

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Дьяконова Александра Никитична

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПЕРЕКЛЮЧЕНИЯ
ЭЛЕКТРОННЫХ ПОТОКОВ ОТ ФЕРРЕДОКСИНА
НА ФНР И ГИДРОГЕНАЗУ.
ПРЯМОЕ МНОГОЧАСТИЧНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ**

Специальность: 03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук,

профессор Галина Юрьевна Ризниченко

Москва 2016

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова (зав. кафедрой – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, А.Б. Рубин).

Научный руководитель:

Ризниченко Галина Юрьева

доктор физико-математических наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Официальные оппоненты:

Иванов Борис Николаевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией фотосинтетического электронного транспорта в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук», г. Пущино.

Чугунов Антон Олегович

кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук», г. Москва.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт математических проблем биологии Российской академии наук», г. Пущино

Защита диссертации состоится «17» ноября 2016 г. в 16.00 часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы 1/24, МГУ, Биологический факультет, аудитория «Новая».

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова и на сайте

http://istina.msu.ru/media/dissertations/dissertation/caa/fa1/22523849/Diakonova_disser.pdf

Автореферат разослан « _____ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Процесс фотосинтеза лежит в основе жизни на Земле. Фотосинтезирующие организмы производят органические вещества из неорганических и обогащают воздух кислородом. Однако человечество расширило функции растений и водорослей и научилось использовать их во всех областях своей деятельности. Много тысяч лет растения используются в качестве топлива, хотя это далеко не самый эффективный метод получения энергии. Недавно было показано, что некоторые фотосинтезирующие организмы способны на свету производить молекулярный водород – экологически чистый источник энергии. Его сгорание в присутствии кислорода дает единственный продукт – воду, не наносящую вреда окружающей среде. Фотосинтезирующие организмы способны на это благодаря специальному ферменту – гидрогеназе, получающей электроны из электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) фотосинтеза от белка ферредоксина и восстанавливающей протоны до молекулярного водорода.

Линейный транспорт электрона по ЭТЦ фотосинтеза приводит к формированию электрохимического потенциала на мембране, служащего движущей силой синтеза АТФ, и образованию НАДФН — сильного восстановителя, необходимого для фиксации углерода в цикле Кальвина и синтеза органических веществ. Этот последний этап опосредуется белком ферредоксин-НАДФ⁺-редуктазой (ФНР), получающей необходимый электрон от белка ферредоксина (Фд). Наряду с этим бактерии и зеленые водоросли содержат белок гидрогеназу, которая может восстанавливать протон до атомарного водорода, получив электрон от ферредоксина. Именно этот процесс может служить источником водорода как биотоплива. В настоящее время активно исследуются пути максимизации выделения водорода организмами, в которых протекает эта реакция. В основном, экспериментальные исследования в данной области направлены на поиски условий выращивания микроорганизмов и создание химерных белков, сокращающих физическое расстояние между ферредоксином и гидрогеназой [Yacoby et al., 2011]. Для практического решения конкретной задачи — получения биоводорода – необходима информация о молекулярных механизмах, делающих возможным процесс синтеза водорода живыми организмами под действием света.

Для изучения молекулярных механизмов взаимодействия белковых молекул используются методы молекулярного моделирования, в которых выявляются факторы, влияющие на процесс образования белок-белковых комплексов. На дальних расстояниях к этим факторам можно отнести силы электростатического взаимодействия между молекулами, вязкость среды,

размеры самих белков, определяющие скорость их диффузии. На близких расстояниях начинают играть роль строение комплементарных поверхностей («интерфейсов») молекул, гидрофобные и Ван-дер-Ваальсовы силы, толщина гидратной оболочки молекулы. Эти факторы определяют скорость взаимодействия молекул в клетке и их сродство друг к другу, а значит и кинетику соответствующего процесса.

Подвижность биомакромолекул традиционно изучается методами броуновской и молекулярной динамики. Броуновская динамика позволяет моделировать процесс формирования предварительного комплекса, то есть комплекса, образующегося при столкновении молекул в результате диффузии.

В работе методами броуновской динамики исследуются механизмы и кинетика взаимодействия ферредоксина с его белками-партнерами, а именно ФНР и гидрогеназой, и исследуются условия, влияющие на эти процессы.

Цели и задачи работы. Целью работы было изучение молекулярных механизмов переключения потоков электронов с ферредоксина на ФНР и гидрогеназу методом многочастичной броуновской динамики. В связи с целью исследования были поставлены следующие задачи:

1. Создание многочастичных броуновских моделей взаимодействия ферредоксина с ФНР и гидрогеназой.
2. Изучение формы и свойств электростатических полей молекул ферредоксина, ФНР и гидрогеназы и их влияния на сродство белков друг к другу.
3. Исследование на модели влияния ионной силы среды на скорость взаимодействия ферредоксина с ФНР и гидрогеназой.
4. Исследование на модели влияния точечных мутаций на скорость взаимодействия белков.
5. Исследование влияния рН среды на конкуренцию за ферредоксин между ФНР и гидрогеназой.

Научная новизна и практическая значимость работы. Научная и практическая значимость работы заключается в разработке прямых моделей взаимодействия ферредоксина с ФНР и гидрогеназой. Было исследовано влияние рН, ионной силы и мутаций на скорость взаимодействия белков. Было показано, что увеличение рН значительно влияет на свойства электростатического поля гидрогеназы и ее сродство к ферредоксину, что указывает на регуляцию переключения электронных потоков в клетке посредством рН. Помимо этого, были идентифицированы аминокислотные остатки, мутации которых потенциально увеличивают скорость взаимодействия ферредоксина и гидрогеназы.

Используемый метод позволяет моделировать процессы так, как они протекают в клетке с учетом свойств растворителя, формы молекул и их

количества. Предсказательная сила метода основывается на возможности моделирования мутаций и исследования их влияния на скорость взаимодействия молекул.

Апробация работы

Материалы диссертации докладывались и обсуждались на: 15-той–20-той и 22-ой Международных конференциях «Математика. Компьютер. Образование», Дубна 2008, 2010, 2012, 2016, Пущино, 2009; 2011, 2013; IV и V Съездах биофизиков России, Нижний Новгород, 2013, Ростов-на-Дону, 2015; 16-ом Международном симпозиуме «Flavins and Flavoproteins», Хака, Испания, 2008; 7-ой международной конференции «Bioinformatics of genome regulation and structure», Новосибирск, 2010; 1-ом международном симпозиуме «1st International Symposium on Computational Materials and Biological Sciences», Токио, Япония, 2013; Международной школе «Вычислительное и теоретическое моделирование биологических взаимодействий», Дубна, 2013; семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 21 работа, из них 7 – в журналах, рекомендованных ВАК для соискателей ученых степеней, 4 – в сборниках научных трудов международных конференций и 9 тезисов – в сборниках тезисов докладов международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, четырех глав, содержащих описание методов и результатов работы, заключения, списка литературы из 110 наименований. Объем диссертации 103 страницы, 29 рисунков и 2 таблицы.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении сформулированы цели и задачи исследования, обоснована актуальность и практическая значимость работы.

В первой главе представлен обзор литературы, посвященной выделению водорода зелеными водорослями и взаимодействиям между участвующими в этом процессе белками ферредоксином, ферредоксин-НАДФ⁺-редуктазой (ФНР) и гидрогеназой. В литературном обзоре описаны основные молекулярные механизмы, приводящие к образованию молекулярного водорода из протонов в результате переноса электрона по электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) фотосинтеза; современное состояние моделирования данных процессов и структура белков ферредоксина, ФНР и гидрогеназы.

Во второй главе описан метод моделирования взаимодействия ферредоксина, ФНР и гидрогеназы – прямое многочастичное моделирование [Ризниченко и др., 2010, 2011, 2014; Хрущев и др., 2013, 2015; Kovalenko et al., 2006; 2010, 2011; Riznichenko et al., 2010].

Процесс взаимодействия двух электрон-транспортных белков можно подразделить на шесть этапов:

- 1) свободная диффузия молекул белков в объеме;
- 2) взаимная ориентация белков в электростатических полях друг друга при сближении;
- 3) образование предварительного комплекса;
- 4) конформационные перестройки, образование временных молекулярных связей, приводящие к формированию финального комплекса;
- 5) передача электрона;
- 6) распад комплекса.

Для описания взаимодействия белков нами используется модифицированный метод многочастичной броуновской динамики, реализованный в программе ProKSim (Protein Kinetics Simulation) [Ризниченко и др., 2010, 2011, 2014; Хрущев и др., 2013, 2015; Kovalenko et al., 2006; 2010, 2011; Riznichenko et al., 2010]. Наш метод позволяет моделировать взаимодействие большого количества белков в трехмерном реакционном объеме, то есть имитировать реакцию в растворе. В модели белки являются трехмерными жесткими телами, рассматриваемыми как броуновские частицы, движущиеся в вязкой среде под действием случайной броуновской и электростатической сил.

Модельная сцена представляет собой трехмерный реакционный объем, имеющий форму параллелепипеда с произвольными размерами граней. Перед началом моделирования молекулы белков случайным образом распределяются по этому объему.

Белки диффундируют в виртуальном реакционном объеме и могут приблизиться друг к другу на малое расстояние без перекрывания их поверхностей. Трехмерные поверхности ферредоксина, ФНР и гидрогеназы были сконструированы с использованием данных о кристаллической структуре этих белков. Молекулы белков были аппроксимированы набором сфер: белки сталкиваются, если соприкасаются представляющие их сферы. Такая аппроксимация позволяет получить достаточно реалистичное описание поверхности белка и значительно снижает время расчета.

Для описания поступательного движения броуновских частиц под действием электростатических сил в физике используют уравнение Ланжевена:

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

где x – координата, вдоль которой рассматривается движение, t – время, ξ_x^{tr} – коэффициент вязкого трения вдоль этой координаты, $f_x(t)$ и F_x – проекции случайной и электростатической сил на ось x , соответственно.

В модели молекулы белков совершают поступательное и вращательное движение в вязкой среде под действием случайной и электростатической сил. Молекулы растворителя являются источником случайной броуновской силы и силы трения. Из-за малого ускорения частиц в вязкой среде, когда времена релаксации инерции малы по сравнению с интересующим масштабом времени, инерцией пренебрегают. Это означает, что суммарная сила, являющаяся суммой броуновской, случайной силы и внешних электростатических сил, равна нулю.

Таким образом, получаем уравнение Ланжевена без инерционного члена ($m \frac{d\vec{v}}{dt}$)

для поступательного движения:

$$\xi_x^{tr} \frac{dx}{dt} = f_x(t) + F_x,$$

где x – координата, вдоль которой происходит поступательное движение, ξ_x^{tr} – коэффициент вязкого трения вдоль этой координаты, $f_x(t)$ и F_x – проекции случайной и электростатической сил на ось x , соответственно.

Для вращательного движения уравнение Ланжевена принимает следующий вид:

$$\xi_x^{rot} \frac{d\phi}{dx} = m_x(t) + M_x,$$

где ϕ – угол поворота вокруг оси x , относительно которой рассматривается движение, ξ_x^{rot} – коэффициент вязкого трения относительно этой оси, $m_x(t)$ и M_x – моменты случайной и электростатической сил относительно оси x , соответственно.

Среднее и дисперсия случайной силы удовлетворяют следующим условиям:

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

$$\langle f_x^2(t) \rangle = \frac{2kT\xi_x^{rr}}{\Delta t},$$

где k – постоянная Больцмана, T – температура, Δt – шаг по времени. Аналогичные выражения справедливы и для момента случайной силы.

Электростатическую силу можно найти по формуле:

$$F_x = -q \frac{\partial U}{\partial x},$$

где q – заряд, U – электростатический потенциал.

Для упрощения расчетов коэффициентов вязкого трения в модели молекулы ферредоксина, ФНР и гидрогеназы представлялись как эллипсоиды вращения.

Электростатические взаимодействия играют важную роль в связывании белков электрон-транспортной цепи. Парциальные заряды на белках создают гетерогенное электростатическое поле, которое значительно снижается с ростом расстояния от поверхности белка, а также за счет экранирования поверхностных зарядов полярными молекулами воды. Если данный белок находится далеко от других белков, он движется лишь за счет броуновской силы, но не электростатической. Таким образом, его движение определяется исключительно броуновской диффузией. Как только белок подходит достаточно близко к другим белкам, его движение в большей степени определяется электростатическим полем последних, что играет решающую роль в достижении правильной ориентации и формировании предварительного комплекса.

Для описания электростатических взаимодействий необходимо рассчитать электростатическую силу и ее момент, действующие на белок со стороны других белков, находящихся на расстоянии существенного электростатического взаимодействия. Перед началом моделирования движения белков вокруг каждого белка в прямоугольной трехмерной области заданного размера рассчитывается значение потенциала электрического поля при заданной ионной силе и рН раствора. Размер области зависит от расстояния взаимодействия между белками и концентрации молекул. Этот размер выбирается автоматически таким, чтобы было возможно рассчитать взаимодействие рассматриваемых белков внутри расстояния взаимодействия.

Для расчета электростатического потенциала вокруг белка задается прямоугольная трехмерная сетка с определенным шагом h . Величина шага является параметром модели и определяет точность расчета потенциала. В наших расчетах мы брали величину шага сетки равную 2 Å, обеспечивающую

достаточную точность и малое время расчета. Каждой ячейке сетки присваиваются значения заряда, диэлектрической проницаемости и ионной силы.

Значения зарядов на атомах вычисляются по уравнению Хендерсона-Хассельбальха. Значения pK_a аминокислот взяты из [Dawson et al., 1959]. Если в одну ячейку попадает несколько заряженных атомов, в нашей модели заряд суммируется.

В модели белок считается областью с диэлектрической проницаемостью $\varepsilon = 2$ с фиксированными зарядами на аминокислотных соответствующих остатках. Раствор считается областью с диэлектрической проницаемостью $\varepsilon = 80$ с мобильными зарядами (ионами).

Потенциал в ячейках сетки рассчитывается по итерационной формуле, которая получена из линеаризованного уравнения Пуассона–Больцмана [Fogolari, 2011]. Потенциал в данной ячейке на данном шаге вычисляется в соответствии с потенциалами в соседних ячейках на предыдущем шаге и суммарным зарядом данной ячейки:

$$\varphi_0 = \frac{\left(\sum_{i=1}^6 h\varepsilon_i\varphi_i\right) + 4\pi q_0}{\left(\sum_{i=1}^6 h\varepsilon_i\right) + h^3\kappa_0^2}$$

$$\kappa^2 = \frac{8\pi N_A e^2 I}{k_B T}, \quad I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^K c_i^{\text{bulk}} Z_i^2$$

Здесь φ – потенциал, ε – диэлектрическая проницаемость, ρ – плотность зарядов в белке, c_i^{bulk} – концентрация i -иона в растворе, Z_i – заряд i -иона, e – заряд электрона, T – температура в К, N_A – число Авогадро, I – ионная сила раствора, h – шаг сетки.

Таким образом, для каждого типа объектов в некоторой области вокруг объекта известно значение потенциала электрического поля. Теперь для нахождения силы и ее момента, действующих на отдельный заряд в белке, необходимо вычислить градиент потенциала, создаваемого другими белками, в той точке, где находится заряд на данном белке. По известному градиенту поля и величине заряда вычисляется сила, действующая на этот заряд. Для того чтобы рассчитать силу и момент, действующие в целом на молекулу, надо просуммировать силу и момент, действующие на каждый из зарядов на данной молекуле.

Шаг по времени и шаг сетки для расчета потенциала оцениваются, исходя из физических принципов, и в дальнейшем не меняются.

На каждом временном шаге в программе рассчитывается суммарное количество образовавшихся комплексов. Построенные по этим данным

кинетические кривые (рис. 1) служат для сравнения результата моделирования и экспериментальных данных и определения модельных параметров. Константа реакции второго порядка может быть получена аппроксимацией полученной в модели кривой по закону действующих масс. Мы предполагаем, что белки взаимодействуют в соответствии со следующей реакционной схемой:



где A_{red} – восстановленный донор электронов, в данном случае, ферредоксин; B_{ox} – окисленный акцептор электронов, ФНР или гидрогеназа; $[A_{\text{red}} B_{\text{ox}}]$ – комплекс, в котором происходит перенос электрона; A_{ox} и B_{red} – окисленный донор и восстановленный акцептор после протекания реакции. Три константы скорости могут быть определены экспериментально, однако для взаимодействия ферредоксина и гидрогеназы таких данных нет. В нашей модели мы рассматриваем только k_{on} – константу, характеризующую диффузионно-контролируемую стадию взаимодействия белков. Мы используем k_{on} для сравнения с результатами модели.

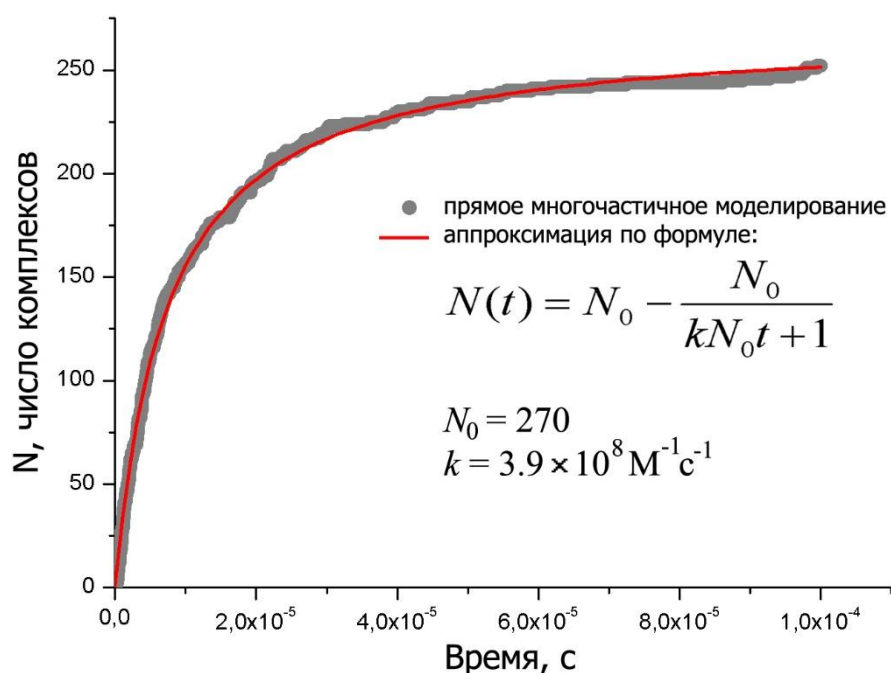


Рисунок 1. Кинетическая кривая восстановления ФНР (количество молекул указано в штуках), полученная на прямой модели, и ее аппроксимация по закону действующих масс (формула на рисунке) при $I = 100$ мМ, $pH = 7$, $p = 0,003$, $r = 18 \text{ \AA}$.

В третьей главе описываются подбор параметров модели (расстояния и вероятности образования комплекса) и валидация модели. Показано соответствие зависимостей констант скоростей образования комплексов

ферредоксин-ФНР и ферредоксин-гидрогеназа теории и экспериментальным данным. Полученные значения параметров в дальнейшем использованы в моделях взаимодействия исследуемых белков.

В четвертой главе представлены результаты моделирования влияния рН среды на взаимодействие исследуемых белков. Свойства белков, включая их растворимость, суммарный заряд и конформацию, зависят от рН среды, то есть от концентрации ионов водорода в среде. В клетках как животных, так и растений, рН цитозоля поддерживается постоянным и близким к 7. Однако в некоторых компартментах клетки рН значительно отличается от цитозольного и в некоторых органеллах, таких как хлоропласты, может изменяться в зависимости от внешних условий и протекающих в клетке процессов [Heldt et al., 1973; Wu and Berkowitz, 1992]. Таким образом, можно говорить о некоторой оптимальной величине рН, при которой белки клетки функционируют наиболее эффективно. Кроме того, в клеточных компартментах сами изменения рН могут служить регуляторным механизмом, изменяющим скорости взаимодействия белков друг с другом и другими типами молекул, их растворимость и конформационную стабильность [Nelson and Cox, 2004].

Такое влияние рН на белки можно изучать путем измерения их активности (в случае ферментов) или скорости взаимодействия с белками-партнерами. Многочисленные эксперименты показали, что зависимость активности большинства белков от рН имеет широкое плато в диапазоне физиологического рН. Более того, считается, что белки могут существовать в своей нативной конформации только в границах рН 4-10 [Nelson and Cox, 2004]. При значениях рН, выходящих из границ этого диапазона, белок денатурирует. В щелочных растворах это происходит из-за частичного разрушения дисульфидных мостиков в реакции β -элиминирования; в кислых – в результате гидролиза подвижных пептидных связей, часто вблизи остатков аспарагиновой кислоты.

Известно, что на световой стадии фотосинтеза помимо транспорта электронов происходит транспорт протонов из стромы в люмен. В результате рН люмена становится более кислым, а рН стромы – более щелочным, причем эти изменения составляют около 2 единиц рН [Hauser et al. 1995]. Мы предполагаем, что такое значительное изменение рН может служить регуляторным механизмом, влияющим на сродство ферредоксина к ФНР и гидрогеназе и, следовательно, на распределение электронных потоков. Для оценки влияния изменения рН стромы на распределение потоков от ферредоксина, нами были рассчитаны зависимости скоростей образования комплексов ферредоксина с ФНР и гидрогеназой в попарных моделях и в конкурентной модели, в которой в реакционном объеме присутствуют все три белка (рис. 2 и 3).

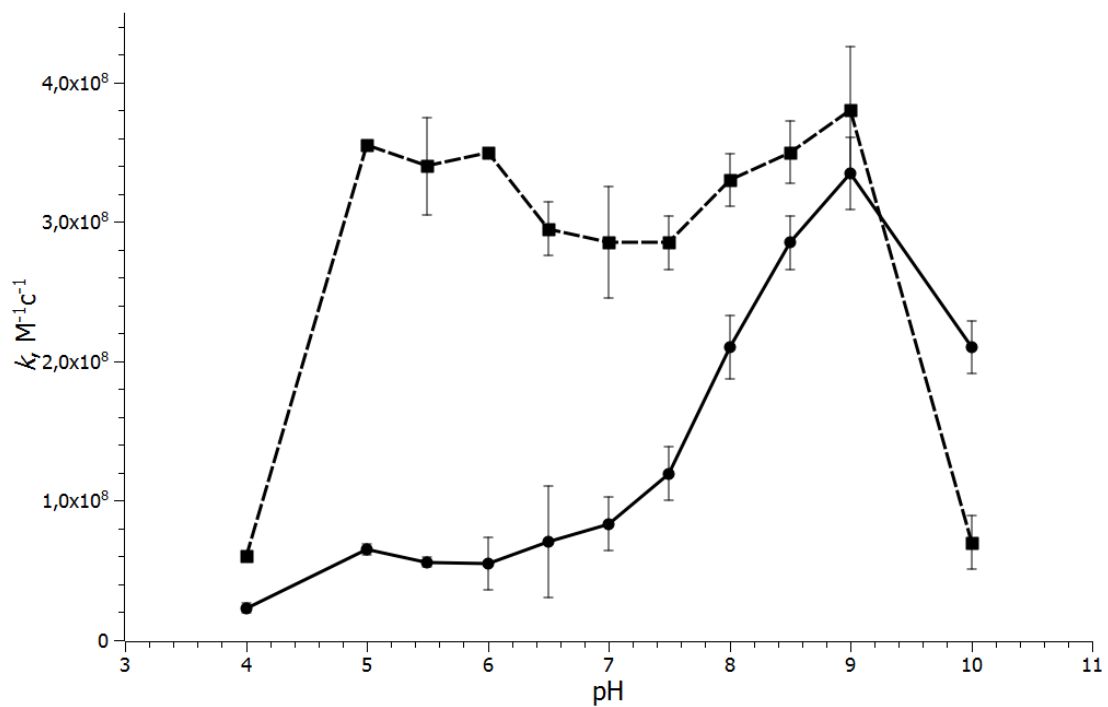


Рисунок 2. Зависимость константы скорости связывания ферредоксина с ФНР (пунктирная линия) и гидрогеназой (сплошная линия) от рН. Каждая точка – среднее пяти расчетов, показан 95%-ный доверительный интервал.

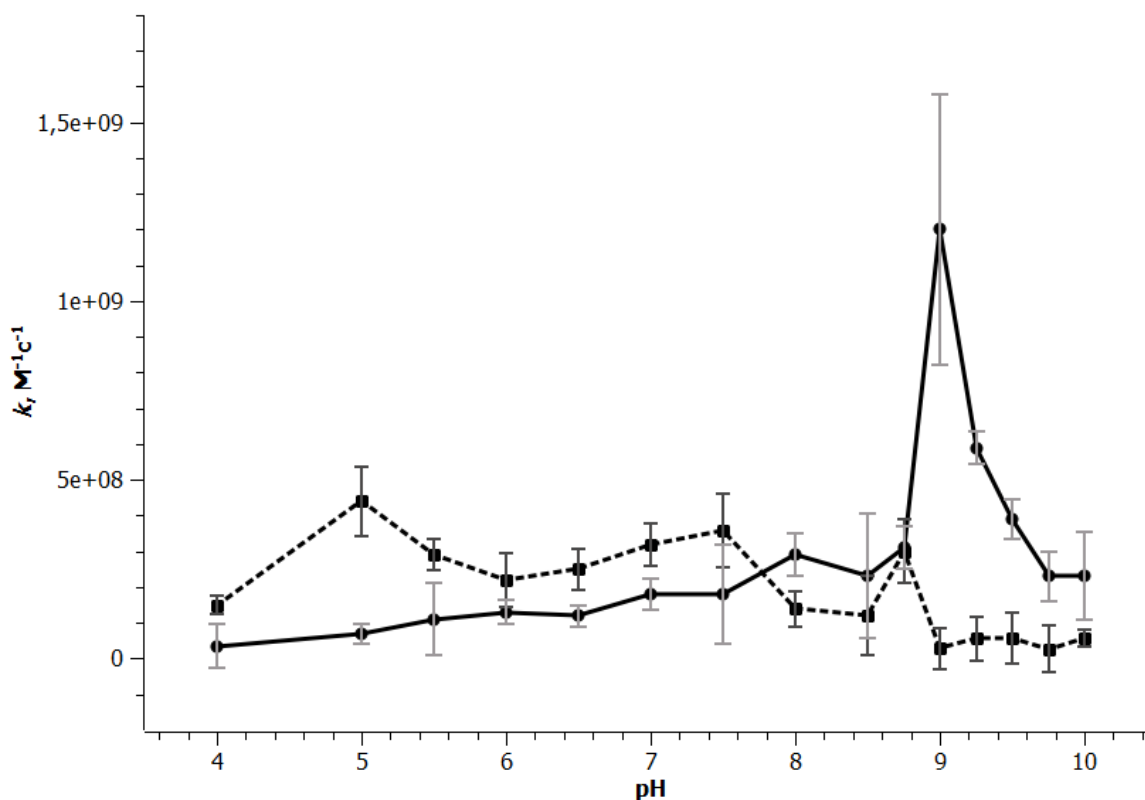


Рисунок 3. Зависимость константы скорости связывания ферредоксина с ФНР (пунктирная линия) и гидрогеназой (сплошная линия) от pH в конкурентной «тройной» модели. Каждая точка – среднее пяти расчетов, показан 95%-ный доверительный интервал.

Рассчитанные нами на модели константы скорости взаимодействия ферредоксина с ФНР (пунктирная линия) и гидрогеназой (сплошная линия) для разных значений pH приведены на рисунках 2 и 3. В обоих типах моделей минимальные значения константы для обеих пар белков соответствуют значениям pH 4 и 10; при таких pH начинает нарушаться нативная конформация белков. В области значений pH 5-7,5 константа скорости связывания гидрогеназы и ферредоксина практически не изменяется, а затем резко увеличивается, достигает максимума при pH 9 и вновь снижается. При этом при pH 6,5 константа скорости связывания ферредоксина с гидрогеназой в парной модели примерно в три раза меньше, чем константа скорости связывания Фд с ФНР; в тройной модели – примерно в два раза. Данный результат качественно согласуется с экспериментальными данными: при pH 7 около 85% электронов идет на ФНР и только 15% — на гидрогеназу [Yacoby et al., 2011].

Зависимость константы скорости связывания ФНР и ферредоксина практически постоянна на промежутке от 6 до 7,5 единиц pH, и имеет второй максимум при pH ~ 9. Такая форма зависимости от pH с широким плато

характерна для многих белков, поскольку им необходимо сохранять активность при изменении рН среды.

рН стромы хлоропластов изменяется от примерно 6 единиц рН в темноте до 8-8,5 единиц на свету. Как показано выше, при таком изменении рН изменяется сродство белков друг к другу. Для того, чтобы понять механизм этого изменения, мы построили эквипотенциальные поверхности белков, отражающие распределение зарядов на молекулах.

На рисунках 4 и 5 приведены эквипотенциальные поверхности ФНР, гидрогеназы и ферредоксина при различных значениях рН 6 и 8. Красный цвет соответствует отрицательно заряженным областям, синий – положительно заряженным.

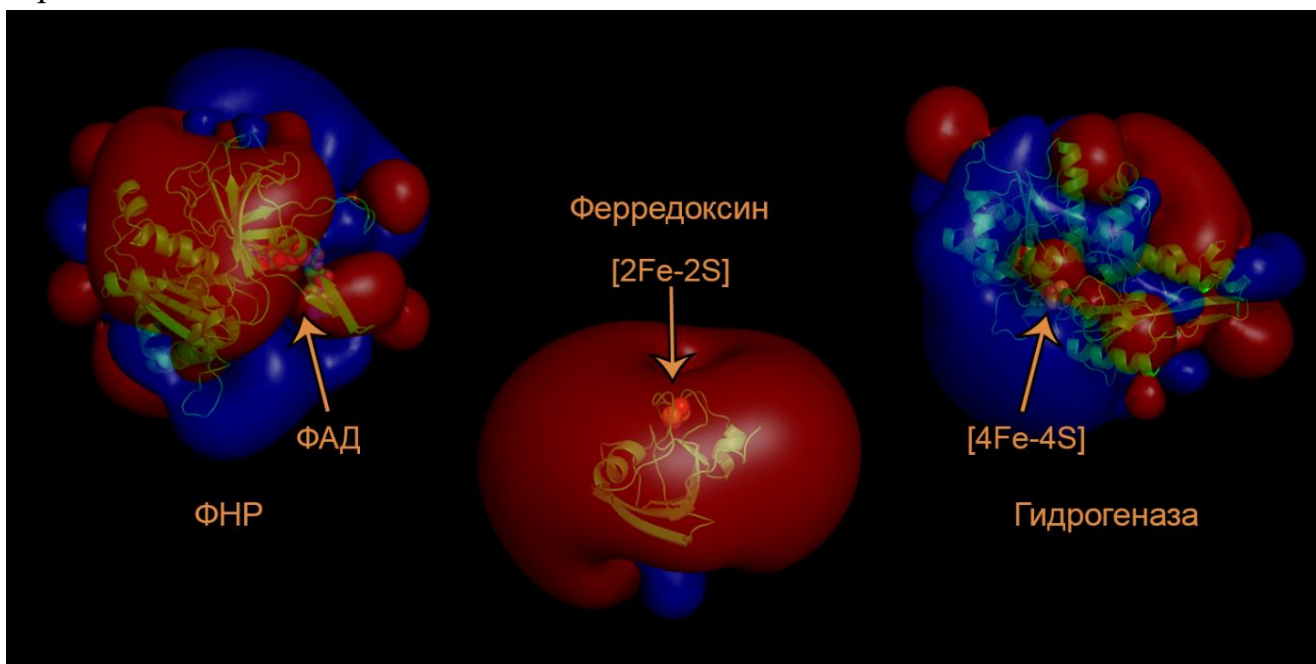


Рисунок 4. Эквипотенциальные поверхности ФНР (слева), гидрогеназы (справа) и ферредоксина (в центре) при рН = 6, I = 150 мМ. Синим изображена поверхность +7 мВ, красным – поверхность -7 мВ

Эквипотенциальная поверхность молекулы ФНР устроена сложно (рис. 4, слева). В целом при рН = 6, что соответствует рН стромы в темноте, молекула заряжена положительно, и ее кофактор (ФАД) располагается в области положительного потенциала. На молекуле есть несколько отрицательно заряженных участков, в том числе один вблизи активного центра. Такая неоднородность эквипотенциальной поверхности должна способствовать правильной ориентации ФНР относительно ее белков-партнеров.

Эквипотенциальную поверхность молекулы гидрогеназы (рис. 4, справа) можно условно разделить на две области – положительную и отрицательную.

Положительные заряды окружают железо-серный кластер молекулы, когда как противоположная сторона белка заряжена отрицательно.

При $pH = 6$ ферредоксин (рис. 4, в центре) заряжен, в целом, отрицательно, что отличает его от двух других белков, которые при данном pH заряжены положительно. На молекуле есть только две области положительного потенциала; одна расположена вблизи кофактора молекулы, $[2Fe-2S]$ -кластера, атомы железа которого и формируют положительно заряженный участок; вторая область располагается с противоположной стороны молекулы, вдали от активного центра.

Таким образом, можно заключить, что при $pH = 6$ ферредоксин будет ориентироваться в поле второй молекулы, ФНР или гидрогеназы, притягиваясь отрицательными областями к положительным, но взаимодействие будет затруднено, поскольку его активный центр и активные центры его партнеров находятся в области положительного потенциала.

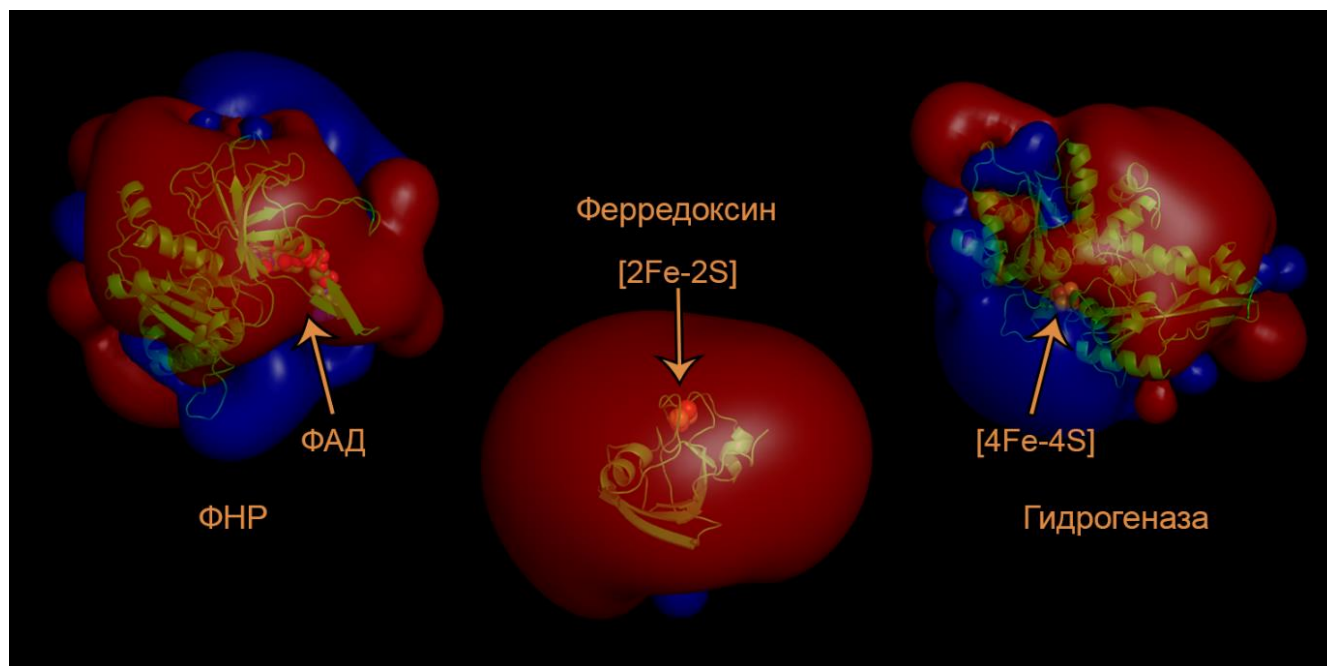


Рисунок 5. Эквипотенциальные поверхности ФНР (слева), гидрогеназы (справа) и ферредоксина (в центре) при $pH = 8$, $I = 150$ мМ. Синим изображена поверхность $+7$ мВ, красным – поверхность -7 мВ

При $pH = 8$ на ферредоксине (рис. 5, в центре) остается лишь очень небольшая область положительного потенциала с противоположной от активного центра стороны. При этом ФНР и гидрогеназа (рис. 5, слева и справа, соответственно) практически не претерпевают изменений – они становятся более отрицательно заряженными, но форма эквипотенциальных поверхностей сохраняется; их активные центры все также окружены положительно

заряженными аминокислотными остатками. Но теперь, поскольку железосерный кластер ферредоксина оказался в области отрицательного потенциала, ему проще сблизиться с обеими молекулами-партнерами, что увеличивает скорость его взаимодействия. В хлоропластах при включении света начинается транспорт протонов из стромы в люмен, что приводит к защелачиванию стромы. Через некоторое время устанавливается равновесное значение рН, составляющее 8-8,5 единиц. При этом было показано, что ФНР не сразу начинает взаимодействовать с ферредоксином – белки реагируют только после защелачивания среды [Mulo, 2011].

В случае взаимодействия гидрогеназы, изменение рН в щелочную сторону приводит к уменьшению области положительного потенциала за пределами ближайшего окружения [Fe-Fe]-кластера. Благодаря этому, при рН 7,5-9 константа связывания с ферредоксином максимальна, поскольку ферредоксин быстро принимает правильную ориентацию в поле гидрогеназы и находит кофактор.

Сходные рассуждения справедливы и для ФНР, но поскольку ее потенциал более неоднороден, этот эффект выражен слабее.

Как показывает изучение полученных эквипотенциальных поверхностей белков, изменения ионной силы и рН раствора значительно модифицируют электростатические свойства белков, изменяя их сродство друг к другу, и, следовательно, скорость их взаимодействия. В условиях стромы тилакоидов, где в процессе фотосинтеза изменение рН составляет 2-3 единицы, такие изменения имеют важные последствия.

На модели мы показали, что в широком диапазоне рН, от 5 до 9, константа скорости связывания ферредоксина и ФНР практически не изменяется. Такая форма зависимости характерна для большинства белков [Berg, 2007]. Таким образом, можно предположить, что регуляция активности ФНР происходит через взаимодействие с дополнительными белками, Tic62 и TROL, а не за счет изменения ее сродства к ферредоксину. Таким образом, все процессы, «выключающие» ФНР при низком рН, направлены на предотвращение непродуктивного взаимодействия белков в темноте. То есть связывание ФНР с TROL и Tic62 в темноте направлено на снижение концентрации свободной ФНР в строме, чтобы в условиях слабого освещения немногочисленные молекулы восстановленного ферредоксина «встречались» с меньшим числом молекул ФНР. Поскольку ФНР для восстановления одной молекулы НАДФ⁺ требуется два электрона, а ферредоксин переносит только один, снижение концентрации ФНР в строме увеличивает вероятность столкновения ферредоксина с уже единожды восстановленной ФНР и, следовательно, вероятность восстановления НАДФ⁺.

С другой стороны, в модели константа скорости связывания ферредоксина с гидрогеназой значительно зависит от pH: при увеличении pH от 7 до 9, константа возрастает в три раза (рис. 2 и 3). Казалось бы, поскольку гидрогеназа восстанавливает протоны, она должна быть более активна при низком pH. Однако экспериментально было показано, что реакция выделения водорода гидрогеназой *in vitro* (с использованием метилвиологена в качестве восстановителя) имеет оптимум при pH 7-8 [Kousorov et al., 2003] и ярко выраженный максимум [Adams and Mortenson 1984; Happe and Naber, 1993]. По-видимому, сродство гидрогеназы к ее реакционным партнерам – протонам и ферредоксину – регулируется независимо. Увеличение pH, происходящее в строме на свету, приводит к увеличению константы скорости взаимодействия с ферредоксином, но снижает количество субстрата катализируемой белком реакции. Таким образом, в строме при низком pH скорость производства водорода мала по причине того, что гидрогеназа получает мало электронов. При увеличении pH количество электронов, поступающих на фермент от ферредоксина, увеличивается, и, следовательно, увеличивается скорость выделения водорода. Можно заключить, что, по-видимому, в хлоропласте скорость выделения водорода регулируется pH за счет регуляции сродства гидрогеназы к ферредоксину, а не напрямую за счет изменения количества протонов.

Таким образом, мы показали, что скорость взаимодействия ферредоксина с гидрогеназой значительно зависит от pH. В границах pH от 6 до 9 константа скорости образования комплекса Фд-гидрогеназа возрастает, когда как для комплекса Фд-ФНР она остается постоянной во всем диапазоне физиологических значений pH. Данный результат указывает на то, что в тилакоидах pH среды участвует в регуляции распределения электронных потоков ЭТЦ фотосинтеза.

В пятой главе обсуждается влияние точечных мутаций на взаимодействие ферредоксина с ФНР и гидрогеназой. Одним из подходов к решению биотехнологической задачи получения водорода из зеленых водорослей является воздействие на молекулярном уровне, а именно изменение структуры или синтеза участвующих в процессе белков. Необходимо, чтобы ферредоксин предпочтительнее взаимодействовал с гидрогеназой, а не с ФНР. Одним из возможных подходов к решению данной задачи является введение в ферредоксин, ФНР или гидрогеназу точечных мутаций, изменяющих сродство белков друг к другу. Таким образом, задача заключается в идентификации мутаций, уменьшающих сродство ферредоксина к ФНР и увеличивающих – к гидрогеназе. Основным экспериментальным методом определения роли аминокислотных остатков во взаимодействиях между белками является сайт-

специфический мутагенез [Casaus et al., 2002; Faro et al., 2002; Gomez-Moreno et al., 1998; Hurley et al., 1993, 1999, 2000; Martinez-Julvez et al., 1998a,b, 1999]. Используя нашу модель, мы воспроизвели такие эксперименты для мутаций, изменяющих заряд белка.

На поверхности ФНР вокруг экспонированной наружу части ФАДа расположено несколько положительно заряженных аминокислотных остатков [Serre et al., 1996] (рис. 6). Эти аминокислотные остатки условно можно подразделить на две группы, различающиеся по степени влияния на взаимодействие с ферредоксином [Hurley et al., 1999]. Вблизи ФАДа на поверхности ФНР, взаимодействующей с ферредоксином, расположено несколько положительно заряженных аминокислотных остатков, ориентирующих отрицательно заряженный ферредоксин при формировании комплекса. К этим остаткам относятся Arg16, Lys72, Lys75, Arg100, Lys138, Arg264 и Lys294. Они располагаются в области нейтрального потенциала, следовательно, изменение их заряда значительно влияет на распределение потенциала в области ФАДа, то есть области взаимодействия с ферредоксином. Замены этих аминокислотных остатков на нейтрально или противоположно заряженные должно привести к неоптимальной для докинга ориентации ферредоксина относительно ФНР, то есть более слабому взаимодействию между белками и неподходящей для электронного транспорта ориентации.

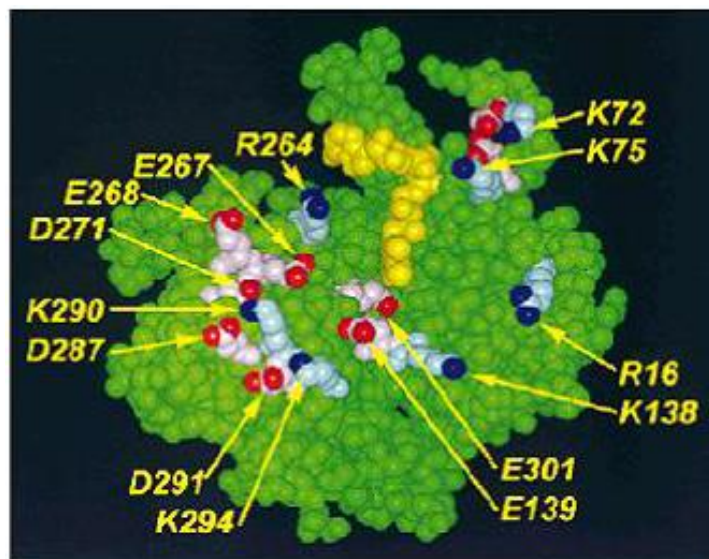


Рисунок 6. Поверхность молекулы ФНР в области ФАДа. Боковые цепи основных аминокислотных остатков показаны голубым цветом (атомы азота – синим). Кислые остатки показаны розовым цветом (атомы кислорода карбоксильной группы – красным). ФАД изображен желтым цветом (адаптировано из [Hurley et al., 2000])

Мы исследовали влияние мутаций с заменой заряда на скорость образования комплекса Фд-ФНР. На модели мы воспроизвели экспериментальные результаты. Экспериментальные и теоретические константы скоростей приведены в таблице 1.

Таблица 1. Экспериментальные [Hurley et al., 1999; Martinez-Julvez et al., 1998a,b] и полученные в модели константы скорости образования комплекса Фд-ФНР для ФНР дикого типа и ее нескольких мутантов при $r = 18 \text{ \AA}$, $p = 0,003$, $I = 100 \text{ mM}$ и $\text{pH} = 7$

	Экспериментальная $k \times 10^8$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$	Модельная $k \times 10^8$, $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
Дикий тип	2,7	2,7
Arg100Ala	--/	2,44
Arg264Glu	1,3	0,88
Lys294Glu	0,91	1,23
Lys138Glu	0,5	0,64
Lys72Glu	0,26	0,17
Arg16Glu	0,22	0,084
Lys75Gln	0,38	0,43
Lys75Glu	0,0082	0,099

Для выявления аминокислотных остатков на поверхности гидрогеназы, изменение которых потенциально способно увеличить скорость ее взаимодействия с ферредоксином, были исследованы точечные мутации с заменой заряда на поверхности взаимодействия белков. Поскольку поверхность молекулы гидрогеназы, взаимодействующая с ферредоксином, заряжена, в основном, положительно (см. рисунки 3 и 4), мы исследовали расположенные рядом отрицательно заряженные аминокислотные остатки, глутамат (Glu) и аспартат (Asp), и производили замену заряда на положительный или убрали заряд, что соответствует мутациям замены Glu и Asp на аргинин (Arg) или глутамин (Gln) и аспарагин (Asn), соответственно. Таким образом, увеличение области положительного потенциала на поверхности взаимодействия гидрогеназы с ферредоксином должно усиливать их взаимное притяжение и, следовательно, скорость взаимодействия. Результаты моделирования для двух значений pH представлены в таблице 2.

Таблица 2. Константы скорости образования комплекса ферредоксина и гидрогеназы дикого и мутантных типов при pH = 7 и 9

	Модельная $k \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH = 7	Модельная $k \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, pH = 9
Дикий тип	3,13	10,1
Glu216Gln	4,42	10,623
Glu216Arg	6,55	15,47
Asp209Asn	3,46	8,03
Asp209Arg	3,86	8,46
Glu34Gln	3,64	7,74
Glu34Arg	3,82	9,304
Glu77Gln	3,47	3,38
Glu77Arg	3,65	8,431
Asp143Lys	4,26	10,135
Glu223Gln	3,91	3,63
Glu223Arg	5,53	12,67

Из таблицы 2 видно, что замена заряда на остатках Glu216, Glu223 и Asp143 гидрогеназы на нейтрально заряженные или положительно заряженные способна увеличить скорость взаимодействия ферредоксина с гидрогеназой.

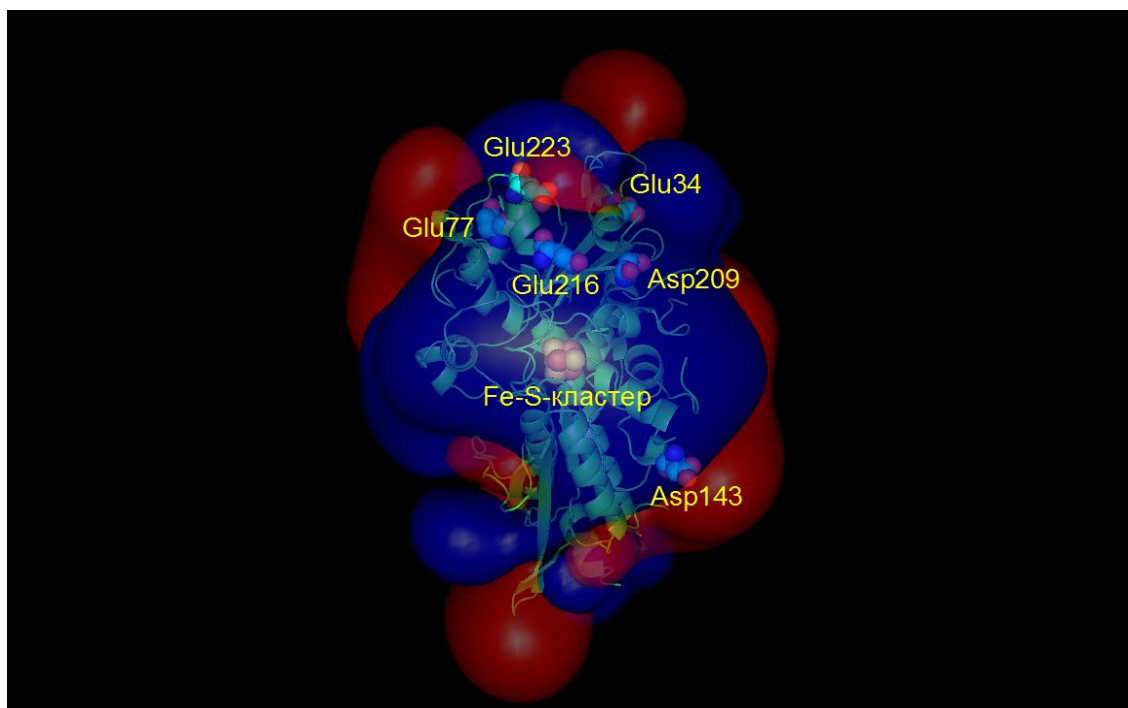


Рисунок 7. Расположение отрицательно заряженных аминокислотных остатков близи активного центра гидрогеназы. Синим изображена поверхность +7 мВ, красным – поверхность -7 мВ

Таким образом, мы идентифицировали аминокислотные остатки ФНР и гидрогеназы, изменение которых потенциально способно привести к увеличению выхода водорода.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние два десятилетия теоретические исследования взаимодействия белков вышли на новый уровень благодаря увеличению вычислительной мощности компьютеров. Однако методы молекулярной динамики до сих пор не позволяют моделировать взаимодействия множества макромолекул. Для этого можно использовать броуновские многочастичные модели, описывающие основные закономерности протекающих в клетках процессов. Результаты прямого многочастичного моделирования согласуются с экспериментальными данными [Martinez-Hulvez et al., 1998a, 1998b; Yacoby et al., 2011] и позволили нам исследовать конкуренцию двух белков (ФНР и гидрогеназы) за источник электронов (ферредоксин).

Перенаправление потока электронов ЭТЦ с ФНР на гидрогеназу является одним из перспективных подходов к увеличению выхода водорода. Для этого требуется понимать, каким образом свойства молекул зависят от свойств среды, в которой они существуют. На нашей модели мы показали, как естественный процесс увеличения рН в строме хлоропластов на свету влияет на взаимодействие белков. Хотя величина рН не влияет на взаимодействие ферредоксина и ФНР, ее изменение значительно изменяет скорость связывания ферредоксина и гидрогеназы. Казалось бы, поскольку гидрогеназа восстанавливает протоны, она должна быть более активна при низком рН, однако это не так, что подтверждается экспериментальными данными [Adams and Mortenson 1984; Harpe and Naber, 1993; Kousorov et al., 2003]. Можно предположить, что сродство гидрогеназы к ее реакционным партнерам – протонам и ферредоксину – регулируется независимо, то есть в хлоропласте скорость выделения водорода регулируется рН за счет регуляции сродства гидрогеназы к ферредоксину, а не напрямую за счет изменения количества протонов как субстрата.

Другим подходом к увеличению выхода водорода является модификация молекул белков для снижения или увеличения их активности. В данном случае, мы исследовали влияние точечных мутаций, изменяющих заряд молекул, на скорость их взаимодействия. Мы идентифицировали ключевые аминокислотные остатки, изменение которых в перспективе может увеличить выход биоводорода.

Однако для лучшего понимания механизмов формирования и распада комплексов и переноса электрона белков требуется более подробные модели, учитывающие не только диффузию и электростатические взаимодействия, но и другие силы, например, гидрофобные и Ван-дер-Ваальсовы. Для этого следует использовать молекулярную динамику и квантовую химию, позволяющие в деталях рассмотреть движение атомов макромолекул и их взаимодействие друг с другом.

Проведенная работа и полученные результаты позволяют нам сделать следующие выводы.

1. Были разработаны модели взаимодействия ферредоксина и ФНР, ферредоксина и гидрогеназы и конкурентная модель взаимодействия трех белков в растворе.

2. Были исследованы форма и свойства электростатических полей молекул ферредоксина, ФНР и гидрогеназы. Было показано, что изменение рН и ионной силы значительно влияют на сродство ферредоксина к ФНР и гидрогеназе.

3. Было показано, что зависимость константы скорости взаимодействия ферредоксина с ФНР от ионной силы имеет немонотонный характер. Была подтверждена гипотеза о том, что при низкой ионной силе электростатические взаимодействия приводят к агрегации белков в «непродуктивные» комплексы.

4. Было показано, что скорость образования комплексов Фд-ФНР и Фд-гидрогеназа определяется электростатическими взаимодействиями белков.

5. На модели была изучена зависимость скорости взаимодействия ферредоксина с ФНР и гидрогеназой. Было показано, что константа скорости связывания ферредоксина с гидрогеназой при увеличении рН от 7 до 9 возрастает в три раза, когда как в широком диапазоне рН, от 5 до 9, константа скорости связывания ферредоксина и ФНР практически не изменяется.

6. С использованием модели ферредоксина и гидрогеназы были предсказаны мутации заряженных аминокислотных остатков, увеличивающие скорость взаимодействия данных белков.

ОСНОВНЫЕ РАБОТЫ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах из списка ВАК

Роль электростатических взаимодействий при образовании комплексов ферредоксин-ферредоксин-НАДФ⁺-редуктаза и ферредоксин-гидрогеназа / А. Н. Дьяконова, С. С. Хрущев, И. Б. Коваленко и др. // *Биофизика*. — 2016. — Т. 61, № 4. — С. 677–685

Моделирование взаимодействий белков фотосинтетической электрон-транспортной цепи фотосинтеза методом броуновской динамики / С. С. Хрущев, А. М. Абатурова, А. Н. Дьяконова и др. // *Биофизика*. — 2015. — Т. 60, № 2. — С. 270–292

Моделирование белок-белковых взаимодействий с применением программного комплекса многочастичной броуновской динамики ProKSim / С. С. Хрущев, А. М. Абатурова, А. Н. Дьяконова и др. // *Компьютерные исследования и моделирование*. — 2013. — Т. 5, № 1. — С. 47–64

Computer simulation of protein-protein association in photosynthesis / I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, A. N. Diakonova et al. // *Mathematical modelling of natural phenomena*. — 2011. — Vol. 6, no. 7. — P. 39–54

Multiparticle computer simulation of protein interactions in the photosynthetic membrane / G. I. Riznichenko, I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova et al. // *Biophysics*. — 2011. — Vol. 56, no. 5. — P. 775–786

Direct computer simulation of ferredoxin and FNR complex formation in solution / I. B. Kovalenko, A. N. Diakonova, A. M. Abaturova et al. // *Physical Biology*. — 2010. — Vol. 7, no. 2

New direct dynamic models of protein interactions coupled to photosynthetic electron transport reactions / G. Y. Riznichenko, I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova et al. // *Biophysical Reviews*. — 2010. — Vol. 2, no. 3. — P. 101–110