

*На правах рукописи*



БОРОНОВСКИЙ  
Станислав Евгеньевич

**МОДЕЛИРОВАНИЕ ДВИЖЕНИЯ ИОНОВ В  
СРЕДЕ НА ОСНОВЕ  
ОПТИМИЗИРОВАННОГО  
КОМПЬЮТЕРНОГО АЛГОРИТМА И ЕГО  
ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ОПИСАНИЯ  
ТРАНСМЕМБРАННЫХ ТОКОВ В БЕЛКОВЫХ  
КАНАЛАХ**

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, г. Москва

**Научный руководитель:** кандидат физико-математических наук, доцент  
Нарциссов Ярослав Рюрикович

**Официальные оппоненты:** Доктор физико-математических наук  
Алиев Рубин Ренатович

Доктор биологических наук, профессор  
Антонов Валерий Федорович

**Ведущая организация:** Институт математических проблем биологии РАН

Защита диссертации 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, Воробьевы горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, «Новая» аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ.

Автореферат разослан " \_\_\_\_ " \_\_\_\_\_ 2010 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

кандидат физико-математических наук



М.Г. Страховская

## Общая характеристика работы

**Актуальность проблемы.** Современное развитие технологии предполагает все большее привлечение тончайших методов диагностики и визуализации как в чисто научных исследованиях, так и в области решения практических прикладных задач. В этих условиях большую роль играют компьютерные технологии, которые позволяют не только проводить статистическую обработку и моделирование процессов, но, по сути, становятся имитаторами реальных систем. Это позволяет проводить компьютерные эксперименты, избегая в ряде случаев постоянного использования дорогостоящих лабораторных методик. Данный подход приобретает особое значение в ситуации, когда необходимость прогнозирования продиктована какой-либо сугубо медицинской задачей. В этих случаях инвазивные методы исследования могут быть практически недоступны по этическим соображениям. Поэтому компьютерная модель в данной ситуации позволяет в некоторой степени расширить диагностические возможности врачей. Важной характеристикой моделирования в данном случае будет являться универсальность подхода к описанию явления, предсказательная «сила» метода и возможность адаптации модели к разнообразным частным случаям конкретных объектов.

Именно поиск и разработку подобных моделей можно с полным основанием считать важнейшей задачей в области прикладного применения биофизики ионного транспорта. Универсальные и нетребовательные к вычислительным ресурсам компьютеров методы описания движения ионов вблизи поверхности мембран и последующего формирования ими трансмембранных токов позволили бы подробно описывать кинетику накопления важнейших ионов в компартментах, наглядно демонстрировали и количественно описывали бы изменение проводимости мембран под действием различных внешних воздействий. Проведение виртуальных компьютерных симуляций процесса позволило бы рассматривать множество интересующих исследователя вариантов постановки эксперимента, избегая возможности появления спонтанных артефактов и значительно сокращая материальные затраты. Кроме того, разработка упомянутых алгоритмов сделала бы возможным проведение оценки работы белковых ансамблей, содержащих различное количество мембранных каналов. Успешность данного подхода впервые открывает особые перспективы существенного объединения микро- и макро- уровней в изучении биологического объекта в разделе мембранного транспорта. Последующее же создание программного обеспечения на базе предложенных алгоритмов позволило бы найти применение результатам подобной работы в различных областях медицинской функциональной диагностики.

Таким образом, разработка эффективного, универсального и простого в использовании подхода к описанию примембранного движения ионов является одной из насущных задач биофизики, имеющей как фундаментальное, так и прикладное значение.

**Цели диссертационной работы.** Разработка оптимизированного компьютерного алгоритма описания движения ионов вблизи поверхности мембраны и его использование для количественной оценки трансмембранных ионных токов.

Для достижения цели работы были поставлены следующие **задачи**:

- Построение математической модели, описывающей динамику движения заряженных частиц в вязкой среде с учетом различной плотности фиксированных зарядов в системе
- Получение аналитического решения уравнения Ланжевена, описывающего траекторию движения частиц в растворе
- Разработка пошагового алгоритма количественного представления динамики движения заряженных частиц в рассматриваемой системе и его формализация в виде независимого программного обеспечения
- Оценить изменение величины ионных токов в условиях наличия и отсутствия гидратной оболочки у частицы в цилиндрической поре
- Используя данные о структуре трансмембранных доменов, получить токовые характеристики для катионных и анионных каналов на примере потенциал-зависимого калиевого канала и хлорного канала глицинового рецептора
- Изучить влияние изменения плотности фиксированных зарядов на величину трансмембранных ионных токов
- Построить временные зависимости ионных токов с учетом вероятностного характера открытия и закрытия ионных каналов

**Научная новизна работы.** В работе впервые предложен алгоритм описания движения ионов вблизи поверхности мембран с использованием подходов броуновской динамики, характеризующийся высокой производительностью, низкими затратами вычислительных мощностей и позволяющий получать величины трансмембранных ионных токов через единичных белковый канал на основе данных о его структуре. Предложенный подход может быть использован в качестве универсального метода для описания токов и накопления ионов в различных биологических компартментах, поскольку результаты моделирования представлены в виде оригинального программного обеспечения. С использованием модельной системы впервые показано, что симметричность расположения зарядов, соответствующих аминокислотным остаткам белка в канале, значительно влияет как на селективность поры, так и на уровни ее проводимости. На примере анионного канала глицинового рецептора теоретически обоснована возможность существования ненулевых усредненных

трансмембранных токов при отсутствии градиента электрохимического потенциала ионов хлора.

**Практическая значимость работы.** Представленный в данной работе алгоритм описания движения ионов вблизи поверхности мембран представляет собой новый тип моделирования, удачно сочетающий в себе как представления о структуре мембранного белкового комплекса, так и описание возможного механизма его работы. В качестве результатов работы программного обеспечения возникает зависимость метаболита (иона) от времени, которая в конечном итоге описывает кинетику каталитического цикла отдельного белка (в данном случае процесс переноса ионов через мембранную пору канала или рецептора). Разработанное программное обеспечение на основе предлагаемого алгоритма является универсальным, что позволяет успешно использовать его для оценки трансмембранных токов через белковые каналы имеющих различную структуру, обладающих различной селективностью и функционирующих в различном окружении. Кроме того, полученные программные продукты могут быть легко интегрированы в другие программы в качестве независимых модулей. Поскольку результатом работы программы является количество ионов, перенесенных в единицу времени, то использование указанных программ делает возможным количественную оценку не только величин трансмембранных токов, но и изменение содержания ионов в компартментах. Такой подход позволит приводить численные оценки изменения концентрации в таких биологических системах, которые сложно описывать с помощью экспериментальных процедур. Одним из перспективных преимуществ разработанного подхода можно считать возможность создания расширенных программных продуктов, используемых врачами в клинической практике.

**Апробация работы** Результаты работы были представлены и обсуждались на 12-й Международной конференции по Биотермокинетики – ВТК (Тракай, 2006); Научной сессии Московского инженерно-физического института (Государственного Университета) (Москва, 2006); 13-м Научном Симпозиуме международной исследовательской группы по системной биологии (Элсинор, 2008); 9-й Международной конференции по системной биологии (Гётеборг 2008); 14-м Научном Симпозиуме международной исследовательской группы по системной биологии (Владимир, 2010).

**Публикации.** Всего по теме диссертации опубликовано 6 печатных работ, из них 2 статьи в российских и зарубежных научных журналах, рекомендованных ВАК РФ для публикации материалов кандидатских и докторских диссертаций.

**Структура работы.** Диссертация представлена на \_\_\_ страницах текста и состоит из 5 глав, включающих обзор литературы и 4 главы собственных исследований автора. Работа проиллюстрирована \_\_\_ рисунками и содержит список литературы, состоящий из \_\_\_ источников.

## Основное содержание работы

В случае рассмотрения движения ионов вблизи поверхности мембран существует несколько возможных подходов для математической формализации данного процесса. В сущности, каждый из них подробно представляет тот или иной физический параметр в качестве искомой переменной в уравнении. Без ограничения общности можно разделить упомянутые подходы на несколько типов. Один из них использует формализм диффузионного (электродиффузионного) приближения. В этом случае перенос частиц через поверхность мембраны представляется как результат решения краевой задачи для однородного или неоднородного уравнения диффузии, полученного в рассматриваемой экспериментаторами системе. Второе направление моделирования описывает динамику движения атомов и молекул в некоторой выделенной области пространства биологического объекта. В этом случае имеет место представление развертки временных кривых изменения линейной (или угловой) координаты, возникающей из решения уравнений Ланжевена для каждой материальной точки, соответствующей отдельным атомам системы. И, наконец, третий тип моделей можно условно охарактеризовать как класс кинетических моделей. В них исследователи характеризуют процессы переноса ионов либо как следствие работы белков переносчиков, либо как феноменологическое представление изменения трансмембранного тока при заданных вероятностях открытия и закрытия мембранных каналов – уравнения Ходжкина-Хаксли. Как ни парадоксально, но при всей подробности упомянутых выше методов, ни один из них в полной мере не позволяет приблизиться к решению важнейшей задачи: описать функционирование биологической структуры в состоянии *in vivo* с осуществлением взаимосвязи между реальной структурой белка-машины и макроскопическими параметрами, измеряемыми в эксперименте, такими как метаболический поток. И для подобной ситуации существуют определенные объективные причины. В **первой главе** диссертации приводится подробное рассмотрение основных особенностей перечисленных выше подходов и указывается возможность их использования для описания трансмембранных токов. Отмечается, что при применении молекулярно-динамических методов требуется использование мощных вычислительных ресурсов, а в случае кинетического моделирования параметры модели в значительной степени начинают зависеть от стандартности выбранных условий. Ограниченность области применимости данных подходов приводит к уменьшению информативности, что в какой-то степени снижает и прогностические качества применяемых моделей. Для того, чтобы избежать

вышеописанных сложностей, необходимо разработать такой методический подход к описанию движения ионов через поверхности мембран, который сделает возможным представление измеримых макро параметров на основе достаточно четкого моделирования процессов на микроуровне.

Для того, чтобы успешно реализовать решение поставленных задач, необходимо сформулировать основные физические особенности рассматриваемой модели и последовательно реализовать их в виде алгоритма, который может быть запрограммирован.

Поскольку окончательной задачей является описание функционирования белкового ионного канала рецептора (или открытого состояния потенциал-зависимого канала), то для рассмотрения в работе предложено использовать трех компартментную модель пространства. Ее описание приводится в **Главе 2**. Два компартмента представляют собой участок гидрофильной фазы биологического объекта, а третий компартмент – гидрофобную фазу мембраны. Заряженные частицы располагаются хаотично в одном и в другом гидрофильном компартменте, их движение определяется взаимодействием друг с другом и с фиксированными зарядами в составе третьего компартмента. Эти упомянутые заряды суть фиксированные заряды аминокислотных остатков в составе белка или отдельные заряды полярных головок липидов, входящих в состав мембраны. Подвижные перемещающиеся ионы способны двигаться свободно под действием внешней стохастической силы (той самой, которая является причиной броуновского движения), силы, возникающей от взаимодействия множества зарядов в компартменте, и силы со стороны внешнего поля. Принципиальным является то обстоятельство, что в подобной ситуации величина взаимодействия между частицами (представленная в явном виде) в большей степени определяет «случайность» их перемещения, нежели влияние соударения с растворителем.

При этом движение ионов представляет собой перемещение твердых шариков, диаметр которых соответствует диаметру данного иона в гидратной оболочке, причем движение происходит в вязкой среде с постоянной диэлектрической проницаемостью. Можно предположить, что пересечение частицами поверхности мембраны через белковый канал происходит лишь в моменты его открытия. Процесс открытия лиганд-зависимых каналов может быть представлен в виде отдельной вероятностной схемы и фактически составляет отдельную задачу.

В соответствии с условиями, представленными выше, можно утверждать, что для случая перемещения заряженных частиц вблизи поверхности мембраны необходимо количественно описать стохастическую траекторию движения ионов (частиц) в моделируемой области, причем прохождение частиц будет происходить только при условии открытого ионного канала. В остальные моменты времени движение частиц происходит таким образом, что траектория

движения не будет пересекать область мембраны. Для случая метаболотропных рецепторов это означает, что для формирования трансмембранного тока следует рассматривать систему в период времени между связыванием и освобождением агониста из сайта рецептора. Численное решение уравнения Ланжевена предполагает периодическое с интервалом  $\Delta t$  переопределение модуля и направления стохастической силы для каждой частицы. Исходя из выбора величины интервала  $\Delta t$  справедливо:

$$\forall t, t': \Delta t = t - t' \Rightarrow \bar{r} \in \Omega: |\bar{r} - \bar{r}'(t)| \approx |\bar{r} - \bar{r}'(t')|$$

Таким образом, движение  $N$  частиц в отдельный интервал времени описывает система из  $3N$  уравнений движения. Заряд, масса и радиус частиц соответствуют заряду, массе и радиусу соответствующих ионов в гидратной оболочке. Кроме подвижных зарядов в растворе, в системе присутствует  $N_f$  неподвижных зарядов от аминокислотных остатков, формирующих ионоселективные фильтры, и заряженных липидов в мембране. Для системы из  $N$  заряженных частиц и  $N_f$  неподвижных зарядов, уравнения изменения координат для каждой отдельной частицы с соответствующими начальными условиями имеет вид:

$$m_k \frac{d^2 x_{k,i}}{dt^2} = \frac{q_k}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \sum_{j \neq k} \left( \frac{q_j}{\left( \sum_{l=1}^3 (x_{k,l} - x_{j,l})^2 \right)^{\frac{3}{2}}} \cdot (x_{k,i} - x_{j,i}) \right) \quad \bar{r}_k = \{x_{k,i}\}_{i=1}^3,$$

$$x_{k,i}(0) = x_{k,i}^0,$$

$$\frac{dx_{k,i}}{dt}(0) = v_{k,i}^0, \quad i = 1..3$$

$$+ \frac{q_k}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \sum_{j=1}^{N_f} \left( \frac{q_j^f}{\left( \sum_{l=1}^3 (x_{k,l} - x_{j,l})^2 \right)^{\frac{3}{2}}} \cdot (x_{k,i} - x_{j,i}) \right) - 6\pi\eta R_k \frac{dx_{k,i}}{dt} + F_s$$

В данном случае предполагается, что параметры среды, такие как вязкость и диэлектрическая проницаемость, не претерпевают существенных флуктуаций в моделируемой области, и в представленной выше формулировке задачи фигурируют их усредненные значения.

Величина стохастической силы будет определяться из следующего соотношения:

$$6\pi\eta R_k = \frac{1}{2kT} \cdot \int_{-\infty}^{+\infty} \langle F_s(0) \cdot F_s(t) \rangle dt$$

В ходе моделирования, после завершения движения частиц в системе за период времени  $\Delta t$  происходит перерасчет стохастической силы и в тоже время пересчет первого и второго слагаемых в правой части уравнений в соответствии



с фактическим новым расположением частиц относительно друг друга и системы фиксированных зарядов. При этом значения координаты и первой производной по времени соответствуют значениям, которые приобрели частицы от некоторого начального момента  $t_0$  (для простоты моделирования и без ограничения общности можно считать  $t_0 = 0$ ) к моменту времени  $t = t_0 + \Delta t$ . В дальнейшем подобные последовательные итерации продолжаются такое количество раз, которое необходимо для получения количественного описания движения частиц за время  $t = \sum_i \Delta t_i$ .

В результате проведенных таким образом расчетов исследователь получает совокупность координат точек, характеризующих перемещение рассматриваемых частиц в моделируемой области. При этом различные варианты начальных распределений положений частиц приводят к различным последующим вариантам перемещения. В **Главе 3** формулируются принципы пошагового построения траекторий частиц и их последующего включения в логический алгоритм.

Для того, чтобы описывать перемещение совокупности частиц в моделируемой примембранной области, необходимо осуществить несколько последовательных действий. Прежде всего, следует получить решение поставленной выше задачи. Представленное уравнение Ланжевена имеет решение в элементарных функциях:

$$x_{k,i}(t) = \frac{q_k \cdot E_{k,i} + F_s}{6\pi \cdot \eta \cdot R_k} \cdot t + \left[ x_{k,i}^0 + \frac{v_{k,i}^0 \cdot m_k}{6\pi \cdot \eta \cdot R_k} - \frac{(q_k \cdot E_{k,i} + F_s) \cdot m_k}{(6\pi \cdot \eta \cdot R_k)^2} \right] - \left[ \frac{v_{k,i}^0 \cdot m_k}{6\pi \cdot \eta \cdot R_k} - \frac{(q_k \cdot E_{k,i} + F_s) \cdot m_k}{(6\pi \cdot \eta \cdot R_k)^2} \right] \cdot \exp\left(-\frac{6\pi \cdot \eta \cdot R_k}{m_k} \cdot t\right)$$

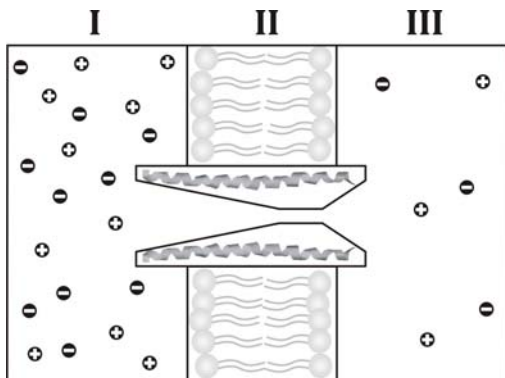
где

$$E_{k,i} = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \left( \sum_{j \neq k} \left( \frac{q_j \cdot (x_{k,i} - x_{j,i})}{\left( \sum_{l=1}^3 (x_{k,l} - x_{j,l})^2 \right)^{\frac{3}{2}}} \right) + \sum_{j=1}^{N_j} \left( \frac{q_j^f \cdot (x_{k,i} - x_{j,i})}{\left( \sum_{l=1}^3 (x_{k,l} - x_{j,l})^2 \right)^{\frac{3}{2}}} \right) \right)$$

что в конечном итоге позволяет получить и решение задачи Коши при выбранных начальных условиях.

В условии соблюдения приведенных выше условий схематическое изображение моделируемой биологической системы может быть отобразено так, как это представлено на **Рис. 1**. Фактически каждая область, примыкающая к

компарменту, представляет собой непроницаемую для частиц среду. В этом существует, конечно, некоторое преувеличение, однако в условиях открытого канала, который во многом соответствует гидрофильной поре внутри некоторой гидрофобной фазы, такое сравнение вполне применимо.



**Рис. 1.** Участок мембраны с рецептором (область II), разделяющий компарменты I и III с различной концентрацией химических соединений, рассматриваемых в ходе моделирования.

На основе доступных на сегодняшний день экспериментальных данных геометрия большинства

ионных каналов может быть описана с помощью двух вестибулей, соединенных узким районом. В каждом конкретном случае геометрия вестибулей может быть разная, но достаточно хорошими типами приближений являются коническая и цилиндрическая геометрии. При этом фиксированные заряды могут размещаться во внутренней полости канала. Схематичное изображение подобных моделируемых систем представлено на **Рис. 2**. Все параметры, описывающие геометрию такой системы, могут быть получены из анализа структуры соответствующих частей мембранных белков. Примечательно, что на рисунке представлены только два заряженных кольца аминокислотных остатков, в то время как их количество не ограничено. То же самое можно сказать и о величине расположенных на них зарядов. Если подобные данные известны, то величина заряда может быть указана с учетом возможного экранирования.

В рамках постулированных условий и сформулированной физической модели трансмембранный ток ионов будет формироваться за счет периодического попадания в канал различных частиц. Фактически величина тока будет составлять произведение числа событий на перенесенный заряд, отнесенное ко времени наблюдения. Причем достаточно очевидно, что для сравнения с экспериментом необходимо использовать относительно большие интервалы времени, поскольку в малых интервалах будут наблюдаться большие флуктуации, обусловленные стохастическим характером движения частиц. Тем не менее, предложенная в работе физическая модель позволяет оценивать перемещение частиц в любом интересующем исследователя диапазоне.

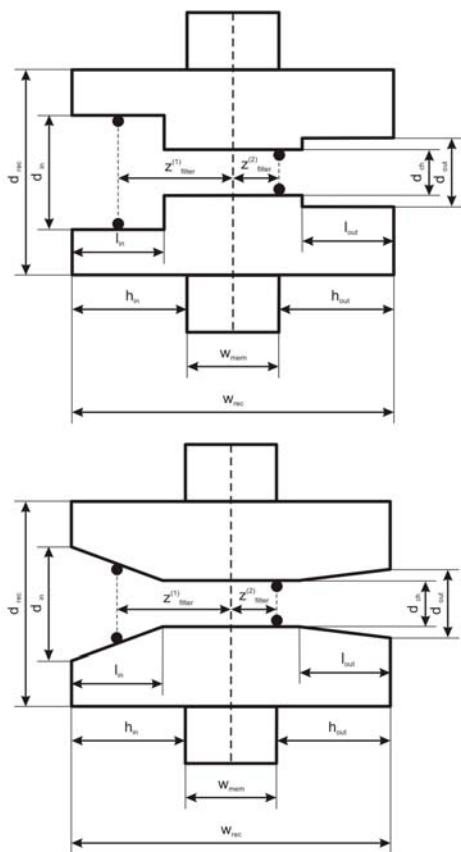


Рис. 2. Схема аппроксимации ионного канала для геометрий А) с цилиндрическим вестибулем, Б) с коническим вестибулем.  $w_m$  – толщина мембраны;  $d_{ch}$  – диаметр узкого района;  $d_{in}$ ,  $d_{out}$  – диаметры внутренней и внешней воронок;  $d_{e_{in}}$ ,  $d_{e_{out}}$  – глубина внутренней и внешней воронок;  $h_{in}$ ,  $h_{out}$  – высота внутренней и внешней внемембранных частей канала;  $w_{rec}$  – общая длина канала;  $d_{rec}$  – общий диаметр канала.

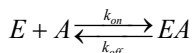
В основе проведения компьютерного эксперимента лежит последовательный подсчет числа пересечений частицами поверхности фазы мембраны через белковый канал с выходом их из одного компартмента в другой. При этом после прохождения частицы симуляция процесса останавливается, и «прошедшая» через канал частица возвращается внутрь своего компартмента в некоторую точку

со случайными координатами. Это приводит к тому, что внутри рассматриваемого алгоритма компартменты не перемешиваются по составу входящих в них частиц. Данное ограничение, впрочем, не является обязательным и отражает лишь тот факт, что в моделируемой системе концентрации ионов в примембранной области по обе стороны мембраны в ходе компьютерного эксперимента остаются постоянными. Как и в реальном эксперименте, в виртуальных симуляциях, проведенных по предложенному алгоритму, можно варьировать условия окружения, отражающиеся в изменении величин параметров модели. Каждое подобное изменение и приводит к непосредственному новому варианту расчетов и, как следствие к новой экспериментальной точке на интересующей исследователя зависимости. В качестве параметров могут выступать различные физические величины, от которых строится зависимость трансмембранного тока. В частности, когда

рассматриваются ионные каналы, традиционно строятся зависимости тока от разности электрических потенциалов, подаваемых по обе стороны мембраны, в которую встроены белок.

Для того, чтобы описать поведение канала в целом, моделирование формирующегося в нем тока недостаточно. Необходимо дать исследователю возможность увидеть временную развертку реальных измеримых токов с учетом открытия и закрытия каналов. Данный вопрос является непростым, поскольку в рамках предложенного алгоритма не существует возможности выстроить системное описание данного процесса. В работе рассмотрен пример лигандзависимого канала, поскольку именно этот случай в наибольшей степени привязан к условиям попеременного открытия или закрытия в зависимости от присоединения агониста.

Рассмотрим сказанное на отдельном примере. Пусть исследователя интересует процесс взаимодействия некоторого вещества А с белком Е. В рассматриваемом в работе случае данный процесс – это связывание лиганда (медиатора) с рецептором, приводящее к открытию ионного канала. При этом предполагается, что данный процесс обратим, и следовательно будет справедлива простейшая схема:



Константа диссоциации комплекса, очевидно, имеет вид:  $K_d = \frac{[A] \cdot [E]}{[EA]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$ .

Если теперь предположить, что в рассматриваемой системе существует всего N молекул белка, то средняя вероятность обнаружить белок в свободном состоянии или в комплексе с А будет равна:

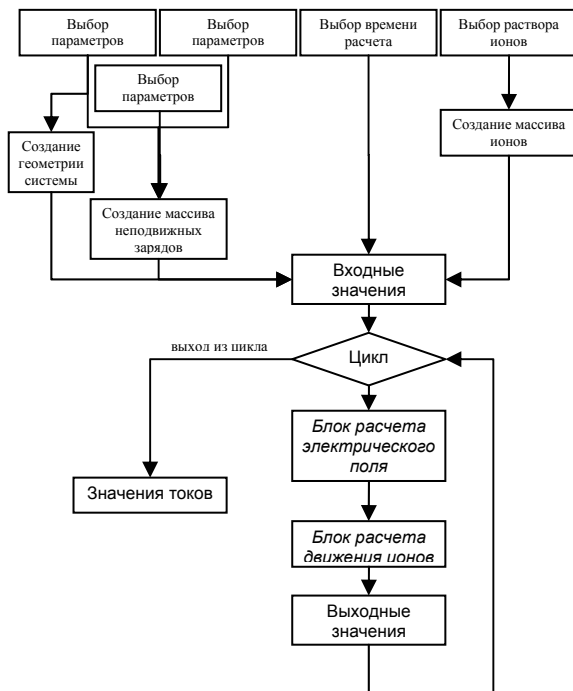
$$\langle P_E \rangle = \frac{n_E}{N}; \quad \langle P_{EA} \rangle = \frac{n_{EA}}{N};$$

$$n_E + n_{EA} = N; \quad \frac{K_d}{[A]} = \frac{n_E}{(N - n_E)}; \quad \langle P_E \rangle = \frac{1}{\left(1 + \frac{[A]}{K_d}\right)}; \quad \langle P_{EA} \rangle = \frac{1}{\left(1 + \frac{K_d}{[A]}\right)}$$

Представленное выше выражение характеризует средние вероятности для образования и распада фермент-субстратного комплекса. В данном случае алгоритм построения последовательности событий прост: фактически происходит разыгрывание состояний 0 или 1 с определенной вероятностью.

В рассматриваемом в данной работе случае приведенные выражения для расчета вероятности позволяют составить несложный алгоритм оценки открытого и закрытого состояния. Предположим, что исходно рецептор находится без связанного лиганда и канал закрыт. Через время  $\Delta t_1$  возможно присоединение лиганда, и реализация данного события может быть разыграна по методике Монте-Карло в соответствии с представленными вероятностями. Если событие

реализовалось (лиганд присоединился), то после этого можно перейти к моделированию формирования трансмембранного тока. Если же нет, то к отсчитываемому времени  $t$  необходимо прибавить  $\Delta t_1$  и снова запустить процедуру разыгрывания присоединения лиганда. Так будет повторяться до тех



**Рис. 3. Общая блок-схема программируемого алгоритма на основе разработанного подхода**

пор, пока не реализуется событие связывания. Аналогично следует разыгрывать реализацию отсоединения лиганда от белка, при этом если сам медиатор остался «сидеть» в сайте связывания, то канал продолжит существование в открытом состоянии. Если же произошло отсоединение лиганда от рецептора, то канал закрывается. Представленные в работе физическая модель движения частиц в примембранном пространстве и математическое описание происходящих при этом явлений могут быть формализованы в виде логического алгоритма (Рис. 3), который в свою очередь может послужить основой для создания программного обеспечения. Была разработана программа MIC (Model of Ion Channels) ver. 1.0, которая использует описанные выше физические принципы броуновской динамики и позволяет моделировать биологическую систему, включающую белковый канал и прилегающий к нему участок мембраны. Описанию самого алгоритма и интерфейса программы посвящена Глава 4. Программа имеет

широкие возможности для проведения исследовательской работы и адаптирована под интересы экспериментаторов. При этом практически не существенно, какой именно тип мембранной поры или канала интересует исследователя (Рис. 4).

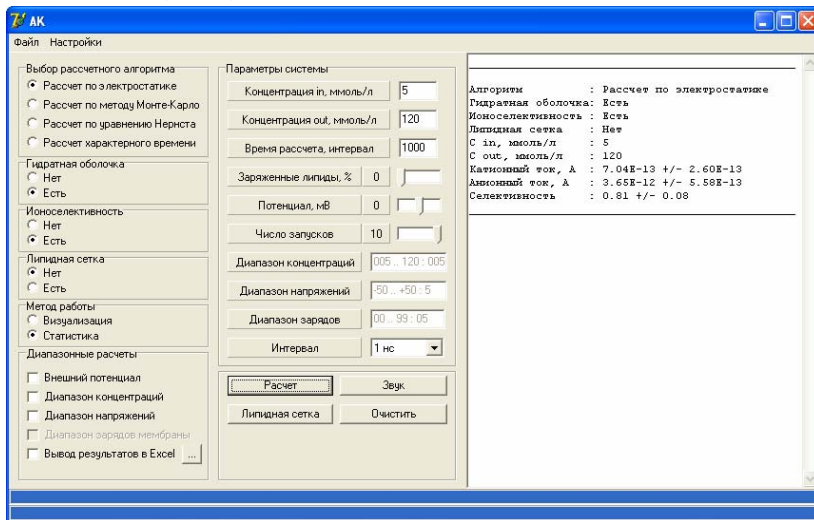
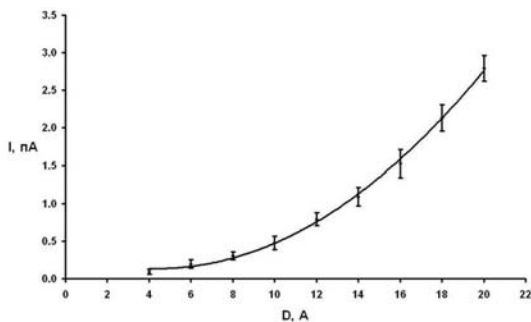
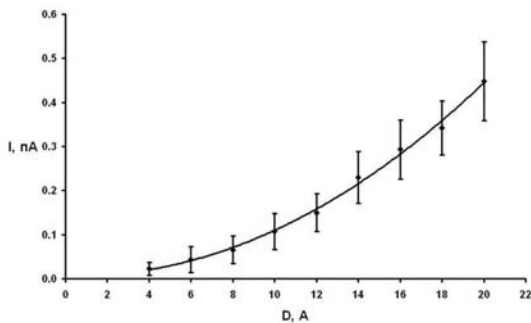


Рис. 4. Общий вид программы моделирования ионных каналов.

Представленный в работе алгоритм и разработанное программное обеспечение успешно применены для описания формирования трансмембранных токов на примере реальных белковых каналов в Главе 5.

Исследование того, насколько диаметр гидрофобной поры влияет на трансмембранный ионный ток, позволит в дальнейшем определить, как геометрическое строение различных ионных каналов определяет их свойства по проводимости. Были рассмотрены два случая прохождения ионов через пору. В первом случае ион не терял гидратную оболочку при прохождении, а во втором движение проходило без нее. В случае движения с гидратной оболочкой (Рис. 5А) значение тока при диаметрах поры до 10 Å не превышает 0.1 пА, и даже при высоких значениях порядка 20 Å составляет всего 0.45 пА. Однако в случае отсутствия гидратной оболочки прохождение иона через канал сильно

**Рис. 5.** Зависимость ионного тока от диаметра гидрофобной поры А) ион не теряет гидратную оболочку; Б) ион теряет гидратную оболочку.

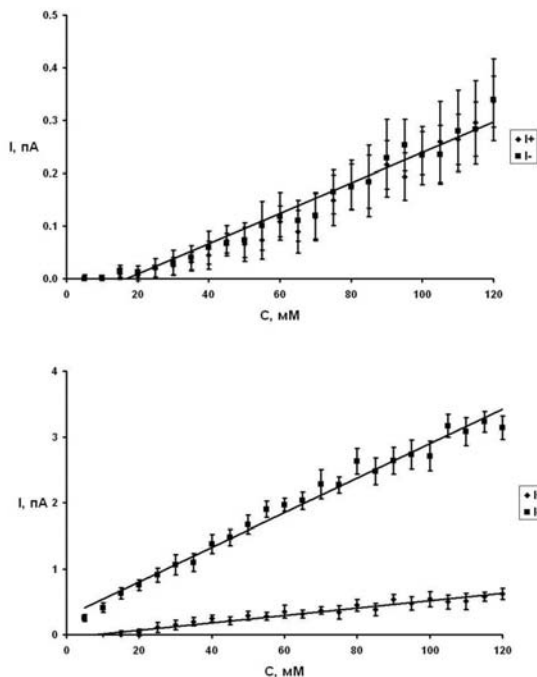


облегчается, и значения трансмембранного тока существенно зависят от диаметра поры (**Рис. 5Б**). При 4 Å он составляет 0.1 пА, а при увеличении диаметра до 20 Å растет вплоть до 2.9 пА

Примечательно, что, несмотря на некоторую «упрощенность» алгоритма, его результаты весьма точно совпадают с экспериментальными измерениями трансмембранного тока в канале. Из приведенного сопоставления результатов виртуального моделирования процесса протекания тока через открытый канал и непосредственных измерений видно, что расхождение результатов математической аппроксимации и эксперимента составляет не более 9% для случая прохождения в гидратной оболочке и 2% в случае прохождения катионов без нее (**Таблица 1**). Данный результат свидетельствует в пользу гипотезы о сбрасывании гидратной оболочки калием при входе в канал.

Для исследования того, как именно влияет на свойства рецепторов наличие в канале заряженных аминокислотных остатков, было проведено моделирование зависимости трансмембранных ионных токов через канал глицинового рецептора от концентрации ионов во внешнем компартменте. В ходе компьютерного эксперимента предполагалось, что концентрация ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Cl}^-$  во внутреннем компартменте была фиксирована и составляла 5 мМ. Внешняя концентрация упомянутых ионов менялась в диапазоне 5 ÷ 120 мМ с шагом 5 мМ. При расчете влияния заряженных аминокислотных остатков на ионный ток внутри канала рецептора были размещены кольца, состоящие из положительных зарядов, соответствующие кольцам аргинина в положениях 0' и 19', и кольцо отрицательных зарядов, соответствующее кольцу остатков аспаргата в положении -5'.

**Рис. 6.** Зависимость ионного тока через канал глицинового рецептора от концентрации ионов во внешнем компартменте А) в канале нет заряженных остатков; Б) в канале присутствуют заряженные остатки.



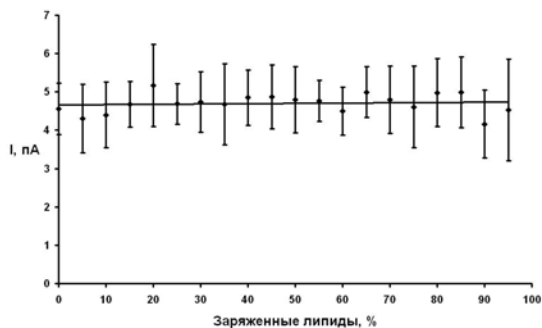
В случае отсутствия заряженных аминокислотных остатков катионный и анионный токи равны в пределах погрешности на всем диапазоне концентраций (Рис. 6А). Однако если в первичной последовательности присутствуют аминокислоты, обладающие зарядом, вид зависимости меняется качественным образом (Рис. 6Б). Амплитуда анионного тока возрастает как по сравнению с катионным, так и в сравнении с анионным током через простую неселективную пору. При концентрации в 5 мМ ток ионов Cl<sup>-</sup> составляет 0.3 пА и линейно возрастает до значения 3.1 пА при концентрации 120 мМ. Следовательно, при физиологическом градиенте концентраций 120 мМ / 5 мМ проводимость канала с заряженными кольцами на порядок превышает проводимость поры с аналогичной геометрией. Таким образом, наличие заряженных аминокислотных остатков в структуре канала не только обеспечивает избирательность по заряду иона, но и многократно увеличивает ток

Изменение плотности распределенных зарядов вокруг канала (увеличения числа отрицательно заряженных липидов) фактически не влияет на величину тока (Рис. 7А). Данный результат обусловлен, прежде всего, тем обстоятельством, что в узкой части канала локализованы очень плотно расположенные отрицательные заряды, осуществляющие роль селективного фильтра и в тоже время создающие поле, затягивающее катионы в просвет канала. В отличие от полученных результатов компьютерных симуляций для калиевого канала, значение трансмембранного хлорного тока для глицинового рецептора убывает с ростом процентного содержания отрицательно заряженных липидов в мембране, и построена зависимость линейна (Рис. 7Б).

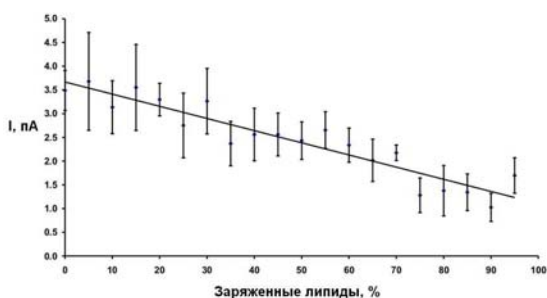


**Таблица 1.** Сравнение экспериментальных значений трансмембранных ионных токов, измеренных для случая калиевого канала *KcsA*, с результатами компьютерной симуляции на основе предложенного алгоритма. Концентрация KCl принималась равной значениям, использованным в экспериментальной системе  $C_{\text{out}}=120$  mM;  $C_{\text{in}}=5$  mM. Результаты компьютерного моделирования представлены в виде  $M \pm SD$  от десяти симуляций.

Величина трансмембранного тока, пА	Ссылка на работу, комментарии
$4,1 \pm 0,12$	Моделирование по предложенному алгоритму с учетом прохождения иона в гидратной оболочке
$4,6 \pm 0,12$	Моделирование по предложенному алгоритму с учетом прохождения иона без гидратной оболочки
$4,5 \pm 0,1$	Экспериментальные данные LeMasurier, 2001



**Рис. 7.** Зависимость ионного тока через изолированный калиевый канал *KcsA* (А) и хлорный канал *GlyR* (Б) при различном процентном соотношении отрицательно заряженных липидов в мембране.



Таким образом, наличие в мембране отрицательно заряженных липидов существенно снижает трансмембранный ток ионов хлора. Причина продемонстрированных различий заключается в неоднородности распределения зарядов в канале. Более координированное поле от близко расположенных отрицательных зарядов в калиевом канале позволяет затаскивать ионы калия вне зависимости от стохастически

расположенных на поверхности мембраны отрицательных зарядов. В то же время удаленные кольца положительных зарядов не справляются с возникшим полем отрицательных зарядов, что приводит к уменьшению вероятности попадания анионов в канал и как следствие к падению суммарного тока.

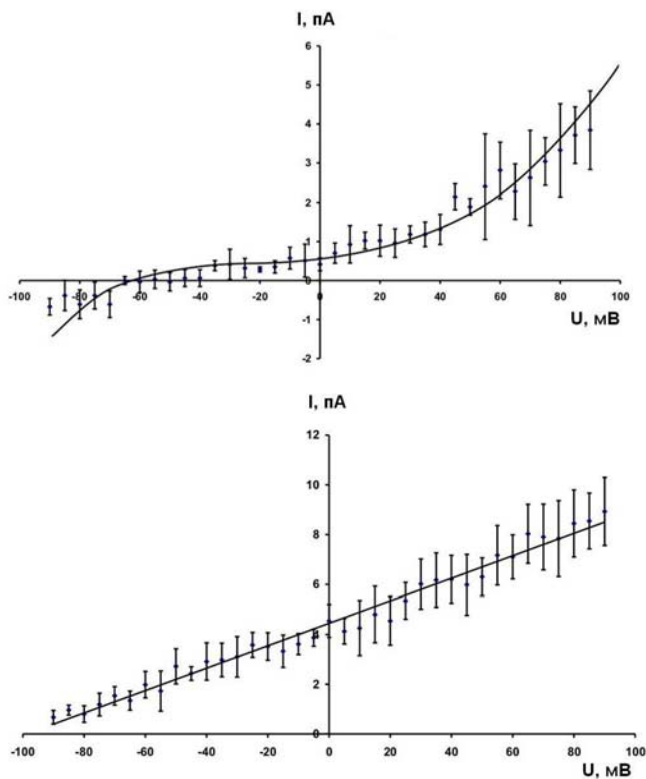
**Таблица 2. Сравнение экспериментальных значений трансмембранных ионных токов, измеренных для случая *GlyR*, с результатами компьютерной симуляции на основе предложенного алгоритма. Концентрация NaCl принималась равной значениям, использованным в экспериментальной системе  $C_{out}=120$  мМ;  $C_{in}=5$  мМ. (А) или  $C_{out}=600$  мМ;  $C_{in}=150$  мМ (Б). Результаты компьютерного моделирования представлены в виде  $M \pm SD$  от десяти симуляций**

Вариант	Величина трансмембранного тока, пА	Ссылка на работу, комментарии
А	3,3±0,18	Моделирование по предложенному алгоритму с учетом прохождения иона <b>в гидратной оболочке</b>
	4,4±0,3	Моделирование по предложенному алгоритму с учетом прохождения иона <b>без гидратной оболочки</b>
	4,7±0,1	Экспериментальные данные Beato, 2004
Б	6,9±0,6	Моделирование по предложенному алгоритму с учетом прохождения иона <b>в гидратной оболочке</b>
	6,3	Экспериментальные данные Bednarczyk, 2002


Ионный ток при отсутствии внешнего потенциала имеет значение 4.7 пА, что полностью соответствует экспериментальным данным. Показано, что при физиологических градиентах концентрации наиболее приближенными к экспериментальным результатам являются симуляции с учетом снятия ионами гидратной оболочки (**Таблица 2**). В этом случае погрешность не превышает 6.5%, по сравнению с 30% для случая проникновения ионов в гидратной оболочке. В то же время, в ситуации достаточно большого «нефизиологического» градиента концентрации результаты симуляции тока с учетом проникновения ионов в гидратной оболочке в канал отклоняются от экспериментальных значений лишь на 9.5%. Таким образом, в случае хлорного канала глицинового рецептора процесс изменения структуры окружения иона при входе в канал играет, по-видимому, большую роль, нежели для калиевого канала.

Параметры ионных токов оцениваются опосредованно через вольтамперные характеристики. По этой причине, как и в предыдущих разделах, была выполнена серия модельных экспериментов для получения вольтамперных характеристик ионного канала глицинового рецептора на основе известных экспериментальных данных. Концентрация NaCl во внешнем и внутреннем компартментах была 120 мМ и 5 мМ соответственно. Для ионного канала без селективного фильтра вольтамперная характеристика имеет классический вид и пересекает ось абсцисс в районе -82 мВ, что соответствует нернстовскому потенциалу при градиенте концентраций 120/5 (Рис. 8А). При наличии селективного фильтра, зависимость приобретает линейный характер (Рис. 8Б). Ионный ток при отсутствии внешнего потенциала имеет значение 4.7 пА, что полностью соответствует экспериментальным данным.

Рис. 8. Вольтамперная характеристика ионного канала *GlyR*: А) без селективного фильтра; Б) с селективным фильтром.



**Таблица 3. Зависимость ионоселективности канала *GlyR* от количества заряженных аминокислотных остатков и их взаимного расположения в селективном фильтре**

Структура селективного фильтра		Ионный ток, пА		S
		$I_{Na^+}$	$I_{Cl^-}$	
Полностью собранный фильтр		0.52±0.09	3.5±0.2	0.74
Один остаток отсутствует		0.48±0.09	1.8±0.2	0.57
Отсутствуют два не соседних остатка		0.40±0.09	1.42±0.13	0.56
Отсутствуют два соседних остатка		0.42±0.06	0.77±0.11	0.30
Отсутствуют три остатка, не являющихся соседними по окружности кольца		0.25±0.06	0.63±0.06	0.43
Отсутствуют три остатка, соседних по окружности кольца		0.29±0.10	0.51±0.10	0.28
Отсутствуют четыре остатка		0.21±0.09	0.35±0.05	0.26
В кольце отсутствуют заряженные остатки		0.34±0.05	0.34±0.08	0.00

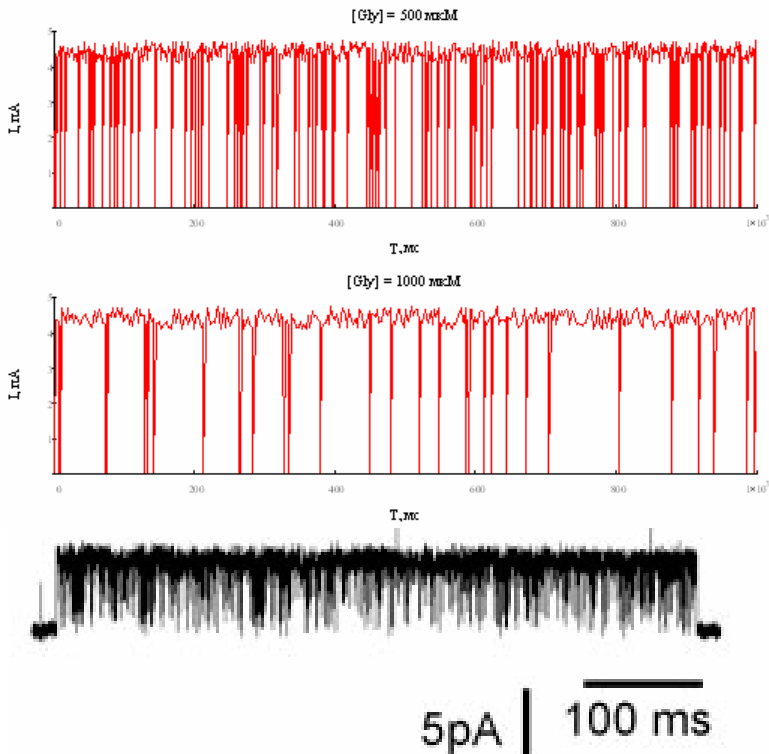
Для оценки относительной избирательной селективности фильтра был введен следующий параметр:  $S = \frac{|I_- - I_+|}{I_- + I_+}$ . Видно, что на относительную

избирательность в существенной степени влияет симметричное расположение заряженных остатков в кольце (**Таблица 3**). При этом симметричность влияет и на абсолютную величину ионного тока. Так, в случае несимметричного расположения трех зарядов относительно центральной оси кольца трансмембранный анионный ток на 46% ниже, чем в случае их симметричного расположения. Таким образом, различное относительное положение субъединиц в условиях наличия или отсутствия в упомянутых положениях зарядов в гетерогенном пентамере глицинового рецептора может приводить не только к структурным, но и к функциональным изменениям свойств данного белка.

На примере глицинового рецептора можно провести оценку реальной симуляции измерения тока в зависимости от времени. В соответствии с предложенным алгоритмом были проведены компьютерные эксперименты,

позволяющие моделировать открытие и закрытие глицинового рецептора при присоединении в его активный сайт агониста (Рис. 9). Несложно видеть, что увеличение концентрации глицина приводит к более длительному времени пребывания рецептора в состоянии с открытым каналом. Данные результаты качественно совпадают с аналогичными зависимостями, полученными в экспериментальных работах.

Рис. 9. Временные характеристики ионных токов через канал *GlyR* для различных концентраций глицина в синаптической щели А) 500 мкМ; Б) 1000 мкМ; В) Экспериментальная характеристика, Beato 2004.



## Выводы

1. Сформулирован оптимизированный алгоритм для описания движения ионов в ограниченном компартменте вблизи поверхности мембраны, основанный на пошаговом решении уравнений Ланжевена. На его основе разработано программное обеспечение, позволяющее моделировать трансмембранные токи при различных градиентах ионов, плотности фиксированных зарядов, а также геометрии ионных каналов.
2. Показано, что снятие гидратной оболочки иона при входе в калиевый канал приводит к увеличению величин трансмембранных ионных токов по сравнению с аналогичным переносом частиц в гидратной оболочке.
3. В ходе компьютерного моделирования получены токовые характеристики для хлорного канала глицинового рецептора, на основе которых показано, что наличие заряженных аминокислотных остатков в полости канала обеспечивает как значительное увеличение анионного тока, так и ионную селективность.
4. Изменение симметричности и величины электрического поля, формируемого заряженными аминокислотными остатками в полости канала глицинового рецептора, приводит к существенному изменению ионных токов, причем их симметричное расположение лучше обеспечивает ионную селективность и избирательную проводимость.
5. На примере хлорного канала глицинового рецептора теоретически обоснована возможность существования ненулевого трансмембранного тока в условиях отсутствия градиента концентрации переносимого иона при условии близкого расположения к входному участку канала неэкранированных зарядов аминокислотных остатков белка.
6. С использованием вероятностного подхода в рамках алгоритма, предложенного в данной работе, создан виртуальный симулятор, позволяющий получить временные зависимости трансмембранных токов через единичный белковый канал.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Boronovsky S.E., Seraya I.P., Nartsissov Ya.R. A Brownian dynamic model of the glycine receptor chloride channel; effect of the position of charged amino acids on ion membrane currents // IEE Proc.-Syst. Biol. 2006. V.153. №5. P.394-397.
2. Boronovsky, S. E., Nartsissov, Y. R. Modeling of single ion channel current by the using of ions motion near the charged membrane surface // In book: Will bottom-up meet top down? 2008. P.25-31.
3. Бороновский С.Е., Нарциссов Я.Р. Электростатическая модель ионного канала глицинового рецептора // Научная сессия МИФИ-2006 Сборник научных трудов. 2006. Т.5. С.158-159.
4. Бороновский С.Е., Нарциссов Я.Р. Влияние геометрии ионного канала на значения трансмембранных токов на примере молекулярно-динамической модели глицинового рецептора // Научная сессия МИФИ-2007 Сборник научных трудов. 2007. Т.5. С.156-158.
5. Бороновский С.Е., Нарциссов Я.Р. Применение броуновской динамики для описания процессов трансмембранного переноса ионов на примере хлорного канала глицинового рецептора // Биофизика. 2009. Т.54. №3. С.448-453.
6. Boronovsky S.E., Nartsissov Ya.R. Probability simulator of enzyme activity and its application to description of transmembrane currents through glycine receptor // In book: Modern trends in Systems biology. Virtual modeling and regulation. 2010. P.113-119.