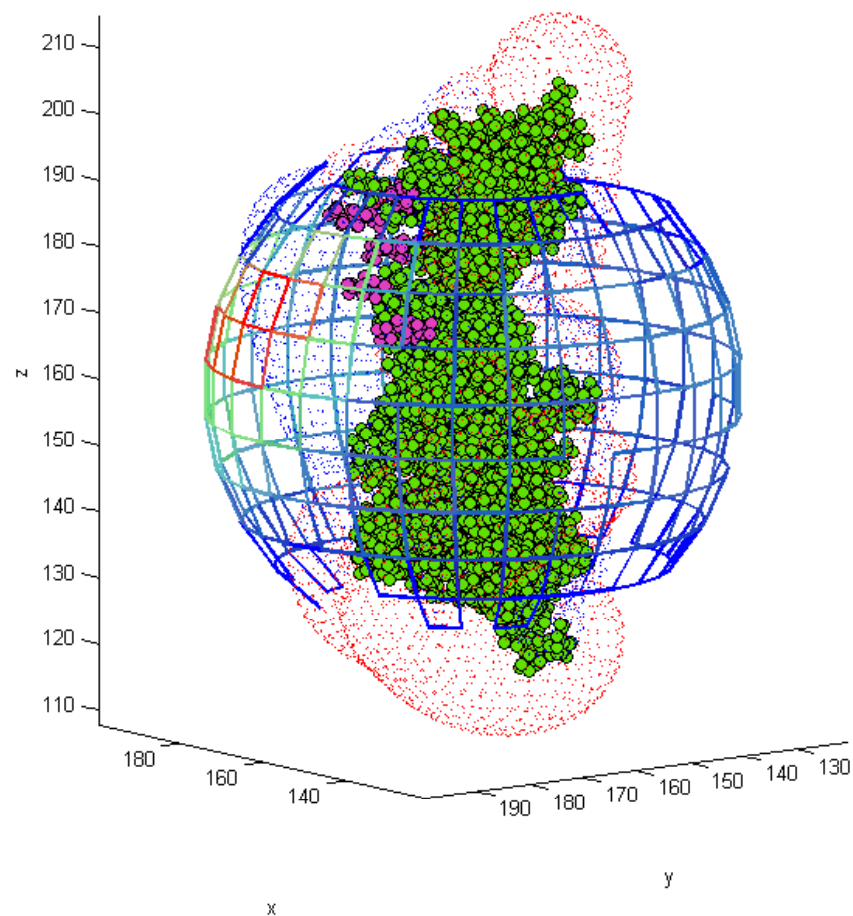
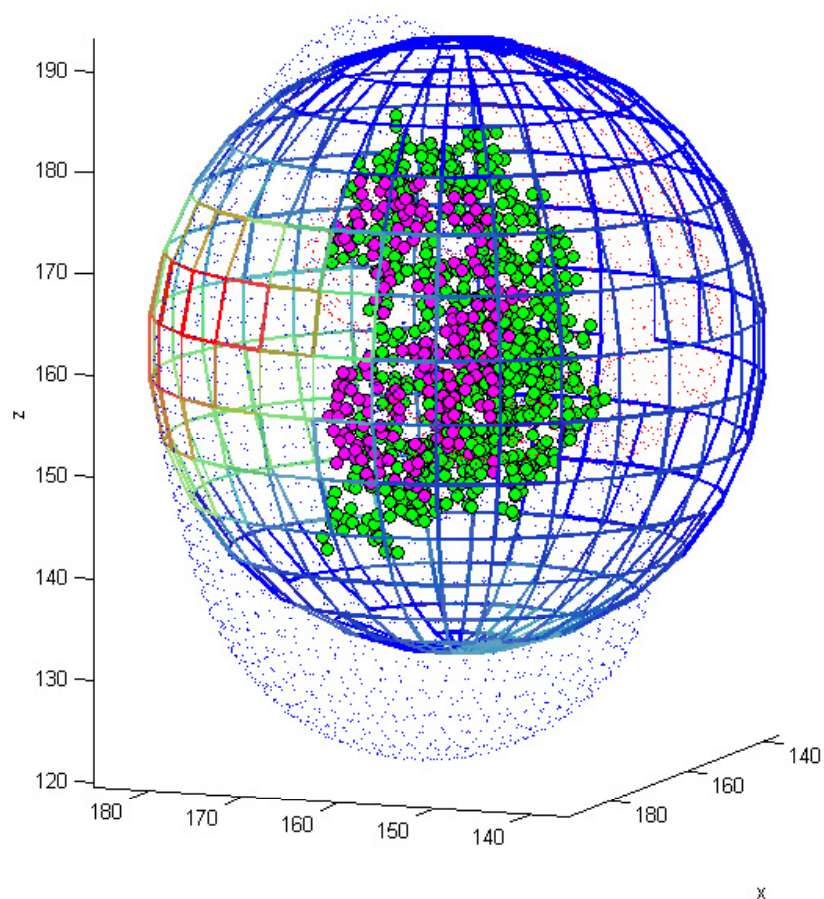
barnase



barstar



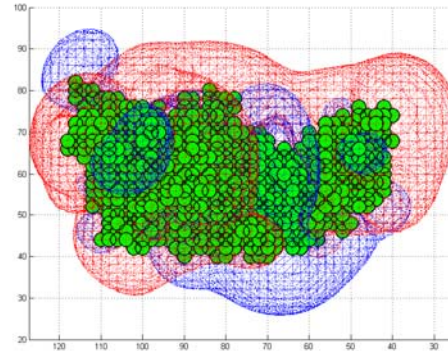
Представление рассчитанной на модели вероятности связывания молекул барназа (справа) и барстар (слева) в виде цветного «глобуса» распределения вероятности при расстоянии между центрами масс белков ≤ 40 Å; синий цвет ячеек соответствует малой вероятности связывания данной ячейкой, красный цвет – высокой вероятности.



Представление рассчитанной на модели вероятности связывания молекул пластоцианина и цитохрома *f* в виде цветного «глобуса» распределения вероятности при расстоянии между центрами масс белков $R=46$ Å; синий цвет ячеек соответствует малой вероятности связывания данной ячейкой, красный цвет – высокой вероятности.

Объемы вычислений

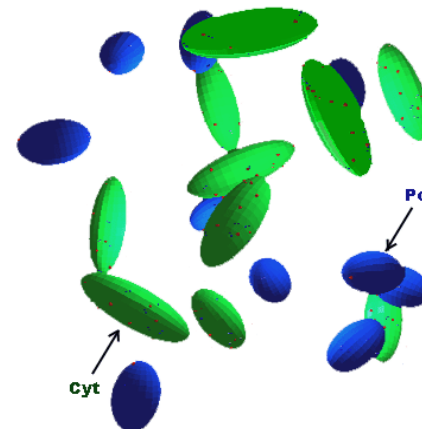
Для вычисления и хранения
электрического потенциала
небольшого белка
необходимо **100 МБ**
оперативной памяти



Для вычисления константы
скорости реакции
необходимо выполнить **10^7**
шагов (шаг 10^{-10} с)



На каждом временном шаге
необходимо вычислить
электростатическую и
броуновскую силы, переместить и
повернуть каждый белок,
проверить факты столкновения и
реакции белков (тысячи операций
для каждого белка)



Спасибо за внимание!