

УДК: 577.31, 577.32, 577.34

Молекулярная модель образования комплекса ОСР с фикобилисомой

Д. В. Зленко^{1,а}, И. Н. Стадничук², П. М. Красильников¹

¹Биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова,
Россия, 119991, г. Москва, Воробьевы горы, 1/12

²Институт биохимии им. А. Н. Баха РАН, Россия, 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33

E-mail: ^а dvzlenko@gmail.com

Получено 24 июля 2014 г.,
после доработки 18 августа 2014 г.

Построена молекулярная модель взаимодействия фикобилисомы с ОСР, белком-тушителем, регулирующим передачу энергии от фикобилисом к фотосистемам в пигментном аппарате цианобактерий. Полученная модель не требует нарушения известной по рентгеноструктурным данным пространственной структуры взаимодействующих белков, а также позволяет удовлетворительно описать процесс переноса энергии к ОСР от фикобилисомы. Методом ММ–PBSA рассчитана свободная энергия образования комплекса. Показано, что свободная энергия имеет величину не более нескольких десятков кДж/моль, что хорошо согласуется с наблюдаемой в эксперименте небольшой устойчивостью комплекса. Показано, что удельная свободная энергия взаимодействия рассматриваемых в модели весьма гидрофильных белков друг с другом примерно в два раза превышает удельную энергию их взаимодействия с водой, что свидетельствует о высокой комплементарности контактирующих белковых поверхностей и является сильным аргументом в пользу предложенной модели.

Ключевые слова: фикобилисома, ОСР, комплексообразование, молекулярное моделирование, свободная энергия, ММ–PBSA

Molecular model of OCP-phycobilisome complex formation

D. V. Zlenko¹, I. N. Stadnichuk², P. M. Krasilnikov¹

¹Lomonosov Moscow State University, 1/12 Vorobevy Gogy, Moscow, 11991, Russia

²A. N. Bach Institute of Biochemistry RAS, 33 Leninsky av., Moscow, 119071, Russia

Abstract. — A molecular model of phycobilisome complex with a quenching protein OCP which regulates the energy transfer from phycobilisome to photosystem in photosynthetic apparatus of cyanobacteria has been developed. In the model obtained a well known spatial structure of interacting proteins remains intact and also the energy transfer from phycobilisome to OCP with reasonable rates is possible. Free energy of complex formation was calculated using MM–PBSA approach. By the order of magnitude this energy is about tens of kJ/mole. This value correlates well with experimental observed low stability of this complex. The specific surface energy of interaction between hydrophylic phycobilisome and OCP is twice larger than specific surface energy of their interaction with water. This reflects a high molecular complementarity of interacting protein surfaces and is a strong pro argument for proposed model.

Keywords: phycobilisome, OCP, complexation, molecular modeling, free energy, MM–PBSA

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2014, vol. 6, no. 5, pp. 761–774 (Russian).

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 14-14-00589. Все расчеты выполнены с использованием суперкомпьютеров «Ломоносов» и «Чебышёв» НИВЦ МГУ.

Введение

Пигментный аппарат окисленных фотосинтетиков состоит из комплексов фотосистем I и II, в реакционных центрах которых энергия световых квантов преобразуется в энергию разделенных зарядов. Для увеличения светопоглощения служат дополнительные пигмент-белковые комплексы, антенны, от которых энергия поглощенного света передается к реакционным центрам фотосистем с эффективностью, близкой к 100%. При избытке световой энергии, поступающей от антенн, существует опасность окислительного повреждения фотосинтетического аппарата. Для предотвращения такого повреждения служат фотопротекторные молекулярные механизмы, снижающие опасность фотоповреждений в хлоропластах и в клетке в целом [Szabo et al., 2005]. В клетках цианобактерий функцию антенны выполняют фикобилисомы — ассоциированные с мембраной тилакоидов надмолекулярные пигмент-белковые комплексы, достигающие массы 3–7 МДа [Watanabe, Ikeuchi, 2013]. Они образованы белками — фикобилипротеинами, содержащими ковалентно связанные с остатками цистеина фикобилиновые хромофоры. Типичные полудисковидные фикобилисомы имеют две части: трехцилиндровое ядро, образованное дисковидными тримерами аллофикоцианина, и примыкающими к ядру шестью боковыми цилиндрами, образованными другими фикобилипротеинами.

Регуляцию световой активности фикобилисом осуществляет специальный белок, получивший название ОСП (orange carotenoid protein), содержащий в качестве кофактора молекулу каротиноида 3'-гидроксиэхиненона [Rakhimberdieva et al., 2004; Wilson et al., 2006]. В темноте, в отсутствие яркого света в синей части спектра, ОСП находится в неактивном, димерном «оранжевом» (ОСП^o) состоянии и не взаимодействует с фикобилисомами. При облучении достаточно сильным синим светом ОСП переходит в светоактивированное мономерное «красное» (ОСП^r) состояние, в котором он, соединяясь с фикобилисомами, переводит поглощенную энергию в тепло и эффективно тушит флуоресценцию последних [Rakhimberdieva et al., 2004; Wilson et al., 2006; Zhang et al., 2014]. Однако как именно происходит это связывание, в настоящий момент неизвестно.

В литературе описаны две модели взаимодействия ОСП с фикобилисомами. В работе [Zhang et al., 2014] на основании экспериментальных данных о ковалентном связывании отдельных участков молекул ОСП и белков фикобилисомы при помощи специального линкерного агента выдвинута гипотеза о встраивании молекулы ОСП между двух тримеров аллофикоцианина. Заметим, что это требует нарушения структуры фикобилисомы и, очевидно, противоречит данным электронной микроскопии последних. В то же время авторы описывают только три ковалентных линкера между ОСП и фикобилисомой, причем один из них с белком РВL_{СМ}, глобулярной части продукта гена АрсЕ, гомологичной α -субъединице фикобилисомы и содержащей терминальный эмиттер [Gao et al., 2004], донирующий энергию на фотосистему. Два других линкера связали ОСП с β -субъединицей фикобилисомы, а не с β^{18} -субъединицей, образующей прочный димер с РВL_{СМ}.

Альтернативой, предложенной структуре, является модель, описанная в работе [Leverenz et al., 2014]. В рамках этой модели при переходе из ОСП^o- в ОСП^r-состояние С-концевой домен ОСП фактически диссоциирует от N-концевого домена, высвобождая молекулу каротиноида, который в таком состоянии, по мнению авторов [Leverenz et al., 2014], способен проникать внутрь фикобилисомы, что и обеспечивает тушение флуоресценции последней. Столь радикальная модель взаимодействия обоснована сходством спектров поглощения светоактивированного ОСП^r и протеолитически расщепленного ОСП, лишённого таким образом С-концевого домена. Кроме того, показано, что такой расщепленный, вечно «красный», вариант ОСП, названный RCP (red carotenoid protein), способен эффективно тушить флуоресценцию фикобилисом на уровне светоактивированной формы ОСП^r. Отметим, однако, что предложенная модель подразумевает

формирование крайне термодинамически невыгодного промежуточного состояния с экспонированным в воду каротиноидом и, как следствие, высокую энергию активации диссоциации комплекса ОСР с фикобилисомой. Между тем эта энергия, скорее всего, невелика, что, собственно, и мешает получить соответствующий кокристалл или как-либо иначе непосредственно доказать существование этого комплекса.

Высокая эффективность тушения флуоресценции предполагает высокий уровень миграции энергии между пигментами фикобилисомы (фикоцианобилином) и кофактором ОСР (3'-гидроксиэхиненоном). Для выполнения этого условия необходимо, чтобы кофакторы были расположены как можно ближе друг к другу. Поэтому авторы описанных работ предлагают модели, в которых ОСР так или иначе погружен внутрь фикобилисомы. В настоящей работе предложено более деликатное решение, не требующее разрушения третичной структуры участвующих в процессе белков и отвечающее геометрии контактирующих поверхностей макромолекул. Предложенная схема образования комплекса позволяет расположить кофакторы на наименьшем возможном, при условии сохранения структуры белков, расстоянии. Рассмотренная в настоящей статье идея уже была сформулирована ранее [Stadnichuk et al., 2013]. Здесь мы рассматриваем термодинамический аспект формирования комплекса, что необходимо для обоснования возможности его образования.

Методы

Докинг. Для построения модели взаимодействия белков была использована простая модель твердых тел, в рамках которой два белка, ОСР (1M98) и гексамерный аллофикоцианин (1ALL), всеми возможными способами располагались друг относительно друга в пространстве. В каждом из полученных вариантов взаимного расположения и контактов белков оценивали энергию электростатического и дисперсионного взаимодействий, а также рассчитывали некоторую эмпирическую штрафную функцию, оцениваемую прежде всего как результат взаимного проникновения поверхностей двух белков и плотности образуемого контакта. По результатам сравнения полученных конфигураций выбрали лучшую по энергии и штрафу модель. Для реализации алгоритма использовали готовое решение, Hex Protein Doking Server [Macindoe et al., 2010].

Молекулярная динамика. Расчеты молекулярной динамики (МД) проведены при помощи пакета программ GROMACS [Pronk et al., 2013] в сочетании с силовым полем OPLS-AA [Jorgensen et al., 1996]. В качестве уравнений движения были использованы уравнения стохастической динамики. Шаг интегрирования во всех расчетах составлял 1 фс. Для расчетов дальнедействующих электростатических взаимодействий был использован метод PME [Essmann et al., 1995] со стандартным набором параметров (шаг сетки 1.2 Å, порядок полиномов интерполяции 4). Для расчета близкодействующих электростатических сил, дисперсионных сил и списков соседних атомов использовали радиус обрезания 1.25 нм. Все расчеты проведены в периодических граничных условиях, при 300 К и постоянном изотропном давлении в 1 атм.

Квантовая химия. Расчеты квантовой химии (КХ) были проведены при помощи пакета FireFly [Granovsky, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>], основанном на исходном коде GAMESS US [Schmidt et al., 1993], в приближении DFT (функционал B3LYP5), в базисе 6-311+G*. Расчет суммарного электростатического потенциала вокруг молекул кофакторов также был проведен при помощи FireFly. Значения парциальных зарядов на атомах молекул кофакторов были скорректированы согласно аппроксимации квантово-химического электростатического потенциала молекул точечными зарядами (RESP [Bayly et al., 1993]).

Модели молекул кофакторов. Модели молекул кофакторов были созданы на основе атомов, стандартных для силового поля OPLS-AA. В случае молекулы 3'-гидроксиэхиненона корректировка парциальных зарядов не потребовалась. В дополнение к стандартным параметрам

силового поля были определены параметры торсионных углов вращения в середине цепи сопряженных двойных связей, параметры которых были приравнены к параметрам центрального торсионного угла дивинила (рис. 1).

При построении модели молекулы фикоцианобилина, ковалентно связанного с Cys84-аминокислотным остатком α -субъединицы аллофикоцианина, были существенно изменены парциальные заряды атомов, поскольку в стандартном наборе силового поля OPLS-AA отсутствуют типы атомов, соответствующие пирролу, замещенному гетероатомами. Поэтому за основу были взяты типы атомов из алифатически замещенного пиррола, а также из некоторых нуклеотидов (рис. 1). Затем при помощи пакета для квантово-химических расчетов FireFly [Granovsky, <http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>] была оптимизирована геометрия молекулы. Для основного состояния в равновесной геометрии было рассчитано распределение электростатического потенциала в пространстве вокруг молекулы. Для расчета парциальных зарядов на атомах молекулы фикоцианобилина была использована процедура RESP [Bayly et al., 1993], чтобы максимально точно аппроксимировать истинный квантово-химический электростатический потенциал, варьируя точечные заряды, помещенные в центры атомов молекулы. В итоговой модели были использованы не непосредственно заряды, полученные в ходе оптимизации, а модифицированные заряды схожих типов атомов из силового поля OPLS-AA, чтобы минимальным образом нарушить самосогласованную систему зарядов исходного силового поля. Модификация состояла в том, чтобы, соблюдая электронейтральность и минимизируя вмешательство в структуру поля, поменять заряды некоторых атомов в направлении величины зарядов, полученных при помощи RESP. Такой подход оправдан, так как парциальные заряды атомов в МД есть эффективная величина, в определении которой нельзя полностью полагаться на RESP [Jorgensen et al., 1996]. Квантово-химические расчеты проведены на суперкомпьютере «Чебышёв» НИВЦ МГУ. Одна итерация оптимизации геометрии занимала около 10 минут на 64 процессорах. Всего потребовалось около 500 итераций.

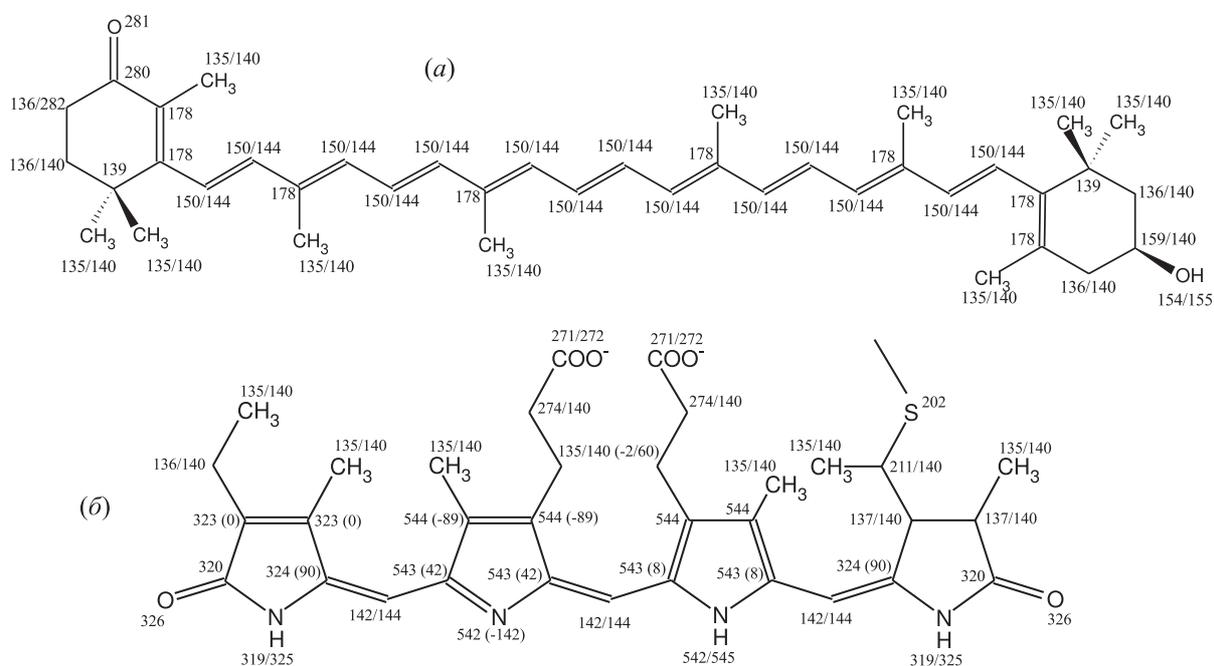


Рис. 1. Структурные формулы кофакторов, 3'-гидроксиэхинонена — кофактора ОСП (а) и фикоцианобилина — кофактора аллофикоцианина (б). Числами даны типы тяжелых атомов / типы связанных с ними атомов водорода (OPLS-AA). В скобках даны парциальные заряды на атомах ($10^{-3}q_e$), рассчитанные методом RESP [Bayly et al., 1993]. Стандартные парциальные заряды не приведены

ММ–PBSA. Расчет свободной энергии связывания ОСР с фикобилисомой был проведен при помощи метода ММ–PBSA (molecular dynamics – poisson Boltzmann surface area [Kollman et al., 2000]), согласно которому полная свободная энергия образования комплекса может быть разделена на несколько вкладов. 1. Энтальпия, связанная с взаимодействием белков и изменением их конформаций при образовании комплекса. Эта энергия практически равна соответствующей свободной энергии из-за незначительности изменения конформационной энтропии в рассматриваемом процессе [Karplus, Kushick, 1981]. 2. Изменение свободной энергии системы, связанной с экспонированной в растворитель поверхностью белков по отдельности и в комплексе. 3. Электростатическая энергия взаимодействия ионизированных групп и формирования двойного электрического слоя (ДЭС).

В рамках метода ММ–PBSA был построен термодинамический цикл, позволяющий последовательно рассчитать вклады в свободную энергию образования комплекса от отдельных энергетических термов. Сначала были рассмотрены ОСР, АРС и их комплекс в вакууме. Затем каждая из трех макромолекулярных структур была перенесена в солевой раствор. При этом рассматривались три процесса: во-первых, гидратация макромолекул; во-вторых, ионизация, связанная с диссоциацией химически активных групп на поверхности белка; в-третьих, формирование двойного электрического слоя над поверхностью макромолекул. При этом расчеты МД были проведены с учетом воды и ионов (Na^+ и Cl^-), а описанные переходы были проделаны виртуально.

В качестве оценки первого термина использована полная потенциальная энергия, полученная напрямую из расчетов молекулярной динамики для неионизированных макромолекул в вакууме, в соответствии с предложенным циклом. Отметим, что необходимо рассматривать именно неионизированные молекулы, так как заряженные группы в вакууме не экранированы друг от друга растворителем, как это имеет место в реальном растворе, что приводит к очень существенным искажениям в оценках итоговых величин. Формирование модели неионизированного белка представляет собой некую методическую сложность, так как практически невозможно, например, добавить в уже относительно равновесную структуру протон, компенсирующий отрицательный заряд ионизированной карбоксильной группы. Поэтому для «разрядки» макромолекул были изменены только парциальные заряды и типы соответствующих атомов (таблица 1). Причем заряд атома кислорода карбоксильной группы был приравнен к заряду гидроксила протонированного карбоксила, а заряд «лишнего» протона в аминокгруппе был приравнен к нулю. Отметим, что авторы метода ММ–PBSA упоминают о необходимости разрядки белковых молекул в вакууме, но не приводят описания процедуры, а также не поясняют ее необходимость [Kollman et al., 2000].

Второй терм был оценен полуэмпирическим методом, в основе которого лежит серия экспериментов по определению удельной свободной энергии сольватации единицы поверхности для набора различных атомных групп [Makhatadze, Privalov, 1993; Privalov, Makhatadze, 1993]. Анализ МД траекторий позволяет для каждой химической группы вычислить доступную для растворителя площадь на поверхности исследуемого белка и оценить полную энергию сольватации ионизированной макромолекулы в чистой воде как сумму свободных энергий сольватации каждой отдельной химической группы.

В опубликованном ранее варианте реализации ММ–PBSA [Kollman et al., 2000] для оценки «неполярной» части энергии сольватации использованы данные о гидратации алканов, для которых эта энергия оказывается прямо пропорциональна площади [Sitkoff et al., 1994], а вся электростатическая часть была вычислена в приближении неявного растворителя при помощи APBS [Baker et al., 2001]. Это не очень аккуратный подход, так как поверхность белка состоит отнюдь не только из неполярных групп. Кроме того, прямые измерения указывают на значительный энтропийный вклад в свободную энергию сольватации полярных групп, который может составлять до 40–50% и сильно варьирует в зависимости от химического строения

Таблица 1. Типы и заряды атомов карбоксильной и amino-групп в ионизированном и неионизированном состоянии, использованные для расчета энтальпии взаимодействия макромолекул

	Ионизированное состояние		Неионизированное состояние	
	тип	заряд	тип	заряд
Карбоксильная группа				
карбонильный углерод	opls_271	+0.700	opls_267	+0.520
протонированный кислород	opls_272	-0.800	opls_268	+0.010
свободный кислород	opls_272	-0.800	opls_269	-0.530
Аминная группа				
атом азота	opls_287	-0.300	opls_900	-0.900
атом водорода	opls_290	+0.330	opls_909	+0.360
лишний протон	opls_290	+0.330	opls_909	+0.000

молекул [Privalov, Makhatadze, 1993]. Для того чтобы нивелировать ошибки, связанные с этой неточностью, мы внесли большую часть электростатической энергии взаимодействия поверхности с растворителем во второй терм, используя для его оценки полные свободные энергии сольватации [Privalov, Makhatadze, 1993]. При этом очевидным образом за рамками рассмотрения оказывается энергия взаимодействия ионизированных групп друг с другом, а также энергия, связанная с формированием двойного электрического слоя в соляном растворе.

Неучтенная во втором терме электростатическая энергия составила третий терм и была оценена в приближении непрерывного растворителя при помощи уравнения Пуассона-Больцмана, для численного решения которого был использован пакет APBS [Baker et al., 2001]. Решалось нелинейное уравнение Пуассона-Больцмана, шаг сетки варьировал в пределах 1.0–1.5 Å. Для оценки энергии ионизации, то есть взаимодействия ионизированных групп друг с другом, была вычислена разность полных электростатических энергий взаимодействия ионизированной и неионизированной макромолекул с растворителем. Энергия формирования ДЭС была оценена как разность полных электростатических энергий взаимодействия ионизированной макромолекулы с соляным раствором (150 мМ NaCl) и с чистой водой. Следует отметить, что при таком подходе некоторая часть электростатической энергии, связанной с поляризацией растворителя вокруг ионизированных групп, учитывается дважды, в составе энергии ионизации и в составе энергии сольватации. Тестирование подхода на небольших пептидах показало, что эта ошибка невелика, что позволило ею пренебречь.

В качестве погрешности расчета указана стандартная ошибка. Для вычисления погрешностей суммарных величин, а также разностей были рассчитаны выборки значений соответствующих величин, по которым уже были вычислены погрешности. Поскольку разные термы рассчитаны по одним и тем же траекториям, из-за наличия внутренних корреляций между значениями энергий, итоговые погрешности оказываются меньше погрешностей, рассчитанных по формальным правилам.

Модельные сцены. Для проведения молекулярной динамики были сформированы модели ОСР, гексамерного аллофикоцианина (АРС) и их комплекса в воде. Все системы представляли собой параллелепипеды, заполненные 150 мМ раствором NaCl, с макромолекулой в центре. Для воды была использована жесткая модель TIP4P [Jorgensen et al., 1983]. Размеры систем составили $9 \times 9 \times 9$ нм ($1.2 \cdot 10^5$ частиц), $16 \times 16 \times 9$ нм ($3.0 \cdot 10^5$ частиц) и $18 \times 16 \times 9$ нм ($3.4 \cdot 10^5$ частиц) для ОСР, АРС и их комплекса соответственно. Для каждой из систем был проведен расчет

молекулярной динамики длиной 100 нс. Расчеты были проведены с использованием суперкомпьютера «Ломоносов» НИВЦ МГУ. Наиболее скромная из систем потребовала для расчета около 80 тыс. процессорочасов (1200 процессоров на 3 суток), наиболее крупная — около 250 тыс. (1200 процессоров на 12 суток).

Результаты

Как было отмечено, фикобилисома состоит из собираемых в определенном порядке белковых агрегатов, связанных со спектрально и химически различающимися кофакторами [Watanabe, Ikeuchi, 2013]. Вопрос о том, с каким именно белком связывается ОСР, обсуждаются в литературе, но общепризнано, что связывание происходит с коровой частью фикобилисомы [Kirilovsky, Kerfeld, 2013]. Поскольку не существует точных данных о строении целой фикобилисомы или ее коровой части, а все белки коровой части гомологичны друг другу, в качестве модели целой фикобилисомы был выбран гексамерный аллофикоцианин (APC) из цианобактерии рода *Arthrospira platensis* (PDB ID: 1ALL) [Brejc et al., 1995]. Соответственно, координаты атомов номерного ОСР [Kerfeld et al., 2003; Zhang et al., 2014] были взяты из представителя того же рода (PDB ID: 1M98).

Докинг двух кристаллических структур дал достаточно широкий набор возможных вариантов связывания ОСР с APC, из которых по своим характеристикам лишь один, на наш взгляд, заслуживает особого внимания (рис. 2). Прежде всего отметим, что в нативной фикобилисоме дисковидные тримеры аллофикоцианина соединяются по четыре своими плоскими поверхностями в цилиндры; три цилиндра контактируют боковыми поверхностями, образуя трехгранную призму [Watanabe, Ikeuchi, 2013]. Следовательно, если предположить, что взаимодействие ОСР с APC происходит без нарушения пространственной структуры ОСР, APC и коровой части фикобилисомы в целом, как это имело место в предложенных ранее моделях [Leverenz et al., 2014; Zhang et al., 2014], то ОСР должен связываться с боковой поверхностью фикобилисомы. В отличие от большинства обнаруженных в процессе докинга вариантов в рассматриваемом случае ОСР взаимодействует именно с боковой поверхностью фикобилисомы, а не с центральной частью тримеров аллофикоцианина. Кроме того, в полученной модели наблюдается очевидное комплементарное соответствие молекулярных поверхностей белков: выступ на поверхности аллофикоцианина (на рис. 2 отмечен черным цветом) соответствует впадине на поверхности ОСР. Следует отметить, что полученная конфигурация не противоречит экспериментам по ковалентному связыванию ОСР и APC [Zhang et al., 2014], в ходе которых установлено, что ОСР контактирует с гомологом α -субъединицы APC (PBL_{CM}) и β -субъединицей, а не β^{18} -субъединицей, прочно связанной с PBL_{CM}. Следовательно, молекула ОСР взаимодействует одновременно с двумя α/β -димерами APC, а не с одним димером, как и показано на рисунке 2.

Существенным параметром полученной модели комплекса является расстояние между кофакторами белков, так как это расстояние является критической величиной, для скорости миграции энергии с фикобилина на каротиноид, а следовательно, и для эффективности тушения флуоресценции фикобилисом [Stadnichuk et al., 2013]. В представленном на рисунке 2 варианте это расстояние составляет 23 Å, что позволяет реализовать наблюдаемую в эксперименте скорость миграции энергии. В то же время в структуре, предложенной в работе [Zhang et al., 2014], это расстояние составило 28 Å, что существенно уменьшает эффективность миграции энергии и тушения флуоресценции. Следует отметить, что, по нашим оценкам, в структуре, полученной в работе [Leverenz et al., 2014], это расстояние еще больше, хоть сами авторы его и не приводят. В ходе расчетов МД комплекс ОСР–APC сохраняет стабильность в течение 100 нс, белки не диссоциируют, а расстояние между кофакторами практически не изменяется и в среднем составляет 24 Å. Это также свидетельствует в пользу предложенной нами модели. Отметим, что в ходе расчета наблюдаются небольшие, порядка 1 Å взаимные перемещения макромолекул друг

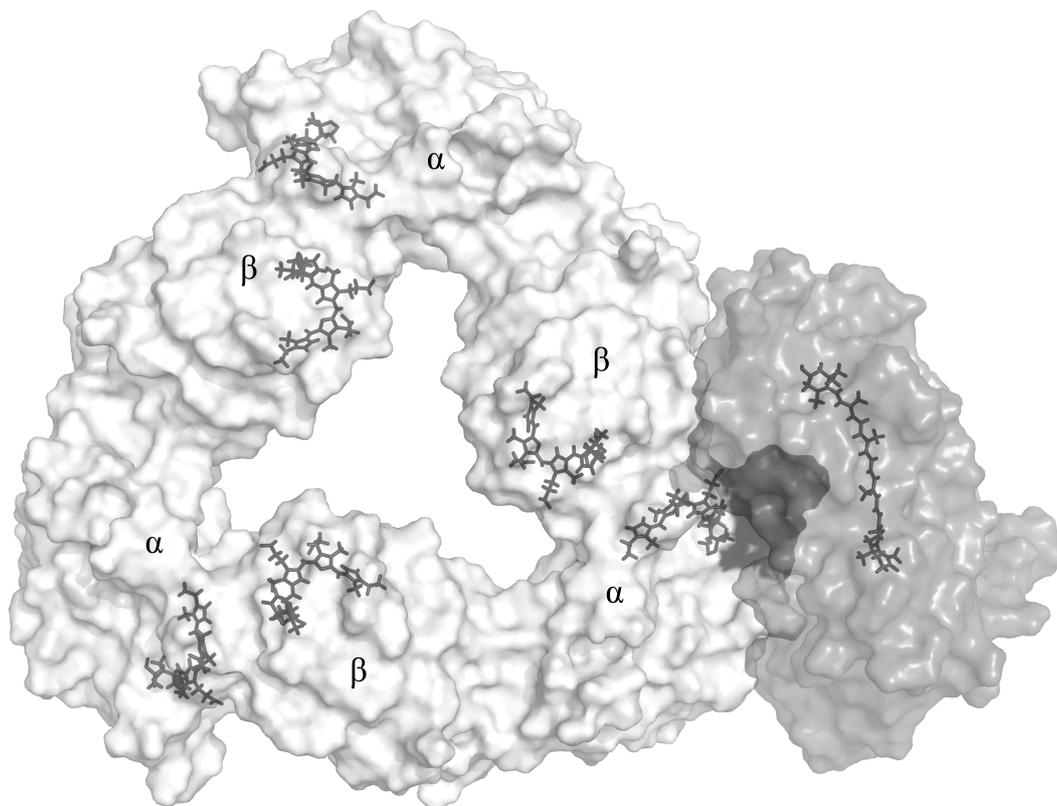


Рис. 2. Структура комплекса ОСР–АРС, полученная в результате докинга [Macindoe et al., 2010]. Показаны поверхности белков (ОСР — более темный) и молекулы кофакторов (темные линии). Буквами отмечено расположение α - и β -субъединиц АРС. Черным цветом отмечен выступ на поверхности аллофикоцианина, соответствующий углублению на поверхности ОСР

относительно друга. Это означает, что в процессе МД артефакты в расчетах свободной энергии, связанные со спецификой конформации начального состояния, созданного не очень «физичной» процедурой докинга, в значительной степени нивелированы.

Для того чтобы подтвердить или опровергнуть возможность формирования описываемого комплекса, был проведен расчет свободной энергии его образования. Отметим, что точно вычислить эту величину, опираясь на данные молекулярного моделирования, достаточно сложно, что связано с малым временем наблюдения и небольшим в сравнении с экспериментом ансамблем наблюдаемых частиц. В самом деле, длина полученных траекторий составляет 10^{-7} с, а характерное время перехода, например, $\text{OCP}^o \rightarrow \text{OCP}^r$ [Rakhimberdieva et al., 2004] составляет около 10 с. Кроме того, в модели рассматривается одиночная макромолекула или комплекс, в то время как в эксперименте их множество. Тем не менее, имея в наличии гипотетическую трехмерную структуру комплекса, можно оценить свободную энергию его образования.

В качестве метода оценки был выбран ММ–PBSA. Подход хорош тем, что позволяет по отдельности оценить различные вклады в свободную энергию образования комплекса. В частности, при связывании двух белков пропадает поверхность контакта белка с водой в тех областях, где белки контактируют друг с другом. Как известно [Makhatadze, Privalov, 1993; Privalov, Makhatadze, 1993], в среднем свободная энергия единицы поверхности контакта белка с водой отрицательна, то есть уменьшение этой поверхности невыгодно системе в целом. В то же вре-

мя при комплементарном связывании энтальпия единицы поверхности образования нового, уже белок-белкового, контакта также имеет отрицательный знак, что компенсирует потерю контакта с водой. Если взаимодействие белков друг с другом термодинамически выгодно, то удельная свободная энергия образования единицы поверхности белок-белкового контакта должна оказаться минимум в два раза больше, чем единицы поверхности водно-белкового контакта. В самом деле, при образовании комплекса на каждую единицу площади формируемого белок-белкового интерфейса исчезает вдвое бóльшая площадь водно-белкового контакта. Это означает, в частности, что связывающиеся белковые поверхности должны точно соответствовать друг другу, в противном случае реальная площадь контакта окажется существенно меньше площади контакта с водой. Следовательно, удельная энергия белок-белкового контакта должна быть не в два, а, например, в четыре и более раз выше энергии водно-белкового контакта.

Вакуумные расчеты позволили рассчитать свободную энергию взаимодействия собственно неионизированных белков без учета эффектов растворителя и ионов. При этом в качестве оценки свободной энергии мы рассматривали энтальпию их взаимодействия, так как изменения конформационной энтропии незначительны [Karplus, Kushick, 1981]. Отдельные вклады в энтальпию макромолекул собраны в таблице 2. Обратим внимание на тот факт, что точность определения как отдельных вкладов в энтальпию, так и полной энтальпии белков очень высока и составляет 0.1%. Это свидетельствует об устойчивости конформаций как отдельных белков, так и комплекса в целом, что говорит об устойчивости предложенной структуры. Вторым существенным моментом является разнонаправленность изменения энтальпии, связанной с валентными и невалентными взаимодействиями. Рост энергии валентных связей и углов свидетельствует о некоторой напряженности структуры белков в комплексе. Изменение энергии двугранных углов составляет несколько кТ и почти не выходит за пределы погрешности расчета (таблица 2), что свидетельствует о стабильности конформаций белков. Энергия дисперсионных и электростатических взаимодействий отрицательна, следовательно, образование вновь созданного белок-белкового интерфейса термодинамически выгодно. При этом по абсолютной величине основной вклад в энтальпию дает дисперсионное взаимодействие. Отметим, что парный потенциал взаимодействия (потенциал 6–12 или потенциал Леннарда–Джонса), описывающий дисперсионные силы, устроен таким образом, что при незначительном, но все же слишком сильном сближении пары атомов он приведет к очень сильному расталкиванию атомов (положительной энергии), а при удалении атомов более чем на 3–4 Å даст нулевой вклад в суммарную энергию. Таким образом, значительный отрицательный вклад дисперсионной энергии в энтальпию образования комплекса свидетельствует о высокой степени комплементарности контактирующих белковых поверхностей. Отметим, что незначительное изменение конформации связанных белков, энергия невалентных взаимодействий которых составляет сотни кТ, свидетельствует об изначально высокой комплементарности поверхностей контакта ОСР и АРС.

Следующий этап термодинамического цикла — сольватация поверхности водой, неразрывно связанная с ионизацией поверхностных групп. В силу методических причин рассматривали процесс сольватации уже ионизированных макромолекул. Для оценки свободной энергии сольватации использовали полуэмпирический подход, в рамках которого полная энергия сольватации рассматривается как сумма известных из экспериментов энергий сольватации отдельных участков поверхности макромолекулы [Makhatadze, Privalov, 1993; Privalov, Makhatadze, 1993]. Результаты расчетов приведены в таблице 3. Отметим, что, как и в случае с энтальпией, точность определения поверхностной свободной энергии макромолекулы составляет ~0.1%, что также свидетельствует о стабильности поверхности одиночных белков и комплекса. При этом итоговое изменение, в отличие от энтальпии связывания белков в вакууме, имеет положительный знак, что продиктовано сокращением поверхности контакта с водой. Подавляющее большинство из приведенных вкладов положительно, за исключением вклада атомов серы из остатков цистеи-

Таблица 2. Энтальпия образования комплекса ОСР–АРС в вакууме (кДж/моль). В качестве оценки энтальпии взята средняя полная потенциальная энергия из молекулярно-динамических расчетов. В качестве погрешности дана стандартная ошибка

	ОСР	АРС	ОСР–АРС	Разность
Вал. связи	$7.2 \cdot 10^3 \pm 2.5 \cdot 10^0$	$2.2 \cdot 10^4 \pm 4.7 \cdot 10^0$	$2.9 \cdot 10^4 \pm 5.1 \cdot 10^0$	$1.4 \cdot 10^1 \pm 6.6 \cdot 10^0$
Вал. углы	$1.0 \cdot 10^4 \pm 2.9 \cdot 10^0$	$3.0 \cdot 10^4 \pm 4.9 \cdot 10^0$	$4.0 \cdot 10^4 \pm 5.6 \cdot 10^0$	$8.7 \cdot 10^1 \pm 1.2 \cdot 10^1$
Торс. углы	$5.4 \cdot 10^3 \pm 2.0 \cdot 10^0$	$1.8 \cdot 10^4 \pm 3.6 \cdot 10^0$	$2.3 \cdot 10^4 \pm 3.9 \cdot 10^0$	$-3.9 \cdot 10^1 \pm 2.4 \cdot 10^1$
Дисп. силы	$-3.5 \cdot 10^3 \pm 7.9 \cdot 10^0$	$-1.0 \cdot 10^4 \pm 1.2 \cdot 10^0$	$-1.4 \cdot 10^4 \pm 1.1 \cdot 10^1$	$-4.6 \cdot 10^2 \pm 1.6 \cdot 10^1$
Электрост.	$-4.5 \cdot 10^4 \pm 3.4 \cdot 10^0$	$-1.4 \cdot 10^5 \pm 1.0 \cdot 10^0$	$-1.8 \cdot 10^5 \pm 9.3 \cdot 10^0$	$-8.7 \cdot 10^0 \pm 1.4 \cdot 10^0$
Сумма	$-2.6 \cdot 10^4 \pm 5.2 \cdot 10^0$	$-8.0 \cdot 10^4 \pm 1.2 \cdot 10^1$	$-1.0 \cdot 10^5 \pm 1.2 \cdot 10^1$	$-4.0 \cdot 10^2 \pm 6.9 \cdot 10^1$

на и метионина, которым можно пренебречь, а также вклада «ароматического азота». Поясним, что в последнюю группу входят все атомы азота, имеющие двойные связи с атомами углерода, в частности атомы азота в аргинине, который в случае комплекса ОСР–АРС сильнее экспонирован в воду, чем в случае отдельных ОСР и АРС. Тем самым отрицательный вклад в суммарную энергию связан с ростом площади соответствующей поверхности. Абсолютная величина суммарного изменения свободной энергии поверхности составляет ~ 470 кДж/моль, что по порядку величины совпадает с суммарным изменением энтальпии ~ 400 кДж/моль. Тем не менее положительное изменение поверхностной энергии существенно превышает отрицательный вклад энтальпии.

Таблица 3. Свободная энергия сольватации в процессе образования комплекса ОСР–АРС (кДж/моль); на основании полуэмпирического подхода, основанного на экспериментальном измерении энергий сольватации небольших фрагментов белковой поверхности [Kollman et al., 2000; Makhatadze, Privalov, 1993; Privalov, Makhatadze, 1993]. В качестве погрешности дана стандартная ошибка

	ОСР	АРС	ОСР–АРС	Разность
Аром. азот	$-2.8 \cdot 10^1 \pm 1.4 \cdot 10^{-1}$	$-9.2 \cdot 10^0 \pm 8.3 \cdot 10^{-2}$	$-5.2 \cdot 10^1 \pm 1.6 \cdot 10^{-1}$	$-1.5 \cdot 10^1 \pm 1.0 \cdot 10^0$
Аром. углерод	$-4.9 \cdot 10^1 \pm 1.4 \cdot 10^{-1}$	$-1.7 \cdot 10^2 \pm 2.8 \cdot 10^{-1}$	$-1.9 \cdot 10^2 \pm 2.9 \cdot 10^{-1}$	$2.2 \cdot 10^1 \pm 1.2 \cdot 10^0$
Алиф. азот	$-4.2 \cdot 10^3 \pm 3.1 \cdot 10^0$	$-9.4 \cdot 10^3 \pm 5.7 \cdot 10^0$	$-1.4 \cdot 10^4 \pm 6.8 \cdot 10^0$	$8.7 \cdot 10^1 \pm 5.1 \cdot 10^1$
Алиф. углерод	$-8.6 \cdot 10^2 \pm 7.3 \cdot 10^{-1}$	$-2.4 \cdot 10^3 \pm 1.1 \cdot 10^0$	$-3.1 \cdot 10^3 \pm 1.3 \cdot 10^0$	$9.3 \cdot 10^1 \pm 7.0 \cdot 10^0$
Карб. углерод	$-3.2 \cdot 10^3 \pm 1.1 \cdot 10^0$	$-7.6 \cdot 10^3 \pm 1.7 \cdot 10^0$	$-1.1 \cdot 10^4 \pm 1.9 \cdot 10^0$	$2.6 \cdot 10^2 \pm 1.4 \cdot 10^1$
Гидроксил	$-5.7 \cdot 10^2 \pm 6.0 \cdot 10^{-1}$	$-1.9 \cdot 10^3 \pm 1.1 \cdot 10^0$	$-2.4 \cdot 10^3 \pm 1.3 \cdot 10^0$	$2.7 \cdot 10^1 \pm 1.4 \cdot 10^1$
Сера	$-2.9 \cdot 10^1 \pm 8.3 \cdot 10^{-2}$	$-3.6 \cdot 10^1 \pm 1.2 \cdot 10^{-2}$	$-6.7 \cdot 10^1 \pm 1.7 \cdot 10^{-1}$	$-2.9 \cdot 10^0 \pm 1.1 \cdot 10^0$
Сумма	$-8.9 \cdot 10^3 \pm 3.9 \cdot 10^0$	$-2.1 \cdot 10^4 \pm 7.1 \cdot 10^0$	$-3.0 \cdot 10^4 \pm 8.1 \cdot 10^0$	$4.7 \cdot 10^2 \pm 6.7 \cdot 10^1$

При виртуальном переносе макромолекулы из вакуума в водный раствор происходит ионизация и в энтальпию добавляется некоторая неучтенная ранее энергия. Для расчета недостающего электростатического вклада в энтальпию, а также для оценки энергии поляризации растворителя и формирования ДЭС использовали приближение непрерывного растворителя, решая уравнение Пуассона–Больцмана при помощи APBS [Baker et al., 2001]. Результаты чисто электростатических расчетов приведены в таблице 4. Хорошо видно, что энергия ионизации макромолекул и поляризации растворителя сама по себе есть существенно положительная величина: этот процесс увеличивает свободную энергию поверхности. Поскольку в комплексе рассматриваемых

белков площадь суммарной поверхности меньше, чем для свободных белков, разность оказывается отрицательной. Абсолютная величина электростатической энергии такова, что она практически полностью компенсирует расхождения в энтальпии и свободной энергии сольватации. Энергия формирования ДЭС также отрицательна, хоть и имеет меньшую величину.

Таблица 4. Электростатическая энергия ионизации макромолекул и энергия формирования двойного электрического слоя (ДЭС, кДж/моль) в реакции образования комплекса ОСП–АРС. Данные получены в приближении непрерывного растворителя при помощи уравнения Пуассона–Больцмана [Baker et al., 2001]. В качестве погрешности дана стандартная ошибка

	ОСП	АРС	ОСП–АРС	Разность
Ионизация	$2.1 \cdot 10^3 \pm 1.8 \cdot 10^1$	$5.9 \cdot 10^3 \pm 2.9 \cdot 10^1$	$7.9 \cdot 10^3 \pm 3.8 \cdot 10^1$	$-4.6 \cdot 10^1 \pm 4.7 \cdot 10^1$
ДЭС	$-2.6 \cdot 10^1 \pm 1.5 \cdot 10^{-1}$	$-3.2 \cdot 10^1 \pm 2.9 \cdot 10^{-1}$	$-6.8 \cdot 10^1 \pm 4.1 \cdot 10^1$	$-1.0 \cdot 10^1 \pm 6.4 \cdot 10^{-1}$
Сумма	$2.0 \cdot 10^3 \pm 1.8 \cdot 10^1$	$5.8 \cdot 10^3 \pm 2.9 \cdot 10^1$	$7.8 \cdot 10^3 \pm 3.2 \cdot 10^1$	$-5.6 \cdot 10^1 \pm 4.7 \cdot 10^1$

Суммируя полученные данные, отметим, что итоговая свободная энергия оказывается очень близкой к нулю (таблица 5). С другой стороны, ошибки, которые по сравнению с полной энтальпией или поверхностной энергией макромолекулы были малы, относительно разностей оказываются вполне существенными. Так, итоговая относительная точность определения энтальпии и свободной энергии поверхности находятся на уровне 10 %, а поляризационная энергия и вовсе может быть определена с точностью до порядка. Итоговое значение свободной энергии образования комплекса оказывается на порядок меньше точности его определения. Иными словами, нельзя с уверенностью утверждать, какого она знака, можно лишь указать порядок этой величины — десятки кДж/моль.

Таблица 5. Вклады в свободную энергию (кДж/моль) образования комплекса ОСП–АРС согласно методу ММ–PBSA [Kollman et al., 2000]. Показаны энтальпии взаимодействия белков в вакууме, свободная энергия сольватации и электростатический вклад от ионизации макромолекул, поляризации растворителя и образования двойного электрического слоя. В качестве погрешности дана стандартная ошибка

	ОСП	АРС	ОСП–АРС	Разность
Энтальпия	$-25\,800 \pm 5$	$-80\,300 \pm 10$	$-106\,500 \pm 12$	-404 ± 69
Поверхность	$-8\,900 \pm 4$	$-21\,500 \pm 7$	$-29\,900 \pm 8$	$+469 \pm 67$
Электрост.	$+2\,000 \pm 17$	$+5\,800 \pm 29$	$+97\,800 \pm 38$	-56 ± 47
Сумма	$-32\,600 \pm 27$	$-96\,000 \pm 46$	$-128\,600 \pm 58$	$+9.6 \pm 66$

Полученный результат хорошо согласуется с малой устойчивостью комплекса ОСП–АРС, мешающей его кристаллизовать. В самом деле, если бы молекулярный комплекс ОСП–АРС был достаточно прочным, то его можно было бы обнаружить тем или иным методом, но в эксперименте он не обнаружен [Stadnichuk et al., 2012]. Отметим также, что полученная свободная энергия образования комплекса минимум на порядок меньше абсолютной величины как собственно энергии взаимодействия белков, так и энергии сольватации поверхности белков. Это означает, что удельное понижение свободной энергии вследствие образования единицы поверхности контакта «белок–белок» примерно в два раза выше удельного ее понижения, связанного с уменьшением поверхности контакта «белок–раствор». Данные свидетельствуют о высокой комплементарности контактирующих белковых поверхностей и подтверждают высокую вероятность

реализации предложенной схемы строения молекулярного комплекса ОСР–АРС в реальных системах.

Полученный результат заставляет проанализировать аналогичные свойства предложенных ранее моделей взаимодействия комплексов. В работе [Zhang et al., 2014] ОСР встраивали между соседними дисковидными тимерами АРС в пределах одного цилиндра, то есть как раз таким образом, который мы посчитали маловероятным. Такое встраивание сопряжено с нарушением контакта между достаточно обширными поверхностями тримеров АРС. Этот процесс, очевидно, термодинамически невыгоден, так как в норме фикобилисома устойчива [Watanabe, Ikeuchi, 2013]. Следовательно, связывание ОСР с фикобилисомой должно давать адекватный по порядку величины отрицательный вклад в свободную энергию связывания, в противном случае комплекс просто не образовался бы. Высокая энергия связывания означает, что должна наблюдаться комплементарность поверхностей рассматриваемых белков в областях, указанных авторами работы. Тем не менее авторы обходят этот аспект стороной [Zhang et al., 2014]. Нам не удалось обнаружить требуемого морфологического соответствия при анализе трехмерных структур ОСР и АРС.

Вторая из предложенных ранее моделей молекулярного комплекса ОСР–АРС [Leverenz et al., 2014] менее детализирована. Ключевым моментом образования комплекса в рамках этой модели является частичное разрушение структуры ОСР, сводящееся к диссоциации его С-концевого домена и экспонированию в раствор половины молекулы 3'-гидроксиэхиненона. У этой модели есть ряд сильных экспериментальных подтверждений, в частности высокая реакционная способность RCP и сложности с получением кристаллов ОСР^r. Тем не менее, так же как и в предыдущем случае, можно утверждать, что энергия образования комплекса, полученного в результате погружения молекулы каротиноида внутрь АРС или фикобилисомы должна быть сопоставима с энергией диссоциации С-концевого домена, что опять-таки подводит нас к мысли о высокой энтальпии связывания теперь уже гидроксиэхиненона с АРС. Следовательно, на поверхности АРС должен быть какой-то гидрофобный карман или иная структура, способная связывать молекулу каротиноида. Никаких указаний на то, как происходит это связывание, авторы не дают, а нам соответствующий гидрофобный карман обнаружить также не удалось.

Предложенная нами модель лишена описанных недостатков, так как наличие молекулярной комплементарности доказано количественно и показано, что рассчитанная свободная энергия не противоречит экспериментальным данным.

Заключение

Работа посвящена построению молекулярной модели комплекса ОСР с фикобилисомой и анализу термодинамики его образования. Предложен вариант комплекса, в котором ОСР взаимодействует с боковой поверхностью коровой части фикобилисомы. Показано, что свободная энергия образования такого комплекса составляет не более нескольких десятков кДж/моль, при этом удельная энергия образования белок-белкового интерфейса оказалась в два раза выше удельной энергии образования водно-белкового интерфейса. С учетом гидрофильности рассматриваемых белков это свидетельствует о комплементарности поверхностей ОСР и АРС. Это, в свою очередь, является веским аргументом в пользу предложенной модели.

Список литературы

Baker N. A., Sept D., Joseph S. et al. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome // PNAS. — 2001. — No. 98. — P. 10037–10041.

- Bayly C. I., Cieplak P., Cornell W., Kollman P. A. A Well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model // *J. Phys. Chem.* — 1993. — No. 97. — P. 10269–10280.
- Brejc K., Ficner R., Huber R., Steinbacher S. Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of allophycocyanin from the cyanobacterium *spirulina platensis* at 2.3 Å resolution. // *J. Mol. Biol.* — 1995. — No. 249. — P. 424–440.
- Essmann U., Perera L., Berkowitz M. L. et al. A smooth particle mesh ewald method // *J. Chem. Phys.* — 1995. — No. 103. — P. 8577–8593.
- Gao X., Wei T. D., Zhang N. et al. Molecular insights into the terminal energy acceptor in cyanobacterial phycobilisome // *Mol. Microb.* — 2004. — No. 85. — P. 907–915.
- Granovsky A. A. Firefly version 8.0.0.
<http://classic.chem.msu.su/gran/firefly/index.html>.
- Jorgensen W. L., Chandrasekhar J., Madura J. D. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water // *J. Chem. Phys.* — 1983. — No. 79. — P. 926–935.
- Jorgensen W. L., Maxwell D. C., Tirado-Rives J. Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids // *J. Amer. Chem. Soc.* — 1996. — No. 118. — P. 11225–11236.
- Karplus M., Kushick J. N. Method for estimating the configurational entropy of macromolecules // *Macromol.* — 1981. — No. 14. — P. 325–332.
- Kerfeld C. A., Sawaya M. R., Vishnu B. et al. The crystal structure of a cyanobacterial water-soluble carotenoid binding protein // *Structure.* — 2003. — No. 11. — P. 55–65.
- Kirilovsky D., Kerfeld C. A. The orange carotenoid protein: a blue-green light photoactive protein // *Photochem. Photobiol. Sci.* — 2013. — No. 12. — P. 1135–1143.
- Kollman P. A., Massova I., Reyes C. et al. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models // *Acc. Chem. Res.* — 2000. — No. 33. — P. 889–897.
- Leverenz R. L., Jallet D., Li M. et al. Structural and functional modularity of the orange carotenoid protein: distinct roles for the N- and C-terminal domains in cyanobacterial photoprotection // *Plant Cell.* — 2014. — No. 26. — P. 426–437.
- Macindoe G., Mavridis L., Venkatraman V. et al. HexServer: an FFT-based protein docking server powered by graphics processors // *Nucl. Acid. Res.* — 2010. — No. 38. — P. 445–449.
- Makhatadze G. I., Privalov P. L. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. I. The enthalpy of hydration // *J. Mol. Biol.* — 1993. — No. 232. — P. 639–659.
- Privalov P. L., Makhatadze G. I. Contribution of hydration to protein folding thermodynamics. II. The entropy and gibbs energy of hydration // *J. Mol. Biol.* — 1993. — No. 232. — P. 660–679.
- Pronk S., Pall S., Schulz R. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit // *Bioinf.* — 2013. — No. 29. — P. 845–854.
- Rakhimberdieva M. G., Stadnichuk I. N., Elanskaya I. V., Karapetyan N. V. Carotenoid-induced quenching of the phycobilisome fluorescence in photosystem ii-deficient mutant of *synechocystis* sp // *FEBS Lett.* — 2004. — No. 574. — P. 85–88.
- Schmidt M. W., Baldrige K. K., Boatz J. A. et al. General Atomic and molecular electronic structure system // *J. Comp. Chem.* — 1993. — No. 14. — P. 1347–1363.
- Sitkoff D., Sharp K. A., Honig B. Accurate calculation of hydration free energies using macroscopic solvent models // *J. Phys. Chem.* — 1994. — No. 98. — P. 1978–1988.
- Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., Bernat G. et al. Fluorescence quenching of the phycobilisome terminal emitter LCM from the cyanobacterium *synechocystis* sp. PCC 6803 detected *in vivo* and *in vitro* // *J. Photochem. Photobiol. B.* — 2013. — No. 125. — P. 137–145.

- Stadnichuk I. N., Yanyushin M. F., Maksimov E. G. et al.* Site of non-photochemical quenching of the phycobilisome by orange carotenoid protein in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // *BBA*. — 2012. — No. 1817. — P. 1436–1445.
- Szabo I., Bergantino E., Giacometti G. M.* Light and oxygenic photosynthesis: energy dissipation as a protection mechanism against photo-oxidation // *EMBO Rep.* — 2005. — No. 6. — P. 629–634.
- Watanabe M., Ikeuchi M.* Phycobilisome: architecture of a light-harvesting supercomplex // *Photosynth. Res.* — 2013. — No. 116. — P. 265–276.
- Wilson A., Ajlani G., Verbavatz J. M. et al.* A Soluble carotenoid protein involved in phycobilisome-related energy dissipation in cyanobacteria // *Plant. Cell.* — 2006. — No. 18. — P. 992–1007.
- Zhang H., Liu H., Niedzwiedzki D. M. et al.* Molecular mechanism of photoactivation and structural location of the cyanobacterial orange carotenoid protein // *Biochemistry.* — 2014. — No. 53. — P. 13–19.