

На правах рукописи

ЮНУСОВ Руслан Рауфович

**Математическое моделирование процесса
фототрансдукции в палочках сетчатки**

(Специальность: 03.00.02. – биофизика)

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2006

Работа выполнена в Институте биохимической физики
им. Н.М.Эмануэля РАН

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Каламкаров Григорий Рафаэлевич

Официальные оппоненты

Доктор химических наук, профессор

Комиссаров Геннадий Германович

Кандидат физико-математических наук

Яковенко Леонид Владимирович

Ведущая организация: Институт физической химии и электрохимии им. А.Н.
Фрумкина РАН

Защита состоится «21» ноября 2006 года в ____ часов на заседании Диссертационного Совета К 501.001.08 Физического факультета Московского Государственного Университета им. Ломоносова по адресу 119992, ГСП-2, Москва, Ленинские горы, МГУ, физический факультет, аудитория 5-19.

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

Автореферат разослан «20» октября 2006 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

К 501.001.08

Хомутов Г. Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Изучение механизмов сенсорной рецепции обнаружило сходный характер процессов протекающих при преобразовании сигналов различной модальности. Оказалось, что механизмы трансдукции (усиления и десенситизации сигнала) в процессах сенсорной, гормональной и синаптической рецепции в принципе близки.

Во всех этих случаях принимают участие белок-рецептор (белок из семейства G-белков), передающий сигнал на фермент-мишень, белки, осуществляющие десенситизацию (киназы, фосфорилирующие белок-рецептор) и белки из семейства арестинов.

Зрительный пигмент родопсин является классическим белком-рецептором, типичным представителем большого семейства G-белок-связывающих рецепторов. Родопсин явился первым типичным интегральным мембранным белком, первичная, вторичная и третичная структура которого была установлена. Его топография в фоторецепторной мембране (семь трансмембранных столбов) явилась прототипом всех известных в настоящее время G-белок-связывающих рецепторов. Принципиальным отличием родопсина от рецепторов других модальностей является то, что вместо сигнальной молекулы (гормон, нейромедиатор, одорант) в этом случае выступает квант света. Однако общие молекулярные механизмы рецепций различных модальностей достаточно близки. Поэтому успехи в понимании молекулярных механизмов взаимодействия ключевых белков фототрансдукции – родопсина, G-белка, родопсиновой киназы и арестина – открывают реальную возможность для подобного рода исследований в отношении молекулярных механизмов трансдукции других модальностей.

Важно отметить что, при описании сложных биохимических систем, начиная с некоторого момента описание лишь отдельных этапов перестает быть информативным для понимания общей картины. Учитывая то, что в последние годы накопилось большое количество новых данных относительно детальных молекулярных механизмов, обеспечивающих процесс фототрансдукции, представляется весьма актуальным их обобщение в рамках кинетической математической модели. С одной стороны это может позволить получить более глубокое понимание системы взаимосвязей в процессах сигнальной трансдукции. С другой стороны математическая модель позволяет свести воедино экспериментальные данные, полученные различными методами и проверить их на противоречивость друг другу.

Целью работы являлось изучение вопроса о том, позволяют ли известные экспериментальные данные адекватно описать как процесс фототрансдукции, так и процесс световой адаптации в палочках сетчатки.

Для достижения поставленной цели в диссертационной работе решались следующие задачи:

- ✓ по возможности наиболее полно обобщить имеющиеся на сегодняшний день представления о молекулярных механизмах, обеспечивающих процесс фототрансдукции в палочках сетчатки;
- ✓ найти критические этапы, оказывающие наиболее существенное влияние на кинетику одиночных фотоответов темноадаптированной палочки;
- ✓ рассмотреть вопрос о том, вписываются ли новые экспериментальные данные о скорости активации трансдуцина в сложившуюся ранее молекулярную схему каскада фототрансдукции;
- ✓ рассмотреть вопрос о возможности адекватного описания на основе сложившейся биохимической картины фототрансдукции, не только одиночных фотоответов, но и адаптационных процессов, протекающих при включении фонового освещения;
- ✓ выявить молекулярные процессы, имеющие определяющее значение для формирования световой адаптации в палочках сетчатки.

Научная новизна результатов исследования

1. На основе последних экспериментальных данных построена наиболее полная математическая модель, описывающая кинетику каскада фототрансдукции.
2. Впервые в модельных экспериментах показано, что в регуляции активности гуанилатциклазы участвуют оба кальций связывающих центра GСАР-белков и проведена оценка значений неизвестных констант скоростей реакций каскада фототрансдукции.
3. Показана определяющая роль кальциевой регуляции активности родопсина в процессе обеспечения световой адаптации.

Научно-практическая значимость результатов работы

Полученная в работе математическая модель позволяет изучать поведение палочки сетчатки в широком интервале освещенностей: от одиночных вспышек в темноте, до процессов при ярком фоновом освещении. Полученные в работе результаты (в том числе

определение критических этапов процесса трансдукции) могут быть применены при изучении процессов рецепции других модальностей.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Построена математическая модель, позволившая обобщить современные представления о молекулярных механизмах фототрансдукции.
2. Определены критические этапы, определяющие кинетику одиночных фотоответов темноадаптированной палочки.
3. Показано, что учет в математической модели последних экспериментальных данных о скорости активации трансдуцина, не требует пересмотра общей схемы каскада трансдукции.
4. Показано что определяющую роль в обеспечении адаптационных процессов играют механизмы кальциевой регуляции активности родопсина.

Апробация работы

Результаты исследований доложены на VIII Всероссийской школе молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии» прошедшей в 2001 году в Казани и на ежегодной молодежной конференции ИБХФ РАН-ВУЗы "Биохимическая физика" в 2002 году.

По материалам диссертации опубликовано 3 статьи и 1 тезис.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Диссертация состоит из введения, шести глав, заключения, выводов, списка литературы и трех приложений. Работа изложена на 140 страницах и включает 23 рисунка. Список литературы включает 127 источников, в том числе 122 источника опубликованных в зарубежных изданиях.

Во введении кратко изложено сравнение фоторецепции со схожими механизмами передачи сигналов других модальностей и обоснована актуальность темы диссертации.

В главе «Литературный обзор» содержится анализ научных работ по теме диссертации. В первой части литературного обзора обобщены современные представления о процессе фототрансдукции: описаны молекулярные механизмы обеспечивающие усиление первичного сигнала, а также изложены механизмы обратной регуляции, позволяющие вернуть рецепторную клетку в начальное состояние.

Во второй части литературного обзора рассмотрены известные на сегодняшний день математические модели, описывающие кинетику молекулярных процессов фототрансдукции.

В главе «Постановка задачи» на основе анализа современных литературных источников показано, что в последние годы, с одной стороны были обнаружены новые дополнительные механизмы молекулярной регуляции процесса фототрансдукции, кинетика которых пока не была исследована в рамках математических моделей, а с другой стороны альтернативными методами были получены новые данные о кинетике одного из ключевых этапов фототрансдукции (активации трансдуцина), сильно расходящиеся с предыдущими результатами. В свете этих данных построение математической кинетической модели, обобщающей наиболее полным образом все современные данные о молекулярных механизмах фототрансдукции, представляется весьма актуальной задачей. В соответствие с выше сказанным, в данной главе были поставленные цели проведенного научного исследования.

Моделирование процесса фототрансдукции темноадаптированной палочки при предъявлении одиночных вспышек

Данная глава посвящена построению математической модели описывающей кинетику одиночных фотоответов адаптированной к темноте палочки сетчатки. В силу кинетических особенностей рассматриваемой системы, а именно сильного различия во временах активации (занимает десятки миллисекунд) и восстановления фотоответа (длится несколько секунд), теоретическое рассмотрение фототрансдукции допустимо проводить последовательно. Поэтому на первом этапе было проведено построение модели описывающей только процесс генерации фототоответа, а затем первоначальная система была дополнена реакциями, обеспечивающими восстановительные процессы.

Активация

Фототрансдукция – это процесс передачи и усиления сигнала, который обеспечивается каскадом внутриклеточных реакций (рис. 1).

Первым звеном в цепочке передачи зрительного сигнала является пигментный белок родопсин, который при поглощении кванта света переходит в активную форму. Конформационно измененный родопсин активирует следующий белок цепи – трансдуцин, данный процесс включает пять реакций. В результате каталитического характера

активации трансдуцина на данном этапе фототрансдукции достигается многократное – в сотни раз – усиление исходного сигнала. На следующем этапе активированный трансдуцин связываясь с фосфодиэстеразой образует комплекс, который обладает способностью к ферментативному гидролизу циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) до гуанозинмонофосфата (ГМФ). В результате внутриклеточная концентрация цГМФ быстро падает. На данном этапе также обеспечивается дополнительное (до 1000 раз) усиление сигнала. Уменьшение внутриклеточной концентрации цГМФ приводит к закрытию цГМФ чувствительных ионных каналов, локализованных в клеточной мембране. Это приводит к гиперполяризации клеточной мембраны, что и является фазой активации фотосовета.

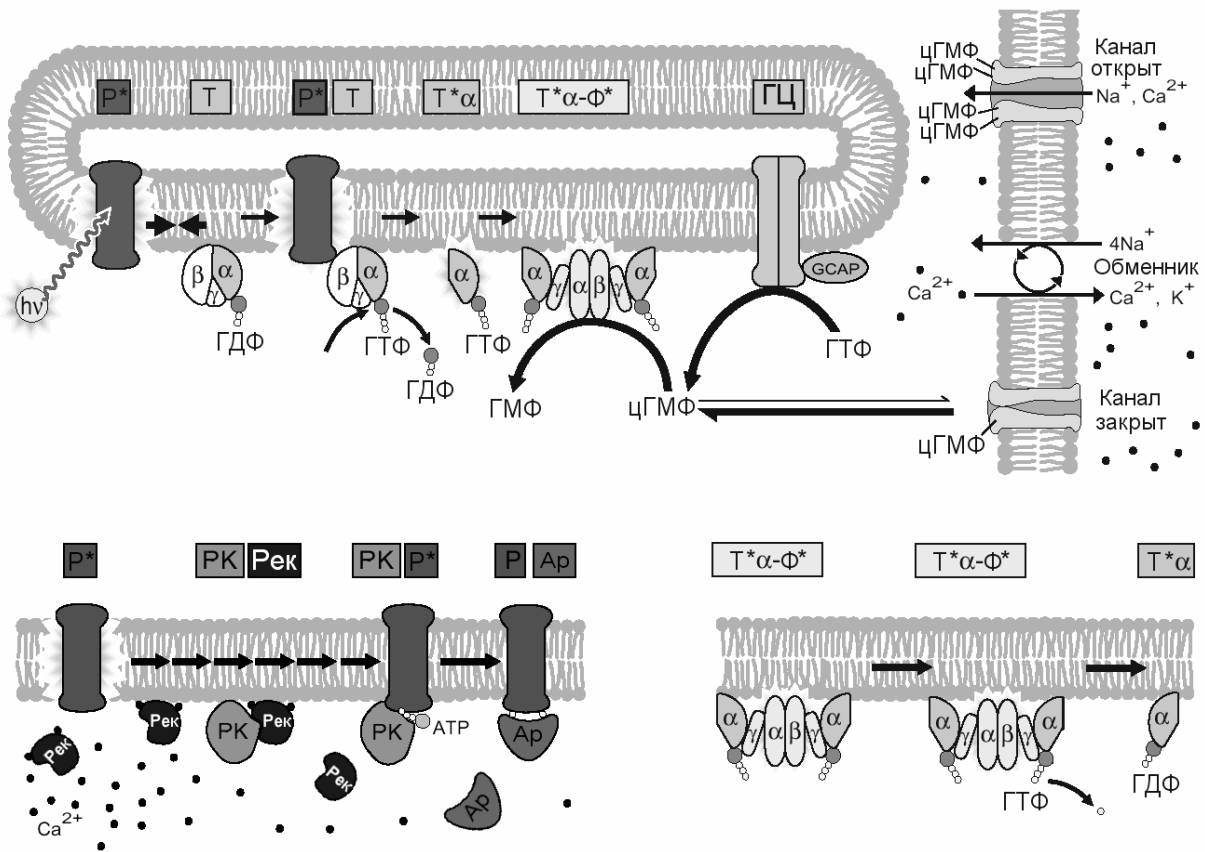


Рис.1. Схема каскада фототрансдукции. Обозначения: Р – родопсин, Т – трансдуцин, Φ – фосфодиэстераза, ГЦ – гуанилатциклаза, РК – родопсинкиназа, Ар – арестин, Рек - рековерин.

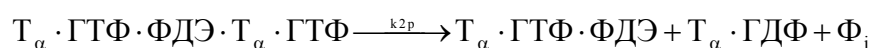
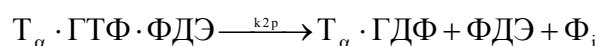
Фаза восстановления фототоответа

После генерации фотоответа зрительный рецептор должен вернуться к исходному темновому состоянию. Для этого необходимо, чтобы цГМФ-чувствительные каналы перешли обратно в открытое состояние, что в свою очередь требует восстановления темнового значения концентрации цГМФ.

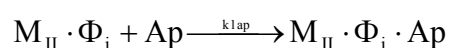
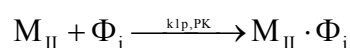
Это обеспечивается, с одной стороны, за счет кальций-зависимого усиления работы гуанилатциклазы. Закрытие цГМФ-зависимых каналов не позволяет поступать кальцию в клетку, что приводит к снижению его концентрации в цитоплазме, и соответственно к ускорению работы гуанилатциклазы.

С другой стороны, необходимо «выключить» активные формы фосфодиэстеразы и родопсина.

Первый процесс обеспечивается ГТФ-азной активностью трансдуцина:



Второй процесс обеспечивается кальций-зависимой инактивацией метародопсина II. Активный родопсин последовательно фосфорилируется родопсинкиназой, причем активность родопсинкиназы регулируется внутриклеточной концентрацией кальция: при уменьшении $[Ca^{2+}]$ процесс фосфорилирования родопсина ускоряется. Далее фосфорилированная форма родопсина связывается с белком арестином, который при этом блокирует каталитические центры родопсина.



Построение математической модели

Хотя сами реакции активации фотоответа определены, константы скоростей для некоторых из них неизвестны (k_2 , k_4 , k_6 – три этапа взаимодействия родопсина с трансдуцином, k_7 , k_8 – взаимодействие трансдуцина с фосфодиэстеразой). Для оценки значений неизвестных констант в работе использовался следующий подход. Представленные в литературе данные, полученные методом светорассеяния в реконструированных системах («сигнал диссоциации» и «сигнал ФДЭ»), позволяют наблюдать кинетику двух промежуточных продуктов фототрансдукции. Используя эти данные, в диссертационной работе была проведена оценка неизвестных констант:

- ✓ на основе «сигнала диссоциации» были определены константы k_2, k_4, k_6 ;
- ✓ на основе «сигнала ФДЭ» были определены константы k_7, k_8 .

Дальнейшее упрощение модели касалось фазы восстановления фототока. Так, экспериментальное изучение кинетики фототоков показало, что фазу восстановления фототока можно довольно точно описать одноэкспоненциальной кривой $f(t) = e^{-t/\tau}$. Параметр τ в показателе экспоненты был назван «временной доминантой». Одноэкспоненциальная кинетика характерна для химических реакций первого порядка. Таким образом, форма фазы восстановления фототока определяется одной лимитирующей реакцией. По литературным данным, ключевым этапом, определяющим фазу восстановления фототока, является процесс инактивации родопсина. Причем, связывание родопсина с арестином протекает намного быстрее, чем его фосфорилирование. Таким образом, можно считать, что «временная доминанта» характеризует процесс фосфорилирования родопсина и соответствует значению константы $k_{1p} = 1/\tau$. Рассмотрение экспериментальных кривых фазы восстановления фототока позволило получить значение $\tau = 2.4$ сек.

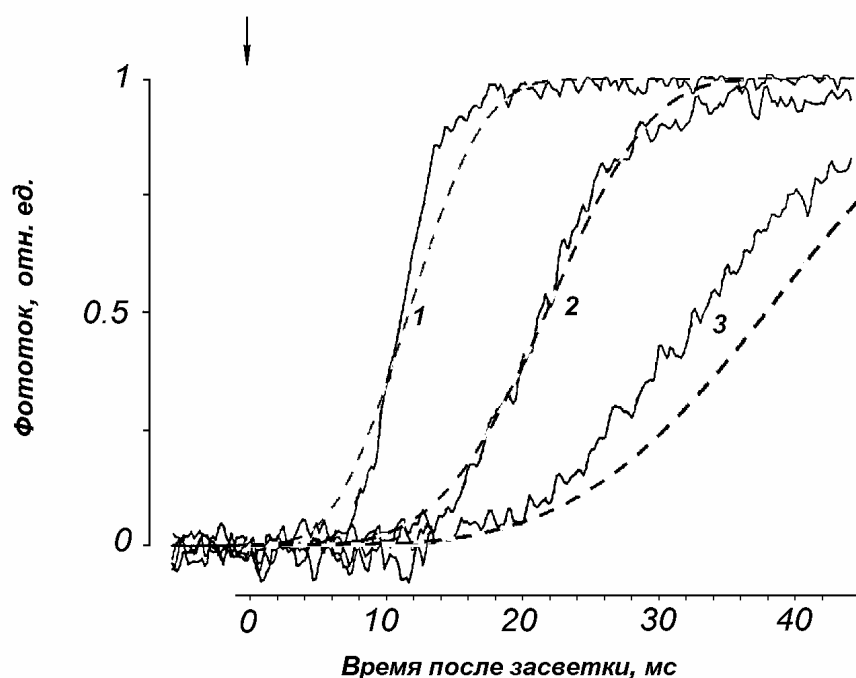


Рис.2. Моделирование фазы активации фототока палочки сетчатки. Сплошные линии – экспериментально измеренные фототоки (по данным работы (Pugh and Lamb, 1990)), штриховые линии – теоретически рассчитанные кривые фототоков. Стрелкой обозначен момент световой вспышки. Засветка вызывает активацию: 10^{-1} (1), 10^{-3} (2), 10^{-4} (3) молекул родопсина. Теоретическое решение получено на основе данных по светорассеянию.

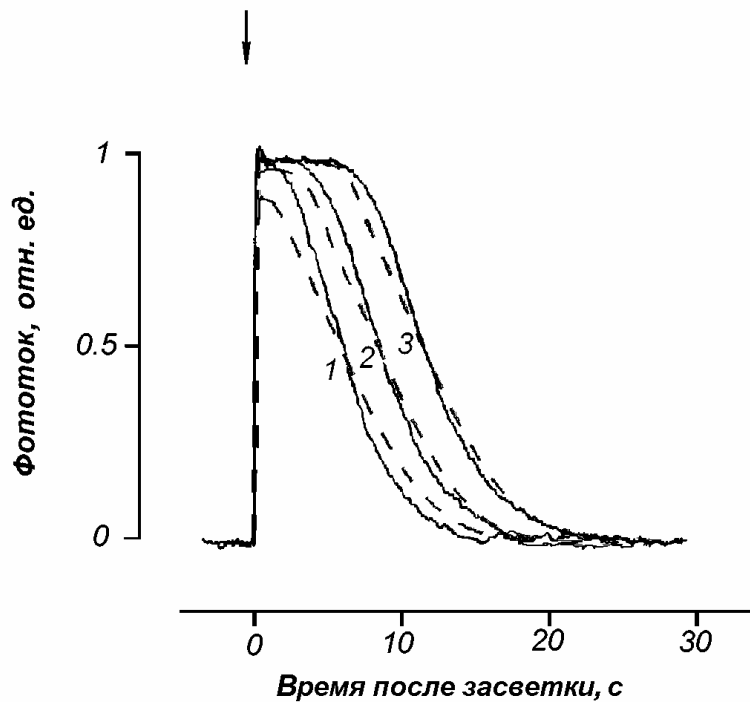


Рис.3. Моделирование фазы восстановления фотоответа палочки сетчатки. Сплошные линии – экспериментально измеренные фототоки (по данным работы (Schleicher et. al., 1989)), штриховые линии – теоретически рассчитанные кривые фототоков. Стрелкой обозначен момент световой вспышки. Засветка вызывает активацию: $2.5 \cdot 10^{-6}$ (1), $8 \cdot 10^{-6}$ (2), $2.5 \cdot 10^{-5}$ (3) молекул родопсина. Теоретическое решение получено на основе данных по светорассеянию.

Таким образом, после оценки значений всех неизвестных параметров в диссертационной работе была построена система дифференциальных уравнений описывающая как активацию, так и восстановление фотоответа. Решение данной системы было получено численно с использованием метода Эйлера.

Теоретически рассчитанное решение обеспечило близкое совпадение с экспериментальными фототоками в широком интервале засветок (рис. 2 и 3). Таким образом, построенная модель (с константами, полученными на основе сигналов светорассеяния) позволяет в целом адекватно описать кинетику процесса фототрансдукции темно адаптированной палочки в ответ на одиночные вспышки.

Определение критических этапов кинетики процесса фототрансдукции

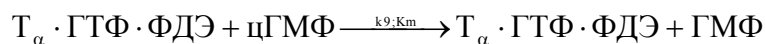
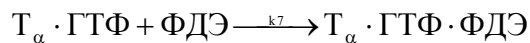
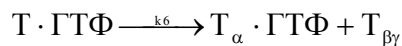
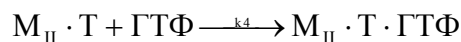
В данной главе было проведено исследование процесса активации фотоответа на предмет выявления критических реакций. Активация фотоответа в палочках сетчатки

представляет собой сложную последовательность биохимических реакций, в которой сочетаются как линейные этапы, так и процессы усилительного характера:

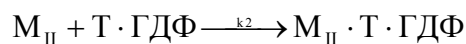
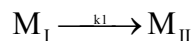
- ✓ во-первых, каждая молекула возбужденного родопсина каталитически активирует некоторое количество молекул трансдуцина;
- ✓ во-вторых, активная форма фосфодиэстеразы также каталитически гидролизует молекулы циклического ГМФ.

В рамках данного исследования было проведено несколько серий теоретических расчетов. Внутри каждой серии варьировалось значение одной из кинетических констант, характеризующих скорость протекания соответствующей реакции, и наблюдалось расхождение получаемых кривых фототока от рассчитанных изначально. В качестве количественного параметра, характеризующего различие между двумя кривыми, использовалось время достижения полумаксимальной амплитуды фототока (время на половине высоты кривой ($T_{1/2}$)).

Сводные результаты по влиянию рассмотренных кинетических параметров на общую кинетику фототрансдукции представлены на рис.4-5. Как видно из представленных данных, построенная модель оказалась наиболее чувствительной к изменению скорости реакций:



Некоторое влияние на общую кинетику оказывают изменения скоростей реакций:



причем, влияние этих реакций несимметрично. Варьируя данные константы можно добиться лишь замедления кинетики фототока, но не ее ускорения. Это свидетельствует о том, что скорость протекания данных реакций достаточно высока, чтобы не вносить заметных задержек в процесс активации фотоответа.

Остальные реакции, составляющие фазу активации фотоответа, не оказывают значимого влияния на общие кинетические параметры системы фототрансдукции.

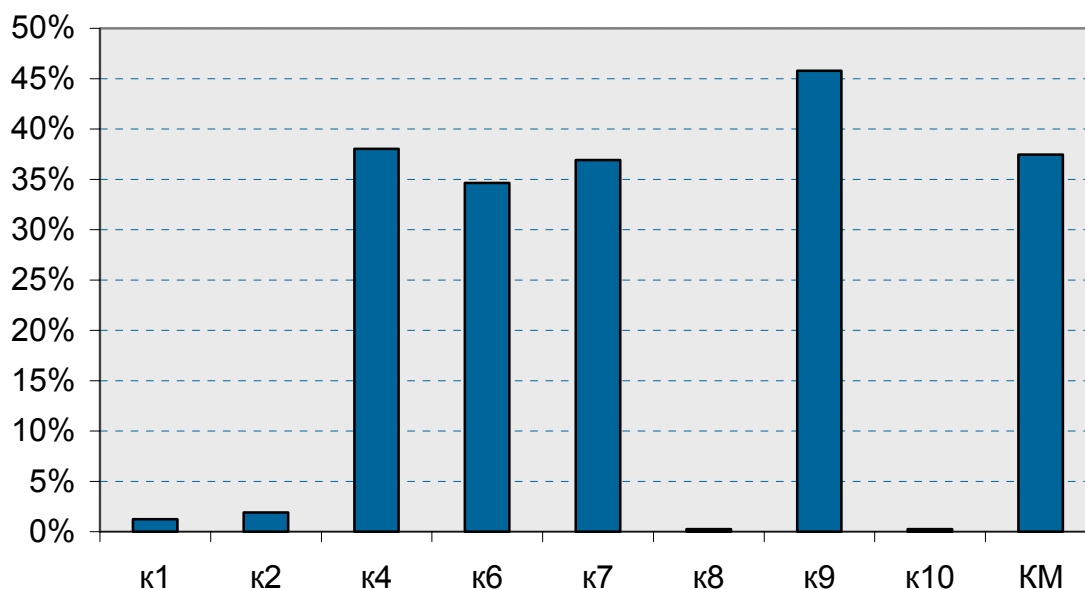


Рис.4. Уменьшение времени на «полувысоте» фототока (по отношению к стандартному), при увеличении значений констант скоростей реакций в 10 раз (константа K_M была уменьшена в 10 раз, т.к. ее действие имеет обратное направление влияния).

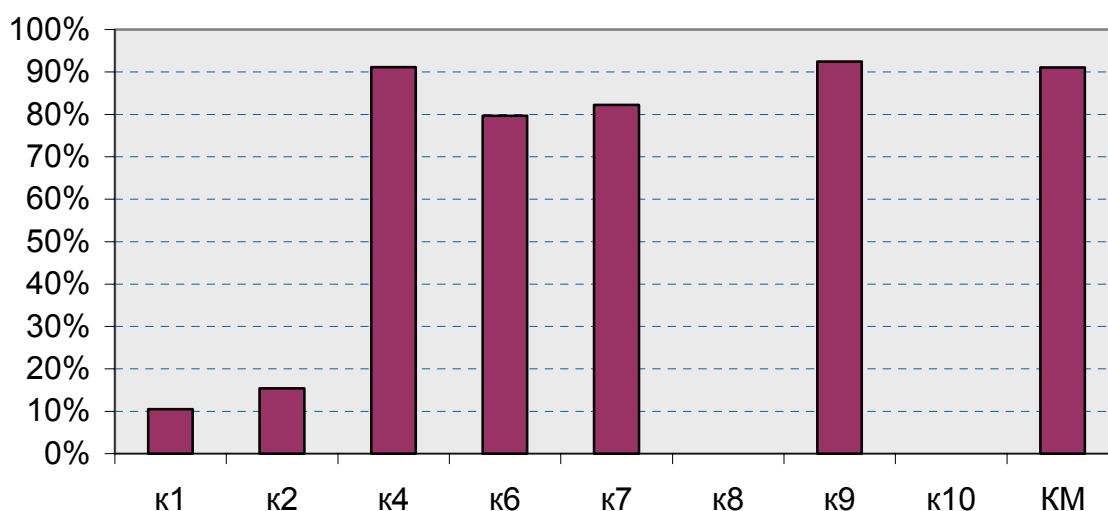


Рис. 5. Увеличение времени на «полувысоте» фототока (по отношению к стандартному), при уменьшении значений констант скоростей реакций в 10 раз (константа K_M была увеличена в 10 раз, т.к. ее действие имеет обратное направление влияния).

Построение модели при использовании констант, полученных альтернативными методами

В последние годы появились данные о кинетике фототрансдукции, полученные в экспериментах с использованием радиоактивного негидролизующего аналога ГТФ

(ГТФγS), при этом скорость активации трансдуцина полученная таким способом (150 сек^{-1} на 1 молекулу возбужденного родопсина) сильно отличалась от результатов экспериментов по светорассеянию ($\sim 1000 \text{ сек}^{-1}$). Таким образом, возник вопрос – насколько критично такое сильное снижение скорости активации трансдуцина для адекватного описания фототока? Для ответа на данный вопрос в диссертационной работе было проведено варьирование констант скоростей реакций в физиологически допустимых пределах, таким образом, чтобы скорость активации трансдуцина была равна 150 сек^{-1} , но кинетика фототока оставалась такой же, как и ранее, т.е. удовлетворяла электрофизиологическим наблюдениям.

Первая часть задачи – понижение скорости активации трансдуцина – сводится к рассмотрению последовательности пяти реакций взаимодействия родопсина с трансдуцином. Проведенный анализ показал, что замедление активации трансдуцина до 150 сек^{-1} можно обеспечить за счет изменения значений констант k_2 и k_4 (два этапа каталитической активации трансдуцина родопсином). Для этого необходимо, чтобы либо $k_2=0.22 \text{ (сек}\cdot\mu\text{M)}^{-1}$, либо $k_4=4.2\cdot 10^{-2} \text{ (сек}\cdot\mu\text{M)}^{-1}$, вместо значений $k_2=69 \text{ (сек}\cdot\mu\text{M)}^{-1}$, $k_4=1.1 \text{ (сек}\cdot\mu\text{M)}^{-1}$, полученных на основе данных по светорассеянию.

Вторым этапом было проведено рассмотрение возможности компенсации снижения скорости активации трансдуцина. Проведенный анализ показал, что такую компенсацию можно обеспечить за счет увеличения скорости работы фосфодиэстеразы. Исследование модели обнаружило, что увеличение констант скоростей реакций k_7 и k_8 (реакции взаимодействия трансдуцина и фосфодиэстеразы) не позволяет добиться необходимого результата. Поэтому увеличить скорость гидролиза цГМФ можно только за счет увеличения частоты оборота фосфодиэстеразы или за счет уменьшения значения константы Михаэлиса. При этом частота оборота фосфодиэстеразы, использованная в первой модели ($k_9 = 2600 \text{ сек}^{-1}$, $k_{10} = 2900 \text{ сек}^{-1}$), и так является очень высокой для ферментов этого семейства, поэтому ее увеличение в модели представляется нефизиологичным. С другой стороны, экспериментальные данные имеют достаточно широкий разброс значений при оценке константы Михаэлиса. Проведенное варьирование константы Михаэлиса показало, что необходимое значение K_m равно $1 \mu\text{M}$ (вместо $K_m=40 \mu\text{M}$ в первоначальной модели), которое укладывается в представленные в литературе оценки.

Кроме представленного выше, существует еще один путь увеличения эффективности гидролиза – это изменение буферной силы цитоплазмы для цГМФ. В предыдущем рассмотрении значение буферной силы было равно 2. Очевидно, что уменьшение буферной силы будет эквивалентно некоторому увеличению скорости гидролиза цГМФ

фосфодиэстеразой. Минимальное физиологическое значение буферной силы равно единице. Однако даже этот минимум не способен сам по себе компенсировать уменьшение скорости активации трансдуцина. Проведенное моделирование показало, что для $BP=1$ значение константы Михаэлиса должно быть равно $5 \mu\text{M}$ (что все равно существенно меньше $40 \mu\text{M}$ – значения, использовавшегося в первоначальной модели).

На рис.6 проведено сравнение двух теоретических кривых. Сплошной линией представлена кривая, полученная в первой модели (на основе экспериментов по светорассеянию), штриховая кривая соответствует второй модели (исходя из скорости активации трансдуцина на основе исследований с использованием ГТФγS).

Таким образом, проведенные теоретические расчеты показали, что даже если принять, что скорость активации трансдуцина на порядок меньше, чем предполагалось ранее, это не ставит под сомнение всю кинетическую схему процесса фототрансдукции. Более низкое значение K_m для фосфодиэстеразы вполне может компенсировать предполагаемое замедление скорости предыдущих реакций. При этом такое значение K_m не выходит из пределов экспериментально полученных значений.

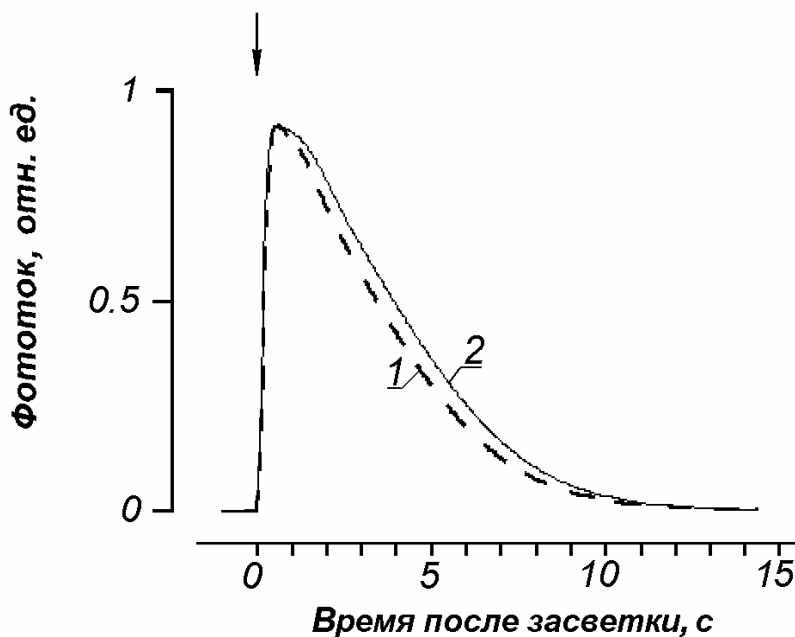


Рис. 6. Сравнение двух альтернативных решений кинетической модели. 1 – теоретический фототок, полученный на основе экспериментов с применением радиоактивного ГТФγS, 2 – теоретический фототок, рассчитанный на основе экспериментов по светорассеянию. Стрелкой обозначен момент световой вспышки. Засветка вызывает активацию 10^{-7} молекул родопсина.

Моделирование адапционных процессов

В данной главе было проведено исследование адапционных процессов проходящих в палочке сетчатки при включении фонового освещения. К адапционным относятся биохимические реакции, обеспечивающие снижение чувствительности при повышении уровня освещения. На сегодняшний день точно установлено, что основным регулятором адапционных процессов является внутриклеточная концентрация кальция. Однако при этом дискуссионным остается вопрос – можно ли только на основе известных механизмов адекватно описать как одиночные фотоответы, так и процесс световой адаптации. Часть авторов дает положительный ответ на данный вопрос, тогда как другие считают необходимым введение дополнительных неизвестных сегодня механизмов.

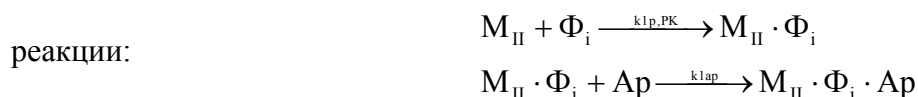
Для ответа на данный вопрос, в диссертационной работе первоначальная математическая модель была дополнена с учетом последних экспериментальных данных о кальциевой регуляции в палочках сетчатки. Кроме того, в данной главе был рассмотрен вклад отдельных стадий каскада фототрансдукции в обеспечение световой адаптации.

Восстановление темнового фототока определяется в палочке тремя этапами – дезактивацией родопсина и фосфодиэстеразы, а также ускорением синтеза цГМФ гуанилатциклазой. Однако из литературных данных известно, что дезактивация фосфодиэстеразы протекает достаточно быстро, и поэтому не оказывает заметного влияния на общую кинетику фототрансдукции. Таким образом, для моделирования процессов световой адаптации были учтены молекулярные процессы, обеспечивающие дезактивацию родопсина и ускорение работы гуанилатциклазы.

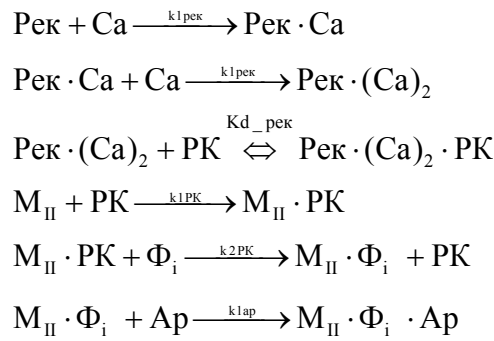
Деактивация родопсина.

Процесс дезактивации родопсина в палочках сетчатки носит многоступенчатый характер, который протекает с участием трех белков: родопсинкиназы, рековерина и арестина, причем рековерин играет роль кальций чувствительного сенсора.

Для учета кальций зависимого процесса инактивации родопсина, в первоначальную математическую модель были внесены следующие изменения:



были заменены на реакции:



Регуляция активности гуанилатциклазы

Первоначально скорость синтеза цГМФ учитывалась известной из литературы эмпирической зависимостью:

$$v_{\Gamma \text{ Ц}} = \frac{v_{\Gamma \text{ Ц}}_{\text{макс}}}{1 + \left(\frac{[\text{Ca}^{2+}]}{K_{\text{Ca}}} \right)^2}.$$

При рассмотрении видно, что эта формула обладает рядом существенных недостатков.

- ✓ во-первых, при $[\text{Ca}^{2+}] \rightarrow \infty$ скорость синтеза цГМФ стремится к нулю. Но из экспериментальных данных следует, что при повышении концентрации кальция скорость синтеза стремится к некоторому отличному от нуля значению (рис. 20);
- ✓ во-вторых, представленная зависимость не учитывает опосредованный характер активации гуанилатциклазы;
- ✓ в-третьих, в данном представлении реакции регулирующие скорость работы гуанилатциклазы учитываются как мгновенные.

В силу этого, в данной главе был осуществлен переход от эмпирической зависимости к моделированию детальных молекулярных механизмов.

Молекула гуанилатциклазы представляет собой трансмембранный белок, локализованный в виде димеров в фоторецепторных дисках. Скорость работы гуанилатциклазы регулируется концентрацией внутриклеточного кальция, опосредованно через модуляторные белки (GCAP1 и GCAP2). Каждая молекула GCAP-белка имеет по два центра связывания ионов кальция, причем до конца неясно оба ли из них задействованы в процесс регуляции каталитической активности гуанилатциклазы. В диссертационной работе были смоделированы оба из этих вариантов. Сравнение с экспериментальными данными (рис. 7) четко указывает на то, что в регуляторном процессе участвуют оба кальций связывающих центра.

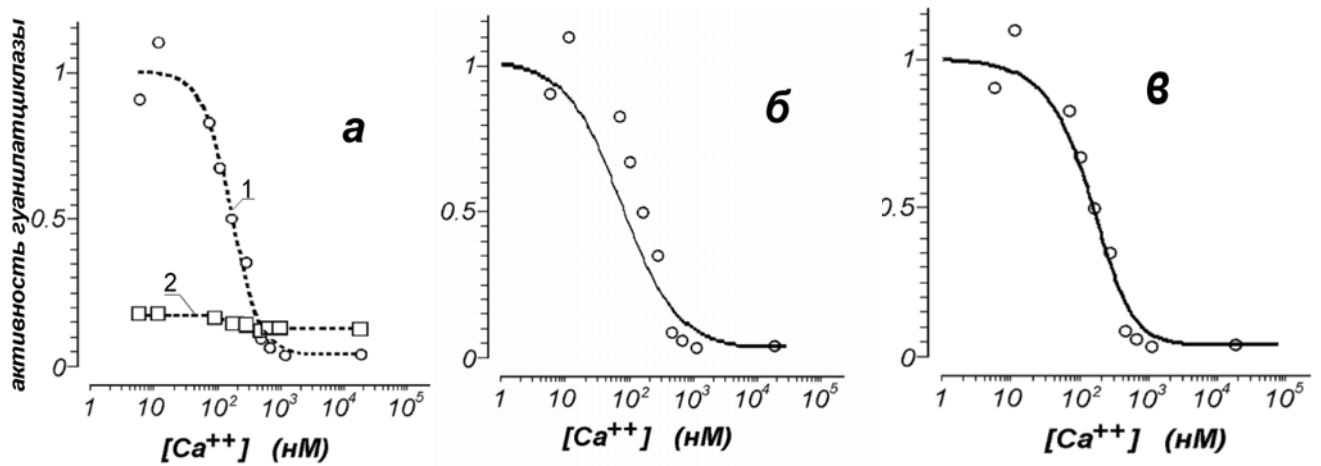


Рис.7. Активность гуанилатциклазы в зависимости от концентрации Ca^{2+} . а – экспериментальные данные активности гуанилатциклазы в присутствии (1) и в отсутствие (2) GСАР-белков (Dizhoor et. al., 1998); активность гуанилатциклазы, теоретически рассчитанная в рамках модели, учитывающей регуляцию посредством одного (б) и двух (в) кальций-связывающих центров GСАР-белков.

Дополненная детальными биохимическими процессами кальциевой регуляции модель тестировалась как в условиях одиночных вспышек, так и при включении фонового освещения. Сравнение теоретических и экспериментальных кривых показало, что за счет известных механизмов кальциевой регуляции можно адекватно описать процессы фототрансдукции (в том числе и при фоновом свете), не используя при этом искусственные подгоночные механизмы.

Роль отдельных механизмов в обеспечении адаптационных процессов

Для изучения вопроса об относительном вкладе рассмотренных выше механизмов, было проведено раздельное моделирование регуляции активностей родопсина и гуанилатциклазы. Проведенный анализ показал, что вклад двух основных процессов, обеспечивающих восстановление фотоответов, далеко не равнозначен (рис.). Так учет молекулярных процессов регуляции активности гуанилатциклазы, практически не изменил кинетических характеристик первоначальной математической модели, и соответственно не позволил правильно описать основные качественные характеристики кинетики адаптационных процессов. Учет в модели кальций зависимой регуляции времени жизни активного родопсина привел к кардинальным изменениям поведения всей системы в целом, причем обнаруженные изменения совпадали с наблюдающимися экспериментально процессами световой адаптации. Таким образом, построенная модель позволила считать основным механизмом, обеспечивающим световую адаптацию, процесс опосредованной реверсином кальций зависимой регуляции активности родопсина.

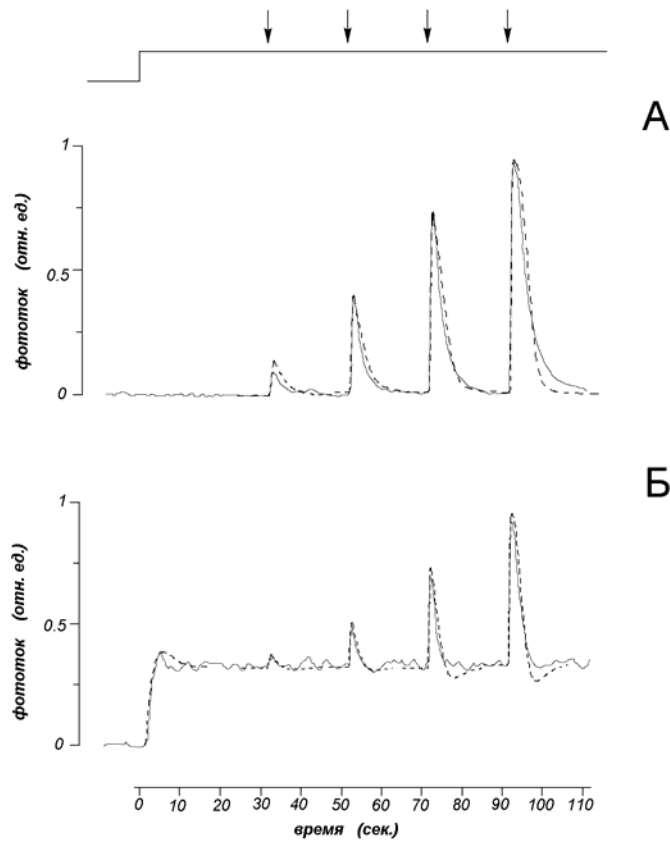


Рис.8. Фотоответы адаптированной к темноте (а) палочки сетчатки и при включении фонового освещения (б).

Сплошные линии соответствуют экспериментально измеренным фототокам (Fain et. al., 2001), штриховые представляют собой теоретически рассчитанные фототоки.

Стрелками обозначены моменты предъявления световых вспышек, ступенькой обозначен момент включения фонового освещения (только для б). Интенсивность вспышек последовательно возрастала: 1.1 фотон/ $\mu\text{км}^2$; 4.7 фотон/ $\mu\text{км}^2$; 15.5 фотон/ $\mu\text{км}^2$; 53.7 фотон/ $\mu\text{км}^2$. Интенсивность фонового освещения составляла 1.7 фотон/ $(\mu\text{км}^2 \cdot \text{сек})$.

Заключение

В представленной работе было произведено обобщение известных на сегодняшний день экспериментальных данных о механизмах фототрансдукции в рамках математической кинетической модели.

В последние годы были уточнены детальные механизмы процесса фототрансдукции. Так, были обнаружены конкретные белки, осуществляющие кальциевую регуляцию в палочках сетчатки (рековерин, GСАР-белки). Их учет в математической модели позволил

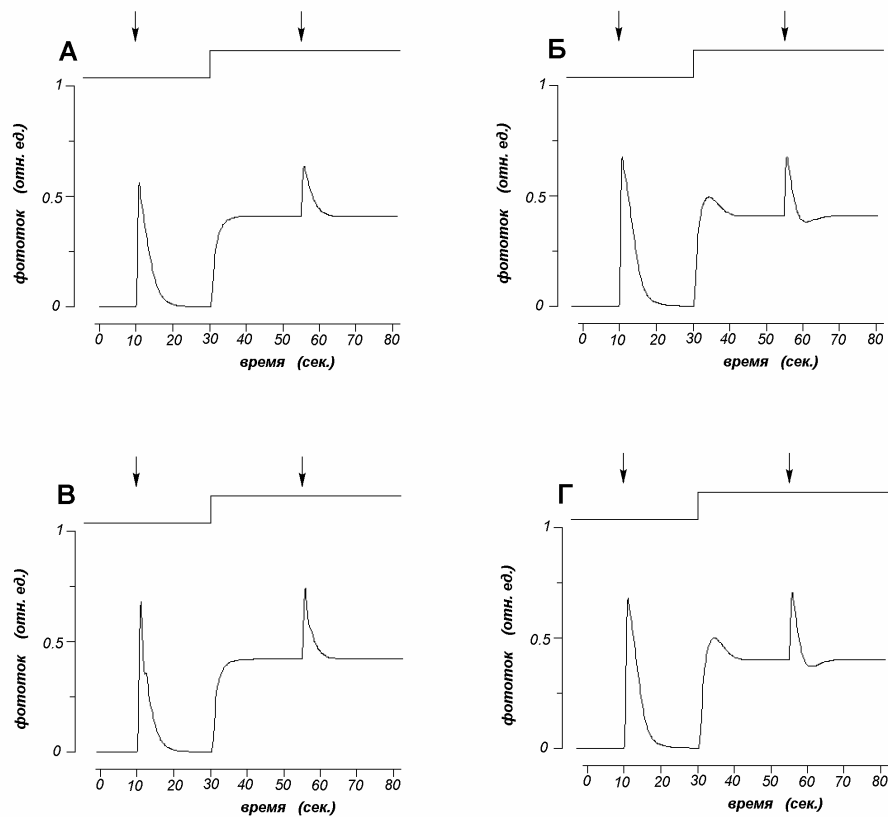


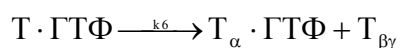
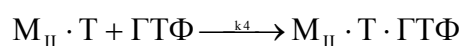
Рис.9. Моделирование адапционных процессов с учетом молекулярных механизмов регуляции времени жизни родопсина и активности гуанилатциклазы.

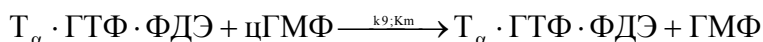
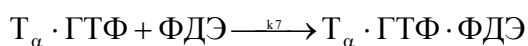
а – эмпирическое описание как регуляции активности родопсина, так и гуанилатциклазы; *б* – учет молекулярных механизмов регуляции активности родопсина, активность гуанилатциклазы в виде эмпирической зависимости; *в* – активность родопсина в виде эмпирической зависимости и учет молекулярных механизмов регуляции активности гуанилатциклазы; *г* – учет молекулярных механизмов регуляции активности родопсина и гуанилатциклазы.

Стрелкой обозначен момент предъявления световых вспышек, ступенькой обозначен момент включения фонового освещения. Вспышки вызывали активацию: $2 \cdot 10^{-8}$ от общего количества родопсина. Фоновое освещение вызывало активацию $5.3 \cdot 10^{-9}$ от общего количества родопсина в секунду.

получить адекватное описание кинетики одиночных фотоответов темноадаптированной палочки сетчатки в широком интервале интенсивностей засветок.

Проведенный анализ построенной модели позволил выделить критические реакции, скорость протекания которых определяет кинетическое поведение системы в целом. Так для фазы активации фотоответа определяющими оказались реакции:





Кинетика фазы восстановления фотоответа определяется в основном временем выключения родопсина.

В представленной работе также был рассмотрен вопрос о достаточности известных на сегодня механизмов фототрансдукции для описания не только одиночных фотоответов, но и обеспечения адаптационных процессов. Проведенное рассмотрение позволило дать положительный ответ на данный вопрос. Изучение вклада отдельных процессов в обеспечение световой адаптации позволило считать, что определяющим процессом здесь является кальций зависимая инактивация родопсина.

Кроме того, в представленной модели был рассмотрен вопрос о противоречивых оценках скорости активации трансдуцина родопсином, полученных различными методами. Проведенный анализ показал, что, несмотря на сильное отличие новых оценок от предыдущих, их учет в общей кинетической модели позволяет также получить адекватное описание наблюдаемых экспериментально фотоответов. Таким образом, каким бы ни оказалось реальное значение скорости активации трансдуцина, это не потребует пересмотра сложившихся представлений о молекулярных процессах, обеспечивающих процесс фототрансдукции.

ВЫВОДЫ

1. Построенная с учетом последних экспериментальных данных математическая модель, позволила адекватно описать кинетику фотоответов темновой адаптированной палочки при предъявлении одиночных вспышек.
2. Проведенный анализ модели позволил выявить отдельные этапы, имеющие определяющее значение для кинетики всего процесса фототрансдукции.
3. Проведенный учет в математической модели экспериментальных кинетических параметров, полученных альтернативными методами, показал, что результаты биохимических оценок, несмотря на сильное расхождение со значениями, полученными методом светорассеяния, не требуют пересмотра самой схемы каскада фототрансдукции.
4. Учет в математической модели современных представлений о молекулярных механизмах кальциевой регуляции фототрансдукции позволил получить адекватное описание не только одиночных фотоответов, но и адаптационных процессов, протекающих при включении фонового освещения.

5. Анализ построенной модели обнаружил, что определяющую роль в обеспечении адаптационных процессов в палочке сетчатки играет регулируемый кальцием процесс выключения активности родопсина.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Юнусов Р.Р., Каламкаров Г.Р. Моделирование процесса генерации фототока на мембране зрительной клетки // Биологические мембраны, 2004, т. 21, № 4, с. 343-352
2. Каламкаров Г. Р., Островский М. А., Юнусов Р. Р., Шевченко Т.Ф. Молекулярные механизмы взаимодействия белков, участвующих в трансдукции фоторецепторного сигнала // Сенсорные системы, 2004, т.18, №4, с. 275-285
3. Юнусов Р.Р., Каламкаров Г.Р. Математическое моделирование адаптационных процессов в палочках сетчатки // Сенсорные системы. 2004, т.18, №4, с. 339-349
4. Юнусов Р.Р., Каламкаров Г.Р. Моделирование фазы нарастания фотоответа в палочках сетчатки// VIII Всероссийская школа молодых ученых «Актуальные проблемы нейробиологии». Казань. 2001. С. 60-61.