

## РОЛЬ ЭЛЕКТРОСТАТИЧЕСКИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ ОБРАЗОВАНИИ КОМПЛЕКСОВ ФЕРРЕДОКСИН–ФЕРРЕДОКСИН-НАДФ<sup>+</sup>-РЕДУКТАЗА И ФЕРРЕДОКСИН–ГИДРОГЕНАЗА

© 2016 г. А.Н. Дьяконова, С.С. Хрущев, И.Б. Коваленко,  
Г.Ю. Ризниченко, А.Б. Рубин

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,  
119991, Москва, Ленинские горы, 1/12*

*E-mail: alex.diakonova@gmail.com*

Поступила в редакцию 20.10.15 г.

После доработки 21.12.15 г.

Построена конкурентная броуновская модель взаимодействия ферредоксина, ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктазы и гидрогеназы, в которой молекулы трех типов белков помещены в кубический реакционный объем, где они двигались за счет броуновской и электростатической сил, создаваемых соседними молекулами и раствором. На данной модели показано, что в диапазоне рН от 5,0 до 9,0 константа скорости связывания ферредоксина и ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктазы практически не изменяется. Таким образом, можно предположить, что регуляция активности ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктазы происходит посредством других процессов. С другой стороны, в модели константа скорости связывания ферредоксина с гидрогеназой значительно зависит от рН: при увеличении рН от 6,0 до 8,0 константа возрастает в три раза. Увеличение рН, происходящее в строме на свету, приводит к увеличению константы скорости взаимодействия с ферредоксином, но снижает количество субстрата катализируемой белком реакции – протонов. Таким образом, в строме при низком рН скорость производства водорода мала по причине того, что гидрогеназа получает мало электронов. При увеличении рН количество электронов, поступающих на фермент от ферредоксина, увеличивается, и, следовательно, увеличивается скорость выделения водорода.

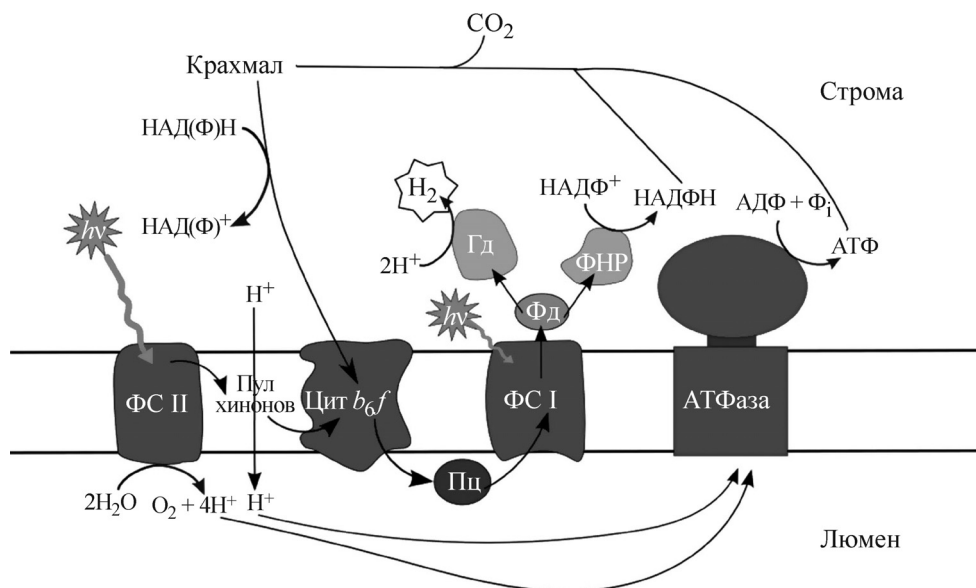
*Ключевые слова: гидрогеназа, биоводород, броуновская динамика.*

С 40-х годов XX века известно, что одноклеточные зеленые водоросли способны выделять при освещении молекулярный водород, Н<sub>2</sub> [1], либо поглощая его в темноте и используя в качестве донора электронов для процесса фиксации СО<sub>2</sub>, либо выделяя его на свету. Выделение Н<sub>2</sub> зелеными водорослями наблюдалось после инкубации клеток в анаэробных условиях в темноте. В этих условиях экспрессируется фермент гидрогеназа, который катализирует образование молекулярного водорода из протонов согласно реакции  $2\text{H}^+ + \text{D}_{\text{вос}} \rightarrow \text{H}_2 + \text{D}_{\text{ок}}$ , где D<sub>вос</sub> и D<sub>ок</sub> – соответственно восстановленная и окисленная формы донора электронов. В зеленых водорослях в качестве донора для гидрогеназы выступает белок ферредоксин (Фд) – конечный акцептор электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Основная роль ферре-

доксина заключается в предоставлении электронов для восстановления НАДФ<sup>+</sup> до НАДФН ферментом ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктазой (ФНР).

После поглощения света антенной фотосистемы II (ФС II) энергия возбуждения передается в содержащий хлорофилл реакционный центр ФС II, и происходит его окисление (рис. 1). Для восстановления реакционного центра ФС II используются электроны воды, расщепляемой кислородвыделяющим комплексом, в результате чего образуется молекулярный кислород О<sub>2</sub> и протоны. Электрон реакционного центра по цепи переносчиков, расположенных в ФС II, передается на стабильный восстановитель – пластохинон. Однако окислительно-восстановительный потенциал пластохинона слишком положителен, чтобы напрямую восстановить ферредоксин, электронный донор гидрогеназы. Поэтому электрон через цитохромный *b<sub>6</sub>f*-комплекс и растворимый белок пластоцианин транспортируется на фотосистему I (ФС I) и используется для восстановления ее реакцион-

Сокращения: Фд – ферредоксин, ФНР – ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктаза, ФС I – фотосистема I, ФС II – фотосистема II.



**Рис. 1.** Электрон-транспортная цепь фотосинтеза водородвыделяющих организмов. ФС II – фотосистема II, Цит  $b_6f$  – цитохромный  $b_6f$ -комплекс, Пц – пластоцианин, ФС I – фотосистема I, Фд – ферредоксин, Гд – гидрогеназа, ФНР – ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктаза. Стрелками показаны пути электронов и протонов.

ного центра, окисленного в результате разделения зарядов. Затем в реакционных центрах ФС I электрон по цепи связанных с ФС I переносчиков передается на ферредоксин и далее либо на ФНР для дальнейшей фиксации углерода, либо в другие метаболические пути. Сопряженно с электронным транспортом в процессе фотосинтеза происходит перенос протонов через тилакоидную мембрану [2,3].

По-видимому, выделение водорода в условиях избыточности освещения у голодающих клеток выполняет функцию защиты системы от перевосстановленности цепи переноса электрона. Такая защита осуществляется путем «сбрасывания» избыточных электронов на протоны [4]. Было показано, что если клетки зеленых водорослей освещать после темновой адаптации в анаэробных условиях, ферредоксин связывается с гидрогеназой и передает ей электроны для восстановления протонов. Данный процесс не связан с фиксацией  $\text{CO}_2$  или запасанием энергии в клеточные метаболиты и приводит к одновременному образованию  $\text{H}_2$  и  $\text{O}_2$ . Поскольку кислород является сильным ингибитором гидрогеназы, выделение водорода в результате такого пути продолжается недолго, в течение 30–90 с [5].

Основной подход к увеличению времени выделения  $\text{H}_2$  клетками зеленых микроводорослей заключается в разделении процессов выделения  $\text{O}_2$  и  $\text{H}_2$  [6]. На первом этапе происходит нормальный фотосинтез: фиксация  $\text{CO}_2$ , высвобождение кислорода в результате окисления

$\text{H}_2\text{O}$  и накопление биомассы. На втором этапе клетки помещают в условия недостатка серы, что приводит к ингибированию процесса биосинтеза и останавливает рост клеток. Если в среде нет содержащих серу питательных веществ, происходит ингибирование синтеза белка D1 реакционного центра ФС II. Поскольку ФС II постоянно повреждается на свету в результате фотоокисления, в отсутствие синтеза и восстановления белка D1 скорость окисления воды ФС II и выделения кислорода падают. Одновременно, при голодании и снижении активности рибулозобисфосфаткарбоксилазы (Ру-БисКо) водоросли начинают накапливать крахмал в концентрациях, в 8–20 раз превышающих его концентрацию в нормальных условиях [7]. В результате, когда скорость выделения кислорода становится меньше скорости его поглощения в процессе дыхания, культура быстро становится анаэробной. Это приводит в первую очередь к синтезу гидрогеназы. Известно, что в аэробных культурах *Chlamydomonas* гидрогеназа отсутствует, т. е. фермент синтезируется только в анаэробных условиях, но точный механизм данного процесса неизвестен [8].

Помимо ФС II другим альтернативным источником электронов для ферредоксина и, следовательно, гидрогеназы служит эндогенный субстрат. В результате анаэробного расщепления крахмала на первых этапах гликолиза образуется НАДН, который восстанавливает пул хинонов. Из пула хинонов электроны по описанному выше пути переносятся на ФС I, фер-

редоксин и гидрогеназу. Однако было показано, что данный процесс быстро замедляется [10], т. е. клетки не способны поддерживать высокую скорость электронного транспорта на  $H_2$  от крахмала как источника электронов.

Таким образом, электроны на гидрогеназу поступают как от остаточной активности ФС II, так и от катаболизма эндогенного субстрата. Важно, что кислород, выделяющийся в результате окисления  $H_2O$ , в данном процессе используется для дыхания, что позволяет поддерживать анаэробные условия.

Другим фактором, влияющим на эффективность выделения водорода, является конкуренция между различными метаболическими путями за восстановленный ферредоксин. Поскольку в отсутствие НАДФ<sup>+</sup> ФНР, как донор электронов НАДФ<sup>+</sup>, не активна, добавление НАДФ<sup>+</sup> к изолированным тилакоидам, содержащим гидрогеназу и ФНР, приводит к снижению выделения водорода на 75% по сравнению с той же системой в отсутствие НАДФ<sup>+</sup>, т. е. с неактивной ФНР [11]. В частности, в анаэробных условиях, конкуренция между гидрогеназой и ФНР за восстановленный ферредоксин является важным фактором, ограничивающим выделение водорода.

Активность ферредоксин-НАДФ<sup>+</sup>-редуктазы, катализирующей восстановление НАДФ<sup>+</sup> в хлоропласте, также регулируется. Известно, что в темноте величина рН стромы тилакоидов примерно равна 6,0. При освещении и активном фотосинтезе, в результате транспорта протонов в люмен величина рН быстро достигает значения 8,0. Также известно, что в темноте, при рН 6,0, когда нет необходимости в протекании реакции ферредоксина и ФНР, ФНР «заякоривается» в тилакоидной мембране через белок TROL [11–13] и во внутренней мембране хлоропласта через белок Tic62 [11,14,15]. Взаимодействие ФНР с этими белками опосредуется гидрофобными взаимодействиями. Более того, при рН около 6 за счет конформационных перестроек НАДФ<sup>+</sup>-связывающего домена ФНР сродство ФНР к НАДФ<sup>+</sup> снижается [16]. При повышении рН до 7,0–8,0 эти процессы обращаются, ФНР активируется и вновь становится способной взаимодействовать как с ферредоксином, так и с НАДФ<sup>+</sup>. Благодаря этому, молекулы ФНР при освещении могут быстро отсоединиться от связывающих их белков и принять участие в электронном транспорте.

Очевидно, процессы регуляции электронного транспорта в целом и электронного потока на гидрогеназу в частности зависят от многих условий – величины протонного градиента на тилакоидной мембране, концентрации НАД(Ф)Н,

восстановленности пула хинонов, соотношения между активностью ФС II и дыханием. При низкой активности ФС II и циклическом транспорте вокруг фотосистемы I происходит перенос протонов через тилакоидную мембрану и, следовательно, защелачивание стромы. Может ли данный процесс защелачивания стромы, в свою очередь, влиять на скорость взаимодействия ферредоксина с ФНР и гидрогеназой и тем самым регулировать электронные потоки? Известно, что изменение электростатических свойств среды – ионной силы и рН – приводит к изменению электростатического потенциала молекул и их сродства друг с другом. Целью нашей работы было исследование взаимосвязи электронных потоков и связанных с ними изменений рН стромы хлоропластов на взаимодействие ферредоксина с гидрогеназой и ФНР. Используя метод прямого многочастичного моделирования [17–21], мы исследовали зависимость кинетики взаимодействия ферредоксина с ФНР и гидрогеназой от рН и влияние распределения зарядов на поверхности белков на скорость их взаимодействия.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Метод броуновской динамики позволяет оценить константу скорости образования предварительных комплексов белков, т. е. комплексов, формирующихся в результате столкновения двух молекул в правильной ориентации [22–25]. В настоящее время существуют классические модели броуновской динамики взаимодействия ферредоксина с гидрогеназой, в которых одна молекула белка фиксирована, а вторая движется вокруг нее за счет броуновской и электростатической силы до тех пор, пока не образуется комплекс [26,27]. В таких моделях константа скорости оценивается на основе аналитически рассчитываемой энергии взаимодействия частиц и вероятности их сближения на расстоянии образования комплекса. В отличие от классической броуновской динамики, где рассматривается взаимодействие двух молекул, в нашей многочастичной модели происходит одновременное взаимодействие нескольких сотен белков каждого типа в трехмерном объеме с заданными характеристиками, такими как размеры, вязкость, диэлектрическая проницаемость раствора, тип граничных условий [17,18,20,21]. Константа скорости рассчитывается по кинетической кривой – зависимости числа образовавшихся комплексов от времени – по закону действующих масс. Таким образом, в нашей модели используется только электростатическое и ме-

ханическое описание движения и взаимодействия молекул без термодинамических расчетов.

**Описание движения белковых молекул.** Модельная сцена представляет собой параллелепипед, в котором диффундируют молекулы белков под действием случайной броуновской силы и электростатических сил, создаваемых соседними белками.

Для описания диффузии белков, вызванной столкновением макромолекул с молекулами среды, используется уравнение Ланжевена, в котором суммарная сила, являющаяся суммой броуновской силы, случайной силы и внешних сил, равна нулю:

$$\xi \frac{dx}{dt} = f(t). \quad (1)$$

**Описание электростатических свойств белков.** Электростатическая сила вычисляется по формуле:

$$F_x = -q \frac{\partial U}{\partial x}, \quad (2)$$

где  $q$  – заряд,  $U$  – электростатический потенциал.

Заряды на белках рассчитываются по уравнению Хендерсона–Хассельбаха, учитывающему рН раствора и константы диссоциации аминокислотных остатков:

$$pH = pK_a + \log \left( \frac{[A^-]}{[AH]} \right) - \text{для кислоты}, \quad (3)$$

$$pOH = pK_b + \log \left( \frac{[BH^+]}{[B]} \right) - \text{для основания}. \quad (4)$$

Потенциал белков рассчитывается по уравнению Пуассона–Больцмана [28]. Вокруг белковой молекулы строится трехмерная сетка, и потенциал в данной ячейке на данном шаге вычисляется итерационно в соответствии с потенциалами в соседних ячейках на предыдущем шаге и суммарным зарядом данной ячейки:

$$\varphi_0 = \frac{\left( \sum_{i=1}^6 h \varepsilon_i \varphi_i \right) + 4\pi q_0}{\left( \sum_{i=1}^6 h \varepsilon_i \right) + h^3 \kappa_0^2}, \quad \kappa^2 = \frac{8\pi N_A e^2 I}{k_B T}, \quad (5)$$

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^K c_i^{\text{bulk}} Z_i^2, \quad \nabla \varepsilon \nabla \varphi = -4\pi \rho + \kappa^2 \varphi.$$

Здесь  $\varphi$  – потенциал,  $\varepsilon$  – диэлектрическая проницаемость,  $\rho$  – плотность зарядов в белке,

$c_i^{\text{bulk}}$  – концентрация  $i$ -иона в растворе,  $Z_i$  – заряд  $i$ -го иона,  $e$  – заряд электрона,  $T$  – температура в К,  $N_A$  – число Авогадро,  $I$  – ионная сила раствора,  $h$  – шаг сетки.

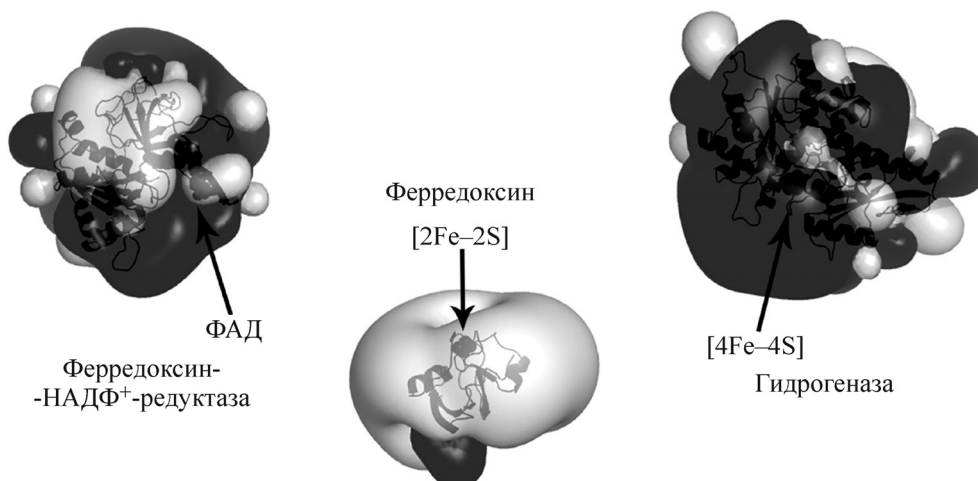
Изменение рН и ионной силы приводит к изменению плотности зарядов на молекуле и, следовательно, к изменению потенциалов белков-партнеров.

**Параметры модели.** В модели константа скорости рассчитывается по кривой зависимости числа образовавшихся комплексов от времени. Параметрами модели являются расстояние и вероятность докинга. Расстояние докинга  $r$  представляет собой расстояние между заданными атомами взаимодействующих белков, обычно кофакторов, при сближении молекул на которое можно считать, что они образовали комплекс. Обычно это расстояние между атомами кофакторов или аминокислотных остатков в месте взаимодействия белков. Если доступна полученная методами рентгеновской кристаллографии или ЯМР трехмерная структура комплекса, это расстояние можно оценить на основе экспериментальных данных. Кроме того, аппроксимация белков сферами добавляет к поверхности молекул несколько ангстрем, поэтому модельное расстояние докинга  $r$  несколько больше, чем в экспериментальной структуре [20,21].

Вероятность докинга  $p$  соответствует вероятности образования финального комплекса при сближении белков на расстояние докинга. Оба эти параметра оцениваются на модели таким образом, чтобы константа скорости образования комплекса при заданных значениях  $p$  и  $r$  соответствовала экспериментально определенной.

В модели в качестве расстояния докинга для ферредоксина и ФНР приняты расстояние между атомами Fe1 железо-серного кластера и С8М флавинадениндуклеотида, для ферредоксина и гидрогеназы – расстояние между Fe1 железо-серного кластера ферредоксина и Fe1 железо-серного кластера гидрогеназы. Известно, что константа скорости образования комплекса ферредоксин–ФНР составляет  $(2-6) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  [30,31]. В соответствии с этим мы выбрали расстояние докинга  $r = 18 \text{ \AA}$  и вероятность докинга  $p = 0,003$ .

Поскольку константа связывания ферредоксина и гидрогеназы экспериментально определена не была, мы выбрали параметры таким образом, чтобы константа образования комплекса ферредоксин–гидрогеназа находилась в границах  $(0,5-1,5) \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , что характерно для специфического взаимодействия неиммун-



**Рис. 2.** Эквипотенциальные поверхности ФНР, ферредоксина и гидрогеназы при рН 5,0,  $I = 150$  мМ. Темно-серым изображена поверхность +7 мВ, светло-серым – поверхность –7 мВ.

ных белков. В результате мы взяли расстояние докинга, соответствующее расстоянию между атомом Fe1 [Fe–Fe]-кластера гидрогеназы и атомом Fe1 [2Fe–2S]-кластера ферредоксина, равное 20 Å, и вероятность докинга  $p = 1$ . При данных значениях параметров константа связывания гидрогеназы и ферредоксина равна  $\sim 1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Значительные различия в вероятностях докинга для комплексов Фд–ФНР и Фд–гидрогеназа объясняются тем, что для моделирования структур белков Фд и ФНР использовали комплекс Фд–ФНР (PDB ID: 1EWY), а для гидрогеназы – отдельный белок (PDB ID: 3LX4). Таким образом, для компенсации меньшей комплементарности поверхностей молекул в случае взаимодействия Фд с гидрогеназой вероятность докинга была выше.

Ранее при помощи разработанной нами программы ProKSim [21], основанной на прямом многочастичном подходе, мы промоделировали взаимодействие белков в двух системах – системе «ferredоксин и ФНР» в растворе и системе «ferredоксин и гидрогеназа» в растворе. В данной работе мы построили «тройную» конкурентную модель одновременного взаимодействия ферредоксина, ФНР и гидрогеназы: в объем размера  $80 \times 80 \times 80$  нм помещали по 50 молекул ФНР и гидрогеназы и 100 молекул ферредоксина. При разных значениях рН по уравнению Пуассона–Больцмана рассчитывали потенциал белков и визуализировали их в программе PyMol (<http://pymol.org/>). За один временной шаг частица перемещается не более чем на 1 Å. Расчет модели дал наборы кинетических кривых – зависимостей числа образовавшихся комплексов от времени. Для того чтобы оценить влияние рН на электростатические свой-

ства ферредоксина, ФНР и гидрогеназы, мы провели сравнение эквипотенциальных поверхностей белков программой ProKSim. Для количественного выражения различий в скоростях взаимодействия белков мы построили зависимости вычисленных констант скоростей от рН.

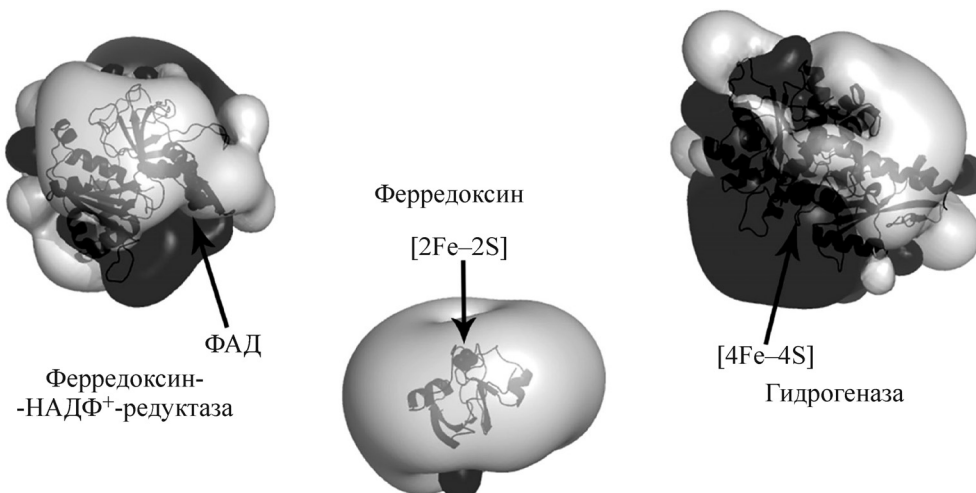
Для выявления аминокислотных остатков на поверхности гидрогеназы, играющих ключевую роль в ее взаимодействии с ферредоксином, мы также исследовали точечные мутации для замены заряда на поверхности взаимодействия белков.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

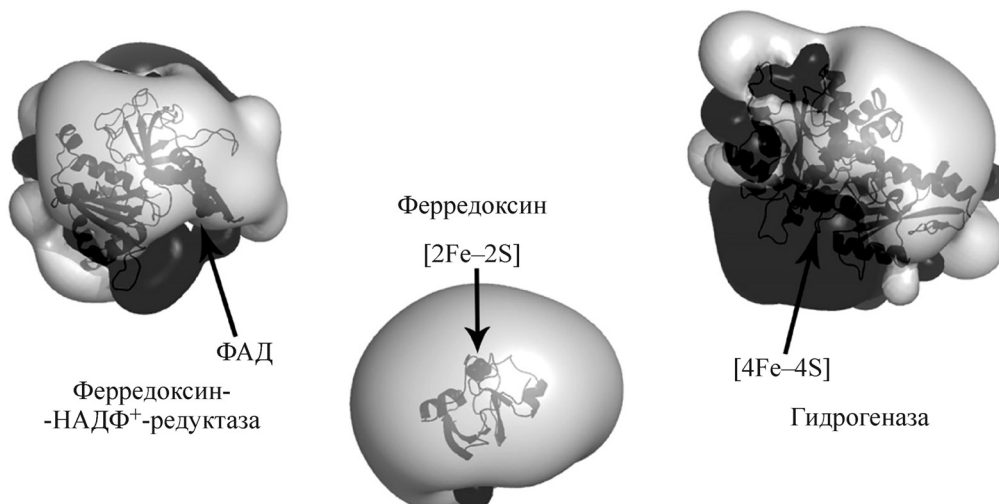
Результаты влияния рН на форму электростатических поверхностей ферредоксина, ФНР и гидрогеназы при различных значениях рН представлены на рис. 2–4.

При помощи конкурентной модели мы исследовали, как изменение рН влияет на распределение электронных потоков с ферредоксином, т. е. с каким из белков-партнеров Фд предпочтительно взаимодействует при разных значениях рН. На рис. 5 показаны зависимости констант скоростей взаимодействия Фд с ФНР и гидрогеназой в тройной конкурентной модели от рН.

При рН 5,0 (рис. 5) константа взаимодействия Фд и ФНР выше, чем константа взаимодействия Фд и гидрогеназы. Как видно из рис. 2, при этом значении рН ферредоксин преимущественно заряжен отрицательно с небольшой областью положительного потенциала с противоположной от кофактора стороны молекулы (рис. 2, в центре). Кофактор ФНР флавинадениндинуклеотид находится в области по-



**Рис. 3.** Эквипотенциальные поверхности ФНР, ферредоксина и гидрогеназы при pH 7,0,  $I = 150$  мМ. Темно-серым изображена поверхность +7 мВ, светло-серым – поверхность –7 мВ.



**Рис. 4.** Эквипотенциальные поверхности ФНР, ферредоксина и гидрогеназы при pH 9,0,  $I = 150$  мМ. Темно-серым изображена поверхность +7 мВ, светло-серым – поверхность –7 мВ.

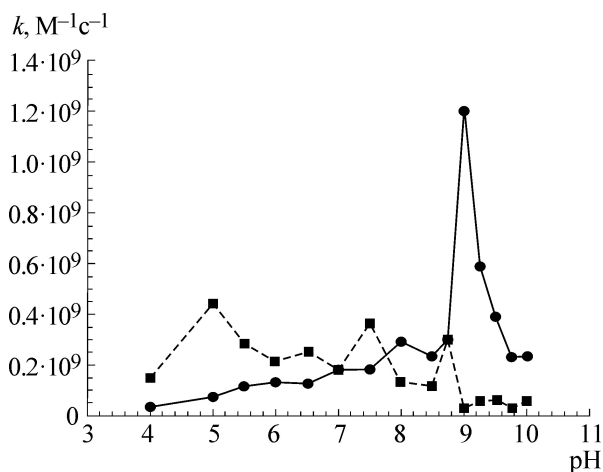
ложительного потенциала (рис. 2, слева), а железо-серный кластер гидрогеназы – в области отрицательного потенциала (рис. 2, справа). Таким образом, при таком распределении зарядов на молекулах ферредоксин чаще подходит к ФНР в правильной ориентации по сравнению с гидрогеназой. Именно это отражают значения констант образования комплексов (рис. 5).

При pH 7,0 (рис. 3) константы образования комплексов Фд–ФНР и Фд–гидрогеназа близки. При повышении pH белки становятся более отрицательно заряженными, в результате чего флавинадениндинуклеотид в белке ФНР оказывается в окружении отрицательно заряженных аминокислот, но рядом сохраняются положи-

тельно заряженные области (рис. 3, слева). В то же время увеличивается область отрицательного потенциала на гидрогеназе, и молекула становится с одной стороны положительно заряженной, с другой – отрицательно заряженной (рис. 3, справа).

При pH 9,0 (рис. 4) скорость взаимодействия ферредоксина с гидрогеназой выше, чем с ФНР, поскольку кофактор флавинадениндинуклеотид в ФНР в данных условиях становится окруженной большой областью отрицательного потенциала (рис. 4, слева), когда как гидрогеназа сохраняет положительный потенциал вблизи железо-серного кластера.

Результаты расчетов на многочастичной модели показали, что в широком диапазоне pH

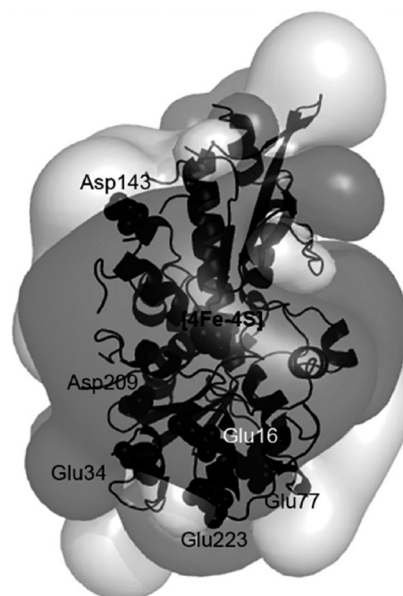


**Рис. 5.** Зависимость константы скорости связывания ферредоксина с ФНР (пунктирная линия) и гидрогеназой (сплошная линия) от pH в конкурентной «тройной» модели.

(от 5,0 до 9,0) константа скорости связывания ферредоксина и ФНР практически не изменяется. Такая форма зависимости характерна для большинства белков [32]. С ростом pH константа скорости взаимодействия ферредоксина и гидрогеназы значительно возрастает. Это указывает на различия в механизмах влияния pH на скорости этих двух реакций. По-видимому, защелачивание стромы на свету не влияет на скорость взаимодействия ферредоксина и ФНР, но играет важную роль в увеличении сродства ферредоксина к гидрогеназе. В результате усиливается отток электронов на водород и происходит «разгрузка» электрон-транспортной цепи.

Одной из задач современной биотехнологии является увеличение выхода водорода у зеленых водорослей, чего можно достигнуть путем увеличения скорости взаимодействия ферредоксина и гидрогеназы за счет введения мутаций, усиливающих электростатические взаимодействия между белками. Ранее мы исследовали влияние точечных мутаций ФНР на скорость ее взаимодействия с ферредоксином и показали, что увеличение положительного заряда на поверхности взаимодействия белков приводит к увеличению константы скорости образования комплекса [17].

Мы исследовали точечные мутации гидрогеназы для замены заряда вблизи ее кофактора [4Fe-4S] (рис. 6, таблица). Поскольку поверхность молекулы гидрогеназы, непосредственно взаимодействующая с ферредоксином, заряжена в основном положительно (рис. 6), мы рассмотрели расположенные рядом отрицательно заряженные аминокислотные остатки, глутамат и



**Рис. 6.** Расположение отрицательно заряженных аминокислотных остатков и активного центра гидрогеназы. Темно-серым изображена поверхность +7 мВ, светло-серым – поверхность -7 мВ.

аспартат, и производили замену заряда на положительный или убирали заряд, что соответствует мутациям замены глутамата и аспартата на аргинин или глутамин и аспарагин соответственно. Таким образом, увеличение области положительного потенциала на поверхности взаимодействия гидрогеназы с ферредоксином должно усиливать их взаимное притяжение и, следовательно, скорость взаимодействия. Ре-

Значения констант скоростей взаимодействия ферредоксина с гидрогеназой дикого типа и мутантных форм при pH 7,0 и 9,0

Мутации	$k, M^{-1}c^{-1}$	
	pH 7,0	pH 9,0
Дикий тип	$3,1 \times 10^8$	$10,1 \times 10^8$
Glu216Gln	$4,4 \times 10^8$	$10,6 \times 10^8$
Glu216Arg	$6,6 \times 10^8$	$15,5 \times 10^8$
Asp209Asn	$3,5 \times 10^8$	$8,0 \times 10^8$
Asp209Arg	$3,9 \times 10^8$	$8,5 \times 10^8$
Glu34Gln	$3,6 \times 10^8$	$7,7 \times 10^8$
Glu34Arg	$3,8 \times 10^8$	$9,3 \times 10^8$
Glu77Gln	$3,5 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$
Glu77Arg	$3,7 \times 10^8$	$8,4 \times 10^8$
Asp143Lys	$4,3 \times 10^8$	$10,1 \times 10^8$
Glu223Gln	$3,9 \times 10^8$	$3,6 \times 10^8$
Glu223Arg	$5,5 \times 10^8$	$12,7 \times 10^8$

зультаты моделирования для двух значений pH представлены в таблице.

Из таблицы видно, что увеличение pH с 7,0 до 9,0 увеличивает константу взаимодействия между гидрогеназой и ферредоксином. Замена отрицательной аминокислоты на положительную также приводит к увеличению скорости образования комплекса. Особенно значительно данный эффект проявляется в случае остатков Glu216 и Glu223 гидрогеназы, замена которых на нейтрально заряженные или положительно заряженные увеличивает скорость взаимодействия ферредоксина и гидрогеназы по сравнению с белками дикого типа.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты моделирования показывают, что скорость взаимодействия ферредоксина и ФНР слабо зависит от изменения pH. Таким образом, можно предположить, что активность ФНР зависит в основном от взаимодействия в темноте с белками TROL и Tic62, фиксирующими ее вблизи тилакоидной мембраны [11,15]. Наоборот, константа скорости связывания ферредоксина с гидрогеназой существенно зависит от pH: при увеличении pH от 6,0 до 8,0 константа возрастает в три раза (рис. 5). Казалось бы, поскольку гидрогеназа восстанавливает протоны, она должна быть более активна при низком pH. Действительно, экспериментально было показано, что реакция выделения водорода гидрогеназой *in vitro* (с использованием метилвиологена в качестве восстановителя) имеет оптимум при pH 7,0–8,0 [31] и ярко выраженный максимум [33,34]. Заметим, что этот механизм изменения скорости выделения водорода за счет влияния на сродство белков превалирует над обратной зависимостью скорости реакции от концентрации протонов как субстрата. В этом случае скорость должна была бы возрастать при низких pH, т. е. при высокой концентрации протонов. 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 хлоро-

пласте скорость выделения водорода регулируется величиной pH за счет регуляции сродства гидрогеназы к ферредоксину, а не напрямую за счет изменения количества протонов.

Моделирование точечных мутаций гидрогеназы показало, что замена двух отрицательно заряженных аминокислотных остатков, Glu216 и Glu223, на положительно заряженные может увеличить скорость взаимодействия гидрогеназы и ферредоксина за счет усиления их взаимного электростатического притяжения. Введение точечных мутаций в гидрогеназу, как метод биотехнологии, потенциально способно увеличить выход водорода.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проекты 14-04-31686 и 14-04-00302.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. H. Gaffron and J. Rubin, *J. Gen. Physiol.* **26** (2), 219 (1942).
2. R. E. Blankenship, *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (Wiley-Blackwell, 2014).
3. Govindjee, J. T. Beatty, and J. F. Allen, *Advances in Photosynthesis and Respiration. Discoveries in Photosynthesis* (Springer, Dordrecht, 2006).
4. A. Melis and T. Happe, *Plant Physiol.* **127**, 3740 (2001).
5. M. L. Ghirardi, R. K. Togasaki, and M. Seibert, *Appl. Biochem. Biotech.* **63**, 141 (1997).
6. A. Melis, L. Zhang, M. Forestier, et al., *Plant Physiol.* **122**, 127 (2000).
7. A. Tsygankov, S. Kousouriv, M. Siebert, and M. Ghirardi, *Int. J. Hyd. Energy* **27**, 1239 (2002).
8. T. Happe, B. Mosler, and J. D. Naber, *Eur. J. Biochem.* **222**, 769 (1994).
9. L. Cournac, F. Mus, L. Bernard, et al., *Int. J. Hyd. Energy* **27**, 1229 (2002).
10. I. Yacoby, S. Pochekailov, H. Toporik, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108** (23), 9396 (2011).
11. S. Jurić, K. Hazler-Pilepić, A. Tomašić, et al., *Plant J.* **60**, 783 (2009).
12. F. Alte, A. Stengel, J. P. Benz, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107** (45), 19260 (2010).
13. P. Mulo, *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 927 (2011).
14. M. Balsera, A. Stengel, J. Soll, and B. Bölter, *BMC Evol. Biol.* **7**, 43 (2007).
15. J. P. Benz, A. Stengel, M. Lintala, et al., *Plant Cell* **21** (12), 3965 (2009).
16. Y.-H. Lee, K. Tamura, M. Maeda, et al., *J. Biol. Chem.* **282** (8), 5959 (2007).
17. I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, P. A. Gromov, et al., *Phys. Biol.* **3**, 121 (2006).



18. I. B. Kovalenko, A. N. Diakonova, A. M. Abaturova, et al., *Phys. Biol.* **7**, 026001 (2010).
19. I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, A. N. Diakonova, et al., *Math. Model. Nat. Phenom.* **6** (7), 39 (2011).
20. G. Yu. Riznichenko, I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, et al., *Biophys. Rev.* **2** (3), 101 (2011).
21. S. S. Khruschev, A. M. Abaturova, A. N. Diakonova, et al., *Biophysics* **60** (2), 212 (2015).
22. E. L. Gross and D. C. Pearson, Jr., *Biophys. J.* **85**, 2055 (2003).
23. A. Spaar and V. Helms, *J. Non-Cryst. Solids* **352** (42), 4437 (2006).
24. A. Spaar, C. Dammer, R. R. Gabdoulline, et al., *Biophys. J.* **90**, 1913 (2006).
25. G. Schreiber, in *Computational protein-protein interactions*, Ed. by R. Nussinov and G. Schreiber (CRC Press, 2009), pp. 87–108.
26. C. H. Chang, P. W. King, M. L. Ghirardi, and K. Kim, *Biophys. J.* **93** (9), 3034 (2007).
27. H. Long, C. H. Chang, P. W. King, et al., *Biophys. J.* **95** (8), 37 (2008).
28. O. S. Knyazeva, I. B. Kovalenko, A. M. Abaturova, et al., *Biophysics* **55** (2), 221 (2010).
29. J. K. Hurley, J. T. Hazzard, M. Martinez-Julvez, et al., *Protein Sci.* **8**, 1614 (1999).
30. M. Martinez-Julvez, J. Hermoso, J. K. Hurley, et al., *Biochemistry* **37**, 17680 (1998).
31. S. Kousorov, M. Siebert, and M. L. Ghirardi, *Plant Cell Physiol.* **44**, 146 (2003).
32. J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer, *Biochemistry* (W.H. Freeman and Company, 2007).
33. M. W. W. Adams and L. E. Mortenson, *J. Biol. Chem.* **259** (11), 7045 (1984).
34. T. Happe and J. D. Naber, *Eur. J. Biochem.* **214**, 475 (1993).

## **A Role of Electrostatic Interactions in Complex Formation Between Ferredoxin–Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reductase and Ferredoxin–Hydrogenase**

**A.N. Diakonova, S.S. Khruschev, I.B. Kovalenko, G.Yu. Riznichenko, and A.B. Rubin**

*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia*

We have developed a Brownian model of competitive interaction between ferredoxin, ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductase and hydrogenase. In this model molecules of the three types were moving in a 3D reaction volume due to Brownian and electrostatic forces created by neighboring molecules and solution. Using the model, we have shown that in a wide range of pH, from 5 to 9, rate constant of ferredoxin and ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductase complex formation is approximately constant. We, therefore, can assume that regulation of the activity of ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-reductase occurs through another processes. On the other hand, in the model the rate constant of the binding of ferredoxin to hydrogenase significantly depends on pH: with the increase in pH from 6,0 to 8,0 the rate constant is threefold greater. At the higher pH, an increase occurs in stroma during illumination, the rate of ferredoxin and hydrogenase interaction increases, but the amount of hydrogenase's substrate – protons decreases. Therefore, at low pH in stroma the rate of hydrogen formation is slow because of insufficient amount of electrons from ferredoxin. When pH increases, the number of electrons coming to hydrogenase also increases, and, hence, the rate of hydrogen production grows.

*Key words: hydrogenase, biohydrogen, Brownian dynamics*