

ПРЯМОЕ КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ КОМПЛЕКСА ФЕРРЕДОКСИНА И ФЕРРЕДОКСИН:НАДФ⁺ - ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ

Дьяконова А. Н., Коваленко И. Б., Абатурова А. М., Ризниченко Г. Ю.

В данной работе с помощью метода броуновской динамики моделируется кинетика образования комплекса между белками электрон-транспортной цепи фотосинтеза ферредоксином и ферредоксин:НАДФ⁺-оксидоредуктазой (ФНР) в растворе. В трехмерном реакционном объеме моделируется движение белков под действием случайной броуновской и электростатической сил, учитывается сложная форма молекул при их столкновении. На основе полученных зависимостей количества образованных комплексов от времени вычисляли кинетическую константу скорости исследуемой реакции. В работе были оценены параметры модели по экспериментальным данным

Введение. Ферредоксин (Фд) является маленьким ($M = 11$ кДа) растворимым белком, служащим конечным акцептором электронов электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) фотосинтеза. Он диффундирует в стромальном пространстве хлоропластов и отдает электрон на ферредоксин:НАДФ⁺ - оксидоредуктазу (ФНР). Ферредоксин также является электронным донором для других ферментов, участвующих в метаболизме серы, азота и углерода [1]. Нашей целью является установление роли белок-белковых взаимодействий с участием ферредоксина в регуляции переключения между циклическим и нециклическим транспортом в ЭТЦ фотосинтеза. Один из партнеров ферредоксина, ФНР, катализирует восстановление НАДФ⁺ до НАДФН, используя две молекулы ферредоксина для осуществления этой реакции. Таким образом, происходит перенос электрона от одноэлектронного донора ферредоксина на двуэлектронный акцептор НАДФ⁺. ФНР – это мономерный флавопротеин, содержащий ФАД (флавинаденидинуклеотид) в качестве единственной простетической группы. ФАД играет роль переключателя между одно- и двуэлектронными переносчиками: первая молекула ферредоксина восстанавливает его до семихинонной формы (ФНР_{сх}), вторая – восстанавливает полностью (ФНР_{вос}).

Наша работа заключается в моделировании трехмерной диффузии ферредоксина и его взаимодействия с ФНР и фотосистемой I. Данная работа посвящена прямому моделированию образования комплекса между ФНР и ферредоксином, выделенных из бактерии *Anabaena* PCC7119, в растворе. Мы моделируем взаимодействия нескольких сотен молекул ферредоксина и ФНР. Нашей целью является выявить роль электростатических взаимодействий в образовании комплекса Фд-ФНР и определить параметры модели.

Взаимодействие между двумя белками можно разбить на четыре этапа [2]: (1) сближение в результате диффузии и электростатического притяжения; (2) определяемое взаимной ориентацией и распределением зарядов взаимодействие отдельных частей молекул, ведущее к возможному образованию предварительного комплекса; (3) конечное связывание и формирование электрон-транспортного комплекса; (4) электронный транспорт. В нашей модели мы рассматриваем только диффузию молекул и элек-

тростатические взаимодействия (образование предварительного комплекса). Также мы не рассматриваем гидрофобные взаимодействия, возможные перестройки комплекса и конформационные изменения белков, важные для формирования конечного комплекса.

Метод моделирования. Модельная сцена представляет собой трехмерный кубический реакционный объем, в котором случайным образом распределены молекулы белков (рис. 1). В модели белки являются трехмерными компьютерными объектами, рассматриваемые как броуновские частицы, движущиеся в вязкой среде под действием случайной броуновской и электростатической сил. Для математического описания процесса используется уравнение Ланжевена [3].

Белки рассматриваются как твердые тела. Они диффундируют в виртуальном реакционном объеме и могут приблизиться друг к другу на малое расстояние. Трехмерные поверхности ферредоксина и ФНР были сконструированы с использованием данных о кристаллической структуре комплекса Фд-ФНР (PDB ID: 1EWY). Молекулы белков были аппроксимированы набором сфер (251 для ферредоксина и 829 для ФНР) для моделирования столкновений. Такая аппроксимация позволяет получить достаточно реалистичное описание поверхности белка и значительно снижает время счета.

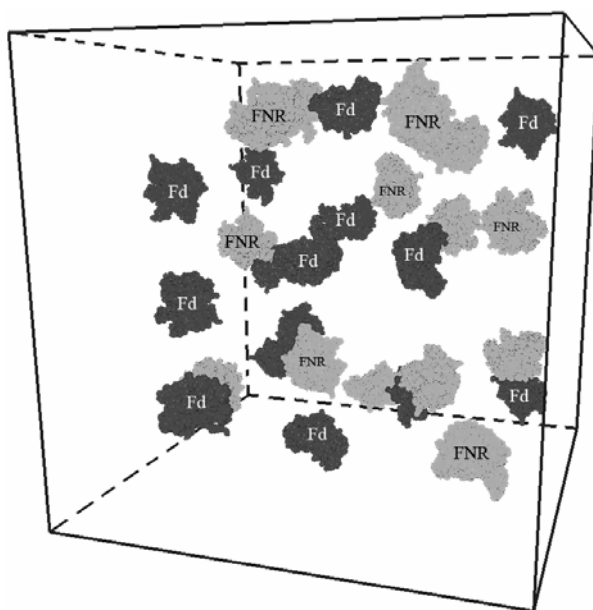


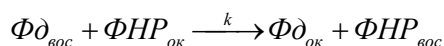
Рис. 1. Визуализация модельной сцены с белками ферредоксином (Fd) и ФНР (FNR)

Электростатические взаимодействия играют важную роль в связывании ферредоксина и ФНР [4]. Парциальные заряды на белках создают гетерогенное электростатическое поле, напряженность которого значительно снижается при удалении от поверхности белка за счет экранирования полярными молекулами воды. Если белок находится далеко от других белков, он движется за счет броуновской силы, но не электростатической. Таким образом, его движение определяется исключительно броуновской диффузией. Как только белок подходит близко к другим белкам, его движение корректируется электростатическим полем последних для достижения правильной ориентации и формирования предварительного комплекса.

На каждом временном шаге в процессе диффузии белков программа проверяет расстояние между железо-серным кластером [2Fe-2S] ферредоксина и ФАДом ФНР. Если на определенном шаге расстояние становится меньше, чем расстояние докинга, молекулы могут образовать комплекс с вероятностью p , являющейся модельным параметром, и программа переходит к следующему шагу. Если белки все еще удовлетворяют условиям докинга, и комплекс не образовался на предыдущем шаге, описанная выше процедура повторяется. Как только молекулы образовали комплекс, мгновенно происходит перенос электрона, и белки меняют свое окислительно-восстановительное состояние [5].

В модели белок представлен как область с низкой диэлектрической постоянной ($\epsilon = 2$) и пространственно распределенными парциальными зарядами. Окружающий раствор имеет высокую диэлектрическую постоянную ($\epsilon = 80$) и содержит подвижные заряды (ионы). Электростатические взаимодействия учитываются в модели только тогда, когда белки сближаются на расстояние, называемое расстоянием электростатического взаимодействия. Для расчета электростатического поля вокруг каждого белка используется уравнение Пуассона-Больцмана [5].

На каждом временном шаге программа подсчитывает количество окисленных молекул ферредоксина и восстановленных молекул ФНР. Построенные по этим данным кинетические кривые (рис. 2) служат для сравнения результата моделирования и экспериментальных данных и определения модельных параметров. Константа реакции второго порядка может быть получена аппроксимацией кривой по закону действующих масс. Для аппроксимации мы используем простую кинетическую схему реакции второго порядка:



Во всех компьютерных экспериментах количество каждого вида молекул (ферредоксина и ФНР) было 270, реакционный объем представлял собой куб со стороной 218 нм, шаг по времени составлял 100 пс.

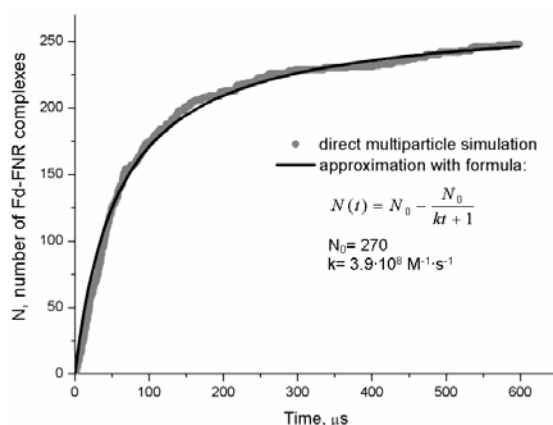


Рис. 2. Кинетическая кривая восстановления ФНР (количество молекул указано в штуках), полученная на прямой модели, и ее аппроксимация по закону действующих масс (формула на рисунке) при $I = 100$ мМ, $pH = 7$, $p = 1$, $r = 17$ Å

Результаты. На рисунке 3 изображены эквипотенциальные поверхности ферредоксина и ФНР дикого типа. Эквипотенциальная поверхность ФНР имеет сложную

форму. ФАД окружен областью положительного потенциала. Ферредоксин создает, в основном, отрицательное электростатическое поле, железо-серный кластер располагается в центре области отрицательного потенциала. Такие свойства электростатического поля благоприятствуют правильному сближению и ориентации белков.

Значение кинетической константы скорости второго порядка k зависит от многих факторов: типа белков, их коэффициентов диффузии, температуры, рН, ионной силы и т.д. В компьютерном эксперименте константа k также зависит от таких модельных параметров, как вероятность образования конечного комплекса p , расстояния докинга r и временного шага Δt . Ионная сила влияет на электростатическое экранирование белков и, соответственно, на электростатические взаимодействия между ними.

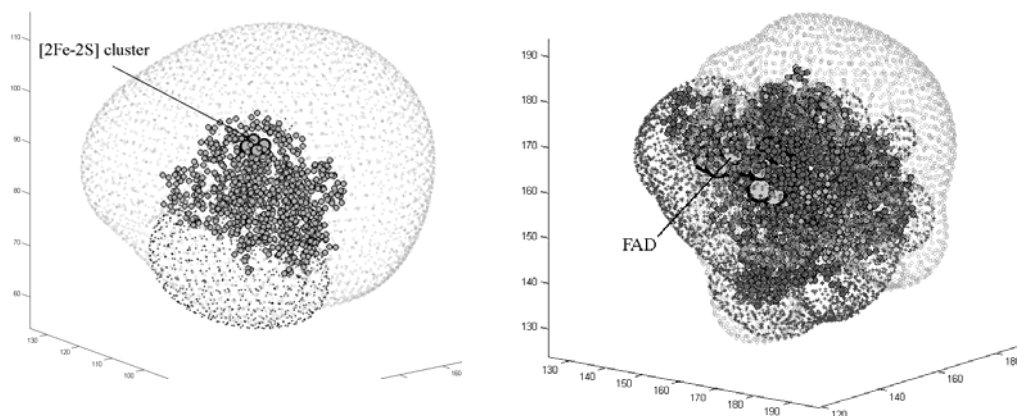


Рис. 3. Эквипотенциальные поверхности -6.5 мВ (светло-серый) и $+6.5$ мВ (темно-серый) для ферредоксина (справа) и ФНР (слева), рассчитанные по уравнению Пуассона-Больцмана; ионная сила 100 мМ, $\text{pH} = 7$, $\epsilon_{\text{p-ра}} = 80$, $\epsilon_{\text{белка}} = 2$

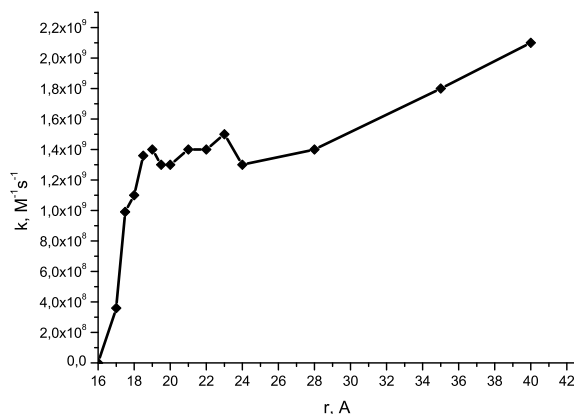


Рис. 4. Зависимость константы скорости реакции образования комплекса Фд-ФНР от расстояния докинга при $I = 100$ мМ, $\text{pH} = 7.0$ и $p = 1$

Одним из наиболее важных параметров является расстояние докинга r . В качестве расстояния докинга мы выбрали расстояние между $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ – кластером ферредоксина и ФАДом ФНР. Компьютерный эксперимент показал, что константа скорости нелинейно возрастает с увеличением расстояния докинга (рис. 4). Наименьшее расстояние, при котором идет реакция, равно 17 Å. При 16 Å реакция практически не идет. На расстоя-

ниях докинга от 17 до 18 Å константа скорости возрастает, на расстояниях от 18.5 до 25 Å остается практически постоянной. Это может быть объяснено действием электростатических сил притяжения между молекулами. На расстояниях 17-20 Å сильно сказываются геометрические факторы (ориентация молекул относительно друг друга и их форма).

В таблице 1 представлены экспериментальные значения констант скорости реакции Фд и ФНР, и наиболее близкие к ним модельные значения константы скорости, полученные при $r = 17$ и 18 Å и $p = 1$. Из таблицы видно, что модельная константа скорости выше экспериментальной для $r = 17$ Å, так и $r = 18$ Å. Для $r = 18$ Å константа скорости выше экспериментальной почти на порядок. В компьютерном эксперименте понизить константу скорости возможно, варьируя вероятность докинга p .

Таблица 1. Экспериментальные и полученные в компьютерном эксперименте константы скорости образования комплекса Фд-ФНР при $p = 1$, $I = 100$ мМ и $pH = 7$ и двух расстояниях докинга $r = 17$ Å и 18 Å

$k \times 10^{-8}, (M \cdot c)^{-1}$ эксперимент [6]	$k \times 10^{-8}, (M \cdot c)^{-1}$ эксперимент [4]	$k \times 10^{-8}, (M \cdot c)^{-1}$ модель, $r = 17$ Å	$k \times 10^{-8}, (M \cdot c)^{-1}$ модель, $r = 18$ Å
2.3	2.7	3.9	11

Мы исследовали зависимость константы скорости реакции от вероятности докинга. В компьютерном эксперименте варьировалась вероятность докинга при постоянном расстоянии докинга. На рисунке 5 представлены зависимости константы скорости от вероятности при $r = 17$ и 18 Å. Видно, что зависимость выходит на плато. При малых вероятностях, белки покидают позицию докинга до того, как успеет сформироваться комплекс, и константа скорости значительно зависит от вероятности. При высоких вероятностях, белки сразу образуют комплекс, и скорость реакции практически постоянна. Из графика видно, что значение константы скорости реакции $2.5 \cdot 10^8 M^{-1}c^{-1}$, являющееся средним значением экспериментальных констант, может быть достигнуто при $r = 18$ Å, $p = 0.003$ и $r = 17$ Å, $p = 0.5$.

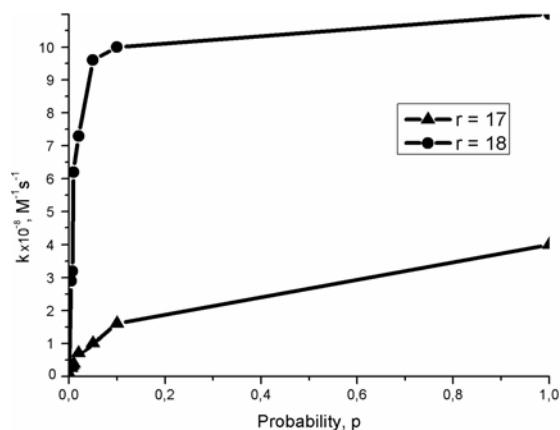


Рис. 5. Зависимость константы скорости реакции образования комплекса Фд-ФНР от вероятности докинга p при $I = 100$ мМ, $pH = 7.0$ и двух значениях расстояния докинга, $r = 17$ Å и $r = 18$ Å

Были получены кинетические константы скорости для мутантных форм ФНР при расстоянии докинга $r = 17$ Å и 18 Å. Электростатическое поле для мутантов имеет другую форму. Для расстояния 17 Å значения константы скорости для различных мутантов

было примерно одинаково. Для расстояния 18 Å константы скорости были различны для различных мутантов и наблюдалось качественное совпадение с экспериментальными данными. Таким образом, оцененные значения параметров модели $r=18$ Å, $p=0.003$.

Заключение. Была построена прямая компьютерная модель образования комплекса Фд-ФНР в растворе. Были исследованы зависимости константы скорости образования комплекса от модельных параметров. Полученные зависимости позволили оценить параметры модели по экспериментальным данным.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Knaff D.B.* Ferredoxin and ferredoxin-dependent enzymes // *Advances in Photosynthesis / Vol. 4. Oxigenic Photosynthesis: The Light Reactions.* Kluwer Academic Publishers, 1996. P. 333–361.
2. *Gross E.L.* Plastocyanin: structure, location, diffusion and electron transfer mechanisms // *Advances in Photosynthesis / Vol. 4. Oxigenic Photosynthesis: The Light Reactions.* Kluwer Academic Publishers, 1996. P. 413–429.
3. *Дой М. и Эдвардс С.Ф.* Динамическая теория полимеров. Москва: Мир, 1999. 440 с.
4. *Hurley J.K., Hazzard J.T., Martinez-Julves M., Medina M., Gomez-Moreno C. and Tollin G.* Electrostatic forces involved in orienting *Anabaena* ferredoxin during binding to *Anabaena* ferredoxin:NADP⁺ reductase: site-specific mutagenesis, transient kinetic measurements, and electrostatic surface potentials // *Protein Science.* 1999. Vol. 8. P. 1614–1622.
5. *Kovalenko I.B., Abaturova A.M., Gromov P.A., Ustinin D.M., Grachev E.A., Riznichenko G.Yu. and Rubin A.B.* Direct simulation of plastocyanin and cytochrome f interactions in solution // *Physical Biology.* 2006. Vol. 3. P. 121–129.
6. *Martinez-Julves M., Hermoso J., Hurley J.K., Mayoral T., Sanz-Aparicio J., Tollin G., Gomez-Moreno C. and Medina M.* Role of Arg100 and Arg264 from *Anabaena* PCC 7119 ferredoxin-NADP⁺ reductase for optimal NADP⁺ binding and electron transfer // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37. P. 17680-17691.

DIRECT COMPUTER SIMULATION OF FERREDOXIN AND FERREDOXIN:NADP⁺-REDUCTASE COMPLEX FORMATION

Diakonova A. N., Kovalenko I. B., Abaturova A. M., Riznichenko G. Yu.

Complex formation in solution of two photosynthetic electron-transfer chain proteins ferredoxin and ferredoxin:NADP⁺-reductase is simulated using Brownian dynamics. Shape of the molecules and their electrostatic interactions are considered in the model. In 3D reaction volume proteins move due to random Brownian force and electrostatic force. In the model proteins collide and form an initial complex. Dependence of number of complexes upon time is obtained. Using this data it is possible to estimate second-order rate constant of the reaction