

СТРУКТУРА МАКРОМОЛЕКУЛЯРНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ

УДК 577.23

Посвящается памяти Н.В. Белова

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА ФОТОСИСТЕМЫ II
ИЗ *Thermosynechococcus elongates* С ТЕРБУТРИНОМ

© 2011 г. А. Г. Габдулхаков, М. В. Донцова, В. Зенгер*

Институт белка РАН, Пущино, Россия

E-mail: azat@vega.protres.ru

*Институт кристаллографии, Свободный университет, Берлин, Германия

Поступила в редакцию 28.02.2011 г.

Фотосистема II — ключевой компонент фотосинтетического пути образования кислорода, расположенный в тилакоидной мембране цианобактерий, зеленых водорослей и растений. Впервые методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 3.2 Å ($R_{factor} = 26.9\%$, $R_{free} = 29.9\%$, $rmsd$ длин связей — 0.013 Å, валентных углов — 2.2° соответственно) определена и уточнена трехмерная структура фотосистемы II из цианобактерии *Thermosynechococcus elongates* в комплексе с гербицидом тербутрином — ингибитором фотосинтеза. Молекула тербутрина обнаружена в сайте связывания подвижного пластохинона. Координаты уточненной структуры комплекса фотосистемы II с тербутрином депонированы в международный банк белковых структур.

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез — это один из самых важных процессов, происходящих в биосфере, за счет которого поддерживается жизнь на Земле. В противоположность химическому и электрохимическому разложению воды, которые являются термодинамически невыгодными процессами, биологическое расщепление воды происходит с высоким КПД и относительно небольшими затратами энергии. До сих пор не удается искусственно воспроизвести такую эффективную систему, что во многом связано со сложностью этого биохимического способа окисления воды. Понимание данного процесса может привести к созданию системы восстанавливающихся энергоресурсов.

Преобразование энергии света в энергию химических связей происходит в реакционных центрах фотосистем I и II. Фотосистема II (ФСII) преобразует солнечную энергию в ее химический эквивалент через серию последовательных реакций, что в конечном счете приводит к образованию углеводов в цикле Кельвина. Именно в этом огромном комплексе белок-кофактор происходит светозависимое расщепление воды, приводящее к образованию молекулярного кислорода, а также протонов и электронов.

За последние десять лет было определено несколько структур димерной формы фотосистемы II [1–5], последняя пространственная модель ФСII получена с разрешением 2.9 Å [6]. В результате определено, что ФСII состоит из ансамбля белков и липидов, с которым связаны хлорофиллы и другие пигменты. Каталитическим центром ФСII яв-

ляется уникальная система фотоокисления воды — Mn_4Ca кластер, который расположен в люминальной части комплекса, в котором окисление воды осуществляется через пять последовательных окислительных состояний, называемых S_i состояниями ($i = 0–4$). В результате серии биохимических реакций окисляются две молекулы воды до молекулярного кислорода, четырех протонов и четырех электронов. [7]. В ходе работы ФСII происходит также восстановление пластохинонов, подвижных переносчиков электронов, располагающихся в билипидном слое мембраны и участвующих в работе электронотранспортной цепи в процессе фотосинтеза. Именно сайты взаимодействия пластохинонов с ФСII являются мишенью для гербицидов. Они соревнуются с природными электронными акцепторами за места связывания на поверхности фотосинтетического комплекса. В результате взаимодействия гербицида с фотосистемой подвижный пластохинон (Q_B) не может занять свое место, и таким образом в ФСII блокируется транспорт электронов от зафиксированного пластохинона (Q_A) к подвижному Q_B . Это приводит к остановке работы всей ФСII [8, 9].

Для понимания механизма электронного транспорта, а также для определения точного места связывания гербицидов с ФСII необходима пространственная структура комплекса ФСII с гербицидом. В данной работе мы представляем первую кристаллическую структуру комплекса цианобактериальной фотосистемы II с тербутрином (2-tert-butylamino-4-ethylamino-6-methylthio-

Таблица 1. Кристаллографические данные и параметры съемки комплекса димера фотосистемы II из *T. elongates* с тербутрином

Пр. гр.	$P2_12_12_1$ (№ 19)
Параметры ячейки, Å, град	$a = 126.9, b = 225.0,$ $c = 304.9, \alpha = \beta = \gamma = 90.0$
Молекулярная масса мономера ФСП с тербутрином, кДа	385
Число мономеров ФСП в независимой части	2
Длина волны, Å	0.93
Разрешение, Å	50.0–3.20 (3.3–3.2)
Число измеренных рефлексов	711 691
Расстояние кристалл–детектор, мм	470
Область качания, град	0.6
Область вращения, град	96
Число независимых рефлексов	137 557
Повторяемость	4.93 (5.07)*
Полнота набора, %	94.1 (90.9)
Мозаичность, град	0.21
Среднее значение $I/\sigma(I)$	7.76 (2.34)*
R_{merge}	12.9 (58.8)*
Коэффициент Мэтьюза (V_m), Å ³ /Da ⁻¹	3.13
Содержание растворителя, %	60.5

* В скобках приведены данные для области высокого разрешения.

1,3,5-triazine) полученную с разрешением 3.2 Å. (PDB ID 3PRQ, 3PRR).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка препарата. ФСП была выделена из тилакоидной мембраны цианобактерий *T. elongatus*, очищена и разделена на мономеры и димеры с помощью ионообменной хроматографии. Более подробно процедура очистки описана в работе Я. Керна [10].

Кристаллизация. Для со-кристаллизации димера ФСП с тербутрином в препарат ФСП добавлен растворенный в диметилсульфоксиде тербутрин до конечной концентрации 2 мМ. Затем препарат был освещен в течение 10 с лампами Halolux 250 (Streppel, Germany). Образцы были выдержаны в течение 120 мин в темноте. Для кристаллизации методом “порций” комплекс ФСП-тербутрин был смешан с таким же объемом осадителя, состоящего из 6.4% PEG 2000, 100 мМ PIPES-NaOH (pH 7.0) и 5 мМ CaCl₂. Окончатель-

ная концентрация тербутрина в каждой кристаллизационной партии составила 1 мМ. После осторожного помешивания полученный раствор был расфасован по 20 мкл в стеклянные капилляры и в политетрафторэтиленовые трубки. Стеклянные капилляры имели следующие размеры: длина 75 мм, внутренний диаметр 1.15 мм, политетрафторэтиленовые трубки 60 и 1 мм соответственно. В таком состоянии раствор комплекса ФСП с тербутрином хранился в отсутствие света при температуре 20°C в течение нескольких дней. Как правило, кристаллы образовывались через 3–5 дней.

Сбор дифракционных данных. Для выбора стратегии съемки при получении набора дифракционных данных с кристаллов ФСП с тербутрином были протестированы несколько линий синхротронного излучения. Предварительные дифракционные данные с разрешением 3.7–4.0 Å получены на синхротронах SLS линия X06SA, Виллиген, Швейцария и ESRF линия ID23-2, Гренобль, Франция. Качество данных было низким. Поэтому для последующих исследований использовалась линия ID 14-4 ESRF, Гренобль, Франция, где собраны дифракционные интенсивности с кристаллов комплекса ФСП-тербутрин с разрешением 3.2 Å. Данные наборы получены при длине волны 0.93 Å и температуре 100 К. Экспериментальный набор модулей структурных амплитуд рассчитан с помощью программ XDS [11]. Кристаллографические характеристики набора и параметры съемки приведены в табл. 1.

Определение пространственной структуры молекулы и ее уточнение. Кристаллическая структура ФСП с тербутрином решена методом молекулярного замещения в программе PHASER [12] из программного комплекса CCP4 [13]. В качестве стартовой модели для решения структуры использована пространственная модель мономера ФСП из *T. elongates*, исследованная ранее с разрешением 2.9 Å (PDB ID 3BZ1) [6]. При уточнении структуры ФСП с тербутрином применялся комплекс программ CNS 1.3 [14]. Для контроля процедуры уточнения и расчета свободного R -фактора (R_{free}) был использован контрольный набор рефлексов, отобранных произвольно из экспериментальных данных. После определения положения и ориентации двух мономеров комплекса ФСП с тербутрином в кристаллической ячейке была выполнена процедура “rigid-body” для всех двадцати белковых субъединиц в мономерах. После этого применялась процедура “annealing” с фиксацией всех атомов основных цепей полипептидов. При уточнении использовалась некристаллографическая симметрия ось второго порядка, связывающая мономеры. Ручная правка модели проводилась с применением программы COOT [15] по картам электронной плотности разностных синтезов Фурье ($2F_o - F_c$) и ($F_o - F_c$), где

F_o – экспериментальные, F_c – расчетные модули структурных факторов. Средние значения B -факторов структуры рассчитывались в программе Bavegate комплекса программ ССР4.

Корректность получаемых по ходу уточнения результатов контролировали с помощью программ Procheck [16], COOT [15]. В табл. 2 приведены статистические данные уточненной структуры ФСII.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оптимизация условий сбора дифракционных данных. Основной проблемой, с которой столкнулись при сборе данных с кристаллов комплекса ФС II с тербутрином, было их быстрое разрушение под воздействием света и интенсивных рентгеновских лучей синхротронного излучения. Поэтому съемка данных с кристаллов проводилась в отсутствие света, а при отборе под микроскопом кристаллов петель использовался зеленый светофильтр, как наименее разрушительный. Было опробовано несколько способов уменьшения радиационного разрушения кристаллов от рентгеновского излучения. Сначала использовали рентгеновский пучок 200×400 мкм, соизмеримый с размером кристалла и короткое время экспозицией около 1–2 с. Измерения проводились на линии синхротронного излучения X06SA. В результате были получены данные с разрешением порядка 3.7 Å, но, к сожалению, такое качество данных не позволило идентифицировать положение относительно небольшой молекулы тербутрина. Увеличение времени экспозиции повышало разрешение, но приводило к разрушению кристалла и потере полноты набора данных. Попытка использования нескольких кристаллов для получения одного полного набора также не увенчалась успехом. Разница в параметрах ячейки кристаллов варьировалась в диапазоне 4–6 Å, и объединить, т.е. привести к общей шкале полученные наборы не удалось. Поэтому был применен другой подход на базе синхротронного излучения линии ID23-2. С помощью микрофокусного пучка диаметром 5–8 мкм при среднем размере кристаллов $100 \times 200 \times 700$ мкм удалось получить данные с двадцати не перекрывающихся позиций на одном кристалле. Но, к сожалению, слияние этих наборов привело к получению данных с разрешением 3.8 Å, что так же недостаточно для обнаружения молекулы тербутрина. По некоторым предположениям невозможность корректного слияния наборов данных с одного кристалла связана с неоднородностью кристалла, вибрацией микрофокусного пучка и неточностью механизма вращения кристалла [17].

Поэтому для дальнейших исследований была выбрана линия синхротронного излучения ID14-4 с довольно узким пучком диаметром 40–50 мкм,

Таблица 2. Статистические характеристики уточнения структуры комплекса димера фотосистемы II из *T. elongates* с тербутрином

Область разрешения, Å	20.0–3.2 (3.83–3.20)*
Число рефлексов в рабочем наборе	136912 (20839)*
Число рефлексов в тестовом наборе	2751 (429)*
Срезка набора, $ F >$	2.2σ
Число неводородных атомов в мономере	25153
Число белковых субъединиц в мономере	20
Количество молекул кофакторов в мономере:	
хлорофилл А	35
феофитин	2
гем	2
пластохинон	1
тербутрин	1
β-каротиноид	12
дигалоктазилдиацилглицерол	7
1,2-дипальмитоил-фосфатидил-глицерол	2
Сульфокиновозил-диацилглицерол	5
моногалактозилдиацилглицерол	11
додецил-β-D-мальтозид	8
Диметилсульфоксид	4
Ион бикарбоната	1
Ион Fe ²⁺	1
Ион кальция	3
Ион хлора	1
Mn ₄ Ca-кластер	1
R-фактор, %	26.9 (46.2)*
R _{free} , %	29.9 (48.6)*
R.M.S.D. длин связей, Å	0.013
R.M.S.D. валентных углов, град	2.2
Статистика Рамачандрана, %:	
наиболее благоприятная область	80.9
разрешенная область	17.5
допустимая область	1.3
запрещенная область	0.4

* В скобках приведены данные для области высокого разрешения.

который не так чувствителен к вибрации работающих рядом приборов и точным механизмам вращения кристалла. В результате удалось собрать восемь фрагментарных наборов по двадцать рент-

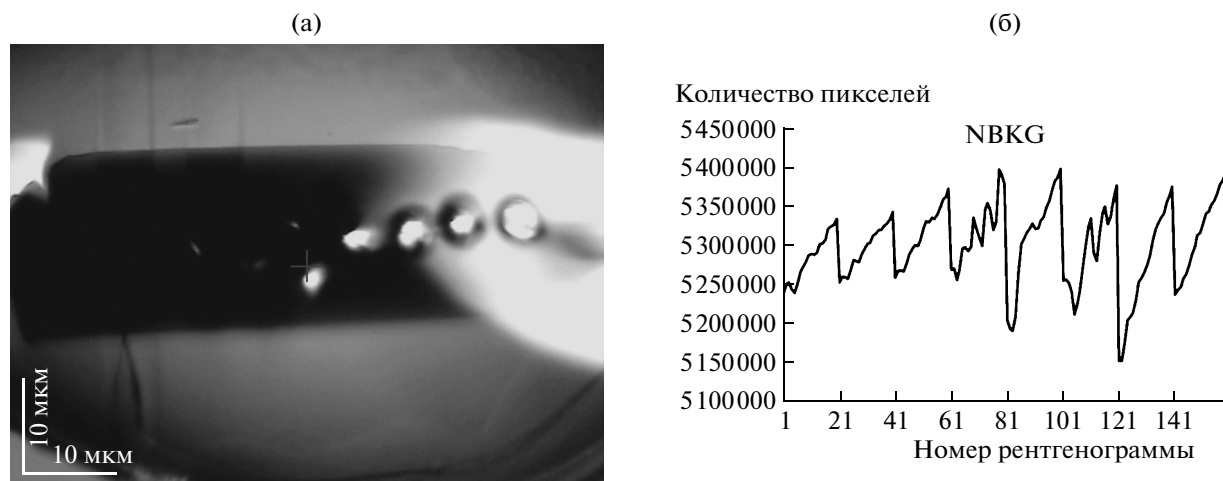


Рис. 1. Кристалл комплекса фотосистемы II с тербутрином после сбора дифракционных данных на линии синхротронного излучения ID14-4 (а), диаграмма изменения параметра NBKG в течение сбора дифракционных данных (б).

генограмм с углом осцилляции 0.6° . Данные получены с неперекрывающихся участков одного кристалла и обработаны программным комплексом XDS как единый набор. На рис. 1 приведена диаграмма разрушения кристалла в течение съемки, в качестве индикатора разрушения выбран параметр NBKG, т.е. количество пикселей, вычитаемых в качестве фона в процедуре INTEGRATE программы XDS. Как видно из диаграммы, в течение сбора данных с одной части кристалла количество пикселей, вычитаемых в качестве фона, увеличивается на 100–200 тысяч, что говорит о быстром разрушении кристалла и соответственно снижении разрешения и качества данных на рентгенограмме. Но, несмотря на разрушение кристалла в процессе съемки, удалось получить непрерывный набор данных с высоким уровнем полноты и разрешением 3.2 \AA .

Пространственная структура комплекса фотосистемы II с гербицидом. Кристаллы комплекса ФСII с тербутрином обладают той же пространственной группой и сходными параметрами ячейки, что и кристаллы исходной ФСII. Структура комплекса была решена методом молекулярного замещения; в качестве стартовой модели использовалась структура мономера ФСII из *T. elongates*, полученная ранее с разрешением 2.9 \AA (PDB ID 3BZ1). Уточненная структура комплекса ФСII с тербутрином содержит два мономера, связанных некристаллографической осью второго порядка (рис. 2). При этом каждый из мономеров, как и в структуре ФСII без ингибитора [6], состоит из двадцати белковых субъединиц (семнадцать из них находятся в мембранной части системы и три в люменальной), тридцати пяти молекул хлорофилла А, двух молекул феофитина, двенадцати β -каротиноидов, двух молекул гема, одной молекулы пластохинона Q_A , двадцати пяти молекул

различных липидов, Mn_4Ca -кластера и других ионов. По сравнению с полученной ранее структурой ФСII с разрешением 2.9 \AA произошла замена пластохинона Q_B на молекулу тербутрина, отсутствует молекула второго подвижного пластохинона Q_C , добавились четыре молекулы диметилсульфоксида и одна молекула детергента додецил- β -D-мальтозида, расположенного вдоль субъединицы I.

Положение молекулы тербутрина в сайте связывания пластохинона Q_B . Молекула тербутрина конкурирует с пластохиноном Q_B за сайт связывания, находящийся внутри ФСII. Положение пластохинона Q_B в структуре нативной ФСII (PDB ID 3BZ1, 3BZ2) фиксировано тремя водородными связями. В формировании этих связей участвуют кето-кислороды головной части пластохинона, которые взаимодействуют с γ -кислородом Ser264A, с кислородом основной цепи Phe265A и с δ -азотом His215A (рис. 3а); длины водородных связей: 2.85 , 2.85 и 2.79 \AA соответственно. Кроме этого, головная часть Q_B удерживается неполярным контактами с аминокислотными остатками Phe255A и Leu271A.

Связывание молекулы тербутрина также происходит посредством водородных связей (рис. 3б). Эти связи формируются тремя азотами тербутрина. Атом N5 кольца тербутрина предположительно образует водородную связь с азотом основной цепи Phe265A, длина которой равна 3.1 \AA . Атом N14 тербутрина может образовать с одинаковой вероятностью водородную связь и с γ -кислородом Ser264A (3.3 \AA) и с кислородом основной цепи Phe265A (3.2 \AA). Учитывая, что максимальная ошибка координат, рассчитанная для полученной модели в программе SFCHECK [18], составляет 0.28 \AA , предполагаем, что возможно слабое взаимодействие между атомом N9 тербут-

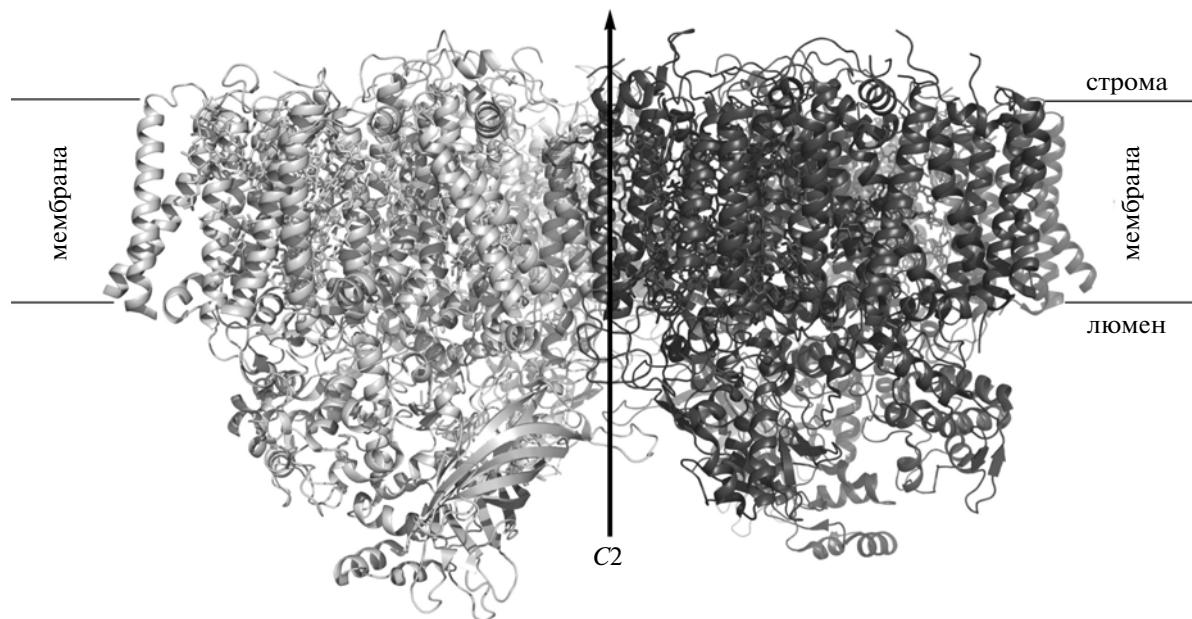


Рис. 2. Пространственная структура комплекса димера фотосистемы II из *Thermosynechococcus elongates* с тербутрином. Стрелкой указана некристаллографическая ось второго порядка, мономеры выделены цветом.

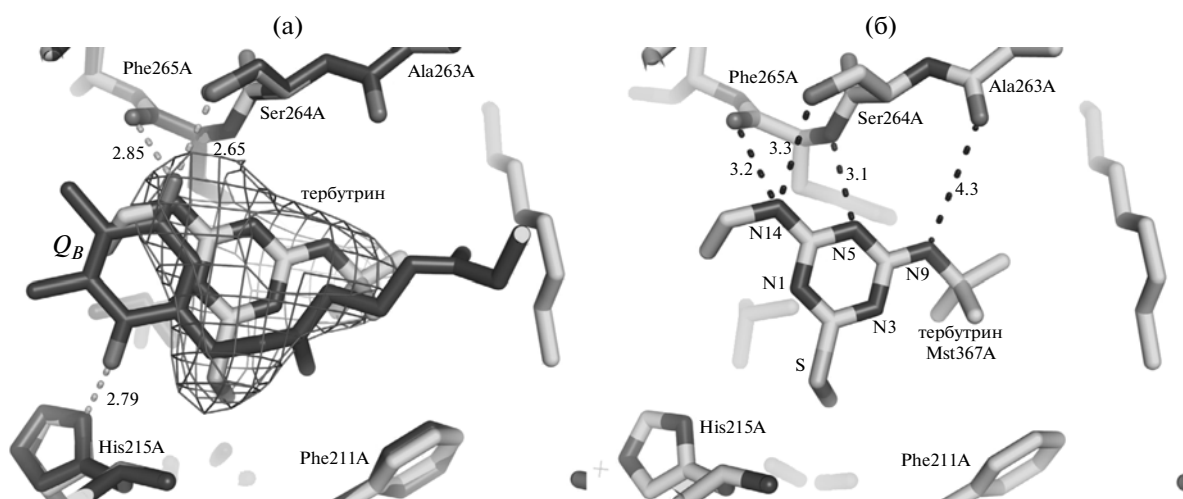


Рис. 3. Наложение пространственных структур нативной фотосистемы II, полученной с разрешением 2.9 Å (выделено темным цветом), и комплекса фотосистемы II с тербутрином в области связывания пластохинона Q_B (выделено светло-серым цветом) (а), положение молекулы тербутрина в сайте связывания пластохинона Q_B (б).

рина и кислородом основной цепи Ala263A (расстояние 4.3 Å). Кроме водородных связей положение тербутрина стабилизировано гидрофобными взаимодействиями с аминокислотными остатками Phe211A, Phe255A, Phe265A, Phe274A, Met214A и Leu271A. К сожалению, невысокое разрешение и как следствие использование некристаллографической симметрии (локальной оси второго порядка) для улучшения уточнения, лишило нас возможности сравнить положение тербутрина в двух мономерах.

Таким образом, в данной работе впервые представлена кристаллическая структура ФСII, инги-

бированной гербицидом тербутрином с разрешением 3.2 Å. Молекула тербутрина обнаружена в области связывания пластохинона Q_B , и удерживается в ней водородными связями, а также гидрофобными взаимодействиями.

Исследование поддержано фондом DFG, проекты SFB A4, C6 и C7. Кристаллографическая часть работы выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук и Программы “Молекулярная и клеточная биология” Президиума РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zouni A., Witt H.T., Kern J. et al. // Nature. 2001. V. 409. P. 739.
2. Kamiya N., Shen J. R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. P. 98.
3. Ferreira K.N., Iverson T.M., Maghlaoui K. et al. // Science. 2004. V. 303. P. 1831.
4. Biesiadka J., Loll B., Kern J. et al. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2004. V. 6. P. 4733.
5. Loll B., Kern J., Saenger W. et al. // Nature. 2005. V. 438. P. 1040.
6. Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A. et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. P. 334.
7. Renger G. // Photosynth Res. 2007. V. 92. P. 407.
8. Oettmeier W. // Cell Mol. Life Sci. 1999. V. 55. P. 1255.
9. Trebst A. // Photosynth. Res. 2007. V. 92. P. 217.
10. Kern J., Loll B., Lüneberg C. et al. // Biochim. Biophys. Acta. 2005. V. 1706. P. 147.
11. Kabsch W. // J. Appl. Cryst. 1993. V. 26. P. 795.
12. McCoy A.J., Grosse-Kunstleve R.W., Adams P.D. et al. // J. Appl. Cryst. 2007. V. 40. P. 658.
13. Collaborative_Computing_Project_4 // Acta Cryst. D. Biol. Cryst. 1994. V. 50. P. 760.
14. Brünger A.T., Adams P.D., Clore G.M. et al. // Acta Cryst. D. Biol. Cryst. 1998. V. 54 (Pt 5). P. 905.
15. Emsley P., Cowtan K. // Acta Cryst. D. 2004. V. 60. P. 2126.
16. Laskowski R.A., Moss D.S., Thornton J.M. // J. Mol. Biol. 1993. V. 231. P. 1049.
17. Flot D., Mairs T., Giraud T. et al. // J. Synchrotron Radiat. 2010. V. 17. P. 107.
18. Vaguine A.A., Richelle J., Wodak S.J. // Acta Cryst. D. Biol. Cryst. 1999. V. 55. P. 191.