

На правах рукописи

Метёлкин Евгений Александрович

**КИНЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ СИСТЕМЫ
ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ В МИТОХОНДРИЯХ
ГЕПАТОЦИТОВ**

03.00.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва — 2008

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова.

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор
Энно Куставич Рууге

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор
Романовский Юрий Михайлович

кандидат биологических наук,
Горячева Екатерина Александровна

Ведущая организация: Гематологический научный центр РАМН

Защита состоится “ ____ ” _____ 2008 в ____ ч. ____ мин. на заседании Диссертационного совета Д 501.002.11 физического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова по адресу: г. Москва, Ленинские горы, МГУ имени М.В.Ломоносова, физический факультет, аудитория _____

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

Автореферат разослан “ ____ ” _____ 2008.

Учёный секретарь Диссертационного совета Д 501.002.11
доктор физико-математических наук, доцент

Хомутов Г.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В последние годы наблюдается значительный прогресс в численных точных методах описания молекулярных механизмов жизнедеятельности клетки. Этому способствует как развитие вычислительной техники, так и разработка новых экспериментальных технологий. Действительно, в настоящее время существуют методы, позволяющие проводить поточные измерения на системах *in vivo* и *in vitro*, то есть, регистрируя одновременно несколько характеристик в режиме «реального времени». Развитие автоматизированных экспериментальных установок, появление возможности хранения и обработки больших объемов данных привело к необходимости более тщательно анализировать и интерпретировать полученные данные. Для решения такого рода задач была выделена специальная область науки, названная «системной биологией». Одним из возможных способов обработки экспериментальных данных для выяснения особенностей функционирования живых систем, а также предсказаний функционирования этих систем в условиях, отличных от экспериментальных, является различные методы моделирования. Применительно к данным, характеризующим изменения концентраций и скоростей биохимических реакций, наиболее эффективным и точным методом является кинетическое моделирование ферментативных систем. Несмотря на то, что кинетическое моделирование развивается уже несколько десятков лет, практическое их использование для биоинженерных и биомедицинских задач стало актуальным только недавно, после появления достаточного количества точных экспериментальных данных и мощной вычислительной техники, доступной рядовому исследователю. Так, ранее большинство кинетических моделей имели качественный характер (то есть не ставили задачу описания точных количественных данных), а сложность (количество компонент) описываемых систем была невысока. В настоящее время описываемые системы усложняются, количество компонент может достигать нескольких сотен и тысяч, а требования к точности все время повышаются. Кроме того, практическое использование кинетического моделирования диктует необходимость построения моделей нового типа, описывающих также метаболическую и генетическую регуляцию метаболизма, эффекты, связанные

с многокомпарментными системами, процессы на границах раздела двух и более компарментов, а также эффекты влияния электрических зарядов на мембранах клетки. Все эти задачи стимулируют разработку новых методов и подходов к построению моделей.

Примером такой многокомпарментной системы со значительным влиянием мембранного потенциала на скорости реакций является митохондрия, построению частичной модели которой посвящена данная работа. Система транспорта и фосфорилирования в митохондрии состоит из ферментов и переносчиков, со сложным механизмом работы, который зачастую неизвестен или пока не описан с помощью дифференциальных уравнений. Кинетическое моделирование, решающее фундаментальную задачу описания функционирования фермента/переносчика, могло бы помочь выбрать из существующих гипотез функционирования отдельных компонент системы ту, которая наиболее соответствует экспериментальным данным. В частности, для физиологически значимого переносчика аденилатов (АНТ) до сих пор не известен механизм работы и кинетические константы элементарных стадий. Кроме того, имеется такой практический (прикладной) аспект моделирования данной системы, как предсказание поведения системы фосфорилирования в различных условиях, подбор оптимальных условий для экспериментальных измерений, при которых наблюдается тот или иной эффект. Более того, многие практические биомедицинские задачи не могут быть решены только экспериментально из-за сложности проведения эксперимента, таким образом, построенная модель могла бы стать вспомогательным инструментом при изучении влияния различных биоактивных веществ на метаболизм, например, при тестировании лекарств.

Целью данной диссертационной работы является выявление и описание с помощью разработанных теоретических методов особенностей функционирования и регуляции системы фосфорилирования митохондрии, а также ее отдельных компонент.

Для достижения поставленной цели в рамках настоящей работы решались следующие основные задачи:

- 1) Разработать подход для описания зависимости скорости работы ферментов и переносчиков, располагающихся на границе двух компарт-

- ментов, от разности электрохимических потенциалов на мембране;
- 2) На основе разработанного метода создать детальные стационарные модели АТФ-синтазы, АТФ/АДФ-антипортера, переносчика неорганического фосфата митохондрий;
 - 3) Построить кинетическую модель системы фосфорилирования в митохондриях клеток печени;
 - 4) Сделать предсказания особенностей функционирования ферментов и переносчиков в широком диапазоне условий;
 - 5) Получить с помощью кинетической модели ответы системы на изменение внешних условий – энергетической нагрузки, концентраций метаболитов, наличие ингибитора.

Научная новизна. Разработан новый подход, позволяющий описать зависимость скорости работы переносчиков и ферментов от потенциала мембраны. Данный подход позволяет использовать кинетические модели для создания «больших моделей» метаболических систем, функционирование отдельных частей которых зависят от потенциала. Модели такого рода могут быть использованы для явного задания функции скорости в дифференциальных уравнениях, в отличие от использовавшегося ранее подхода, в котором система описывалась статистическими методами. В работе впервые, исходя из кинетических и структурных данных, построена кинетическая модель АТФ/АДФ-антипортера, которая учитывает зависимость кажущихся параметров от разности потенциала на мембране. Для модели определены кажущиеся и реальные параметры элементарных стадий. На основе механизма чередующегося сродства построена модель АТФ-синтазы, которая объединена с моделью переноса протонов, которая описывается одной функцией. Ранее созданные модели АТФ-синтазы представляли собой либо модели F_1 -комплекса, либо модели переноса протонов через F_0 -комплекса, не связанные между собой, причем ранее описание функционирования комплексов решалось статистическими методами, а не с помощью дифференциальных уравнений. Была построена модель фосфорилирующей системы митохондрии. Для верификации параметров этой

модели использовались экспериментальные данные, полученные в сотрудничестве с нашими коллегами, использовавшими ряд оригинальных экспериментальных разработок. Так впервые удалось построить модель, которая количественно точно описывает зависимость основных характеристик энергетического метаболизма от концентраций метаболитов и потенциала мембраны.

Практическое значение. Методика описания зависимости скорости катализа или транспорта от потенциала через его влияние на элементарные стадии может быть также использована для других систем, где влияние электрического потенциала существенно. Построенная модель фосфорилирующей системы митохондрии может быть использована для решения прикладных задач как самостоятельно, так и в составе более сложных систем, таких как система окислительного фосфорилирования митохондрии и т.п. Результаты такого моделирования могут быть использованы для решения, в частности, биомедицинских задач, таких как тестирование лекарственных средств для изучения влияния последних на систему энергетического метаболизма или изучения влияния ядов на систему.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на семи научных конференциях, в том числе на третьей европейской конференции по вычислительной биологии (Глазго, 2004), на второй международной конференции по системной биологии (Канада, 2004), на Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2005» (Москва, 2005), на 12 международной конференции по биотермокинетики (Тракай, 2006), на 12 международной конференции «Математика.Компьютер.Образование.» (Пушино, 2005), на 15 международной конференции «Математика.Компьютер.Образование.» (Пушино, 2008), на конференции «Российская биоэнергетика: от молекул клетке» (Москва, 2005).

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, трех глав и списка цитируемой литературы. Рукопись включает в себя 125 страниц, в том числе 32 рисунков, 8 таблиц. Список литературы включает в себя 133 наименования.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность исследуемой проблемы, сформулирована цель и задачи диссертационной работы, перечислены полученные в диссертации новые результаты, их практическая ценность и описана структура диссертации.

Глава 1. содержит литературный обзор. В разделе 1.1. приводится описание свойств и особенностей адениннуклеотид-трансферазы (АНТ) – основного высокоспецифичного переносчика АТФ и АДФ в митохондриях. Важность точного кинетического описания этого переносчика объясняется тем, что во многих случаях он может лимитировать весь путь окислительного фосфорилирования. Ранее исследователями было показано, что переносчик работает по принципу антипорта со стехиометрией 1:1, то есть на одну перенесенную молекулу АДФ приходится одна молекула АТФ, транспортируемая в противоположном направлении, что приводит к выходу одного отрицательного заряда из матрикса. Тем не менее, механизм работы и степень влияния электрического потенциала на элементарные стадии переноса до сих пор обсуждаются в литературе. Имеются две гипотезы функционирования антипортера: механизм случайного связывания (Random Bi-Bi) и механизм пинг-понг (Ping-pong). Аргументы за и против каждого механизма приводятся в этом разделе. В обзоре также рассматриваются существующие модели АНТ и показывается, что до сих пор не построена модель, которая бы количественно описывала экспериментальные данные.

Раздел 1.2. посвящен H^+ -АТФ-синтазе - ферменту, связанному с внутренней мембраной митохондрии и катализирующему фосфорилирование АДФ неорганическим фосфатом за счет протон-движущей силы. Фермент обнаружен также в хлоропластах растений и в бактериях, где выполняет аналогичную функцию. АТФ-синтаза имеет сложный субъединичный состав и необычные каталитические свойства, усложняющие его кинетическое описание. В частности, ранее было показано, что гидролиз и синтез АТФ происходит в соответствии с уникальным механизмом чередующегося сродства, впервые описанным П.Д. Бойером. Результаты рентгеноструктурного анализа и ряд уникальных экспериментальных методик привели к

представлениям об АТФ-синтазе, как о молекулярной машине, в которой перенос протонов сопряжен с вращательным катализом. Приводится описание элементарных процессов, преобразования протон-движущей силы в энергию синтеза. В настоящем обзоре также обсуждается стехиометрия переноса протонов. Приводятся различные экспериментальные методики измерения стехиометрического соотношения и его значения для различных организмов. В работе описываются существующие в литературе модели АТФ-синтазы.

Раздел 1.3. посвящен описанию основных свойств фосфатного переносчика митохондрии. Этот переносчик может быть описан как электро-нейтральный антипортер аниона Pi и аниона OH^- , либо как симпорт Pi и иона H^+ . Обсуждается природа движущей силы для переноса неорганического фосфата, а также каталитические параметры такого переноса. Так, приводятся данные, что только протонированная форма фосфата ($H_2PO_4^-$) может переноситься посредством переносчика.

Раздел 1.5. полностью посвящен существующим кинетическим моделям процессов синтеза АТФ в митохондриях. Приводится 3 примера построения кинетических моделей. Указаны их слабые и сильные стороны.

В главе 2. приведено описание методов исследования. Подробно описаны: методика построения каталитического цикла механизма переносчиков или ферментов, вывод функции скорости и различные приближения, упрощающие вывод. Приводятся также методы определения параметров, входящих в функцию скорости и критерии точности их определения. Рассматриваются методы изучения поведения построенных моделей, используемые в работе. Перечислены программные и аппаратные средства для моделирования.

Глава 3. представляет собой основную часть работы, содержащую вывод функций скорости работы для отдельных переносчиков, ферментов и описание модели пути фосфорилирования в целом, а также определение значений параметров. Раздел 3.1. посвящен выводу уравнений для описания концентраций различных форм метаболитов. Под формами метаболитов здесь подразумеваются комплексы аденилатов и неорганического фосфата с ионами водорода и магния, учет которых важен, поскольку

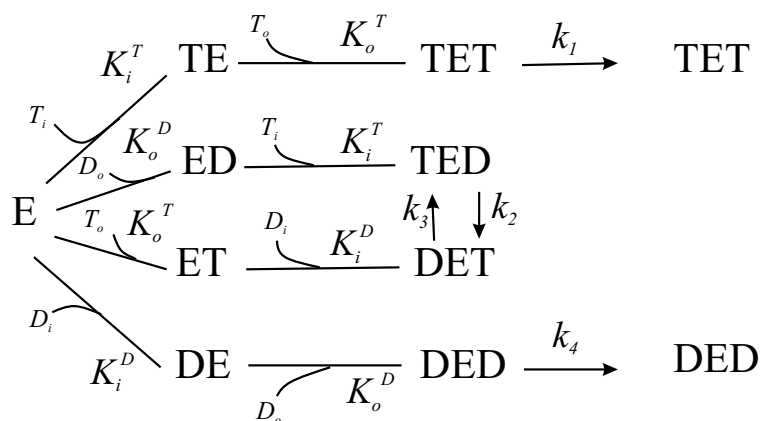


Рис. 1. Кинетическая схема функционирования адениннуклеотид-транслоказы митохондрии. T , D обозначают АТФ, АДФ соответственно, нижний индекс обозначает локализацию: i — в матриксе, o — в межмембранном пространстве. E — свободная форма переносчика. XEY — тернарный комплекс АНТ с молекулой X со стороны матрикса, Y — со стороны межмембранного пространства. Линиями показаны процессы образования комплекса. Стрелками — процессы транспорта. На схеме приведены константы скоростей переноса и константы диссоциации для соответствующих стадий.

ферменты и переносчики обладают специфичностью к той или иной форме субстрата. Выводится зависимость стационарной концентрации каждой такой формы от полной концентрации метаболитов и ионов. Приводится предварительный расчет соотношений между формами метаболитов при условиях, близких к физиологическим.

Раздел 3.2. посвящен построению модели адениннуклеотид-транслоказы митохондрии. Исходя из кинетических и структурных данных рассматривается димерная модель функциональной единицы переносчика, работающего как два взаимосогласованных канала, переносящих две молекулы аденилатов одновременно в двух направлениях. Как показано в работе, это согласуется с кинетическим механизмом работы, структурными данными и результатами экспериментов с ингибиторами. Рассматриваются две возможные схемы расположения мономеров в составе функциональной единицы. Исходя из экспериментальных данных для построения модели нами выбирается цис-схема расположения. Исходя из данной схемы построен каталитический цикл функционирования переносчика, изображенный на рисунке 1. Исходя из схемы функционирования и набора экспериментально обоснованных приближений была

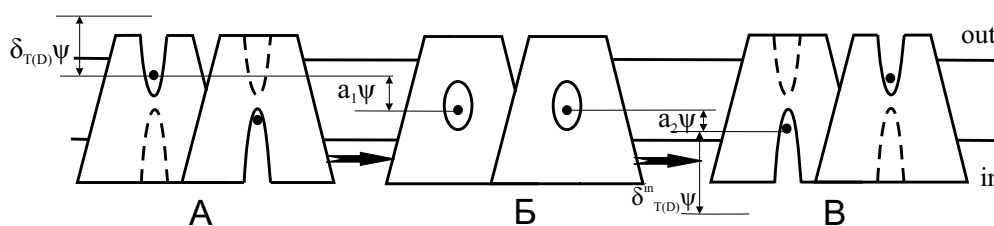


Рис. 2. Модель адениннуклеотид-транслоказы используемая для вывода зависимости скорости переноса от электростатического потенциала мембраны. А, Б, В – ряд последовательных состояний АНТ в процессе переноса. $\delta_{T(D)}$ – отношение разности потенциалов между местом связывания аденилата с внешней стороны мембраны и свободным состоянием к полной разности потенциала на мембране, $\delta_{T(D)}^i$ – отношение разности потенциалов между местом связывания аденилата с внутренней стороны мембраны и свободным состоянием к полной разности потенциала на мембране, a_1 , a_2 – эффективное перемещение аденилатов от устойчивого состояния до максимума потенциального барьера.

выведена функция скорости, описывающая зависимость скорости работы переносчика от концентраций метаболитов: $v^{ANT} = f(D_i, T_i, D_o, T_o)$.

Зависимость скорости трансмембранного переноса аденилатов от электростатического поля заряженной мембраны мы учитывали через описание зависимости кажущихся кинетических констант от разности потенциала мембраны. Для этого мы разбили путь, по которому проходит молекула при переносе условно на три участка (см. рис. 2), что позволило в рамках некоторых приближений описать зависимость константы скорости переноса от величины полного потенциала мембраны: $k_j = k_j^0(Z_1 a_1 \phi + Z_2 a_2 \phi + a_3 \phi)$. В полную модель АНТ вошло 11 независимых параметров, которые мы идентифицировали исходя из экспериментальных данных, взятых из работы [1]. С помощью численных методов идентификации параметров удалось добиться хорошего соответствия между экспериментальными данными и результатами моделирования, что показано на рис. 3. Основываясь на результатах подбора параметров можно заключить, что около 7% падения электрического потенциала приходится на стадию связывания АТФ. В значительно меньшей степени потенциал влияет на связывание АДФ, однако получить точных оценок такого влияния, основываясь на используемых экспериментальных данных невозможно – требуются дополнительные эксперименты. Вычисленные значения параметров

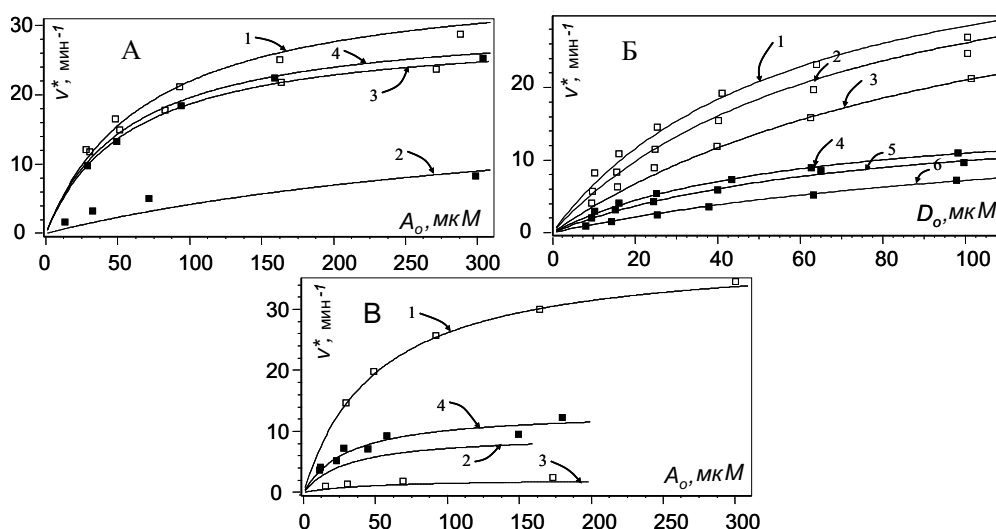


Рис. 3. Результаты подбора параметров. Представлены экспериментальные точки из работы /1/ и теоретические кривые – результаты моделирования после подстановки найденных параметров. А) Зависимость скорости транспорта меченого аденилата от концентрации внешнего меченого АТФ или АДФ; Б) Зависимость скорости транспорта меченого аденилата от внешнего меченого АДФ; В) Зависимость скорости транспорта меченого аденилата от концентрации внешнего меченого АДФ

показали также, что в процессе переноса аденилаты значительно смещаются в направлении переноса, кроме того, имеются заряженные группы в составе мономера АНТ, которые смещаются при переносе аденилатов.

Предсказания построенной модели при параметрах близких к физиологическим изображены на рисунке 4. Так, удалось показать, что транспорт АДФ в матрикс митохондрии осуществляется только при величине потенциала более 100 мВ, при прочих параметрах близких к физиологическим. При меньших значениях наблюдается обратный перенос. Для оценки эффективности работы АНТ было изучено отношение количества перенесенных молекул АДФ к полному числу оборотов переносчика. Расчет показал, что эффективность работы АНТ не превышает 0,5 даже при высоких значениях потенциала. Учет множественности форм аденилатов (Mg^{2+} , H^+ -связанные формы) позволил оценить влияние pH на скорость переноса аденилатов рис.4. Сравнение построенной модели с прочими моделями АНТ из литературы показал, что наша модель точнее описывает переносчик как по величине невязки, так и по критерию Акаике.

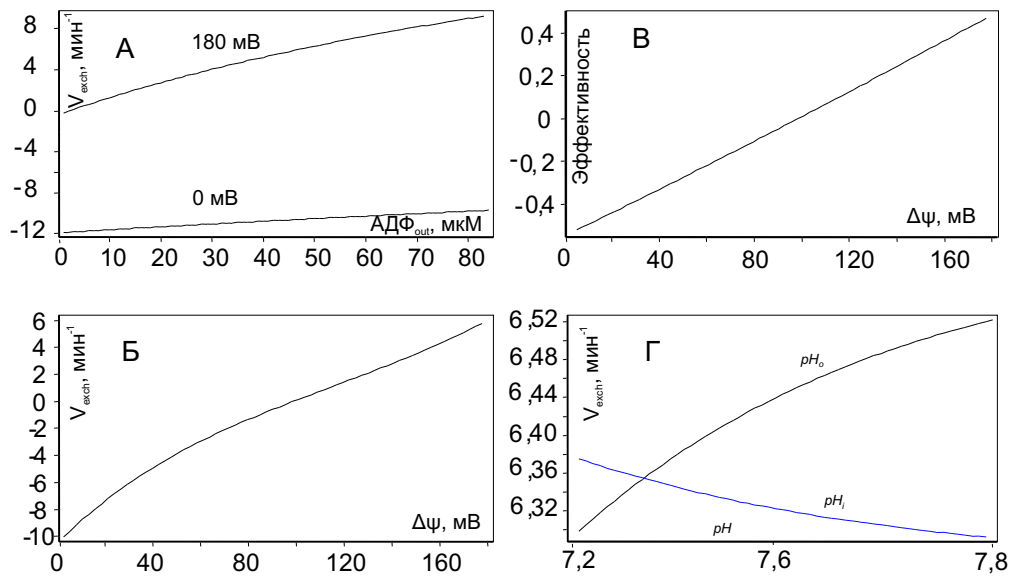


Рис. 4. А) Зависимость скорости обмена АТФ/АДФ от концентрации внешней АДФ при различных значениях потенциала на мембране. Б) Зависимость скорости обмена АТФ/АДФ от потенциала на мембране. В) Зависимость эффективности обмена АТФ/АДФ (отношение скорости обмена к полному числу оборотов) от потенциала на мембране. Г) Зависимость скорости обмена АТФ/АДФ от величины pH внутри и снаружи митохондрии. Каждая кривая отражает изменение значения в одном из компартментов при фиксированной pH в другом.

Раздел 3.3. посвящен построению модели H^+ -АТФ-синтазы. Модель включает в себя как описание механизма чередования сродства в каталитических центрах, так и процесс векторного переноса протонов через внутреннюю мембрану митохондрии. Ряд экспериментально обоснованных приближений позволил упростить вывод функции скорости синтеза/гидролиза АТФ. Влияние векторного переноса протонов на направление и скорость работы АТФ-синтазы учитывалось путем рассмотрения статистического ансамбля γ -субъединиц, связанных с кольцом c -субъединиц. Была выведена функция распределения (см. рис. 5) по энергетическим состояниям субъединиц в зависимости от угла скручивания упругого стержня γ -субъединицы, а затем произведен переход от характеристик микросостояний к величине константы скорости реакции синтеза/гидролиза, путем усреднения всех возможных переходов исходя из функции распределения.

Исходя из кинетических и структурных данных о функционировании АТФ-синтазы и схемы Бойера чередующегося сродства нами был постро-

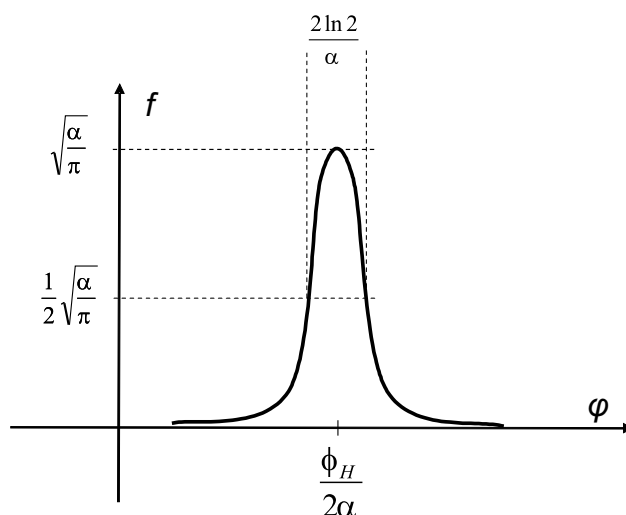


Рис. 5. Вид функции распределения состояний упругих стержней по углам скручивания.

ен каталитический цикл фермента (см. рис. 6). С использованием ряда приближений для быстрых стадий катализа, методом Кинга-Альтмана была выведена функция скорости синтеза АТФ. Зависимость скорости катализа от потенциала мембраны и разности pH учитывалось через изменение константы скорости, что было описано выше. В итоге была выведена функция скорости, содержащая семь независимых параметров, которые мы идентифицировали исходя из экспериментальных данных по кинетике АТФ-синтазы, найденных в литературе [2]. С помощью численных методов идентификации параметров удалось добиться хорошего соответствия между экспериментальными данными и результатами моделирования, что показано на рис. 7. Основываясь на оценке параметров, можно заключить, что константы скорости диссоциации АТФ и АДФ в двух каталитических центрах имеют одинаковый порядок. Константа диссоциации для АТФ в три раза больше, чем для АДФ. Кроме того показано, что потенциал мембраны влияет как на скорость гидролиза, так и на синтез АТФ при любых физиологических условиях.

Предсказания построенной модели, при параметрах, близких к физиологическим, изображены на рисунке 8. С помощью данного моделирования удалось показать, что при значениях АДФ выше 5 мМ скорость работы АТФ-синтазы изменяется незначительно. Кроме того, из графиков видно, что при значениях концентраций P_i от 10 мМ и выше, скорость син-

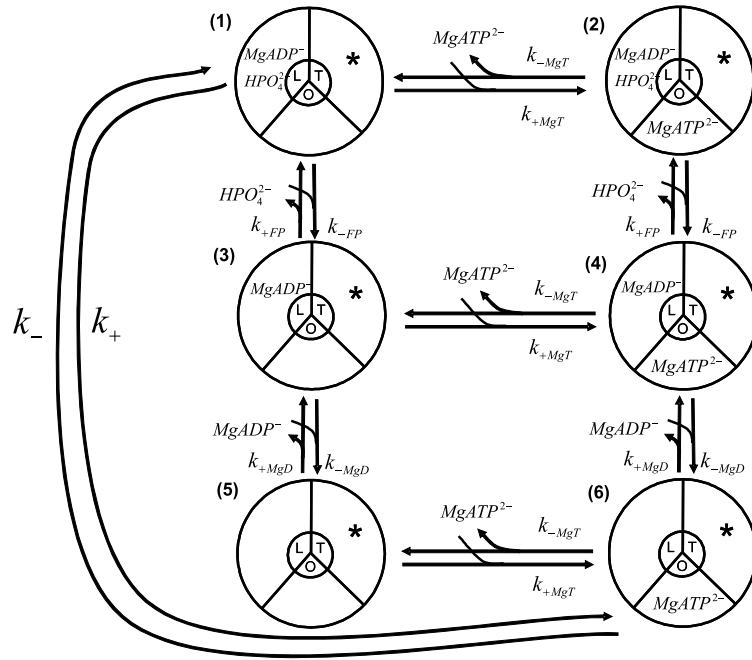


Рис. 6. Каталитический цикл, используемый для вывода функции скорости АТФ-синтазы.

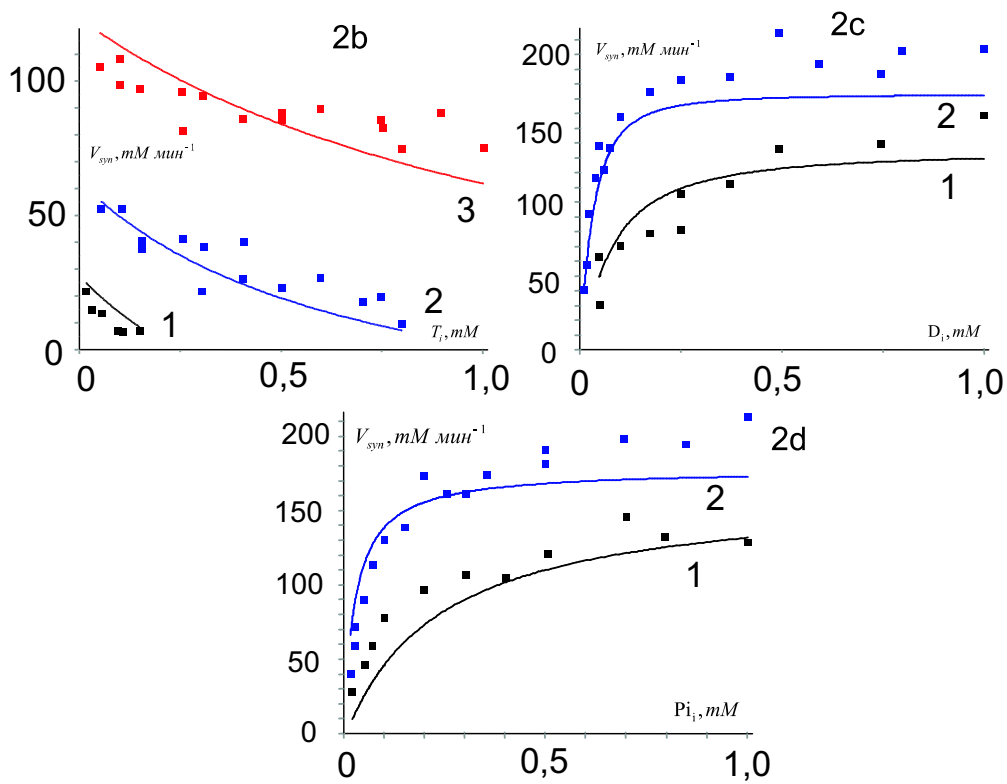


Рис. 7. Сравнение результатов экспериментальных данных из работы [2] и моделирования после идентификации параметров.

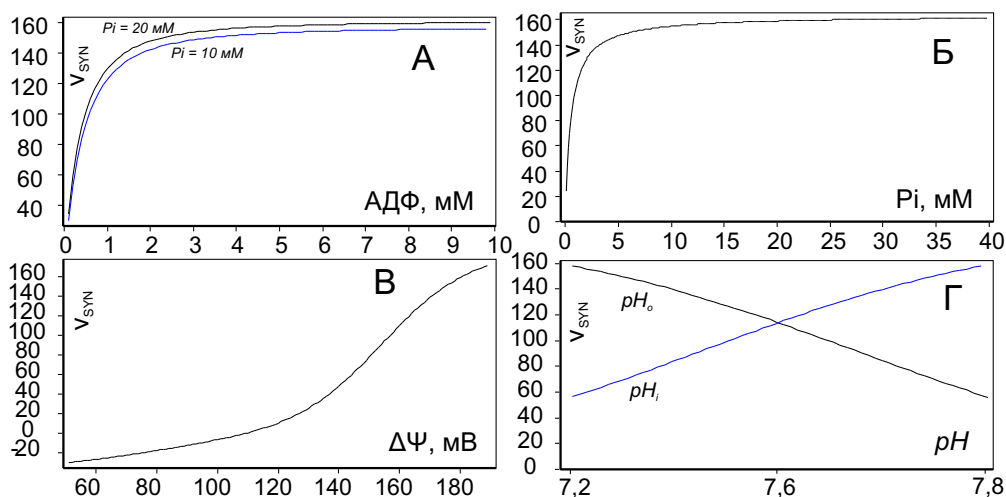


Рис. 8. А) Зависимость скорости синтеза АТФ от концентрации АДФ при различных концентрациях неорганического фосфата. Значения параметров: $pH_i = 7,8$; $pH_o = 7,2$; $Mg^{2+} = 0,32$ мМ; $T_i = 10$ мМ – D_i ; $\Delta\psi = 180$ мВ. Б) Зависимость скорости синтеза АТФ от концентрации P_i . Значения параметров: $pH_i = 7,8$; $pH_o = 7,2$; $Mg^{2+} = 0,32$ мМ; $T_i = 3$ мМ; $D_i = 7$; $\Delta\psi = 180$ мВ. В) Зависимость скорости синтеза АТФ от величины pH . Значения параметров: $pH_i = 7,8$; $pH_o = 7,2$; $Mg^{2+} = 0,32$ мМ; $T_i = 3$ мМ; $D_i = 7$; $P_i = 20$ мМ; $\Delta\psi = 180$ мВ. Г) Зависимость скорости синтеза АТФ от величины электрического потенциала. Значения параметров: $pH_i = 7,8$; $pH_o = 7,2$; $Mg^{2+} = 0,32$ мМ; $T_i = 3$ мМ; $D_i = 7$; $P_i = 20$ мМ.

теза практически не изменяется. Графики 8В,Г показывают, что как электрический потенциал, так и разность pH влияют на скорость гидролиза и синтеза во всем диапазоне условий. В разделе 3.4. приводится построение стационарной модели фосфатного переносчика митохондрии.

Раздел 3.5. посвящен описанию объединенной модели системы фосфорилирования митохондрии, включающей в себя адениннуклеотид-транслоказу, H^+ -АТФ-синтазу, фосфатный переносчик, а также процессы образования различных форм метаболитов. Схема на рис. 9 представляет собой метаболическую карту взаимодействий различных участников описываемой системы. На основе приведенной схемы и выбранных ранее приближений была составлена система дифференциальных уравнений, описывающих зависимость концентраций метаболитов от времени. Кроме определенных в предыдущих разделах параметров, система содержит два неизвестных параметра – активности адениннуклеотид-транслоказы и H^+ -АТФ-синтазы, которые необходимо было определить исходя из эксперимен-

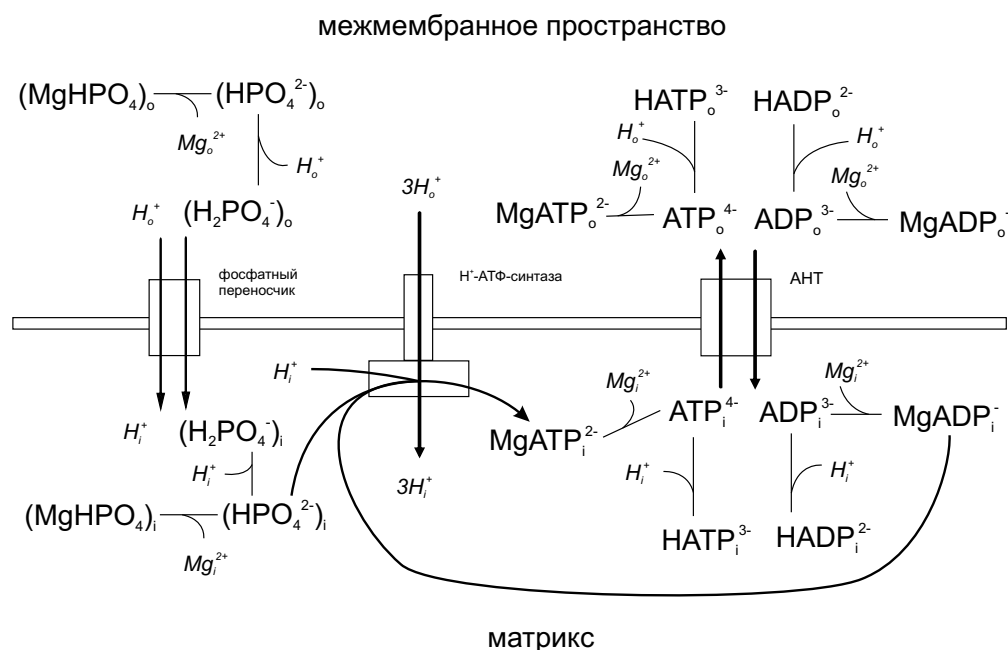


Рис. 9. Схема для описания системы фосфорилирования митохондрии, используемая для построения модели. На схема указаны также процессы образования магниевых и протонированных форм метаболитов.

тальных данных. Такие экспериментальные данные были получены нами в сотрудничестве с лабораторией нейробиохимии Университета Будапешта в Венгрии под руководством В. Адам-Визи. Используемая оригинальная экспериментальная методика позволяет проводить измерения концентраций АТФ, АДФ и потенциала мембраны в режиме реального времени. В итоге удалось получить данные, представленные на рисунке 10, где представлены результаты экспериментов с разобщителем и ингибитором АНТ. Используя численные методы, удалось определить неизвестные параметры уравнения. Сравнить, насколько результаты моделирования после идентификации параметров соответствуют экспериментальным данным можно на рисунке 10. Исходя из экспериментальных данных удалось определить активность АНТ, для АТФ-синтазы удалось найти только нижнюю границу активности. Таким образом, нами была численно описана система фосфорилирования митохондрии гепатоцита крысы. С учетом литературных данных о коэффициентах управления для АНТ и АТФ-синтазы и используя данную систему можно сделать количественные предсказания поведения системы в условиях, близких к физиологическим. Результаты моделирования представлены на рисунке 11. С помощью моделирования зависимости

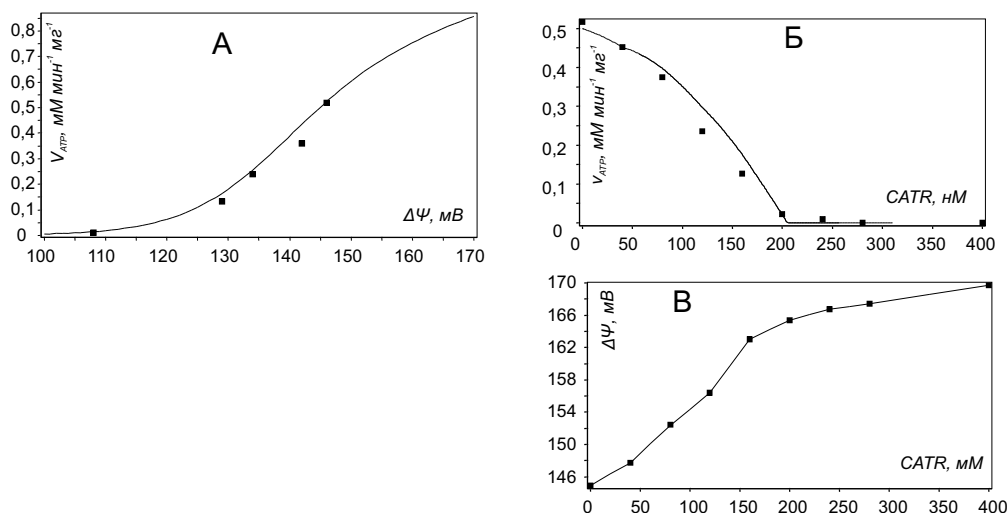


Рис. 10. Сравнение экспериментальных данных и результатов моделирования системы фосфорилирования митохондрии после определения параметров. А) Зависимость стационарной скорости образования АТФ в зависимости от потенциала мембраны (эксперимент с разобщителем). Б) Зависимость стационарной скорости образования АТФ в зависимости от количества разобщителя сАТР. В) Зависимость потенциала мембраны от количества разобщителя.

выхода АТФ из митохондрии при фиксированных концентрациях внемитохондриальных метаболитов (рис. 11А) удалось показать, что только при значении потенциала более 100 мВ наблюдается синтез АТФ. При меньших значениях наблюдается гидролиз АТФ, независимо от значения активности АТФ-синтазы. Величина разности pH влияет на скорость синтеза АТФ в диапазоне $\Delta\Psi$ от 60 до 160 мВ, поскольку при больших значениях фосфорилирование определяется исключительно скоростью работы АНТ, на которую разность pH влияет незначительно. При возрастании внешней энергетической нагрузки (АДФ/АТФ) скорость синтеза значительно увеличивается, что объяснимо с точки зрения физиологии клетки. Действительно, высокие концентрации АДФ в клетке могут быть опасны, чего митохондрия пытается избежать, увеличивая скорость гидролиза.

Кроме того, была построена зависимость концентрации внутренних аденилатов от энергизации митохондрии. Ранее, концентрации метаболитов пытались получить экспериментально, однако, поскольку соотношение АТФ/АДФ в матриксе сложно измерить экспериментально, были получены довольно противоречивые данные. Полученная нами теоретическая

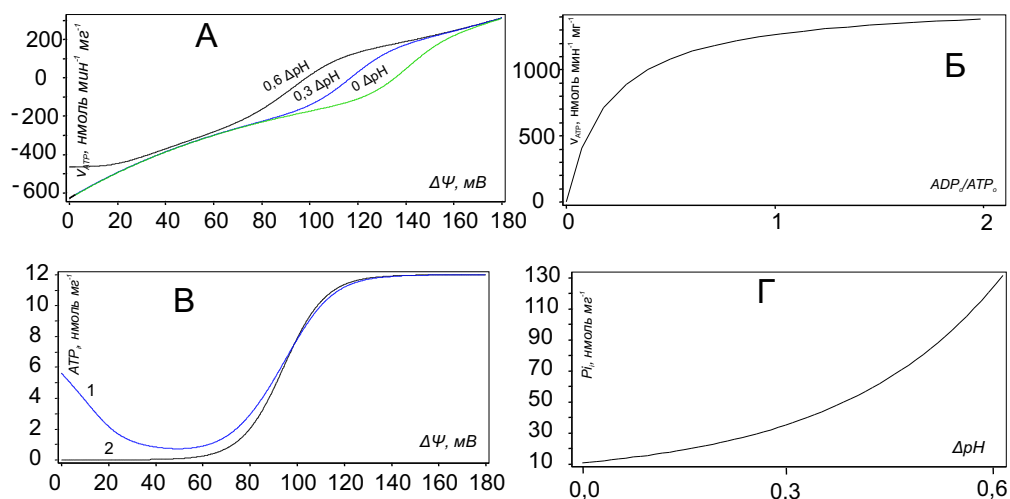


Рис. 11. А) Зависимость скорости фосфорилирования в митохондриях от потенциала мембраны: $ADP_o = 50 \mu\text{M}$; $ATP_o = 2 \text{ mM}$; $pH_o = 7,2$; $Mg_o = 1 \text{ mM}$; $Mg_i = 0,35 \text{ mM}$; $Pi_o = 10 \text{ mM}$. Б) Зависимость скорости фосфорилирования митохондрии от энергетической нагрузки: $ATP_o = 2 \text{ mM}$; $pH_o = 7,2$; $pH_i = 7,8$; $Mg_o = 1 \text{ mM}$; $Mg_i = 0,35 \text{ mM}$; $Pi_o = 10 \text{ mM}$. В) Зависимость стационарной концентрации АТФ от потенциала мембраны (данные для двух активностей АТФ-синтазы): $ATP_o = 2 \text{ mM}$; $ADP_o = 50 \mu\text{M}$; $pH_o = 7,2$; $pH_i = 7,8$; $Mg_o = 1 \text{ mM}$; $Mg_i = 0,35 \text{ mM}$; $Pi_o = 10 \text{ mM}$. Г) Зависимость стационарной полной концентрации P_i от разности pH : $pH_o = 7,2$; $pH_i = 7,8$; $Mg_o = 1 \text{ mM}$; $Mg_i = 0,35 \text{ mM}$; $Pi_o = 10 \text{ mM}$.

зависимость является чувствительной по отношению к активности АТФ-синтазы. Так, при минимальном значении активности, концентрация АТФ в матриксе имеет ярко выраженный минимум, что можно объяснить низкой скоростью работы АТФ-синтазы при низких значениях потенциала. В этом случае, концентрация аденилатов в матриксе будет определяться работой АНТ и распределяться в соответствии с разностью потенциалов мембраны и концентрацией аденилатов со стороны межмембранного пространства. При увеличении активности АТФ-синтазы минимум сглаживается, поскольку в этом случае соотношение АТФ/АДФ распределяется в соответствии с приближением быстрого равновесия для АТФ-синтазы и не зависит от работы АНТ. Была также построена зависимость стационарной концентрации неорганического фосфата в матриксе (рис. 11Г), которая полностью определяется разностью pH на мембране.

На основе результатов, полученных в данной работе были сделаны следующие выводы:

- 1) Подход, в рамках которого зависимость скорости работы фермента или переносчика от величины энергизации митохондрии учитывается через зависимость кажущихся кинетических констант от значения потенциала мембраны, позволяет количественно описать существующие экспериментальные данные.
- 2) Подход, применяемый в настоящей работе, позволяет описать функционирование ферментов и переносчиков точнее, чем ранее использовавшиеся методы, как по величине невязки, так и по интегральному критерию Акаике.
- 3) Функционирование адениннуклеотид-транслоказы хорошо описывается кинетикой Random Bi-Bi (классификация Келланда).
- 4) Электрический потенциал значительно влияет как на стадию связывания аденилатов с адениннуклеотид-транслоказой, так и на стадию их переноса.
- 5) Эффективность работы адениннуклеотид-транслоказы не превышает 0,5 при потенциале мембраны от 0 до 200 мВ.
- 6) Транспорт АДФ в матрикс митохондрии при физиологических параметрах осуществляется при значении потенциала мембраны митохондрии более 100 мВ.
- 7) В составе функциональной субъединицы АНТ, по-видимому, присутствуют заряженные группы, смещаемые в процессе переноса аденилатов.
- 8) Потенциал мембраны и разность pH влияют как на скорость синтеза, так и скорость гидролиза АТФ АТФ-синтазой.
- 9) Константа скорости диссоциации АТФ и АДФ в двух каталитических центрах (O, L) АТФ-синтазы составляют величину порядка 10^2 с^{-1} , что многократно превышает константу скорости катализа.
- 10) При высоком значении потенциала (160-190 мВ) насыщающая концентрация неорганического фосфата в матриксе составляет около 10

мМ, насыщающая концентрация АДФ в матриксе составляет около 5 мМ.

- 11) Величина протон-движущей силы значительно влияет на скорость работы АДФ-синтазы во всем физиологическом диапазоне значений (0-190 мВ).
- 12) Синтез АДФ митохондрией происходит при потенциале от 100 мМ и выше, при более низких значениях потенциала наблюдается гидролиз.
- 13) При потенциале от 160 мВ скорость синтеза АДФ не зависит от ΔpH .
- 14) При возрастании внешней нагрузки скорость синтеза АДФ увеличивается.
- 15) Зависимость концентрации АДФ в матриксе может иметь минимум.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Kramer R., Klingenberg M. Electrophoretic control of reconstructed adenine nucleotide translocation (1982) *Biochemistry*, 21(5), 1082-1089.
- [2] Panke O., Rumberg B. Kinetic modelling of the proton translocating CF_0F_1 -ATP synthase from spinach. *FEBS Lett.* (1996) V.383(3) p.196-200.

Основное содержание диссертационной работы изложено в следующих публикациях:

- 1) Metelkin E, Goryanin I., Demin O. Mathematical Modeling of Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase. *Biophysical Journal*. 2006. V.90, pp.423-432.
- 2) Метелкин Е. «Кинетическая модель адениннуклеотид-транслоказы митохондрии», Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов - 2005», Москва, С. 67.
- 3) Metelkin E. «Kinetic Model of Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase», 12th International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB 2004), Glasgo, p.217.

- 4) Demin O., Lebedeva G., Zobova E., Metelkin E., Plyusnina T., Lavrova A., Gizzatkulov N. «Strategy to develop large-scale kinetic models», E.Coli. 2nd International E.Coli Alliance Conference on System Biology Project Gemini, Canada, 2004.
- 5) Metelkin E, Demin O. «Mathematical Modeling of Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase», 12th International conference «Mathematics.Computer.Education.», Pushchino, 2005.
- 6) Metelkin E, Demin O. «Mathematical Modeling of H⁺-ATP-synthase», 15th International conference «Mathematics.Computer.Education.», Dubna, 2008.
- 7) Metelkin E., Demin O. «A Kinetic Model of Mitochondrial ATP-synthase: the binding change mechanism», Systems Biology: redefining BioThermoKinetics, Trakai, Lithuania, 2006, p.56.
- 8) Metelkin E, «Kinetic Model of Mitochondrial Adenine Nucleotide Translocase», Russian Bioenergetics: from molecule to the cell, Moscow, Russia.