

## Синтез АТФ $F_1$ -АТФазой в стохастической модели

А. Ф. Погребная<sup>1,а</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
физический факультет,  
119991, ГСП-1, г. Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1, стр. 2

E-mail: <sup>а</sup>paf140877@mail.ru

*Получено 2 сентября 2008 г.*

Данная работа является продолжением цикла работ [1–4], посвященных построению математической модели вращающегося молекулярного мотора  $F_1$ -АТФазы. В данной работе в рамках представленной ранее модели рассматривается синтез АТФ при вращении ротора молекулярного мотора под действием внешней силы.

Ключевые слова: АТФ, АТФаза, внешняя сила

### Synthesis of ATP by $F_1$ -ATPase in stochastic model

A. F. Pogrebnaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Moscow State University, Physical Faculty, MSU, 1, building 2, GSP-1, Leninskiye Gory, Moscow, 119991, Russia

**Abstract.** — The paper continues our series of papers [1–4] devoted to the development of mathematical model on rotation of  $F_1$ -ATPase molecular motor. Here it has been considered the synthesis of ATP induced by external force applied to the rotor.

Key words: ATP, ATPase, external force

Citation: *Computer Research and Modeling*, 2009, vol. 1, no. 2, pp. 217–223 (Russian).

F<sub>1</sub>-АТФаза, катализирующая синтез/гидролиз АТФ, — часть фермента F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФсинтазы в энергопреобразующих мембранах живых клеток. Энергетически выгодный процесс переноса протонов водорода через мембранную часть F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФсинтаза — комплекс F<sub>0</sub> под действием электрохимического потенциала и синтез АТФ в F<sub>1</sub>-АТФазе сопряжены благодаря наличию ротора, механически связывающего F<sub>0</sub> и F<sub>1</sub> комплексы. Протонный ток через F<sub>0</sub> вращает вал и является причиной конформационных изменений в каталитических центрах F<sub>1</sub>-АТФаза, что приводит к синтезу АТФ [5]. С другой стороны гидролиз АТФ в F<sub>1</sub>-АТФазе приводит к вращению вала в противоположную сторону и создает поток протонов через мембрану в обратном направлении. Отделенный от мембранной части комплекс F<sub>1</sub>-АТФаза сохраняет свою каталитическую способность к гидролизу и синтезу АТФ [6].

Структурные свойства и молекулярный механизм работы F<sub>1</sub>-АТФазы изложены в многочисленных статьях (см., например, [6]). Характерный размер этого молекулярного мотора около 100 ангстрем. Белковый комплекс F<sub>1</sub>-АТФаза состоит из ( $\alpha\beta$ )<sub>3</sub> $\gamma$  субъединиц, где центральная субъединица  $\gamma$  окружена цилиндром из  $\alpha_3\beta_3$ . Кристаллографический анализ показывает, что все три  $\beta$  каталитические субъединицы находятся в различных конформациях: плотно закрытой — ( $\beta_i$ ), неплотно закрытой — ( $\beta_j$ ), открытой — ( $\beta_e$ ) (рис. 1). При этом активный центр (АЦ) каталитической субъединицы в плотно закрытой конформации ( $\beta_i$ ) связан с АТФ, АЦ полузакрытой конформации ( $\beta_j$ ) связан с АДФ и АЦ открытой конформации ( $\beta_e$ ) — пуст. Согласованное изменение всех трех конформаций, сопряженное с гидролизом АТФ, приводит к вращению «ротора» — центральной  $\gamma$  субъединицы, и, наоборот, вращение изогнутой несимметричной  $\gamma$  приводит к конформационным изменениям в каталитических субъединицах, что приводит к синтезу АТФ.



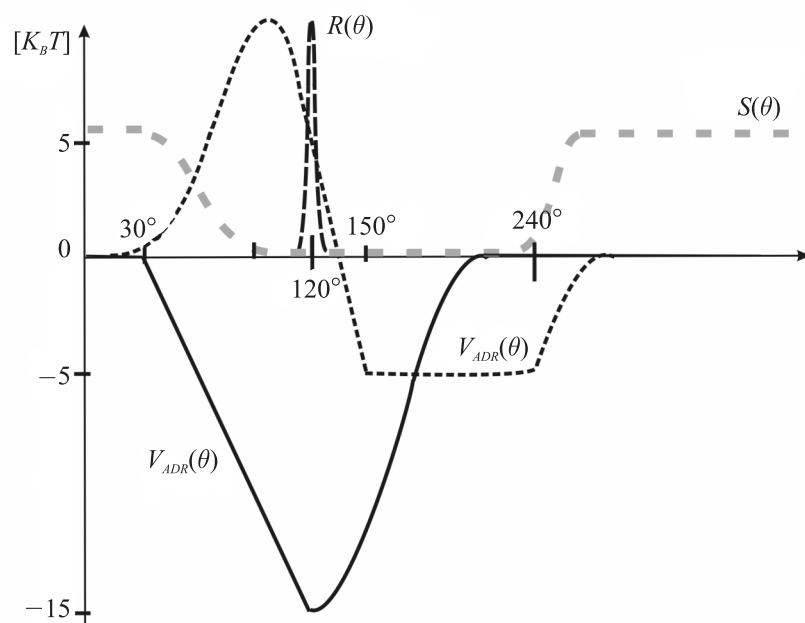
**Рис. 1.**  $\beta$  и  $\gamma$  субъединицы (по данным рентгеноструктурного анализа) в трех различных конформациях: *a* —  $\beta$  субъединица, связанная с MgATP (закрытая конформация  $\beta_i$ ); *б* —  $\beta$  субъединица со свободным каталитическим центром (открытая конформация  $\beta_e$ ); *в* —  $\beta$  субъединица, связанная с MgADP (конформация  $\beta_j$ )

В настоящее время вращение и при гидролизе и при синтезе наглядно экспериментально продемонстрировано. В этих экспериментах к основанию субъединицы  $\gamma$ , выступающему из ансамбля  $\alpha_3\beta_3$ , прикреплялась нагрузка (фрагмент нити актина или полистироловая бусинка) с флуоресцирующей меткой. Средняя скорость вращения ротора в режиме гидролиза была в пределах 0.5–10 Гц (в зависимости от нагрузки), с шагами в  $120^\circ$ , а КПД мотора близко к 100 %. В более поздних экспериментах, выполненных с большим во времени разрешением, было показано, что повороты ротора на  $120^\circ$  происходят ступенчато и включают в себя две фазы: поворот на  $80$ – $90^\circ$ , после чего наступает пауза, затем следует второй поворот на  $40$ – $30^\circ$ . В работе [7] представлены результаты по наблюдению синтеза АТФ изолированным ферментом F<sub>1</sub>-АТФазы при вращении ротора по часовой стрелке с помощью внешнего вращающего момента. В этом эксперименте к ротору пришивалась намагниченная бусинка и с помощью электромагнитов вращалась по часовой стрелке (в сторону, соответствующую синтезу АТФ).

Настоящая работа является продолжением наших ранних работ, в которых мы представили достаточно простую динамическую модель F<sub>1</sub>-АТФазы, описывающую стохастическое движение центральной  $\gamma$  субъединицы в силовом поле, образованном субъединицами комплекса  $(\alpha\beta)_3$ . Для описания потенциального рельефа, в котором реализуется движение  $\gamma$  субъединицы, были определены энергии связи различных субстратов, участвующих в работе мотора, с активным центром, конформация которого определяется положением  $\gamma$  субъединицы. Наша модель позволяет описать направленное вращение ротора, как при синтезе, так и при гидролизе АТФ, а также ответить на вопросы, почему при работе мотора реализуются паузы именно в положениях 90, 120, 210, 240° и т. д., а также почему эффективность мотора близка к 100 % [3]. В данной работе мы представляем результаты по моделированию синтеза АТФ в рамках нашей модели.

## Описание модели

Прежде чем представить уравнения модели, опишем события, происходящие в моторе под действием внешнего вращающего момента. Изогнутая  $\gamma$  единица вращается внутри комплекса  $(\alpha\beta)_3$  и является причиной конформационных изменений в каталитических субъединицах. Она насильно сгибает подвижную часть  $\beta$  при повороте на 30° и полностью раскрывает активный центр (АЦ) при повороте на 90°. Мы предполагаем, что посадка  $P_i$  предшествует входу АДФ в карман, но не приводит к изменению конформации каталитической субъединицы. Далее в открытый АЦ входит АДФ, в каталитической субъединице происходит переход  $\beta_e \rightarrow \beta_i$  (см. рис. 2). Поворачиваясь на 30°,  $\gamma$  субъединица переводит  $\beta_i$  в  $\beta_e$ . Если повороту ротора на первые 30° предшествует посадка реагентов (АДФ и  $P_i$ ), то после поворота реагенты настолько близки друг к другу, что становится возможна реакция синтеза АТФ. Во время этого же поворота другой своей стороной  $\gamma$  субъединица «раскрывает» (переход  $\beta_i \rightarrow \beta_e$ ) предыдущую субъединицу, содержащую в своем АЦ синтезированную АТФ. Таким образом, за поворот  $\gamma$  субъединицы на 120° происходит сближение реагентов, реакция синтеза и открытие каталитического центра.



**Рис. 2.**  $V_{ATP}(\theta)$  — силовой потенциал, образованный каталитической субъединицей, содержащей в АЦ молекулу АТФ;  $V_{ADP}(\theta)$  — силовой потенциал, образованный каталитической субъединицей, содержащей в АЦ молекулу АДФ;  $S(\theta - \theta_i)$  — «открытость АЦ»;  $R(\theta - \theta_i)$  — реакционная способность АЦ. Более подробно получение и параметры потенциала описаны в работе [3]

## Основные уравнения

Для описания движения ротора мы используем уравнение Ланжевена, которое имеет вид

$$\xi \frac{\partial \theta}{\partial t} = -\frac{\partial V_s(\theta)}{\partial \theta} + f_1(t) + F_{ext}, \quad (1)$$

где  $\theta$  — задает угловое положение центральной  $\gamma$  субъединицы;  $\xi$  — коэффициент вязкого трения, возникающий при вращении нагрузки;  $V_s(\theta)$  — силовой потенциал, являющийся аддитивной суммой силовых потенциалов, создаваемых всеми тремя  $\beta$  каталитическими субъединицами, находящимися в положениях  $\theta_1 = 0^0$ ,  $\theta_2 = 120^0$ ,  $\theta_3 = 240^0$ :  $V_s(\theta) = V(\theta - \theta_1) + V(\theta - \theta_2) + V(\theta - \theta_3)$ ;  $F_{ext}$  — внешний вращающий момент;  $f_1(t)$  — момент вращения, создаваемый силами стохастической природы, обусловленными тепловыми флуктуациями. При этом  $\langle f_1(0)f_1(\tau) \rangle = \xi kT \delta(\tau)$ . Учитывая, что характерные частоты вращения  $\gamma$  субъединицы составляют десятки герц, и учитывая значительную вязкость среды (при  $\eta \approx 10^{-3} \text{ Nsm}^{-2}$ ,  $\xi \approx 10^{-21}$  [3–6]) и сравнительно малую величину момента инерции ( $J = mL^2 \approx 10^{-32}$ ), при составлении уравнения (1) мы опустили член  $J \frac{d^2\theta}{dt^2}$ , отвечающий за инерцию системы.

Изменение деформационного потенциала, создаваемого каталитическими центрами, в общем случае определяется присутствием в кармане того или иного комплекса в нем, т. е.

$$V(\theta - \theta_i) = \bar{\psi}_{ATP} V_{ATP}(\theta) + \bar{\psi}_{ADP} V_{ADP}(\theta), \quad (2)$$

где  $\bar{\psi}_{ATP}, \bar{\psi}_{ADP} \in \{[1,0], [0,1], [0,0]\}$  — определяют наличие или отсутствие того или иного субстрата в активном центре, а  $V_{ATP}(\theta), V_{ADP}(\theta)$  — определяют потенциалы, возникающие при присутствии субстрата, соответствующего индексу потенциала (рис. 2). Эта запись потенциала учитывает наше предположение, что выход  $P_i$  происходит сразу после гидролиза.

«Химический цикл» — посадка, выход и преобразование субстратов в АЦ — мы описываем с помощью системы кинетических уравнений для вероятности заселенностей активных центров субстратом, которые однозначно определяют вероятности  $\psi_{ATP}, \psi_{ADP}$  в уравнении (3):

$$\begin{aligned} \frac{d\psi_{ATP,i}}{dt} &= -\left( \frac{S(\theta - \theta_i)}{\tau_{-ATP}} + \frac{R(\theta - \theta_i)}{\tau_h} \right) \psi_{ATP,i} + \frac{R(\theta - \theta_i)}{\tau_s} \psi_{ADP,i} + k_{+ATP} n_{ATP} S(\theta - \theta_i), \\ \frac{d\psi_{ADP,i}}{dt} &= -\left( \frac{S(\theta - \theta_i)}{\tau_{-ADP}} + \frac{R(\theta - \theta_i)}{\tau_s} \right) \psi_{ADP,i} + \frac{R(\theta - \theta_i)}{\tau_h} \psi_{ATP,i} + k_{+ADP} n_{ADP} S(\theta - \theta_i), \end{aligned} \quad (3)$$

где  $i = 1, 2, 3$  — номер каталитической субъединицы. Уравнение (3) описывает динамику изменения вероятности заполнения активных центров  $\psi_{ATP(ADP),i}$  тем или иным субстратом (АТФ или АДФ), причем учитывая, что карман может быть заселен только одной молекулой субстрата, на вероятности  $\psi_{ATP(ADP),i}$  наложены ограничения:  $0 \leq \psi_{ATP(ADP),i} \leq 1$ ,  $\psi_{ATP(ADP),i} + \psi_{ADP(ATP),i} \leq 1$ . Константа  $k_{ATP(ADP)}$  — задает скорость посадки субстрата в полностью открытый центр;  $n_{ATP}$  и  $n_{ADP}$  — концентрации АТФ и АДФ во внешней среде;  $S(\theta - \theta_i)$ ,  $R(\theta - \theta_i)$  — функции, описывающие «открытость» и «реакционную способность» активных центров в зависимости от положения  $\gamma$  субъединицы (см. рис. 2);  $1/\tau_{DT}$ ,  $1/\tau_{TD}$  — определяют скорость гидролиза и синтеза АТФ в полностью закрытом центре;  $1/\tau_{ATP(ADP)}$  — скорость выхода продуктов реакции из АЦ.

В уравнении (3) первое слагаемое описывает посадку и уход субстрата из активного центра, скорость такого процесса ограничивается конформацией  $\beta$  субъединицы (функция  $S(\theta - \theta_i)$ ). Второй член описывает реакции гидролиза и синтеза в закрытом центре. Область конформационных состояний, определяемых координатой  $\theta_i$ , при которых протекает реакция, ограничивается функцией  $R(\theta - \theta_i)$ .

Полученная система уравнений позволяет нам полностью описать динамику работы всего мотора.

## Результаты численного моделирования и выводы

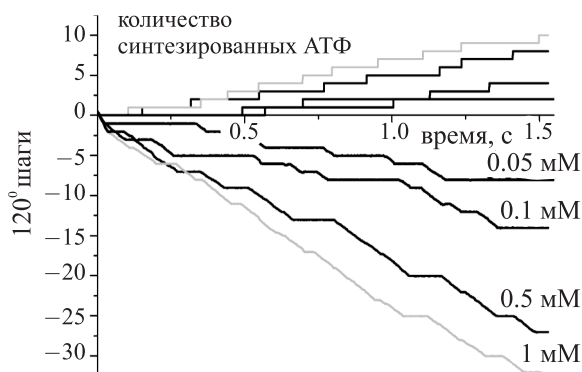
При численном решении системы (1)–(5) мы полагали, что в начальном состоянии АЦ свободны от субстратов. Во всех расчетах  $\xi = 10^{-21}$  Нмс, что соответствует нити филамента актина длиной 1 мкм,  $k_{+ATP} = 4 \times 10^6 \text{ с}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ,  $\tau_{-ATP} k_{+ATP} = 0.12 \text{ M}^{-1}$ ,  $\tau_{-ADP} k_{+ATP} = 0.25 \text{ M}^{-1}$ ,  $k_{+ADP} / k_{+ATP} = 0.5 \text{ M}^{-1}$ . При моделировании процесса синтеза мы полагали концентрацию АТФ во внешней среде равной нулю.

Для численного решения уравнения (1) мы воспользовались простой разностной схемой. Для моделирования шумового воздействия теплового резервуара на вращение центральной субъединицы на каждом шаге по времени ( $\Delta t = 0.01 \div 0.1$  мс) мы генерировали случайное число с гауссовским распределением. В уравнении (4) левые части аппроксимировались разностью и далее решение уравнений разбивалось на два этапа, т. е. использовался метод разбиения по «физическим» факторам. На первом шаге  $\Delta t / 2$  производился расчет вероятности выхода/посадки субстрата из/в активного центра, а на втором шаге производился учет химической реакции внутри АЦ.

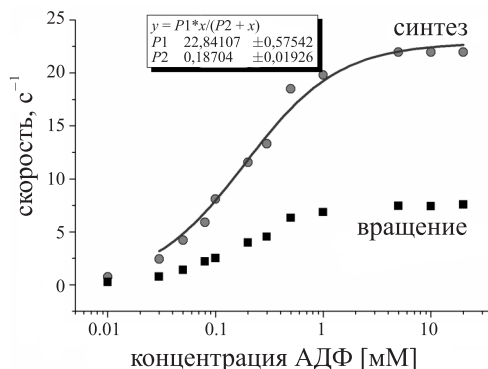
Подробнее о методике численного расчета можно прочесть в наших более ранних работах (см., например, [3]), отметим только, что, определяя начальные вероятности  $\psi_{ATP(ADP),i;t=0}$ , мы считываем значения вероятностей на следующем шаге  $\psi_{ATP(ADP),i;t=\Delta t/2}$  и  $\psi_{ATP(ADP),i;t=\Delta t}$ , по этим значениям вероятностей определяем состояние активного центра (заселенность его тем или иным субстратом). В случае  $\psi_{ATP(ADP),i;t=\Delta t/2} > \mu$  ( $\psi_{ATP(ADP),i;t=\Delta t} > \mu$ ), где  $\mu \in [0,1]$  случайное число с равномерным законом распределения на интервале  $[0,1]$ , активный центр считался заселенным субстратом, т. е.  $\psi_{ATP(ADP),i;t=\Delta t/2} (\psi_{ATP(ADP),i;t=\Delta t}) \leftarrow 1$  (коэффициенты в выражении (3)), в противном случае  $\psi_{ATP(ADP),i;t=\Delta t/2} (\psi_{ATP(ADP),i;t=\Delta t}) \leftarrow 0$ . На следующем этапе по заданному состоянию мотора производилось решение уравнения Ланжевена (1), в котором значения потенциалов определялись исходя из полученных значений  $\psi_{ATP(ADP),i;t=\Delta t}$  (0 или 1). На следующем шаге по времени последовательность операций повторялась. Таким образом, на базе кинетических уравнений мы могли моделировать поведение отдельного мотора (одной «реализации»). Для описания усредненных характеристик (например, скорости химических реакций, осуществляемых каталитическими комплексами), необходимо провести моделирование ансамбля моторов, т. е. провести усреднение по множеству отдельных реализаций.

На рис. 3 представлены полученные нами реализации зависимости угла поворота  $\gamma$  субъединицы от времени при различных концентрациях АДФ, знак минус указывает на направление вращения по часовой стрелке (в сторону противоположную той, что при синтезе). Сверху показано количество молекул АТФ, покидающих один из трех АЦ. Видно, что с ростом концентрации АДФ уменьшается длительность пауз перед каждым  $120^\circ$  шагом. На рис. 4 представлена зависимость средней скорости вращения и синтеза от концентрации АДФ в окружающей среде. Сплошная линия на рисунке является аппроксимацией точек гиперболой, искомые значения  $K_m \approx$

$\approx 0.187 \text{ мМ}$ ,  $v_{\text{max}} \approx 22.8 \text{ с}^{-1}$ . К сожалению, мы не можем сравнить полученные значения с экспериментальными данными.



**Рис. 3.** Реализации зависимости угла поворота  $\gamma$  субъединицы от времени при различных концентрациях АДФ

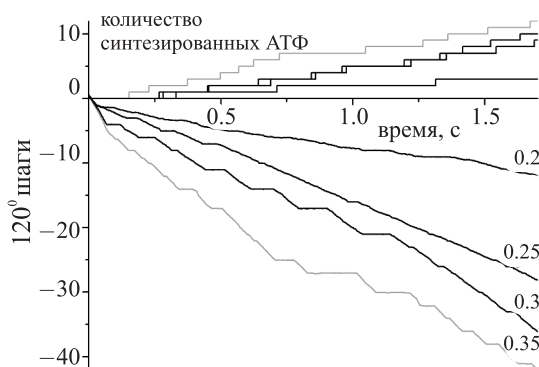


**Рис. 4.** Зависимость средней скорости вращения и синтеза от концентрации АДФ в окружающей среде

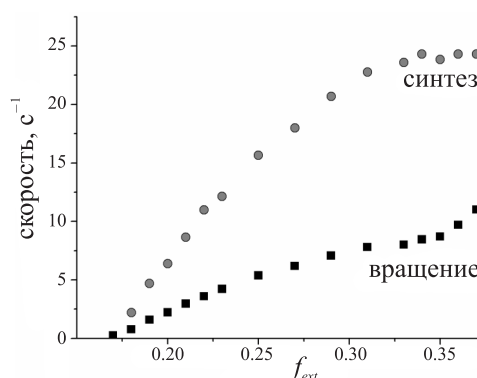
На рисунке 5 представлены полученные нами реализации зависимости угла поворота  $\gamma$  субъединицы от времени при различных величинах вращающего момента ( $f_{\text{ext}}$  есть внешний вращающий момент на единицу угла поворота  $\theta$ ). Замечу, что угол наклона силового потенциала, образованного каталитическими субъединицами (рис. 2), равен  $\frac{\partial V_s}{\partial \theta} = \frac{20}{120} \approx 1.667$ . Как и следовало

ожидать, с ростом величины внешнего вращающего момента скорость вращения растёт, но появляются паузы, которые могут быть обусловлены ожиданием посадки АДФ в активный центр. При малых величинах вращающего момента время перехода от одного центра к другому велико, и молекула АДФ успевает связаться со следующим активным центром. С ростом вращающего момента время перехода уменьшается ( $\tau_{\text{step}} = \frac{\xi}{\left(f_{\text{ext}} - \frac{\partial V_s}{\partial \theta}\right) k_B T}$ ), и паузы, связанные с ожиданием

посадки АДФ, становятся различимы. На рис. 6 представлена зависимость средней скорости вращения и синтеза от величины вращающего момента ( $f_{\text{ext}}$ ). При больших величинах скорость синтеза выходит на насыщение, скорость же вращения продолжает практически линейно расти. Это, на наш взгляд, объясняется либо тем, что синтезируемая молекула АТФ не успевает покинуть АЦ и его «закрывает»  $\gamma$  субъединица, либо молекула АДФ не успевает связаться с АЦ.



**Рис. 5.** Зависимости угла поворота  $\gamma$  субъединицы от времени при различных величинах вращающего момента ( $f_{\text{ext}}$ )



**Рис. 6.** Зависимость средней скорости вращения и синтеза от величины вращающего момента ( $f_{\text{ext}}$ )

Предложенная модель позволяет смоделировать синтез АТФ во время вращения ротора F<sub>1</sub>-АТФазы по часовой стрелке под действием внешней вращающей силы. Зависимость скорости синтеза от концентрации АДФ подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментена, константа Михаэлиса–Ментена  $K_m \approx 187$  мкМ при используемых нами кинетических параметрах фермента (константы скоростей посадки/выхода субстратов, а также скорости синтеза/гидролиза АТФ). Зависимость скорости синтеза от величины внешнего вращающего момента носит линейный характер вплоть до значений  $f_{ext} \approx 2 \frac{\Delta V_s}{120}$ . При больших значениях скорость вращения продолжает линейно расти, а скорость синтеза остается постоянной, что объясняется тем, что вновь синтезируемая молекула АТФ не успевает покинуть АЦ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке программы «Научные школы России» (2071.2003.4), Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 05-03-32880), Междисциплинарного научного проекта МГУ, а также INTAS (01-0450).

Автор благодарна за помощь в построении модели и всестороннее обсуждение результатов А. В. Воронову, Ю. М. Романовскому и А. Н. Тихонову.

## Список литературы

1. *Pogrebnaya A. F., Romanovsky Y. M., Tikhonov A. N.* Electrostatic interactions in catalytic centers of F<sub>1</sub>-ATPase // SPIE. 2003. Vol. 5068. P. 27–35.
2. *Тихонов А. Н., Погребная А. Ф., Романовский Ю. М.* Электростатические взаимодействия в каталитических центрах F<sub>1</sub>-АТФазы // Биофизика. 2003. Т. 48, № 6. С. 1052–1070.
3. *Pogrebnaya A. F., Romanovsky Yu. M., Tikhonov A. N.* Stochastic model of molecular motor of ATPase // Complex Dynamics, Fluctuations, Chaos and Fractals in Biomedical Photonics, Proceedings SPIE. 2004. Vol. 5330. P. 120–131.
4. Walker J. E. (Ed.) The Mechanism of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase // Biochim. Biophys. Acta: special issue. 2000. Vol. 1458, № 2–3. P. 294.
5. *Senior, Nadinaciva S., Weber J.* The molecular mechanism of ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase // Biochim. Biophys. Acta. 2002. Vol. 1553. P. 188–211.
6. *Yasuda R., Noji H., Yoshida M., Kinoshita K. Jr. & Itoh H.* Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase // Nature. 2001. Vol. 410, № 19. P. 898–904.
7. *Itoh H., Takahashi A., Adachi K., Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinoshita K.* Mechanically driven ATP synthesis by F<sub>1</sub>-ATPase // Nature. 2004. Vol. 427. P. 465–468.

