Роль заряженных аминокислотных остатков пластоцианина во взаимодействии с цитохромным b₆f комплексом и фотосистемой I высших растений: исследование методом броуновской динамики Федоров В.А.^{*1}, Вольхин И.А.¹, Хрущев С.С.¹, Антал Т.К.², Коваленко И.Б.^{**1}

¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия ²Псковский государственный университет, Псков, Россия

Аннотация. Пластоцианин – белок-переносчик электронов в электронтранспортной цепи хлоропластов, осуществляющий перенос электрона от цитохрома f цитохромного b₆f комплекса на фотосистему I. В работе с использованием метода броуновской динамики был изучен процесс формирования диффузионно-столкновительного комплекса пластоцианина и фотосистемы I высших растений. Были исследованы электростатические свойства белков, выявлены наиболее важные для их взаимодействия аминокислотные остатки. Было показано, что пластоцианин контактирует с положительно заряженной выступающей в люмен альфа-спиралью субъединицы F фотосистемы I аминокислотными остатками как своей «большой» (D42, E43, D44, E45, D51), так и «малой» (E59, E60, D61) отрицательно заряженной области в 73 % случаев, и остатками только «большой» области в 27 % случаев. Сопоставление результатов исследования с полученными ранее данными по взаимодействию пластоцианина с цитохромом позволило идентифицировать f роль заряженных аминокислотных остатков пластоцианина в процессе образования комплекса с фотосистемой I и цитохромом f. При взаимодействии с цитохромом f положительно заряженная область, находящаяся вблизи малого домена цитохрома f и формируемая аминокислотными остатками К58, К65, К66, K187 и R209, притягивает отрицательно заряженные аминокислотные остатки D42, E43, D44, E45, D51 «большой» области пластоцианина, образуя электростатический шарнирный контакт, вокруг которого происходит поворот при формировании финального комплекса. «Малая» область пластоцианина участвует в стабилизации финального комплекса. Таким образом, и при образовании диффузионно-столкновительного комплекса с фотосистемой I, и в реакции с цитохромом f пластоцианином используются одни и те же отрицательно заряженные аминокислотные остатки.

Ключевые слова: броуновская динамика, белок-белковые взаимодействия, кластерный анализ, пластоцианин, цитохром f, фотосистема I.

введение

Пластоцианин является белком переносчиком электронов в электрон-транспортной цепи хлоропластов, осуществляющий перенос электрона от цитохрома f цитохромного

^{*}xbgth@yandex.ru

^{**}ikovalenko78@gmail.com

b₆f комплекса на фотосистему I. Схема переноса электрона пластоцианином в электронтранспортной цепи приведена на рисунке 1.



Рис. 1. Схема участка электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Показана роль пластоцианина в передаче электрона от цитохрома f к фотосистеме I. На схеме желтым показана фотосистема I (PDB ID: 5L8R, субъединица F – оранжевым), фиолетовым – цитохромный b₆f комплекс (PDB ID: 7ZYV, субъединица F – темно-фиолетовым), зеленым – пластоцианин (PDB ID: 2PCF).

Фотосистема I (PSI) – крупный белковый комплекс массой около 365 кДа. Фотосистема I преобразует энергию солнечного света в восстановление ферредоксина, который затем используется для синтеза никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДΦ). Фотосистемы І обладают большой консервативностью: строение реакционного центра у цианобактерий, эукариотических водорослей и растений принципиально не отличается. В то же время строение светособирающей антенны у цианобактерий и эукариотических организмов значительно отличается: в качестве периферической антенны у цианобактерий выступают фикобилисомы [1], а у растений водорослей – локализованные в мембране И содержащие хлорофилл И светособирающие комплексы [2]. Реакционные центры фотосистемы I обычно формируют тримеры или тетрамеры. В работе [3] авторы указывают на возможность формирования димеров фотосистемы I и у зеленых водорослей, предполагая пути регуляции процесса димеризации/мономеризации.

Пластоцианин – растворимый белок, локализованный в люминальном пространстве тилакоида, участвующий в переносе электрона от цитохромного b₆f комплекса к фотосистеме I в хлоропластах высших растений, зеленых водорослей и цианобактерий [4]. С помощью метода криоэлектронной микроскопии недавно была получена структура комплекса фотосистемы I гороха с мобильными переносчиками электрона пластоцианином и ферредоксином с разрешением 2.5 Å [5] (PDB ID: 6YEZ). Авторы работы [6] детально описали взаимодействие аминокислотных остатков пластоцианина и фотосистемы І. Предполагается, что в процессе формирования комплекса принимает участие субъединица F фотосистемы I, которая за счет электростатических взаимодействий с пластоцианином способствует его правильной ориентации в процессе сближения. При этом ключевую роль играют три аминокислотных остатка субъединицы F фотосистемы I K93, K96 и K100, взаимодействующие с остатками D42, E43, D44 и E45 пластоцианина. При дальнейшем формировании комплекса основную уже играет взаимодействие гидрофобных областей, сформированных роль аминокислотными остатками пластоцианина РЗ6, Р86, F35, H37, H87 (оба гистидина

координируют ион меди), и W658 и W625 субъединиц А и В фотосистемы I, соответственно. В результате ион меди оказывается ровно напротив реакционного центра P700, которому он должен передать электрон. Расстояние между ними при этом составляет 14.7 Å, что попадает в теоретически предсказанный из кинетических данных диапазон 14.5–15 Å [7, 8]. После передачи электрона константа диссоциации комплекса пластоцианина с фотосистемой I возрастает в шесть раз [9], и комплекс разваливается. Кинетические исследования показывают наличие ярко выраженных двух стадий реакции пластоцианина с фотосистемой I у зеленых водорослей и высших растений с характерными временами около 10 мкс и 100 мкс, причем медленная стадия зависит от концентрации молекул пластоцианина [9]. Предполагается, что это связано с формированием стабильного комплекса фотосистемы I с белком-переносчиком – быстрая стадия соответствует переносу электрона внутри этого комплекса, а медленная – диффузии пластоцианина и образованию нового комплекса.

В нашем предыдущем исследовании [10] было проведено моделирование связывания цитохрома f с пластоцианином у высших растений, зелёных водорослей и цианобактерий. При этом использовался комбинированный подход: образование столкновительного комплекса моделировалось методом броуновской динамики с помощью программы ProKSim [11], а формирование финального комплекса методом молекулярной динамики. При этом стартовой структурой для молекулярной динамики являлась одна из структур столкновительных комплексов. Были выявлены различия в молекулярных механизмах образования комплексов пластоцианина и цитохрома f высших растений, зелёных водорослей и цианобактерий *in silico*.

В настоящей работе проведено моделирование взаимодействия пластоцианина с фотосистемой I высших растений методом броуновской динамики. Были исследованы электростатические свойства выявлены наиболее важные белков, лля ИХ взаимодействия аминокислотные остатки. Сопоставление результатов исследования с полученными ранее данными по взаимодействию пластоцианина с цитохромом f идентифицировать позволило роль заряженных аминокислотных остатков пластоцианина в процессе образования комплекса с фотосистемой I и цитохромом f.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание молекулярно-динамической модели фотосистемы I

В качестве основы для создания молекулярной модели фотосистемы 1 высших растений была выбрана размещенная в базе данных RCSB PDB структура суперкомплекса фотосистемы 1 гороха (PDB ID: 5L8R), полученная в 2017 году методом рентгеноструктурного анализа [12]. На данный момент эта структура является наиболее полной для высших растений и включает все основные субъединицы реакционного центра фотосистемы 1 и четыре связанных с ней светособирающих комплекса. В структурной модели идентифицировано расположение многочисленных пигментов: молекул хлорофиллов типа а и b и каротиноидов четырех типов, кофакторов: филлохинона и железо-серных кластеров, тесно связанных с белком липидных молекул (монодигалактозилдиацилглицерол, И дипальмитоилфосфатидилглицерол). Было проведено сопоставление структуры белковых цепей 5L8R с соответствующими аминокислотными последовательностями и выявлены не разрешенные по данным рентгеноструктурного анализа плохо структурированные участки цепей. При создании модели недостающие промежуточные участки белковых цепей добавлены с помощью программного обеспечения MODELLER [13]. Отсутствующие в структуре 5L8R участки цепей на N- и C-концах белковых цепей не достраивались. Молекулы детергента были удалены из системы, а недостающие атомы в молекулах кофакторов были добавлены с помощью программного обеспечения PyMOL (Schrödinger, LLC) [14].

В качестве силового поля для построения модели было выбрано поле CHARMM36m [15], объединенное с полем CGenFF 4.4 [16]. Такой выбор обусловлен необходимостью использовать модель фотосистемы 1 совместно с разработанными ранее с использованием силового поля CHARMM27 молекулярной моделью мобильного переносчика электрона пластоцианина. Параметры для хлорофилла а взяты из работы [17]. Топология для хлорофилла в построена на основе топологии хлорофилла а и параметров альдегидной группы бензальдегида из СНАRMM36 [18]. Параметры для бетакаротина и виолаксантина получены с помощью автоматизированной процедуры определения параметров поля CGenFF [19, 20]. Параметры для лютеина и зеаксантина взяты из [21]. Набор параметров для филлохинона был получен на основе параметров нафтохинонового кольца менахинона из [22] и параметров алифатической цепи фитила из поля CHARMM36 [18]. Параметры для моно- и дигалактозилдиацилглицерола были получены с помощью автоматизированной системы определения параметров гликолипидов, входящей в программный комплекс CHARMM-GUI [23, 24]. Для дипальмитоилфосфатидилглицерола использовали параметры из силового поля СНАRMM36 [18]. Параметры для железо-серных кластеров взяты из [25]. Параметры для всех типов молекул были преобразованы в предназначенный для использования программным комплексом GROMACS [26] формат. Также были созданы наборы правил для определения координат отсутствующих в рентгеноструктурных данных атомов водорода.

Для моделирования связывания с фотосистемой I гороха была использована молекулярно-динамическая модель пластоцианина фасоли, созданная в соответствии с протоколом, описанным в [10].

Моделирование образования комплексов белков методом броуновской динамики

Взаимодействие двух белков электронтранспортной цепи представляет из себя сложный процесс, в котором можно условно выделить два основных этапа. Первый этап – формирование столкновительного комплекса – происходит за счет диффузии белков друг к другу под действием случайных сил и дальнодействующих электростатических взаимодействий. втором этапе за счет контактов Ha аминокислотных остатков различных белков и изменения ориентации аминокислотных остатков относительно друг друга происходит формирование финального комплекса, необходимого для протекания реакции переноса электронов [27]. Метод броуновской динамики позволяет моделировать поведение белков на достаточно больших расстояниях друг от друга, где определяющую роль в их поведении играют электростатические и случайные броуновские силы. Белки при этом рассматриваются как жесткие тела, а молекулы растворителя и ионы не задаются в явном виде, но учитываются через макропараметры, такие как диэлектрическая проницаемость, коэффициент вязкого трения и ионная сила.

При формировании столкновительного комплекса белки движутся за счет броуновского движения. Моделирование движения частицы под действием случайных сил и сил электростатических взаимодействий можно осуществлять с использованием уравнения Ланжевена [28]:

$$m\frac{d^2x}{dt^2} = f_x(t) + F_x - \xi_x^{tr} \frac{dx}{dt},$$

где m – масса частицы, t – время, x – координата, $f_x(t)$ – проекция случайной силы на ось x, F_x – проекция электростатической силы на ось x, ξ_x^{tr} – коэффициент вязкого трения вдоль координаты x. Отдельно рассматриваются поступательное и вращательное движения частиц вдоль каждой координаты. Движение отдельных

ФЕДОРОВ и др.

атомов при таком подходе не рассматривается, то есть молекулы белка в таких расчетах представляют из себя жесткие тела. Уравнение движения решается численно с учетом вязкого трения. Инерционным членом уравнения пренебрегаем ввиду использования шага по времени значительного превышающего постоянную времени релаксации возмущения.

Электростатические взаимодействия между белками возникают из-за наличия у них заряженных аминокислотных остатков. При учете их вклада во взаимодействие между белками необходимо учитывать диэлектрическую проницаемость среды (для воды и белка она разная) и наличие в растворе ионов, экранирующих заряды противоположных знаков. Ионы и молекулы растворителя в вычислениях броуновской динамики присутствуют в неявном виде. Электростатический потенциал рассчитывается в соответствии с уравнением Пуассона – Больцмана [29].

Были заданы следующие параметры среды: pH 7, ионная сила 100 мМ, температура 300 К, вязкость среды 0.001 кг/(м·с). Электростатический потенциал принимался равным нулю на расстоянии 3.5 нм от поверхности белка. Шаг сетки для расчёта электростатического потенциала – 1 Å. Размер виртуальной ячейки, в которой проводилось моделирование, был выбран $20 \times 20 \times 20$ нм, были заданы периодические граничные условия. Фотосистема I была зафиксирована на границе бокса таким образом, чтобы пластоцианин мог контактировать исключительно с люминальной частью фотосистемы.

Расчеты методом броуновской динамики проводились с использованием уравнения Ланжевена до тех пор, пока энергия электростатического притяжения между белками не становилась больше 8 kT. Каждая структура с энергией, превышающей пороговое значение, сохранялась. Для выявления метастабильных энергетически выгодных взаимных ориентаций молекул использовали метод, основанный на частоте встречаемости похожих структур [30–32]. По всем структурам столкновительных комплексов, относящихся к каждому кластеру, с помощью программного комплекса GROMACS проводился расчёт значений теплового фактора (В-фактора) для каждого из атомов пластоцианина. Для визуализации структур использовали программу РуМОL [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение электростатического потенциала у поверхности фотосистемы І

На рисунке 2,а показано распределение электростатического потенциала вблизи поверхности фотосистемы I (вид вдоль плоскости мембраны). Видно, что большая часть обращенной в люмен поверхности фотосистемы І заряжена отрицательно, однако P700 вблизи реакционного центра находится область положительного электростатического потенциала. Ha рисунке 2,б показан поверхностный электростатический потенциал фотосистемы I (вид перпендикулярно плоскости мембраны со стороны люмена). Желтый овал схематически показывает область на поверхности фотосистемы I, контактирующую с пластоцианином, в соответствии с экспериментальными данными [5]. Необходимо отметить, что эта область в основном хотя на периферии содержит два положительно не заряжена, заряженных аминокислотных остатка. Протяженную область положительного потенциала формирует экспонированная в люмен часть субъединицы F (две альфа-спирали). На периферии люминальной части фотосистемы I N-конец субъединицы VIII (I) и K126 субъединицы VI (H) формируют еще одну небольшую локальную область положительного потенциала.

ПЛАСТОЦИАНИН ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ЦИТОХРОМНЫМ Ь ГКОМПЛЕКСОМ И ФОТОСИСТЕМОЙ І РАСТЕНИЙ



Рис. 2. Карта электростатического потенциала фотосистемы І. Изменение цвета от красного к синему соответствует потенциалу от -5 kT/e до +5 kT/e (±135 мВ). а) – вид вдоль плоскости мембраны, приведена дополнительная визуализация электростатических эквипотенциальных поверхностей (+7 мВ – синий цвет, -7 мВ – красный цвет). б) – вид перпендикулярно плоскости мембраны со стороны люмена. Дополнительно серым цветом в центре показан димер хлорофилла а – реакционный центр фотосистемы І Р700. Желтый овал схематически показывает область на поверхности фотосистемы І, контактирующую с пластоцианином, в соответствии с экспериментальными данными [5].

Анализ столкновительного комплекса пластоцианина с фотосистемой I

Для молекул пластоцианина и фотосистемы I высших растений с помощью ранее разработанной нами программы броуновской динамики ProKSim были получены диффузионно-столкновительных структуры комплексов энергией С электростатического притяжения, превышающей 8 kT. В вычислительном эксперименте диффузия пластоцианина была ограничена только люминальным пространством. Кластерный анализ полученных при моделировании взаимодействия пластоцианина с фотосистемой I структур выявил три типа структур с энергией электростатического притяжения между молекулами более 8 kT. На рисунке 3 представлены центральные структуры кластеров диффузионно-столкновительных комплексов, то есть структуры, наименьшим образом отличающиеся от всех остальных структур соответствующего кластера. Видно, что пластоцианин в структурах этих кластеров находится около Р700, что обеспечивается притяжением его отрицательных зарядов к описанным ранее положительно заряженным областям люминальной части фотосистемы І.

Первый кластер включает в себя 67 % структур, второй – 5.5 %, третий – 27 %. Во всех трех случаях пластоцианин находится вблизи субъединицы F, со стороны субъединиц A и B. Отличие между структурами заключается в ориентации молекулы пластоцианина. Расстояния от меди до ближайшего атома π -системы хлорофилла реакционного центра равны соответственно 47.1 Å, 27.1 Å и 29.4 Å в описанных ранее трех центральных структурах кластеров. У центральной структуры второго кластера наименьшее значение расстояния между кофакторами.



Рис. 3. Визуализация центральных структур первого (а), второго (б) и третьего (в) кластеров диффузионно-столкновительных комплексов пластоцианина и фотосистемы 1 высших растений с энергией электростатического притяжения более 8 kT. Серым цветом показана фотосистема 1, отдельно выделен Р700 и обведена структура субъединицы F. Структура пластоцианина окрашена зеленым, оранжевой сферой показан атом меди.

Для оценки разброса положений пластоцианина относительно фотосистемы I в каждом из кластеров были проанализированы значения теплового В-фактора. Эти данные показаны на рисунке 4. Чем больше значение b-фактора для атома в структуре, тем сильнее разброс положений этого атома среди структур данного кластера. Значения b-фактора показаны на рисунке 4 толщиной и цветом линии, представляющей структурный скелет белка.



Рис. 4. Центральные структуры первого (а), второго (б) и третьего (в) кластеров диффузионностолкновительных комплексов пластоцианина и фотосистемы I высших растений с энергией электростатического притяжения, превышающей 8 kT. Раскраска молекулы пластоцианина отображает разброс значения В-фактора от 0 (изумрудный) до 4223 Å² (рубиновый).

При сравнении кластеров между собой видно, что наименьший разброс положений наблюдается во втором кластере, который, к тому же, является самым редким. Небольшая подвижность структур в этом кластере легко объяснима тем, что в этом кластере пластоцианин ближе всего подходит к фотосистеме I. В случае первого и третьего кластеров мы видим, что атомы, находящиеся вблизи субъединицы F, малоподвижны относительно фотосистемы I, а наиболее подвижные атомы находятся на наибольшем удалении от субъединицы F. Это можно интерпретировать таким образом, что при связывании пластоцианин заякоривается на субъединице F и без разрыва этого контакта может совершать движения вокруг этой области контакта.

ПЛАСТОЦИАНИН ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИИ С ЦИТОХРОМНЫМ b_of комплексом и фотосистемой і растений

Для всех кластеров рассчитывалась частота встречаемости парных контактов аминокислотных остатков пластоцианина с субъединицей F фотосистемы. Контактирующими считались аминокислотные остатки, находящиеся на расстоянии менее 5 Å. В таблице 1 представлены пять самых часто встречающихся контактов между заряженными аминокислотными остатками в трех кластерах столкновительных комплексах с энергией больше 8 kT.

Таблица 1. Пять самых часто встречающихся контактов между заряженными аминокислотными остатками в трех кластерах столкновительных комплексов пластоцианина (Пц) и субъединицы F (F) фотосистемы I высших растений с энергией электростатического притяжения больше 8 kT

Кластер 1			Кластер 2			Кластер 3		
Пц	F	Частота встречаемости	Пц	F	Частота встречаемости	Пц	F	Частота встречаемости
E43	K100	0.90	E43	K100	0.98	E43	K96	0.89
E43	K101	0.78	E59	K107	0.98	E45	K89	0.77
E45	K107	0.59	E43	K93	0.98	E43	K93	0.71
E60	K89	0.59	E60	K107	0.92	D44	K89	0.70
D42	K107	0.54	D51	K93	0.90	D44	K96	0.58

Хотя наиболее часто контактирующие пары аминокислотных остатков различаются между кластерами из-за различной ориентации молекул белков друг относительно друга, как для фотосистемы I, так и для пластоцианина можно выделить те, которые встречаются в таблице чаще других и возможно наиболее значимы. Со стороны фотосистемы — это аминокислотные остатки лизина субъединицы F с номерами 93, 100, 101 и 107. Со стороны пластоцианина – это аминокислотные остатки Е43, Е59, D44.

Несмотря на большое разнообразие полученных нами структур диффузионностолкновительных комплексов, ни одна из них не совпала с экспериментально определенным комплексом [5]. Мы полагаем, что получаемые при моделировании методом броуновской динамики структуры характеризуют начальную стадию формирования функционально активного комплекса. На этой стадии за счет дальнодействующих электростатических взаимодействий уже определилась взаимная ориентация молекул, однако ещё не произошло вытеснение молекул воды из интерфейса. Для моделирования межмолекулярного преобразования столкновительного комплекса в финальный может быть использован метод молекулярной динамики, в явном виде учитывающий молекулы растворителя и их взаимодействие с аминокислотными остатками белков, однако такое исследование выходит за рамки данной работы.

Таблица2. Расстояния между контактирующими положительно заряженными аминокислотными остатками субъединицы F фотосистемы I и отрицательно заряженными аминокислотными остатками пластоцианина в комплексе, полученном методом криоэлектронной микроскопии в работе [5] (PDB ID: 6YEZ)

Субъединица F	Пластоцианин	Расстояние, Å
K93	D44	4.7
K96	D44	6.1
K100	E43	6.2
K101	E59	4.7
K101	E60	6.1

В экспериментально полученной структуре комплекса пластоцианина и фотосистемы I контактирующими являются отрицательно заряженные остатки E43, D44, E59 и E60 на пластоцианине и положительно заряженные остатки K93, K96, K100 и K101 субъединицы F на фотосистеме I, расстояния между контактирующими аминокислотными остатками пластоцианина и субъединицы F фотосистемы I в комплексе, полученном методом криоэлектронной микроскопии в работе [5] (PDB ID: 6YEZ), приведены в таблице 2. Видно, что в столкновительных комплексах, полученных нами, в контакте с субъединицей F в основном принимают участие те же аминокислоты пластоцианина, что и в финальном комплексе (табл. 1).

Как следует из экспериментальных работ и тех выводов, которые мы можем сделать исходя из результатов вычислений, ключевую роль в формировании столкновительного комплекса играет притяжение между положительно заряженными остатками субъединицы F и отрицательно заряженными остатками пластоцианина.

Сравнение механизмов формирования комплексов пластоцианина с фотосистемой I и с цитохромным b₆f комплексом

Ранее нами был детально рассмотрен процесс формирования комплекса пластоцианина и цитохрома f [10, 33] и выявлено, что цитохром f высших растений формирует диффузионно-столкновительный комплекс с пластоцианином посредством диффузионного захвата. На поверхности пластоцианина существуют две отрицательно заряженные области [34] – «нижняя», или «большая» (D42, E43, D44, E45, D51) и «верхняя», или «малая» (E59, E60, D61). При диффузионном захвате положительно заряженная область, находящаяся вблизи малого домена цитохрома f и формируемая аминокислотными остатками K58, K65, K66, K187 и R209, притягивает отрицательно заряженные аминокислотные остатки D42, E43, D44, E45, D51 «нижней» области пластоцианина, образуя электростатический шарнирный контакт, вокруг которого происходит поворот при формировании финального комплекса. При этом «верхняя» область пластоцианина участвует в стабилизации финального комплекса.

Из результатов настоящего исследования следует, что пластоцианин контактирует с положительно заряженной выступающей в люмен альфа-спиралью субъединицы F фотосистемы I аминокислотными остатками обеих областей («малой» и «большой») в кластерах 1 и 2 и только «большой» областью в кластере 3. Таким образом, и при образовании диффузионно-столкновительного комплекса с фотосистемой I, и в реакции с цитохромом f пластоцианином используются одни и те же отрицательно заряженные аминокислотные остатки.

БЛАГОДАРНОСТИ

Антал Т.К. выражает благодарность Научно-образовательному математическому центру «Северо-Западный центр математических исследований имени Софьи Ковалевской» (договор № 075-02-2023-937 от 16.02.2023). Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-2931.2022.1.4.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Watanabe M., Semchonok D.A., Webber-Birungi M.T., Ehira S., Kondo K., Narikawa R., Ohmori M., Boekema E.J., Ikeuchi M. Attachment of phycobilisomes in an antenna–photosystem I supercomplex of cyanobac-teria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014.V. 111. № 7. P. 2512–2517. doi: 10.1073/pnas.1320599111
- 2. Simpson D.J., Knoetzel J. Light-harvesting Complexes of Plants and Algae: Introduction, Survey and Nomenclature. *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*.

Advances in Photosynthesis and Respiration. 1996. V. 4. doi: <u>10.1007/0-306-48127-</u> <u>8_27</u>

- 3. Naschberger A., Mosebach L., Tobiasson V., Kuhlgert S., Scholz M., Perez-Boerema A., Ho T.T.H., Vidal-Meireles A., Takahashi Y., Hippler M., Amunts A. Algal photosystem I dimer and high-resolution model of PSI-plastocyanin complex. *Nat. Plants*. 2022. V. 8. № 10. P. 1191–1201. doi: 10.1038/s41477-022-01253-4
- 4. Höhner R., Pribil M., Herbstová M., Lopez L.S., Kunz H.-H., Li M., Wood M., Svoboda V., Puthiyaveetil S., Leister D., Kirchhoff H. Plastocyanin is the long-range electron carrier between photo-system II and photosystem I in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020. V. 117. № 26. P. 15354–15362.
- 5. Caspy I., Borovikova-Sheinker A., Klaiman D., Shkolnisky Y., Nelson N. The structure of a triple complex of plant photosystem I with ferredoxin and plastocyanin. *Nat. Plants*. 2020. V. 6. P. 1300–1305. doi: <u>10.1038/s41477-020-00779-9</u>
- Caspy I., Fadeeva M., Kuhlgert S., Borovikova-Sheinker A., Klaiman D., Masrati G., Drepper F., Ben-Tal N., Hippler M., Nelson N. Structure of plant photosystem Iplastocyanin complex reveals strong hydrophobic interactions. *Biochem J.* 2021. V. 478. № 12. P. 2371–2384. doi: <u>10.1042/BCJ20210267</u>
- Hippler M., Reichert J., Sutter M., Zak E., Altschmied L., Schröer U., Herrmann R.G., Haehnel W. The plastocyanin binding domain of photosystem I. *EMBO J.* 1996. V. 15. № 23. P. 6374–84.
- 8. Hippler M., Drepper F., Haehnel W. The oxidizing site of photosystem I modulates the electron transfer from plastocyanin to P700+. *Photosyntthesis: from Light to Biosphere*. 1995. V. 2. P. 99–102.
- Drepper F., Hippler M., Nitschke W., Haehnel W. Binding dynamics and electron transfer between plastocyanin and photosystem I. *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 1282– 1295. doi: <u>10.1021/bi951471e</u>
- 10. 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 for-mation in higher plants, green algae and cyanobacteria. *Physiologia Plantarum.* 2019. № 166. P. 320–335.
- 11. 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.
- Mazor Y., Borovikova A., Caspy I. Nelson N. Structure of the plant photosystem I supercomplex at 2.6 Å resolution. *Nature Plants*. 2017. V. 3. P. 17014. doi: 10.1038/nplants.2017.14
- 13. Webb B., Sali A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*. 2016. V. 54. № 1. doi: <u>10.1002/cpbi.3</u>
- 14. Schrödinger L.L.C. DeLano W. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.* URL: <u>https://pymol.org</u> (accessed 20.11.2023).
- Huang J., Rauscher S., Nawrocki G., Ran T., Feig M., Groot B., Grubmüller H. MacKerell A.D.Jr. CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods*. 2017. V. 14. № 1. P. 71–73. doi: <u>10.1038/nmeth.4067</u>
- Vanommeslaeghe K., Hatcher E., Acharya C., Kundu S., Zhong S., Shim J., Darian E., Guvench O., Lopes P., Vorobyov I., Mackerell A. D. Jr. CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. *Journal of Computational Chemistry*. 2010. V. 31. № 4. P. 671– 690. doi: 10.1002/jcc.21367

- 17. Adam S., Knapp-Mohammady M., Yi.J., Bondar A.N. Revised CHARMM force field parameters for iron-containing cofactors of photosystem II. *Journal of Computational Chemistry*. 2018. V. 39. № 1. P. 7–20. doi: <u>10.1002/jcc.24918</u>
- Huang J., MacKerell Jr A.D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*. 2013. V. 34. № 25. P. 2135–2145. doi: 10.1002/jcc.23354
- 19. Vanommeslaeghe K., MacKerell Jr A.D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) I: bond perception and atom typing. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012. V. 52. № 12. P. 3144–3154. doi: 10.1021/ci300363c
- 20. Vanommeslaeghe K., Raman E.P., MacKerell Jr A.D. Automation of the CHARMM General Force Field (CGenFF) II: assignment of bonded parameters and partial atomic charges. *Journal of Chemical Information and Modeling*. 2012. V. 52. № 12. P. 3155–3168. doi: <u>10.1021/ci3003649</u>
- Grudzinski W., Nierzwicki L., Welc R., Reszczynska E., Luchowski R., Czub J., Gruszecki W.I. Localization and orientation of xanthophylls in a lipid bilayer. *Scientific Reports*. 2017. V. 7. № 1. P. 1–10. doi: 10.1038/s41598-017-10183-7
- Teixeira M.H., Arantes G.M. Effects of lipid composition on membrane distribution and permeability of natural quinones. *RSC Advances*. 2019. V. 9. № 29. P. 16892–16899. doi: 10.1039/C9RA01681C
- 23. Jo S., Kim T., Iyer V.G., Im W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *Journal of Computational Chemistry*. 2008. V. 29. № 11. P. 1859–1865. doi: <u>10.1002/jcc.20945</u>
- Lee J., Patel D.S., Ståhle J., Park S.-J., Kern N.R., Kim S., Lee J., Cheng X., Valvano M.A., Holst O., Knirel Y.A., Qi Y., Jo S., Klauda J.B., Widmalm G., Im W. CHARMM-GUI membrane builder for complex biological membrane simulations with glycolipids and lipoglycans. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2018. V. 15. № 1. P. 775–786. doi: 10.1021/acs.jctc.8b01066
- Chang C.H., Kim K. Density functional theory calculation of bonding and charge parameters for molecular dynamics studies on [FeFe] hydrogenases. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2009. V. 5. № 4. P. 1137–1145. doi: 10.1021/ct800342w
- 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. V. 1. P. 19–25. doi: 10.1016/j.softx.2015.06.001
- Gross E.L., Pearson Jr. D.C., Pearson D.C. Brownian dynamics simulations of the interaction of Chlamydomonas cytochrome f with plastocyanin and cytochrome c6. *Biophys. J.* 2003. V. 85. № 3. P. 2055–2068.
- 28. Langevin P. On the theory of Brownian motion. C. R. Acad. Sci. 1908. V. 146. P. 530– 533.
- Fogolari F., Brigo A., Molinari H. The Poisson-Boltzmann Equation for Biomolecular Electrostatics: A Tool for Structural Biology. J. Mol. Recognit. 2002. V. 15. P. 377– 392.
- 30. Ankerst M., Breunig M.M., Kriegel H.P., Sander J. OPTICS: Ordering Points to Identify the Clustering Structure. *Proc. ACM SIGMOD*. 1999. P. 49–60.
- 31. 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.
- 32. 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.* 2003. P. 75–87.

- Федоров В.А., Хрущев С.С., Коваленко И.Б. Анализ траекторий броуновской и молекулярной динамики для выявления механизмов белок-белковых взаимодействий. Компьютерные исследования и моделирование. 2023. Т. 15. № 3. С. 723–738. doi: 10.20537/2076-7633-2023-15-3-723-738
- 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. V. 1322. № 2–3. P. 106–114. doi: 10.1016/S0005-2728(97)00064-9

Рукопись поступила в редакцию 12.11.2023, переработанный вариант поступил 20.11.2023. Дата опубликования 22.11.2023.

Role of Charged Amino Acid Residues of Plastocyanin in Interaction with Cytochrome B6f Complex and Photosystem I of Higher Plants: A Study Using the Brownian Dynamics Method

Fedorov V.A.¹, Volkhin I.A.¹, Khrushchev S.S.¹, Antal T.K.², Kovalenko I.B.¹

> ¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia ²Pskov State University, Pskov, Russia

Abstract. Plastocyanin is an electron carrier protein in the electron transport chain of chloroplasts, carrying out the transfer of an electron from cytochrome f of the cytochrome b6f complex to photosystem I. Using the method of Brownian dynamics, the process of formation of the encounter complex of plastocyanin and photosystem I of higher plants was studied. The electrostatic properties of proteins were studied, and the most important amino acid residues for their interaction were identified. It was shown that plastocyanin contacts the positively charged alphahelix protruding into the lumen of the F subunit of photosystem I with amino acid residues of both its "large" (D42, E43, D44, E45, D51) and "small" (E59, E60, D61) the negatively charged regions in 73 % of cases, and only the "large" region in 27 % of cases. A comparison of the study results with previously obtained data on the interaction of plastocyanin with cytochrome f made it possible to identify the role of charged amino acid residues of plastocyanin in the process of complex formation with photosystem I and cytochrome f. When interacting with cytochrome f, a positively charged region located near the small domain of cytochrome f and formed by amino acid residues K58, K65, K66, K187 and R209, attracts negatively charged amino acid residues D42, E43, D44, E45, D51 of the "large" region of plastocyanin, forming an electrostatic hinge contact around which rotation occurs when the final complex is formed. The "small" region of plastocyanin is involved in the stabilization of the final complex. Thus, both in the formation of the encounter complex with photosystem I, and in the reaction with cytochrome f the same negatively charged amino acid residues of plastocyanin are used.

Key words: Brownian dynamics, protein-protein interactions, cluster analysis, plastocyanin, cytochrome f, photosystem I.