

На правах рукописи



Машковцева Елена Валерьевна

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОМБИНИРОВАННЫХ ПОДХОДОВ
МАТЕМАТИЧЕСКОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ ДЛЯ ОПИСАНИЯ
КАТАЛИТИЧЕСКОГО ЦИКЛА F_0F_1 -АТФСИНТАЗЫ**

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2010

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте цитохимии и молекулярной фармакологии

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук, доцент
Нарциссов Ярослав Рюрикович

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор
Романовский Юрий Михайлович

доктор физико-математических наук
Якушевич Людмила Владимировна

Ведущая организация:

Институт математических проблем биологии РАН

Защита состоится 21 октября 2010 года в 14 часов на заседании диссертационного совета Д501.001.96 при Московском Государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, «Новая» аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «__» _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Одним из ключевых разделов метаболизма живых клеток является преобразование энергии в ходе окислительно-восстановительных реакций и мембранного транспорта. Важнейшую роль в эффективности функционирования энергопроизводящей системы клеток играет АТФсинтаза. Полученная энергия в форме АТФ необходима для протекания всех процессов в живых организмах, от деления до апоптоза. Однако, несмотря на значительные успехи структурной биологии в последние годы, точный механизм функционирования основного энергосинтезирующего фермента клетки до сих пор не детализирован. F_0F_1 -АТФсинтаза относится к АТФазам F-типа [Boyer, P.D., 2002] и является уникальным молекулярным мотором, использующим для синтеза АТФ энергию электрохимического градиента, создаваемого за счет переноса электронов при дыхании или фотосинтезе. Этот фермент присутствует в большинстве живых организмов – на внутренней стороне плазматической мембраны бактерий, наружной стороне тилакоидной мембраны хлоропластов, во внутренней мембране митохондрий [Foster et al, 2006; Тихонов, А.Н., 1997]. Обилие разрозненных структурных и функциональных данных не позволило сформулировать единой теории накопления и преобразования энергии, а также объяснить крайне высокую эффективность молекулярного мотора F_0F_1 -АТФсинтазы.

В последние годы растет число пациентов с генетическими дефектами митохондриальной АТФсинтазы. В настоящее время большинство митохондриальных болезней являются смертельными, что отчасти обусловлено недостаточным пониманием механизма формирования синдромов и неверным выбором терапии заболевания. Поэтому возможность воздействия на активность фермента могла бы помочь скорректировать различные патологические состояния. Одним из возможных подходов может стать моделирование патологически измененного фермента и его гипотетического механизма работы [Das, A.M., 2003].

Высокая степень интеграции фермента с мембраной не позволяет непосредственно исследовать многие параметры его функционирования.

Однако сложность его механизма также осложняет процесс моделирования синтеза/гидролиза АТФ. Накопление и преобразование механической энергии вращения в энергию макроэргической связи АТФ ограничивает применение простого кинетического подхода, при этом описание структурных особенностей фермента не объясняет обратимости катализа. Таким образом, все существующие методы моделируют только часть общего процесса (либо моделирование всего цикла крайне затруднительно по вычислительным ресурсам) и не позволяют представить достаточно подробно весь каталитический цикл АТФсинтазы в целом.

Цель исследования. Построить универсальную модель, описывающую каталитический цикл F_0F_1 -АТФсинтазы, и на ее основе разработать программное обеспечение, имитирующее активность данного белка при различных условиях.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи:**

1. Получить количественную оценку времени перемещения протонов через мембрану в полуканалах F_0F_1 -АТФсинтазы.
2. На основе уравнений динамики рассчитать основные характеристики поворота (период вращения и моменты сил) для подвижных белковых частей F_0F_1 -АТФсинтазы.
3. Используя вероятностные алгоритмы, получить количественные оценки процессов гидролиза и синтеза АТФ на каталитических сайтах отдельного фермента.
4. На основе полученных результатов моделирования составить алгоритм описания последовательности элементарных событий в ходе полного каталитического цикла F_0F_1 -АТФсинтазы.
5. Формализовать предложенный алгоритм в виде независимого программного обеспечения.
6. Провести сравнение результатов компьютерного моделирования с экспериментально полученными характеристиками синтеза и гидролиза АТФ в различных тканях, происходящего с участием F_0F_1 -АТФсинтазы.

Научная новизна. Впервые разработана физическая модель, позволяющая на основе известных данных о структуре интегрального мембранного белка и предполагаемых принципах его работы описывать его полный каталитический цикл и получать временные зависимости изменения концентрации субстратов и продуктов. На основе предложенной модели впервые был разработан алгоритм, позволяющий симулировать как гидролиз АТФ, так и его синтез АТФсинтазой, а также получать количественные характеристики этих процессов в тканях. Принципы построения модели и структура алгоритма позволяют адаптировать используемые параметры для различных биологических систем, что значительно расширяет возможности применимости предложенного в работе подхода.

С использованием результатов моделирования разработано оригинальное программное обеспечение (программный пакет PASH ver. 1.0), позволяющее проводить компьютерную симуляцию полного повторяемого каталитического цикла АТФсинтазы в различных условиях. Преимуществом предложенного программного продукта является сочетание детализированного описания элементов структуры мембранного белка и низкие требования к вычислительным мощностям используемых компьютеров.

Практическая значимость работы. Разработанное программное обеспечение на основе предложенного алгоритма описания каталитического цикла F_0F_1 -АТФсинтазы позволяет в рамках исследовательской лаборатории на основе структурных данных и параметров экспериментальной системы получать информацию о количественных характеристиках синтеза и гидролиза АТФ в клетках и тканях. Условия проведения подобной компьютерной симуляции могут быть очень точно адаптированы к неоднородностям оцениваемой системы по измеримым параметрам (вязкость мембран, количество и положение зарядов в белке и т.д.). Подобная адаптация является крайне необходимой для оценки функционирования нативных тканей (органов), что открывает возможности в оценке энергообеспечения клеток организма без проведения дорогостоящих инвазивных процедур. Особенность предложенного алгоритма состоит еще и в том, что осуществление виртуального эксперимента в программном пакете PASH не требует

существенных вычислительных мощностей и, следовательно, позволяет значительно снизить временные и финансовые затраты на оценку аналогичных показателей *in vivo*. В результате применения данного подхода к описанию функционирования фермента могут быть выявлены важные закономерности, последующая экспериментальная проверка которых позволит уточнить известные данные о механизмах образования энергии, что имеет большое значение в исследовании патогенеза и современных методов терапии ряда заболеваний. Упомянутая универсальность и низкая ресурсозатратность разработанного программного обеспечения дает возможность интеграции с другими компьютерными продуктами для одновременного моделирования множества происходящих в живой клетке процессов.

Апробация работы. Материалы диссертации изложены и обсуждены на конференции, посвященной 40-летию медико-биологического факультета РГМУ (г. Москва, 2003 г.), на 13 Европейской биоэнергетической конференции (г. Пиза, Италия, 2004), на XI Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2004), на международной конференции «Митохондрии, от молекулярного подхода к физиологии и патологии» (г. Бари, Италия, 2005 г.), на 15 Европейской биоэнергетической конференции (г. Дублин, Ирландия, 2008), на 13 конференции Международной исследовательской группы по системной биологии (г. Эльсинор, Дания, 2008 г.), на 9 международной конференции по системной биологии (г. Гетеборг, Швеция, 2008 г.), на 14 конференции Международной исследовательской группы по системной биологии (г. Владимир, Россия, 2010 г.).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 10 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, и четырех глав, в которых представлены описания использованных методов, результаты исследований и их обсуждение, заключения, выводов и списка использованной литературы. Список литературы включает ___ источников, из них ___ на русском языке и ___ на иностранных языках. Диссертация изложена на ___ страницах машинописного текста, иллюстрирована ___ рисунками и ___ таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы.

В **первой главе** представлен обзор литературных данных. Подробно описаны особенности структуры и молекулярные механизмы каталитического цикла протонной АТФсинтазы F-типа. Кроме структурных данных, освещаются современные представления о каталитическом цикле фермента, проводится сравнение АТФаз, выделенных из различных организмов, анализируется влияние различных химических соединений на активность фермента, а также его функционирование в различных патологических состояниях. Приводится подробное описание и критический анализ существующих моделей F_0F_1 -АТФсинтазы.

Описание функционирования F_0F_1 -АТФсинтазы на основе структурных данных можно проводить с помощью модели ее каталитического цикла. Поскольку структура множества ферментов одного типа одинакова, возможно применение единого подхода, заключающегося в моделировании работы единичного фермента, которая затем аппроксимируется на все множество работающих белков в данном объеме.

Фермент состоит из внемембранного каталитического домена F_1 , связанного посредством центральной ножки с мембранным доменом F_0 (**Рисунок 1**). Глобулярный домен F_1 состоит из пяти различных главным образом гидрофильных субъединиц со стехиометрией $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\varepsilon_1$ [Fillingame et al., 1995; Senior, 1988]. α и β субъединицы расположены поочередно вокруг двойной спирали из двух антипараллельных α -спиралей γ -субъединицы. Каталитические участки на β -субъединицах расположены на поверхностях между α и β [Abrahams et al., 1994]. Хвост γ -субъединицы выступает из комплекса $3\alpha\beta$ и может связываться с полярными участками с-субъединиц фактора F_0 [Watts et al., 1995]. В митохондриях δ и ε субъединицы объединены с γ -субъединицей в центральную ножку [Orriss et al., 1996], как δ -субъединица бактерий и хлоропластов [Stock et al., 1999].

После отщепления фактора F_1 в мембране остается часть F_0F_1 -АТФсинтазы, ответственная за перенос протонов (фактор F_0) [Racker, 1976]. Фактор F_0 состоит из большей частью гидрофобных субъединиц a , b и c со стехиометрией $a_1b_2c_{9-15}$ [Boyer, 2002].

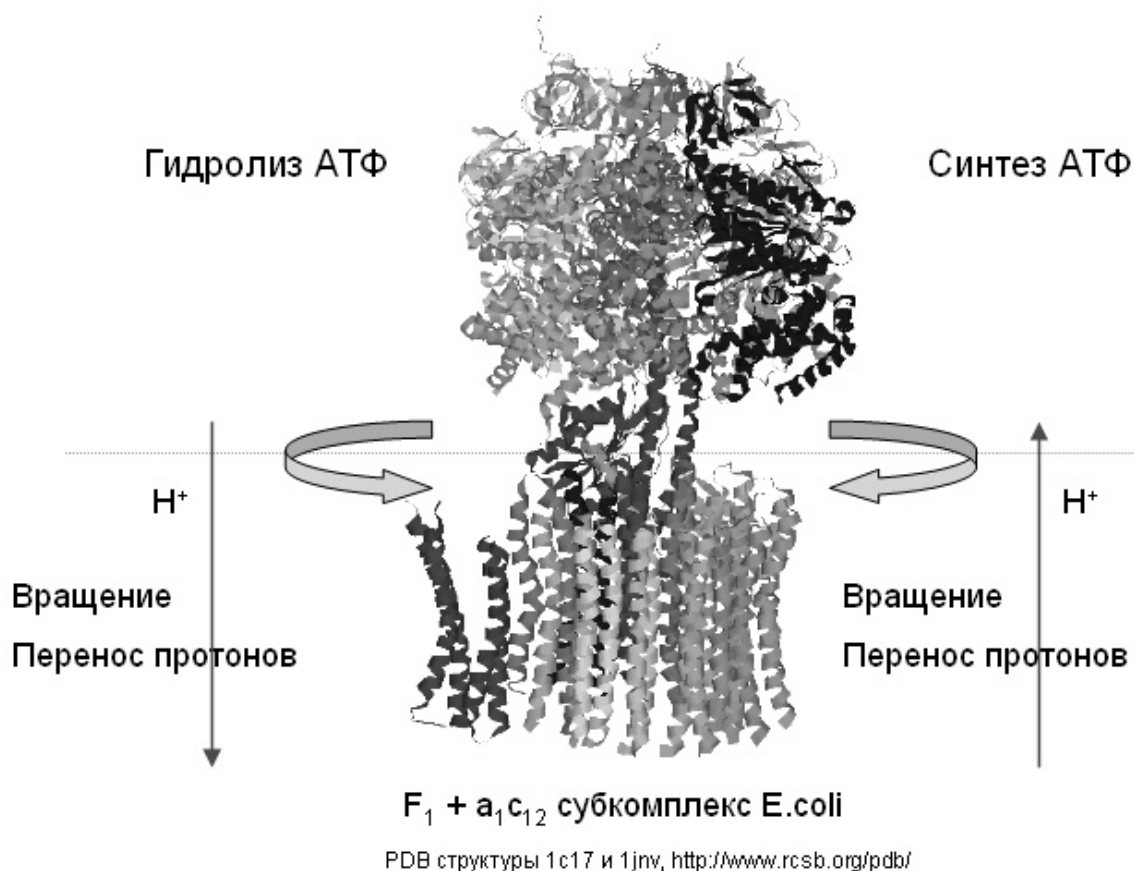


Рисунок 1. Строение F_0F_1 -АТФсинтазы *E.coli*.

Весь каталитический цикл F_0F_1 -АТФсинтазы можно условно разделить на несколько процессов, которые в ходе катализа протекают одновременно, но могут происходить и независимо друг от друга: непосредственно катализ синтеза/гидролиза молекул АТФ в факторе F_1 на каталитических субъединицах, вращение подвижных белковых частей фермента и перенос протонов через энергосопрягающую мембрану. Все эти процессы необходимы для корректного функционирования фермента, в то же время их временные характеристики различны и могут оцениваться отдельно.

Вторая глава посвящена количественной оценке времени переноса протонов через мембранные полуканалы F_0F_1 -АТФсинтазы.

Определение вероятного расположения протонных полуканалов в факторе F_0 F_0F_1 -АТФсинтазы по данным литературы. Были проведены анализ вероятной

структуры полуканалов и приблизительная оценка возможного количества молекул воды и протонов, расположенных внутри них. Для этого по данным литературы были выявлены все заряженные и существенные аминокислотные остатки, уточнено их расположение относительно друг друга и предполагаемых полостей. Локализовались отрицательно заряженные атомы карбоксильных групп, которые могли формировать возможные «центры» областей скопления протонов при их движении через пространство внутри белка. Эти остатки выделялись при визуализации pdb-структуры, после чего проводился анализ их взаимного расположения; по координатам, взятым из структурных данных, вычислялись расстояния между ними. Перед проведением расчетов были также указаны возможные локализации молекул воды.

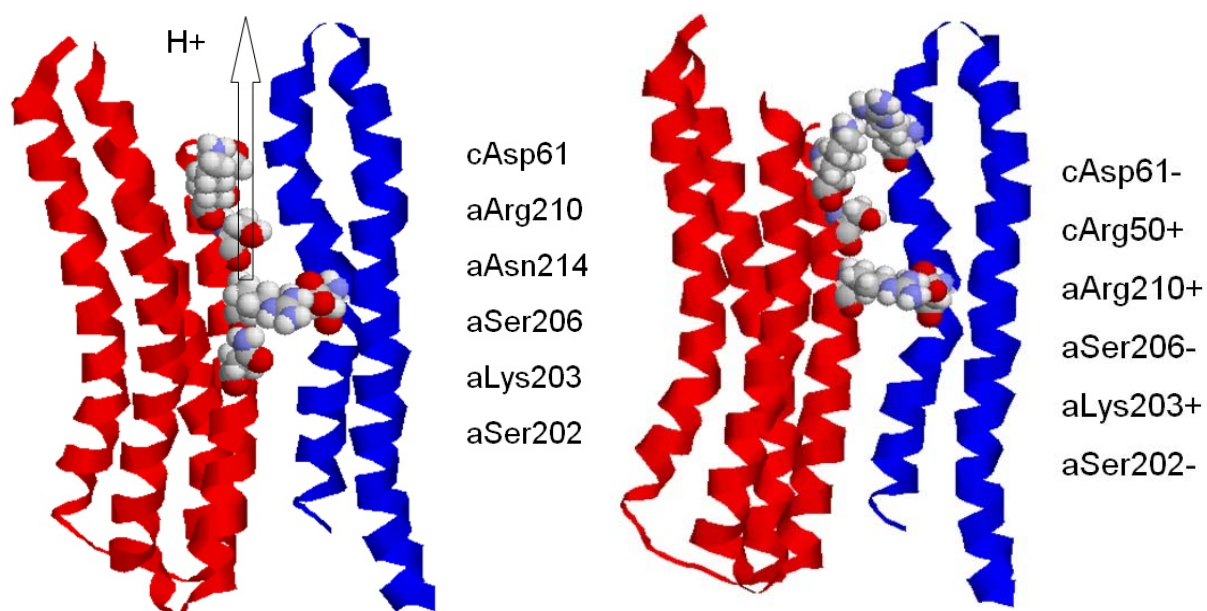


Рисунок 2. Структура выходного полуканала (слева изображены 4 ТМС а-субъединицы, справа – ближайшая с-субъединица). Стрелкой показано предполагаемое направление движения протонов. На спиралях показаны указанные справа аминокислоты, которые являются существенными и/или заряженными.

Возможности оценки среднего времени перемещения протонов в пространстве полуканалов с использованием квантово-механического подхода.

Существует несколько подходов в решении проблемы о перемещении протонов внутри некоторого ограниченного пространства. Особенность данной задачи состоит в том, что, по сути, движение протонов представляет собой не просто стохастическое перемещение частицы под действием взаимодействий с

растворителем, но последовательную её локализацию вблизи соответствующих атомов как растворителя (воды), так и аминокислотных остатков белка. В подобных условиях с учетом малых размеров рассматриваемой системы, а также вероятностного характера перемещения частицы можно было бы воспользоваться приближением квантовой механики. Примечательно, что при всей сложности предлагаемого подхода, в сущности для правильной оценки кинетических параметров работы отдельной белковой машины необходимо лишь среднее значение времени перемещения протонов от поверхности мембраны до фиксированных аминокислотных остатков. В дальнейшем этот параметр может быть использован для компьютерного розыгрыша реального времени по методу Монте-Карло. Упомянутый подход позволяет в достаточной степени точно описывать вероятности перемещения частицы в моделируемой системе. Однако с учетом того, что результаты такого моделирования должны быть инкорпорированы в более сложную виртуальную симуляцию каталитического цикла АТФсинтазы, а также должны быть пригодны для постоянного многократного использования в ходе программных циклов, предпочтение должно быть отдано подходу, в котором исследователь сможет избегать множества дополнительных вычислений.

Применение диффузионного подхода к описанию движения протонов по полуканалам F_0F_1 -АТФсинтазы на примере внешнего полуканала. Описание перемещения протонов и получение искомым характеристик движения, пригодных для последующего их включения в программы, происходит с помощью диффузионного приближения. При этом для оценки значения среднего времени диффузионно обусловленного перемещения частицы желательно рассматривать лишь «главные» точки возможного перемещения частицы. В частности, в качестве подобных точек можно выбрать некоторое положение вблизи входа в полуканал и область Asp61 на с-субъединице. В этом случае оценка среднего времени перемещения частицы на расстояние l в

трехмерном пространстве составит:

$$\tilde{t} = \frac{l^2}{6 \cdot D} \quad (1),$$

где \tilde{t} - среднее время перемещения, D – коэффициент диффузии. В Таблица 1 представлены результаты подобных расчетов для случая перемещения протонов по различным «путям» внутри полуканала. Легко видеть, что изменение предполагаемого времени при выборе различных путей не превысит 30% от среднего значения для рассматриваемых примеров.

| Предполагаемый путь перемещения протона | $D_1=1.4 \cdot 10^{-10} \text{ м/с}^2$ | $D_2=4.1 \cdot 10^{-10} \text{ м/с}^2$ |
|-----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------|
| ASP61 → SER206 → SER202 → outside | $6.45 \cdot 10^{-9} \text{ с}$ | $2.20 \cdot 10^{-9} \text{ с}$ |
| ASP61 → SER206 → outside | $8.79 \cdot 10^{-9} \text{ с}$ | $3.00 \cdot 10^{-9} \text{ с}$ |
| ASP61 → outside | $11.3 \cdot 10^{-9} \text{ с}$ | $3.86 \cdot 10^{-9} \text{ с}$ |

Таблица 1. Оценка среднего времени (сек) перемещения единичного протона с внешней стороны мембраны на отрицательно заряженные аминокислотные остатки в полуканале. Результаты расчетов в соответствии с выражением (1) представлены для случая двух экспериментально оцененных значений коэффициента диффузии [Albaldawi, N., 1992] и нескольких возможных путей перемещения протона.

Математическое описание протонирования/депротонирования существенных отрицательно заряженных аминокислотных остатков с-субъединиц F_oF_1 -АТФсинтазы в процессе ее каталитического цикла. В соответствии с подходом, предложенным D.A. Cherepanov с соавт., константы скорости протонирования/депротонирования карбоксильного остатка с-субъединицы (k_{on} и k_{off}) в случае равновесия концентрации протонов на поверхности мембраны и внутри протонного полуканала могут быть оценены по эмпирическим формулам: $k_{on} = 5 \cdot 10^{12-pH}$; $k_{off} = 5 \cdot 10^{12-pK}$ [Cherepanov, 1999]. С помощью рассчитываемых значений констант нами был предложен метод описания протонированных/депротонированных остатков Asp61. Вероятности нахождения остатка в одном из состояний будут оказывать влияние на совокупное время каталитического цикла.

Предложенный во второй главе подход позволяет количественно оценить время перемещения протонов через полуканалы АТФсинтазы и закладывает основу для моделирования ее полного каталитического цикла.

В третьей главе производится описание вращения подвижных субъединиц F_0F_1 -АТФсинтазы в процессе ее каталитического цикла с помощью уравнений классической механики.

Постановка задачи и описание модели вращения ротора F_0F_1 -АТФсинтазы. Одной из основных задач данной работы является создание эффективной физической модели, описывающей вращение белкового комплекса АТФсинтазы и позволяющей осуществлять моделирование данного процесса с использованием ограниченных вычислительных мощностей среднего ПК. Гипотеза о возможном механизме работы фермента предполагает вращение одних частей белкового комплекса относительно других. Существует предположение о том, что вращение может быть вызвано взаимодействием отрицательно заряженного Asp61 второй ТМС с-субъединиц (здесь и далее структурные данные приведены для фермента, выделенного из *E.coli*) с положительно заряженным остатком Arg210, принадлежащим а-субъединице, входящей в состав статора [Boyer, 2002]. С физической точки зрения вращение ротора можно описать как вращение однородного цилиндра радиусом R и массой m относительно его главной геометрической оси в однородном изотропном диэлектрике с диэлектрической проницаемостью ϵ , обусловленное взаимодействием точечного заряда q_2 на поверхности цилиндра с фиксированным точечным зарядом q_1 (расположенным на статоре). Заряды расположены в одной плоскости, параллельной основанию цилиндра, при этом $q_1 = 1.6 \cdot 10^{-19}$ Кл, а $q_2 = -1.6 \cdot 10^{-19}$ Кл.

Общий вид уравнения, описывающего поведение рассматриваемой системы, с учетом силы вязкого трения, силы упругого скручивания, стохастических движений и силы кулоновского взаимодействия следующий:

$$I \cdot \frac{d^2\theta(t)}{dt^2} = \left| F_{q_1-q_2}(t) \right| \cdot R \cdot \sin(\alpha \cdot \theta(t) + b) - 4 \cdot \pi \cdot \eta \cdot l \cdot R^2 \cdot \frac{d\theta(t)}{dt} - \frac{\pi \cdot R_\gamma^4 \cdot E}{4 \cdot L_\gamma \cdot (1 + \sigma)} \cdot \theta(t) + F_{stoch} \cdot R \cdot \cos(\theta_{stoch}) \quad (2)$$

Количественное описание динамики вращения ротора F_0F_1 -АТФсинтазы с учетом различных значений параметров модели. Перед тем, как проводить

вычисления на основе модели, необходимо провести анализ границ ее применимости. Так как в основе описания вращения цилиндра лежит один из принципов классической механики, границы применения модели не могут выходить за пределы ее применимости. Произведение неопределенностей канонически сопряженных физических величин на четыре порядка больше постоянной Планка. Это дает основание утверждать, что данная модель может быть адекватно описана с использованием представлений классической, а не квантовой механики.

Сначала был рассмотрен предельный случай, описывающий ситуацию, при которой вращение происходит с максимально возможной в рамках предложенной модели угловой скоростью. Такой ситуации соответствует вращение ротора заданной массы в вакууме без упругого натяжения в центральной оси за счет силы взаимодействия двух зарядов. Для данного случая было получено теоретическое решение, в результате которого минимальное время поворота ротора на элементарный угол оценено равным 0,6 нс.

Вязкость митохондриальной внутренней мембраны и модуль Юнга для γ -субъединицы *E.coli* точно не известны, поэтому в данной работе мы варьировали эти параметры в рамках известных значений для других условий и белков. Был проведен анализ поведения ротора при различных значениях указанных параметров. Полученная динамика вращения ротора представляет собой медленное поступательное движение к положению равновесия. При достаточно малых значениях модуля Юнга этим положением равновесия является положение около угла θ_r , около которого затем происходят незначительные колебания ротора за счет стохастической силы. При увеличении модуля Юнга положение равновесия смещается в сторону начального положения, и уже при значениях, на 1-2 порядка меньших известных значений для большинства белков, достигаемый угол значительно меньше необходимого для осуществления каталитического цикла угла θ_r .

Изучив зависимость равновесного угла от значения модуля Юнга, можно заключить, что для данного исследуемого белка (*E.coli*) максимальным значением, при котором может осуществляться каталитический цикл

АТФсинтазы при условии соблюдения описанной теории, является значение порядка $5 \cdot 10^6 \text{ Н/м}^2$. Однако очевидно, что данный результат может быть вызван несовершенством оценки структурных показателей, лежащих в основе модели, например, расстояния между зарядами, уменьшение которого неизбежно приводило бы к увеличению энергии взаимодействия и, таким образом, к увеличению максимально возможных значений показателей упругости. Кроме того, вполне вероятно, что фиксация концов ножки (γ -субъединицы) не столь жесткая, и позволяет некоторую свободу движения, что может компенсировать получаемую недостаточную упругость центральной ножки, приведенную выше.

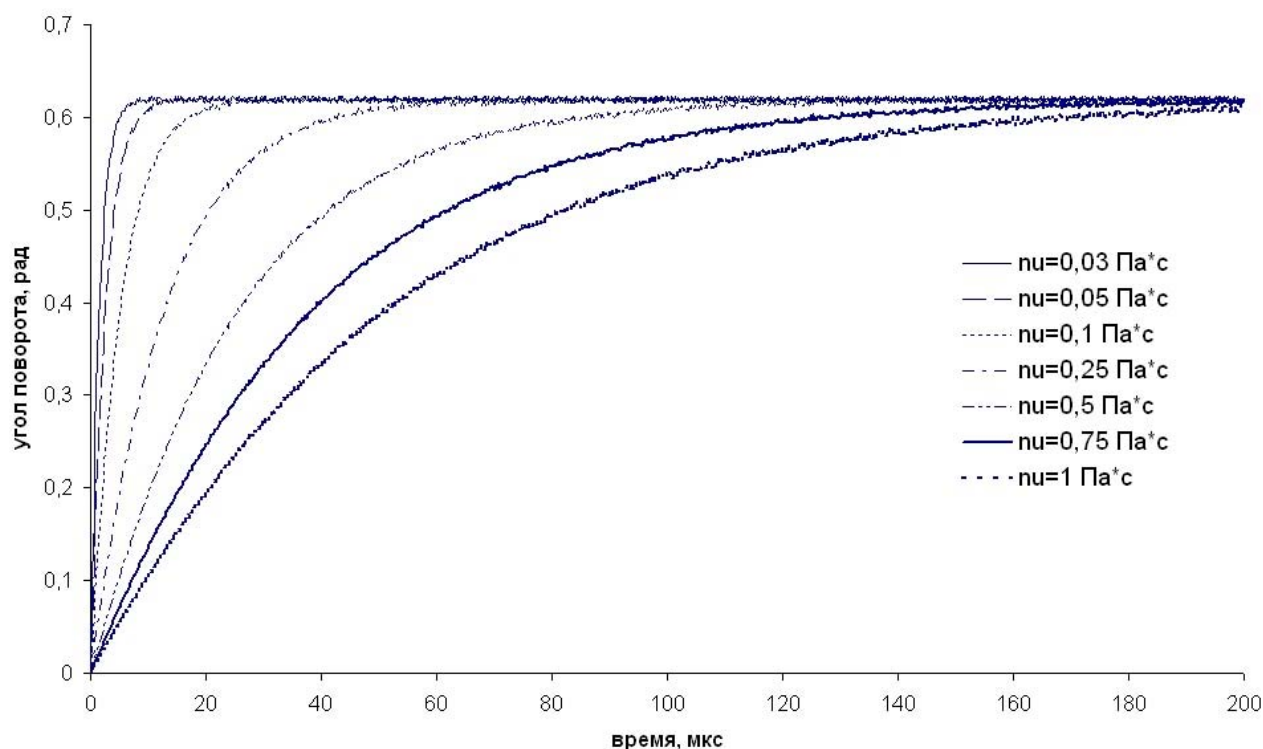


Рисунок 3. Зависимости угла поворота ротора от времени при различных значениях вязкости, модуль Юнга γ -субъединицы $E=3 \cdot 10^6 \text{ Н/м}^2$

При допустимой упругости предельный угол поворота ротора, необходимый для протекания каталитического процесса, достигается при любых значениях вязкости. Иными словами, вязкость окружающей ротор мембраны, в отличие от модуля Юнга, не оказывает влияния на амплитуду углового движения в моделируемой системе. В то же время с увеличением вязкости мембраны время

достижения Asp61 области полуканалов, обеспечивающих протонирование/депротонирование, существенно растет.

Во время поворота белкового ротора происходит изменение величины воздействующих на него моментов сил: параллельно с уменьшением моментов электростатической силы и силы вязкого трения происходит нарастание момента упругого натяжения. Это обусловлено изменением относительного положения зарядов, углового скручивания центральной ножки, а также возрастанием угловой скорости. По мере приближения движущегося отрицательного заряда с-субъединицы к положительно заряженному остатку происходит увеличение вклада стохастической силы, которое выражается в колебаниях значений момента силы вязкого трения.

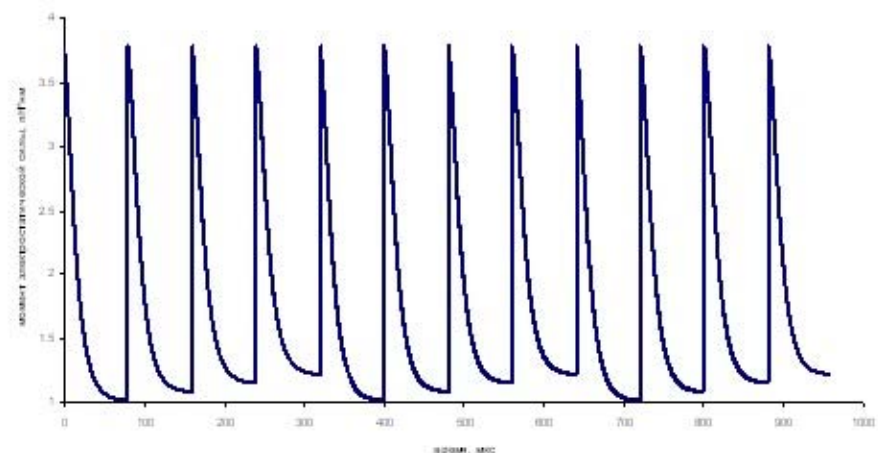
Результаты оценки времени поворота ротора на один шаг в зависимости от значения вязкости ($E=3 \cdot 10^6 \text{ Н/м}^2$) представлены в Таблица 2. Легко заметить, что для высоких значений вязкости, например 1 Па·с (вязкость глицерина), время поворота на один шаг увеличивается существенно и составляет 210 мкс, что даже несколько превосходит известные экспериментальные значения [Etzold, 1997].

Таким образом мы можем установить расчетное время полного оборота ротора, в условиях значений $E=3 \cdot 10^6 \text{ Н/м}^2$ и $\eta=0,26 \text{ Па}\cdot\text{с}$, оно составляет 1 мс, что близко к экспериментально полученным данным [Junge, W., 2001].

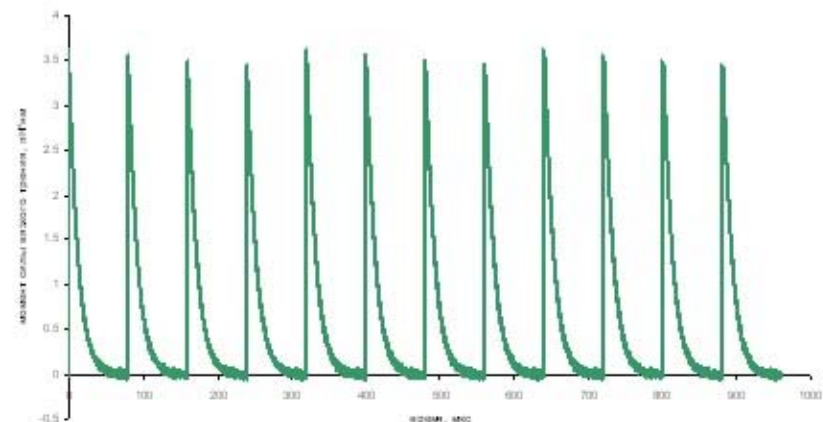
| | | | | | | | |
|---------------|------|------|-----|------|-----|------|-----|
| η , Па·с | 0.03 | 0.05 | 0.1 | 0.25 | 0.5 | 0.75 | 1 |
| Время, мкс | 6 | 9 | 20 | 60 | 120 | 170 | 210 |

Таблица 2 Время поворота ротора F_0F_1 -АТФсинтазы на элементарный шаг в зависимости от значения вязкости мембраны.

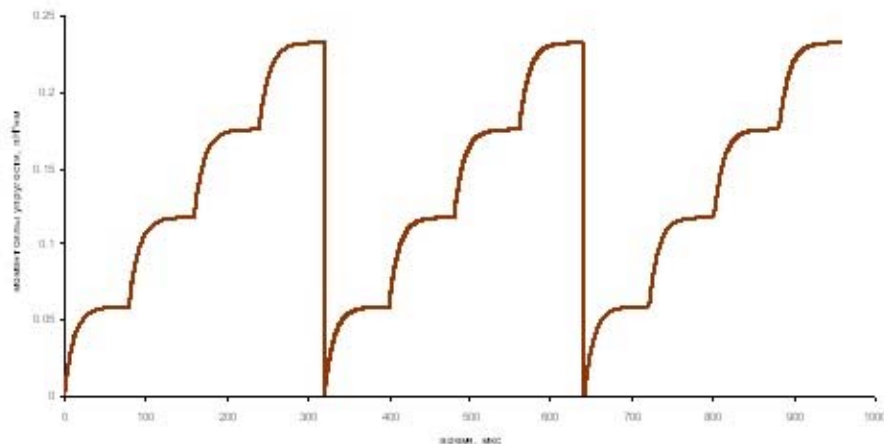
Применение для описания вращения подвижных белковых субъединиц F_0F_1 -АТФсинтазы уравнения динамики позволяет оценить такие важные характеристики, как время и паттерн вращения. Кроме того, приведенный выше подход позволяет получать характеристики вращения при изменении структуры и свойств фермента, а также параметров среды (в частности, вязкости мембраны).



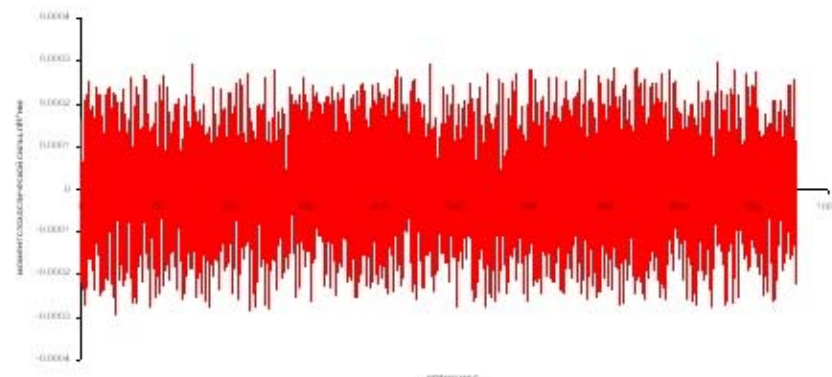
А)



Б)



В)



Г)

Рисунок 4. Динамика изменения моментов сил, возникающих в процессе каталитического цикла F_0F_1 -АТФсинтазы за время одного полного оборота фермента. А) Зависимость момента электростатической силы, возникающей между двумя взаимодействующими зарядами, от времени. Б) Зависимость момента силы вязкого трения, возникающей при вращении белковых субъединиц в мембране, от времени В) Зависимость момента силы упругого взаимодействия γ -субъединицы от времени. Г) Зависимость момента стохастической силы, действующей на ротор при вращении, от времени [Nartsissov, 2006].

Четвертая глава посвящена моделированию каталитического процесса F_0F_1 -АТФсинтазы, происходящего на β -субъединицах, с использованием методов Монте-Карло.

Количественные оценки вероятностей состояний β -субъединиц фактора F_1 в процессе каталитического цикла. Рассматривается процесс синтеза АТФ. Предполагается, что в каждый момент времени каждая из трех β -субъединиц находится в одном из трех конформационных состояний (Т, О, L). Весь каталитический цикл разбит на несколько элементарных стадий, т.е. таких событий, которые сами по себе не являются достаточными для функционирования фермента, но без завершения которых катализ невозможен: обратимые процессы связывания с каталитическим сайтом АТФ и АДФ и их отщепление, а также сама реакция образования АТФ из АДФ и неорганического фосфата и наоборот. При описании подобных событий есть два основных параметра, которые характеризуют его протекание: это вероятность самого события и время, за которое данное событие произойдет. Вероятность для β -субъединицы быть в одном из состояний определяется по формулам:

$$\beta \Rightarrow P_{\beta} = \frac{1}{1 + \frac{[ADP]}{K_d^{ADP}} + \frac{[ATP]}{K_d^{ATP}}}$$

$$\beta ATP \Rightarrow P_{\beta ATP} = \frac{1}{1 + \frac{K_d^{ATP}}{[ATP]} + \frac{K_d^{ATP}[ADP]}{K_d^{ADP}[ATP]}} \quad (3)$$

$$\beta ADP \Rightarrow P_{\beta ADP} = \frac{1}{1 + \frac{K_d^{ADP}}{[ADP]} + \frac{K_d^{ADP}[ATP]}{K_d^{ATP}[ADP]}}$$

Создание алгоритма для описания последовательности конформационных состояний каталитических β -субъединиц фактора F_1 . После того, как определены значения вероятностей основных событий, следует составить непосредственную схему последовательности того, что будет происходить в каталитических субъединицах параллельно с процессом вращения. Для этого были схематически изображены возможные события на каждой субъединице.

На каждом шаге определялось состояние β -субъединицы, наличие и тип связанного нуклеотида, вероятность протекания синтеза или гидролиза АТФ, а также отсоединения нуклеотида. Блок статора был сформирован из трех блоков субъединиц, проходящих взаимопревращения в процессе каталитического цикла с учетом влияния концентрации протонов по обе стороны мембраны.

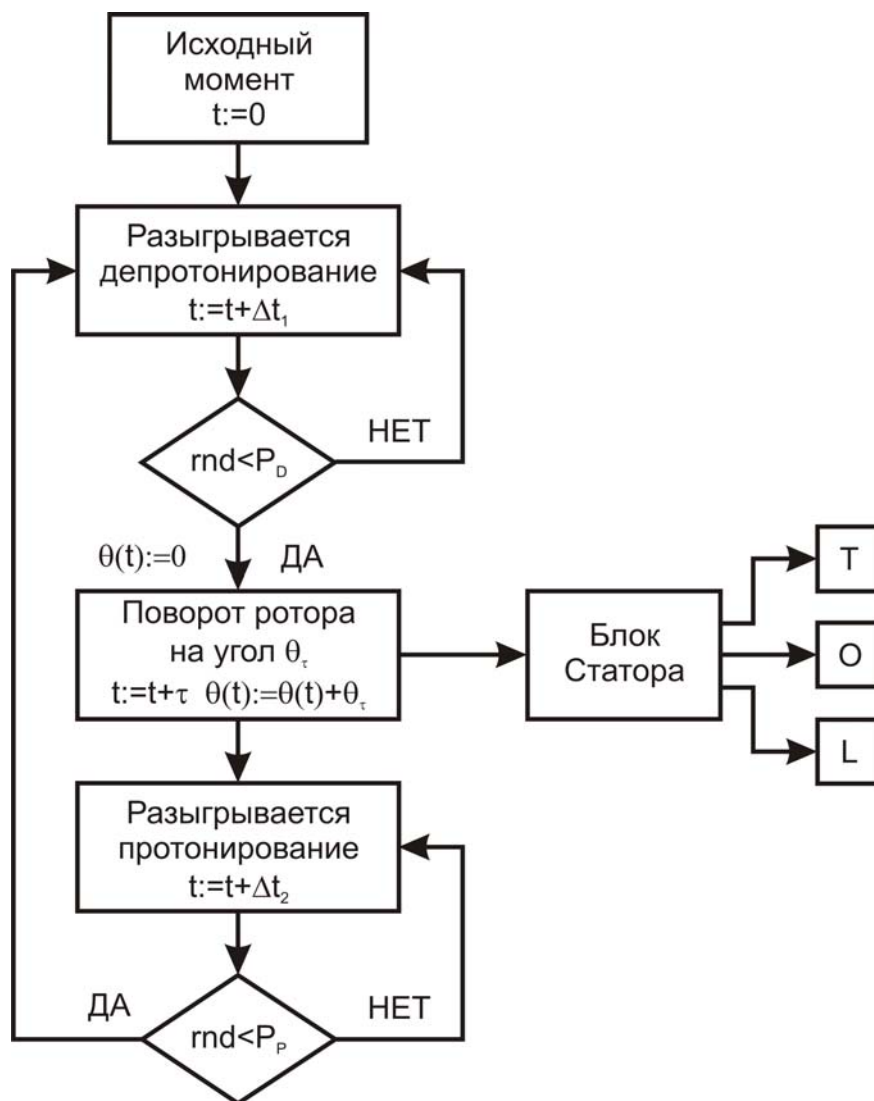
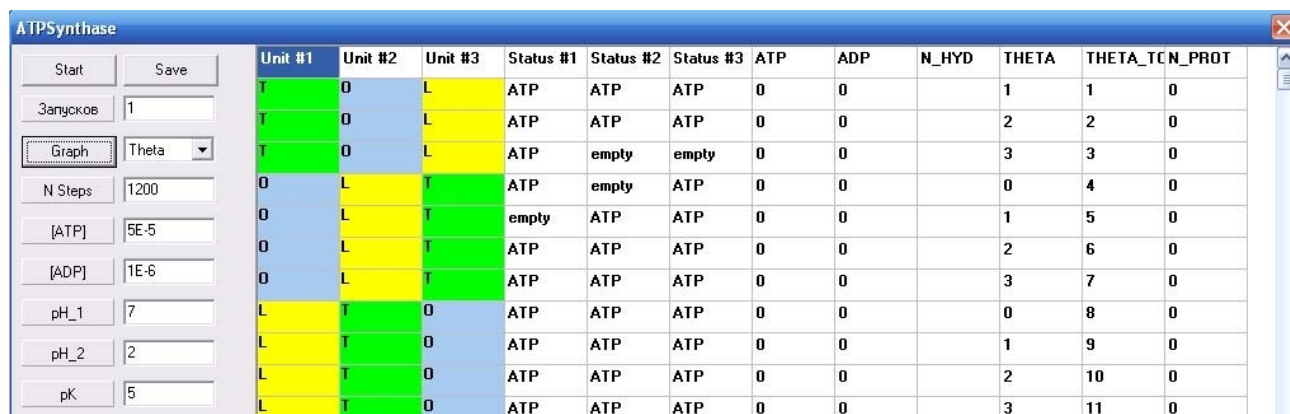


Рисунок 5. Блок-схема основной части программы по описанию каталитического цикла F_0F_1 -АТФсинтазы.

Подобная вероятностная оценка событий позволяет получить не только количество образованных молекул АТФ и АДФ, но и время, за которое это произошло, т.е. поток нуклеотидов. Кроме того, это первая модель, которая позволяет оценить не только гидролиз АТФ, но и синтез, а также может продемонстрировать состояние каталитического равновесия.

В пятой главе производится описание компьютерного моделирования синтеза и гидролиза АТФ в митохондриях F_0F_1 -АТФсинтазами.

Оценка параметров катализа с помощью компьютерной программы PASH по вероятностной схеме. Сформулированные в работе принципы реализованы в виде аппаратно-независимого программного обеспечения, которое позволяет получать интересующие исследователей параметры. По результатам вычислений можно получить информацию о состоянии каждой β -субъединицы на каждом шаге расчета, наличии или отсутствии в них нуклеотидов, реализации процесса синтеза или гидролиза, количестве протонов, перенесенных через мембрану в обоих направлениях, а также количественную характеристику этапа вращения и суммарный угол поворота ротора фермента. Кроме того, для каждого конкретного расчета указываются полученные значения вероятностей, которые корректируются по результатам предшествующих шагов. В конечном итоге в результате работы программы можно оценить макроскопический поток синтезированного или гидролизованного АТФ, а также перенесенных протонов для одного белка (Рисунок 6).



| Unit #1 | Unit #2 | Unit #3 | Status #1 | Status #2 | Status #3 | ATP | ADP | N_HYD | THETA | THETA_TCN_PROT |
|---------|---------|---------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-------|-------|----------------|
| T | 0 | L | ATP | ATP | ATP | 0 | 0 | | 1 | 1 |
| T | 0 | L | ATP | ATP | ATP | 0 | 0 | | 2 | 2 |
| T | 0 | L | ATP | empty | empty | 0 | 0 | | 3 | 3 |
| 0 | L | T | ATP | empty | ATP | 0 | 0 | | 0 | 4 |
| 0 | L | T | empty | ATP | ATP | 0 | 0 | | 1 | 5 |
| 0 | L | T | ATP | ATP | ATP | 0 | 0 | | 2 | 6 |
| 0 | L | T | ATP | ATP | ATP | 0 | 0 | | 3 | 7 |
| L | T | 0 | ATP | ATP | ATP | 0 | 0 | | 0 | 8 |
| L | T | 0 | ATP | ATP | ATP | 0 | 0 | | 1 | 9 |
| L | T | 0 | ATP | ATP | ATP | 0 | 0 | | 2 | 10 |
| L | T | 0 | ATP | ATP | ATP | 0 | 0 | | 3 | 11 |

Рисунок 6. Окно программы по расчету вероятностей и описанию состояний β -субъединиц. Показаны конформационные состояния субъединиц.

Особый интерес представляет сопоставление результатов моделирования с данными экспериментальных процедур по оценке скорости катализа F_0F_1 -АТФсинтазой синтеза/гидролиза АТФ. Из Таблица 3 очевидно, что с ростом исходной концентрации АТФ скорость гидролиза также увеличивается до некоторого предельного значения. Расчетные значения скорости гидролиза близки к экспериментальным и также демонстрируют увеличение с ростом

концентрации субстрата. Однако моделирование проводилось в условиях 100% функционирующих ферментов, что в реальных условиях наблюдается редко, кроме того, может варьировать содержание F_0F_1 -АТФсинтазы в митохондриальном белке (расчет проведен для случая 3,3% [Etzold, 1997]). Следует отметить, что программа PASH допускает значительно более точную оценку величины скорости гидролиза АТФ АТФсинтазой, однако для ее осуществления необходимо наряду с рассматриваемыми параметрами более точно учитывать количественную характеристику вязкости мембраны.

| Экспериментальная скорость гидролиза АТФ, мкмоль/мин/мг белка | Условия | Источник | Расчетная скорость гидролиза АТФ, мкмоль/мин/мг белка |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------------------------------------|
| 3,1 | Выделение без фосфолипидов | [Arselin, 1996] | 5,2 |
| 2,3 | [АТФ]=0.1 мМ | [Syroeshkin, 1999] | 4,56 |
| 3,5 | [АТФ]=0.2 мМ | [Syroeshkin, 1999] | 4,87 |
| 5,2 | [АТФ]=1 мМ | [Syroeshkin, 1999] | 5,32 |
| 6,7 | Mg-АТФ, V_{max} | [Syroeshkin, 1999] | 5,37 |

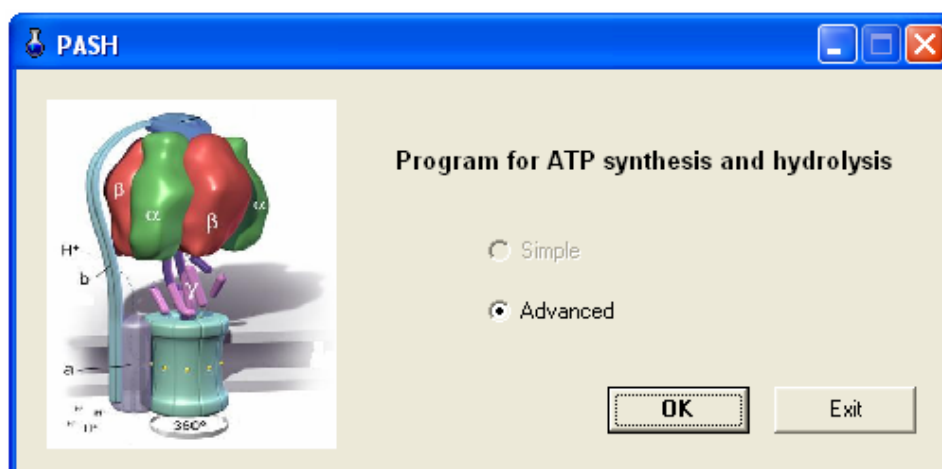
Таблица 3. Экспериментальная и расчетная скорости гидролиза АТФ F_0F_1 -АТФсинтазой при различных условиях.

При сопоставлении результатов моделирования с экспериментальной скоростью синтеза АТФ (Таблица 4) очевидно, что в рамках предложенной модели синтез АТФ происходит на несопоставимо меньшем проценте белков, нежели гидролиз. Причина этого феномена может заключаться в том, что для гидролиза необходимо наличие лишь активных сайтов β -субъединиц, наличие же потенциала на сопрягающей мембране и отрицательной кооперативности вовсе необязательно (явление унисайтного катализа [Penefsky et al., 1991]). В тоже время в случае синтеза АТФ принципиально наличие нативной сопрягающей мембраны, обладающей достаточной величиной мембранного потенциала. Фактически в случае синтеза наблюдается не просто оценка активности самого фермента, а оценка функциональной активности комплекса ферментов дыхательной цепи и АТФсинтазы. Поскольку выделение препарата митохондрий может приводить к нарушению их нативной структуры, то возникает ситуация, при которой количество реально существующего в пробе

белка АТФсинтазы не соответствует количеству реально работающего на синтез фермента.

| Вязкость мембраны, Па·с | Расчетная скорость синтеза АТФ, мкмоль/мин/мг белка | Экспериментальная скорость синтеза АТФ, мкмоль/мин/мг белка |
|-------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,03 | 1,05 | 0,2 [Pitard, 1996] 0,15-0,2 [Guiseppe Attardi 1995] 0,1 [Cortes-Hernandez, 2007] 0,058 [Pepe, 2002] 0,004 [Massart, 2002] 0,0029 [Baracca, 2000] |
| 0,05 | 0,70 | |
| 0,1 | 0,315 | |
| 0,25 | 0,105 | |
| 0,5 | 0,05 | |
| 0,75 | 0,037 | |
| 1 | 0,03 | |

Таблица 4 Экспериментальная и расчетная скорости синтеза АТФ F_0F_1 -АТФсинтазой при различных условиях. Данные приведены для случая 1% работающих ферментов.



Таким образом, описанная в данном разделе разработанная программа PASH для моделирования каталитического цикла F_0F_1 -АТФсинтазы является законченным программным продуктом, позволяющим исследователям в рамках лабораторий с использованием ПК получать оценку потоков синтеза/гидролиза АТФ ферментом, а также ряд других параметров функционирования описанного белка. С помощью PASH возможно проводить оценку общего количества синтезированного/гидролизованного АТФ в клетке, ткани, органе, во всем организме.

Расчет синтеза/гидролиза АТФ в реальной системе на примере отдельных клеток и тканей. С помощью литературных данных [Безбородкина, 2008] и рассчитанного с помощью PASH количества синтезируемого в единицу времени АТФ, легко оценить общую массу АТФ, синтезируемого любым органом. Так, для печени масса производимого АТФ составляет 1289 г в час (для 5% работающих АТФсинтаз). Известно, что для полноценного развития эмбриона человека необходимо наличие в ооците не менее 100000 митохондрий [J.C.St.John, 2004]. Количество энергии, необходимое для данного процесса составляет 1,5 мкг АТФ в сутки, что примерно втрое больше массы самого ооцита (0,4 мкг [Кьюмерле Х.П., 1987]).

Выводы

1. С использованием комбинированных методов математического моделирования построена универсальная модель, описывающая совокупность элементарных процессов, происходящих на белковых субъединицах АТФсинтазы.
2. На основе предложенной физической модели, базирующейся на данных рентгеноструктурного анализа, сформулирован алгоритм, представляющий полный каталитический цикл исследуемого белка.
3. Разработано независимое программное обеспечение, позволяющее проводить компьютерные эксперименты, описывающие синтез и гидролиз АТФ моделируемым белком при различных условиях.
4. Показано, что реализация предложенного подхода позволяет без дополнительных условий с помощью компьютерной симуляции получать экспериментально измеримые характеристики исследуемой системы в условиях обратимости процессов, происходящих на АТФсинтазе.
5. На основе сопоставления результатов моделирования с экспериментальными данными продемонстрирована возможность использования разработанного программного продукта для получения количественных характеристик энергетического обеспечения тканей живого организма.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Машковцева Е.В.** Теоретическое описание механо-конформационных изменений подвижных белковых составляющих F_0F_1 -АТФсинтазы. // *Вестник РГМУ* – 2003. №3 (34).- С. 209
2. **Машковцева Е.В., Нарциссов Я.Р.** Возможности применения теоретического моделирования энергосинтезирующих систем клеток для изучения патологических состояний различной этиологии. // *Тезисы докладов XI Российского Национального Конгресса "Человек и Лекарство"*.-2004.- С.813.
3. **Нарциссов Я.Р., Машковцева Е.В.** Математическая модель механо-конформационных изменений в интегральных мембранных белковых комплексах F_0F_1 -АТФсинтазы. // *Биофизика*.- 2005.- Т.50.- № 6.- С.1048-1054.
4. **Nartsissov Ya.R., Mashkovtseva E.V.** A novel mechanical model of ATP synthesis and hydrolysis in F_0F_1 -ATP synthase. // *Biochim. Biophys. Acta*.- 2004.- EBEC Short report.-V.13.- P.117.
5. **Mashkovtseva E.V., Nartsissov Ya.R.** Theoretical description of rotation within F_0F_1 -ATP synthase using solid-state mechanics approach. // *Abstracts of Bari International Conference on Mitochondria, from Molecular insight to Physiology and Pathology* .- 2005.- Bary - P.36.
6. **Nartsissov Ya. R., Mashkovtseva E.V.** Application of rigid body mechanics to theoretical description of rotation within F_0F_1 -ATP synthase. // *J. Theor. Biol.* - 2006.- V.242.- №2.- P.300-308.
7. **Mashkovtseva E.V., Nartsissov Ya.R.** Quantum-mechanical approach to the description of proton diffusion in the membrane protein pore of ATP-synthase. // *BBA-Bioenergetics*. – 2008. V.1777, suppl. 1. – P.S18.
8. **Mashkovtseva E.V., Boronovsky S.E., Nartsissov Ya.R.** Pulsing charge model of the proton movement through a membrane protein channel of ATP synthase. // In book: *Will bottom up meet top-down?* - 2008. – P.15-20.

9. **Mashkovtseva E.V., Boronovsky S.E., Nartsissov Ya.R.** Quantum-mechanical description of step-by-step protons motion through membrane protein channels.// *The 9th International Conference on System Biology. Abstract book.* – 2008. – P.160.
10. **Mashkovtseva E.V., Boronovsky S.E., Nartsissov Ya.R.** Mechano-probability model of FoF1-ATPsynthase Catalytic Cycle: a novel approach to ATP synthesis and hydrolysis description. // In book: *Modern trends in Systems biology. Virtual modeling and regulation.* - 2010. – P.153-155.