

ПРЯМОЕ МНОГОЧАСТИЧНОЕ КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ИОННОЙ СИЛЫ РАСТВОРА НА КОНСТАНТУ СВЯЗЫВАНИЯ ФЛАВОДОКСИНА И ФОТОСИСТЕМЫ 1

Абатурова А. М., Коваленко И. Б., Ризниченко Г. Ю., Рубин А. Б.

С помощью компьютерной модели, основанной на методах многочастичного прямого моделирования и броуновской динамики, изучается кинетика образования комплекса между компонентами фотосинтетической электрон-транспортной цепи – белком флаводоксином и мембранным комплексом фотосистемы 1. Моделируется броуновское движение нескольких сотен молекул флаводоксина, учитываются электростатические взаимодействия и сложная форма молекул. С помощью данной модели удалось воспроизвести экспериментальную немонотонную зависимость константы связывания флаводоксина с фотосистемой 1. Это говорит о том, что для описания такого вида зависимости достаточно учета только электростатических взаимодействий

Введение. Флаводоксин (Флд) является маленьким водорастворимым электрон-транспортным белком, участвующим во многих биологических процессах: фиксации азота [1], восстановлении сульфитов [2], активации рибонуклеотид-редуктазы, превращении дитиобiotина в биотин [3]. Флаводоксин, как и ферредоксин, является необходимым посредником взаимодействия электрон-транспортной фотосинтетической цепи с циклом фиксации углерода и другими метаболическими системами автотрофных организмов. Он участвует в линейном и циклическом транспорте электронов при фотосинтезе, перенося электроны от акцепторной части мембранного мультиферментного комплекса фотосистемы 1 (ФС1) к ферредоксин: НАДФ⁺-оксидоредуктазе (ФНР) [4]. У некоторых видов цианобактерий и водорослей Флд синтезируется постоянно, у других же видов он может синтезироваться вместо ферредоксина при нехватке железа в питательной среде. Это связано с тем, что у ферредоксина функцию редокс-центра выполняет железо-серный кластер, а у флаводоксина редокс-центром служит нековалентно связанная молекула флавинононуклеотида (ФМН).

Известно, что в связывании флаводоксина с ФС1 важную роль играют электростатические взаимодействия [4]. Структура комплекса Флд-ФС1 неизвестна. Однако известны структуры Флд и ФС1 по отдельности, и есть данные по кинетике связывания Флд и ФС1 с последующим восстановлением Флд. Зависимость константы связывания Флд и ФС1 (k_{on}) от ионной силы носит немонотонный характер [5]. Целью данной работы является выявление роли электростатических взаимодействий Флд и ФС1 в формировании такого вида зависимости.

Зависимость константы скорости реакции от ионной силы раствора для связывания двух произвольных белков может быть убывающей в случае электростатического притяжения белков, возрастающей в случае отталкивания, не зависеть от ионной силы в случае, когда электростатические взаимодействия не играют

роли в связывании белков, и быть немонотонной. Зависимость константы связывания Φ_{LD} и Φ_{C1} от ионной силы относится к последнему варианту: при малых значениях ионной силы возрастающая, при больших убывающая. Для объяснения этого типа зависимости существует несколько теорий. Одна [6] объясняет такую зависимость тем, что монополярная и дипольная составляющие энергии электростатического взаимодействия белков разных знаков. Но, как авторы сами заключают, в реальных системах такого быть не может. Другая теория [5, 7] объясняет тем, что сначала образующийся комплекс не оптимален для электронного транспорта и необходима стадия конформационной перестройки (с участием гидрофобных взаимодействий), которая ингибируется при низких значениях ионной силы. Третья теория [8] предполагает, что образующийся предварительный комплекс – это не комплекс в обычном понимании слова, а множество быстро переходящих друг в друга электростатически выгодных взаимных ориентаций белков. При низких значениях ионной силы, когда электростатические взаимодействия слишком сильны, равновесие сдвигается в сторону предварительного комплекса, а не конечного, выгодного с точки зрения электронного транспорта и фиксируемого гидрофобными взаимодействиями.

В работе [9] с помощью метода броуновской динамики производилось численное моделирование убывающего участка зависимости константы связывания пластоцианина и цитохрома f от ионной силы, однако не был изучен начальный возрастающий участок зависимости при низких значениях ионной силы (меньше 50 мМ). Это связано с ограничениями метода. В работе [9] моделируется движение одной молекулы белка относительно другой. Траектория считается законченной, когда белок уходит за пределы сферы моделирования, где на него не действуют электростатические взаимодействия. Траектория считается успешной, если, до того как уйти, один белок приблизился к другому ближе, чем на заданное расстояние. Для расчета константы скорости реакции необходимо знать отношение количества успешных траекторий к общему числу траекторий. При низких значениях ионной силы электростатические взаимодействия настолько сильны, что один белок не уходит от другого за пределы сферы моделирования, и траектории никогда не кончаются. Поэтому с помощью используемого в работе [9] метода невозможно рассчитать константу скорости реакции для низких значений ионной силы.

Прямая многочастичная модель. Этого недостатка лишена наша компьютерная модель [10], которая использует методы броуновской динамики совместно с многочастичным моделированием. В работе [10] с помощью этой модели мы изучали кинетику образования комплекса пластоцианина и цитохрома f . В нашей модели белки рассматриваются как твердые тела, диффундирующие в трехмерном реакционном объеме под действием случайной броуновской и электростатической сил. Для расчета столкновений поверхности белков аппроксимируются наборами сфер. Электростатический потенциал рассчитывается с помощью уравнения Пуассона–Больцмана. В модели можно изменять ионную силу раствора, температуру, рН, форму реакционного объема, характер распределения зарядов на белках. Модельными параметрами, значения которых нужно подбирать для совпадения результатов моделирования с экспериментом, являются вероятность образования комплекса (докинга) P и расстояния докинга r . Если два белка сблизилась, и расстояние между

определенными атомами одного белка и атомами другого стало меньше расстояний докинга, то в модели с заданной вероятностью образуется комплекс.

В данной работе мы моделируем кинетику образования комплекса между Флд из *Anabaena* (PDB ID 1RCF) и ФС1 из высшего растения *Pisum Sativum* (PDB ID 2O01) при разных значениях ионной силы. Для ускорения счета в модели комплексы фотосистемы 1 фиксировались. Мы можем считать мультиферментные комплексы ФС1 практически неподвижными по сравнению с Флд, так как из-за большого размера у ФС1 коэффициент диффузии на порядок меньше, чем у Флд. Концентрация ФС1 и Флд была одинаковой и равна 7 мкМ, pH раствора был 7, диэлектрическая проницаемость для белка считалась равной 2, для раствора – 80.

Представленная модель является частью большой модели фотосинтетических процессов, разрабатываемой нами и включающей электронный транспорт от цитохромного b_6f комплекса к ФС1 через пластоцианин и от ФС1 к ФНР через ферредоксин и флаводоксин.

Результаты и обсуждение. В модели в качестве расстояния докинга мы брали расстояние между ФМН флаводоксина и железо-серным кластером F_B фотосистемы 1. Значение расстояния докинга и вероятности докинга оценивали по экспериментальным данным из [5].

На рис. 1А представлены полученные зависимости константы связывания Флд и ФС1 от расстояния докинга при различных значениях ионной силы. При увеличении расстояния докинга k_{on} возрастает. Это связано с тем, что чем больше расстояние докинга, тем больше область, попав в которую, молекулы образуют комплекс. При расстоянии докинга меньше 20 Å в модели комплексы не образуются. Это связано с тем, что молекулы не могут подойти ближе этого расстояния. В модели им мешают сферы, аппроксимирующие поверхности, в природе – Ван-дер-Ваальсовы радиусы атомов и водяная шуба. Однако в реальной ситуации может произойти конформационная перестройка, и расстояние в реальном комплексе может оказаться меньше, чем в модели. Для упрощения ситуации мы не рассматриваем стадию конформационной перестройки, учитываем только электростатические взаимодействия.

Как видно из рис. 1, при больших значениях расстояния докинга (36 Å) с увеличением ионной силы k_{on} падает, при меньших значениях расстояния докинга у зависимости (рис. 1Б) появляется начальный возрастающий участок. Наличие убывающего участка как в экспериментальной зависимости k_{on} от ионной силы (рис. 4А), так и в модельной (рис. 1Б, 4Б), говорит о том, что при образовании комплекса ФС1-Флд происходит электростатическое притяжение белков: при увеличении ионной силы увеличивается экранирование поля белков противоположными ионами, сила электростатического притяжения падает, поэтому и k_{on} падает.

При pH=7 Флд отрицательно заряжен. Как видно из рис. 2, при ионной силе раствора 0 мМ и 80 мМ, вокруг ФМН флаводоксина расположена отрицательная эквипотенциальная поверхность, на противоположном участке белка расположена небольшая область положительного потенциала.

Эквипотенциальные поверхности ФС1 имеют сложную форму (рис. 3). Если мы сравним эквипотенциальные поверхности ФС1 при разной ионной силе, то мы заметим,

что при 0 мМ (рис. 3А) вокруг акцепторной части ФС1, взаимодействующей с Флд, расположена большая область положительного потенциала. Таким образом, при малых значениях ионной силы электростатические взаимодействия будут способствовать притяжению Флд к ФС1 и, как следствие, более продолжительному нахождению его рядом (поэтому метод из [9] здесь не работает), но такой потенциал ФС1 не будет способствовать образованию одной специфической ориентации Флд в комплексе с ФС1. При меньших значениях ионной силы (рис. 3Б) электростатический потенциал вокруг ФС1 уменьшается и эквипотенциальные поверхности приобретают более сложную форму, имеющую локальные положительные и отрицательные участки. В результате этого притяжение между Флд и ФС1 уменьшается, суммарно Флд проводит меньше времени вблизи ФС1, но увеличивается вероятность ориентаций белков, удовлетворяющих требованиям формирования комплекса, что приводит к возрастанию величины константы связывания.

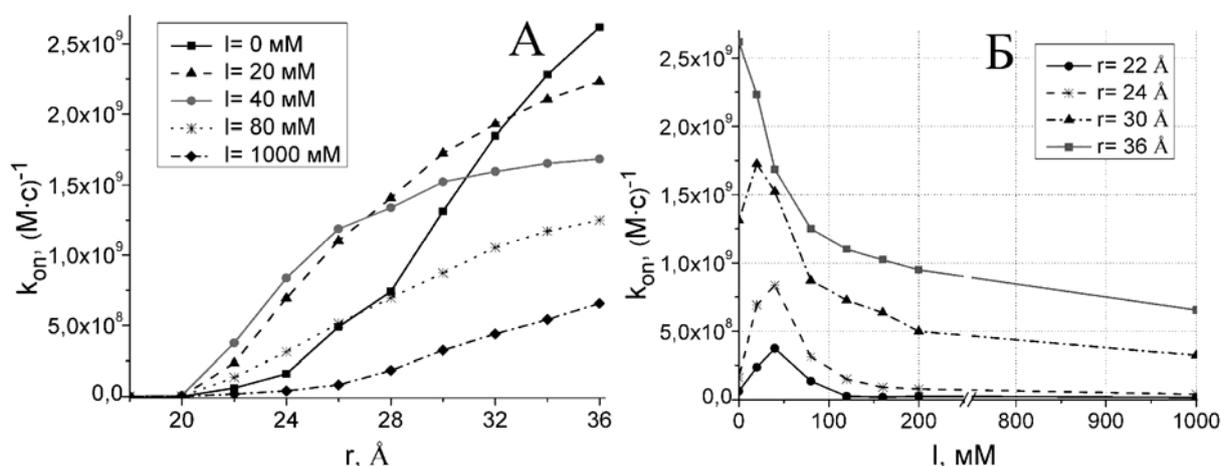


Рис. 1. А – зависимость константы связывания Флд и ФС1 от расстояния докинга при разных значениях ионной силы. Б – Зависимость константы связывания Флд и ФС1 от ионной силы при разных значениях расстояния докинга. Вероятность докинга P=1

Когда в модели мы уменьшаем расстояние докинга, критерии отбора для образования комплекса становятся более строгими: недостаточно просто сближения белков, но необходимо сближение их определенных частей. Таким образом, заметить нарушение образования специфических комплексов при низкой ионной силе и падение константы связывания мы можем только, введя более строгие условия отбора комплексов, т.е. уменьшив расстояние докинга.

В работе [5] с помощью метода абсорбционной спектроскопии были измерены кинетики восстановления Флд из *Anabaena* частицами ФС1 из высшего растения *Spinacia oleraceae* после вспышки света при pH=7. В результате вспышки света электрон с донорной части ФС1 переходил на акцепторную (процесс занимает меньше 1 мкс) и восстанавливал Флд, ФМН переходил в семихинонную форму, за изменением поглощения которого при 575 нм и наблюдали. Концентрация Флд была намного больше, чем ФС1, поэтому считалось, что реакция псевдо-первого порядка. Кинетика представляла собой экспоненту, по характерному времени которой оценивалась наблюдаемая константа скорости реакции (константа псевдо-первого порядка).

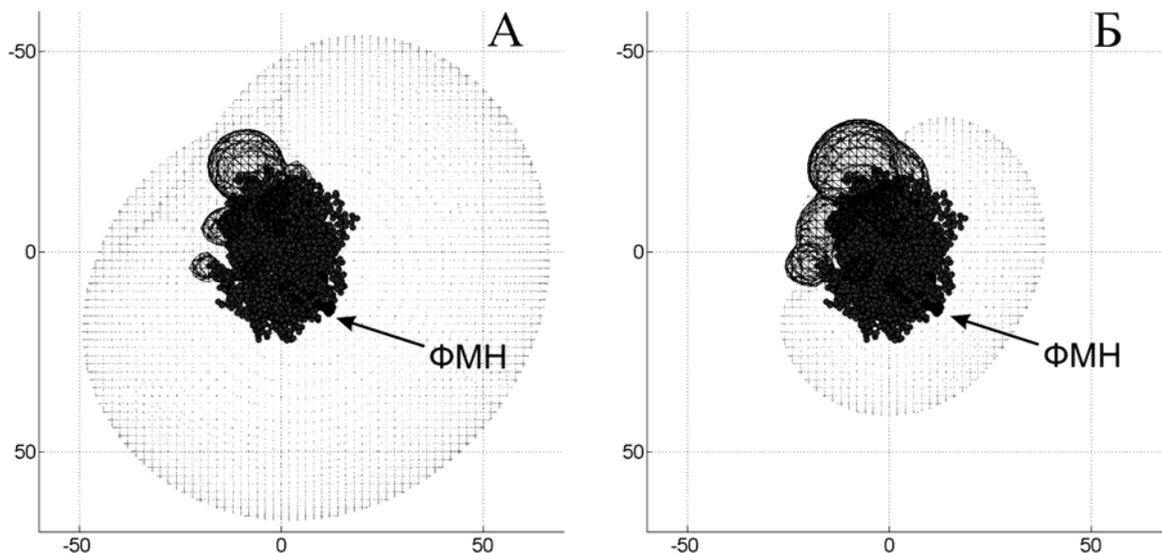


Рис. 2. Эквипотенциальные поверхности -6.5 мВ (серый цвет) и 6.5 мВ (черный цвет) для Флд. Темно-серые кружочки – атомы молекулы, стрелочкой указано расположение ФМН. А – ионная сила раствора 0 мМ , Б – ионная сила раствора 80 мМ

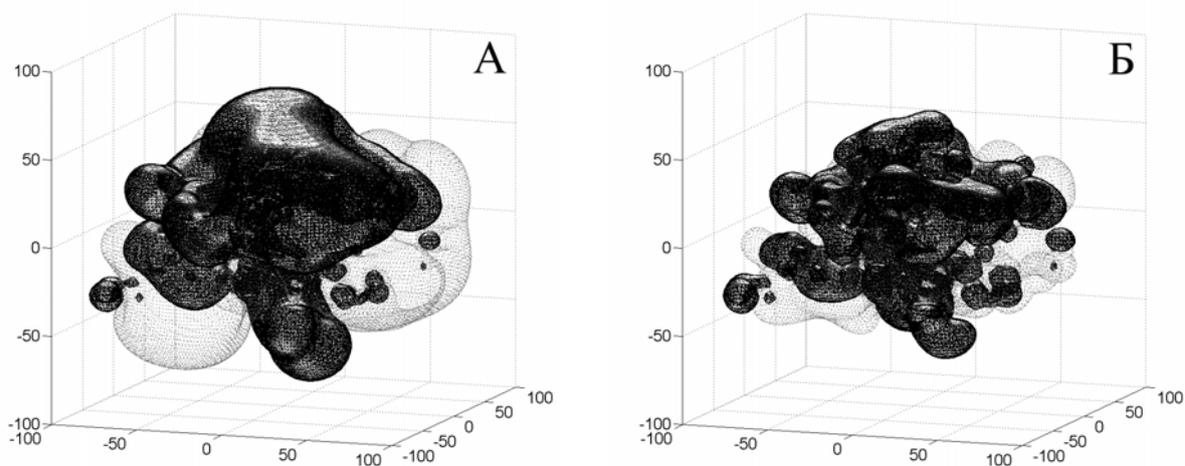


Рис. 3. Эквипотенциальные поверхности -6.5 мВ (серый цвет) и 6.5 мВ (черный цвет) для ФС1. Сверху находится акцепторная сторона ФС1, снизу донорная. А – ионная сила раствора 0 мМ , Б – ионная сила раствора 80 мМ

С увеличением концентрации Флд наблюдаемая константа связывания сначала почти линейно возрастала, потом выходила на плато. Поэтому авторы предположили, что реакция имеет две стадии – образование комплекса и перенос электрона. Исходя из этого приближения, авторы получили для константы связывания значение $3.6 \cdot 10^7 (\text{М} \cdot \text{с})^{-1}$, а для константы скорости переноса электрона 270 с^{-1} . Также для концентрации Флд 10 мкМ авторы получили нелинейную зависимость наблюдаемой константы скорости реакции от ионной силы с максимумом при $40\text{--}80\text{ мМ}$ (рис. 4А). Если мы знаем значение наблюдаемой константы скорости и знаем концентрацию Флд, при которой оно получено, то, разделив значение наблюдаемой константы скорости на

концентрацию Флд, при условии, что это начальный линейный участок концентрационной зависимости, мы получим значение константы связывания белков. Если же это участок плато, мы получим заниженное значение k_{on} .

Мы подобрали значения параметров модели – расстояния и вероятности докинга, так, чтобы зависимость k_{on} от ионной силы имела максимум при 40–80 мМ и значение k_{on} при ионной силе 20 мМ было близко к $3.6 \cdot 10^7 \text{ (M} \cdot \text{c)}^{-1}$. Как видно из рис. 1Б, максимум ближе всего к 40–80 мМ для зависимости при расстоянии докинга 22 Å. При меньших расстояниях докинга реакция практически не идет.

Зависимости k_{on} от вероятности докинга в модели были такие же, как и для взаимодействия пластоцианина и цитохрома *f* в работе [10]: сначала почти линейно возрастающие, затем приходящие к насыщению. Понижение вероятности докинга качественно не изменяло зависимость от ионной силы. При вероятности докинга 0.025, расстоянии докинга 22 Å и ионной силе 20 мМ модельное значение константы связывания составило $5.2 \cdot 10^7 \text{ (M} \cdot \text{c)}^{-1}$. Полученная на модели зависимость k_{on} от ионной силы при расстоянии докинга 22 Å и вероятности докинга 0.025 представлена на рис. 4Б. Качественный характер зависимости согласуется с экспериментальными данными (рис. 4А).

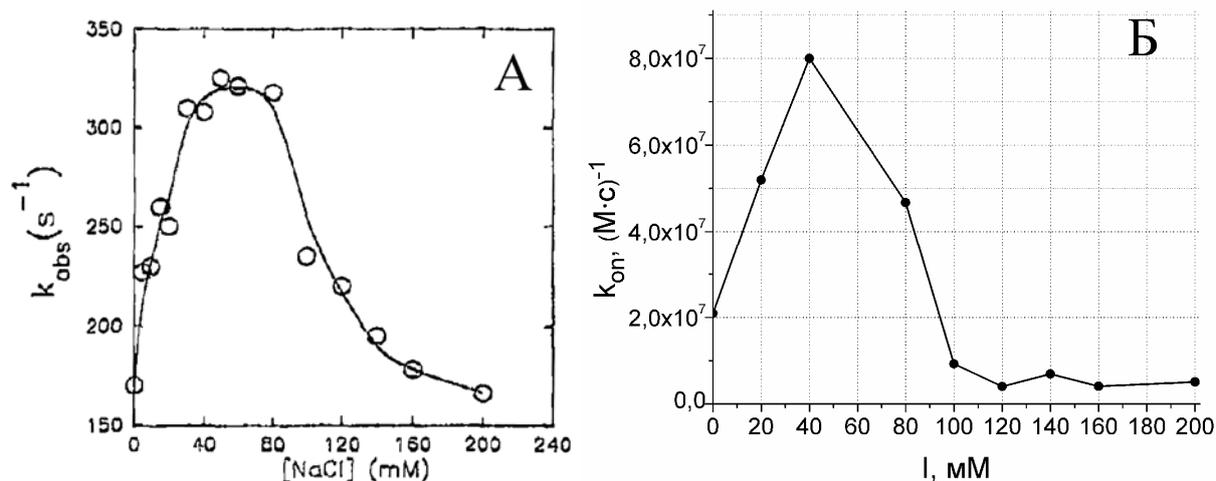


Рис. 4. А – экспериментальная зависимость наблюдаемой константы скорости реакции Флд и ФС1 от ионной силы раствора из [5]. Б – модельная зависимость константы связывания Флд и ФС1 от ионной силы раствора, расстояние докинга $r=22 \text{ Å}$ и вероятности докинга $P=0.025$

Заключение. Построена модель взаимодействия белка флаводоксина и комплекса фотосистемы I, учитывающая их сложную форму и электростатические взаимодействия. Модель воспроизводит процессы, предшествующие стабилизации комплекса: случайное сближение молекул за счет броуновского движения, дальнейшее сближение и взаимную ориентацию за счет электростатических взаимодействий. Уже потом в реальных системах эта ориентация меняется за счет конформационных изменений и стабилизируется гидрофобными взаимодействиями. Последние процессы не учтены в настоящей модели, их учет является предметом дальнейших исследований.

Показано, что при определенных значениях параметров модель может описывать нелинейную зависимость константы связывания белков от ионной силы. Таким

образом, для формирования такого вида зависимости достаточно учета только электростатических взаимодействий.

Наша модель подтверждает теорию [8] о том, что падение константы связывания при малых значениях ионной силы вызвано сдвигом равновесия в сторону множества быстро переходящих друг в друга электростатически выгодных взаимных ориентаций флаводоксина относительно фотосистемы 1, но не выгодных с точки зрения электронного транспорта.

Работа была выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты № 07-04-00375 и № 08-04-00354.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yakunin A.F., Gennaro G., Hallenbeck P.C.* Purification and properties of a nif-specific flavodoxin from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* // *J. Bacteriol.* 1993. Vol. 175, №21. P. 6775–6780.
2. *Gruez A., Pignol D., Zeghouf M., Coves J., Fontecave M., Ferrer J.L., Fontecilla-Camps J.C.* Four crystal structures of the 60 kDa flavoprotein monomer of the sulfite reductase indicate a disordered flavodoxin-like module // *J. Mol. Biol.* 2000. Vol. 299. P. 199–212.
3. *Wan J.T., Jarrett J.T.* Electron acceptor specificity of ferredoxin (flavodoxin):NADP⁺ oxidoreductase from *Escherichia coli* // *Arch. Biochem. Biophys.* 2002. Vol. 406. P. 116–126.
4. *Nogues I., Hervas M., Peregrina J.R., Navarro J.A., De la Rosa M.A., Gomez-Moreno C., Medina M.* Anabaena Flavodoxin as an Electron Carrier from Photosystem I to Ferredoxin-NADP⁺ Reductase. Role of Flavodoxin Residues in Protein-Protein Interaction and Electron Transfer // *Biochemistry.* 2005. Vol. 44, № 1. P. 97–104.
5. *Medina M., Hervas M., Navarro J. A., De la Rosa M. A., Gomez-Moreno C., Tollin G.* A laser flash absorption spectroscopy study of *Anabaena* sp. PCC 7119 flavodoxin photoreduction by photosystem I particles from spinach // *FEBS.* 1992. Vol. 313, № 3. P. 239–242.
6. *Watkins J.A., Cusanovich M.A., Meyer T.E., Tollin G.* A “parallel plate” electrostatic model for bimolecular rate constants applied to electron transfer proteins // *Protein Science.* 1994. Vol. 3. P. 2104–2114.
7. *Diaz-Quintana A., Navarro J.A., Hervas M., Molina-Heredia F.P., De la Cerda B., De la Rosa M.A.* A comparative structural and functional analysis of cyanobacterial plastocyanin and cytochrome c6 as alternative electron donors to Photosystem I // *Photosynthesis Research.* 2003. Vol.75. P. 97–110.
8. *Ubbink M., Ejdebäck M., Karlsson B.G., Bendall D.S.* The structure of the complex of plastocyanin and cytochrome f, determined by paramagnetic NMR and restrained rigid-body molecular dynamics // *Structure.* 1998. Vol. 6, № 3. P. 323–335.
9. *Pearson, D. C., Gross E. L.* Brownian Dynamics Study of the Interaction between Plastocyanin and Cytochrome f // *Biophysical Journal.* 1998. Vol. 75. P. 2698–2711.
10. *Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Gromov P.A., Ustinin D.M., Grachev E.A., Riznichenko G.Yu., Rubin A.B.* Direct simulation of interaction of plastocyanin and cytochrome f in solution // *Phys. Biol.* 2006. Vol. 3. P. 121–129.

**DIRECT MULTIPARTICLE COMPUTER SIMULATION OF IONIC
STRENGTH DEPENDENCE OF THE ASSOCIATION RATE CONSTANT FOR
FLAVODOXIN AND PHOTOSYSTEM I**

Abaturova A. M., Kovalenko I. B., Riznichenko G. Yu., Rubin A. B.

Kinetics of complex formation between components of the photosynthetic electron transport chain – flavodoxin and membrane complex photosystem I has been studied using computer model based on methods of multiparticle simulation and Brownian dynamics. We simulated Brownian motion of several hundreds of flavodoxin molecules, taking into account electrostatic interactions and complex shape of the molecules. Our model could describe experimental nonmonotonic dependence of the association rate constant for flavodoxin and photosystem I. This lets us conclude that electrostatic interactions are sufficient to form such kind of nonmonotonic dependence