

ОБЗОРЫ АКТУАЛЬНЫХ ПРОБЛЕМ

Молекулярные преобразователи энергии живой клетки. Протонная АТФ-синтаза — вращающийся молекулярный мотор

Ю.М. Романовский, А.Н. Тихонов

Функционирование живой клетки и всех многоклеточных организмов обеспечивается в основном за счёт свободной энергии, освобождающейся при ферментативном гидролизе молекул аденозинтрифосфорной кислоты (Adenosine Triphosphate, АТР). Подавляющее большинство молекул АТР образуется протонными АТФ-синтазами, являющимися самыми маленькими в природе наноразмерными молекулярными электромоторами. В статье рассмотрены современные представления о молекулярном строении и механизмах функционирования протонной АТФ-синтазы, описаны биофизические эксперименты, позволившие в реальном масштабе времени наблюдать за вращением "ротора", а также проанализированы некоторые математические модели, описывающие работу этой наноразмерной макромолекулярной машины.

PACS numbers: 87.10. – e, 87.15. – v, 87.16. – b

DOI: 10.3367/UFNr.0180.201009b.0931

Содержание

1. Введение (931).
 2. АТФ — основная энергетическая "валюта" живой клетки (933).
 3. Структурно-функциональная организация протонных АТФ-синтаз (935).
 - 3.1. Строение протонной АТФ-синтазы.
 - 3.2. Механизмы функционирования F_0F_1 -АТФ-синтазы.
 4. Протонная АТФ-синтаза — вращающийся молекулярный мотор (941).
 - 4.1. Экспериментальные доказательства вращения ротора.
 - 4.2. Механизмы генерации вращательного момента, эффективность работы мотора.
 5. Математические модели F_0F_1 -АТФ-синтазы (946).
 - 5.1. Динамические модели работы протонной АТФ-синтазы.
 - 5.2. Электростатические взаимодействия и энергетика гидролиза АТФ.
 - 5.3. Стохастико-динамическая модель F_1 -АТФазы.
 - 5.4. "Триггерная" модель F_1 -АТФазы.
 6. Заключение (954).
- Список литературы (955).

Если бы для описания клетки нам пришлось выбирать между двумя крайними моделями — часовым механизмом и гомогенной химической реакцией в газовой фазе, — выбор был бы однозначен: клетка несравненно ближе к часовому механизму, чем к чисто статистической системе.

Л.А. Блюменфельд [1]

АТФ-синтаза — это великодушная молекулярная машина... Все ферменты прекрасны, но АТФ-синтаза является одним из самых красивых, самых важных и удивительных ферментов.

P.D. Boyer [37]

1. Введение

Понятие "молекулярные машины", появившееся более 35 лет назад, в 70-е годы XX в. [1], стало общепринятым, в настоящее время оно прочно утвердилось в научной литературе [1–27]. Молекулярная машина является макромолекулярным устройством, как правило, природного происхождения (например, молекула белка или белковый комплекс), которое осуществляет преобразование химической энергии в энергию направленного движения макромолекул или их отдельных фрагментов, перенос молекул и ионов через биологические мембраны и т.д. (см., например, недавние обзоры [7–16], а также оригинальные статьи [17–28]). Представление о ферментах как о наноразмерных молекулярных машинах подразумевает существование в них сравнительно небольшого числа выделенных (механических) степеней свободы, связанных с согласованным движением групп атомов или с наличием подвижных фрагментов [1–3, 29, 30]. Это означает, что отдельные части белка или белкового комплекса могут рассматриваться как элементы макромолекулярного устройства, подобные деталям макроскопических машин и механизмов.

Ю.М. Романовский, А.Н. Тихонов. Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, Воробьёвы горы, 119991 Москва, Российская Федерация
Тел. (495) 939-29-73
E-mail: yuromanovsky@yandex.ru, an_tikhonov@mail.ru, an_tikhonov@physics.msu.ru

Статья поступила 26 марта 2010 г.,
после доработки 23 апреля 2010 г.

С точки зрения физика, главной особенностью *молекулярных машин и механизмов* (МММ) является сочетание в них *механических* и *статистических* свойств [1–3, 29–32]. Механические свойства МММ определяются крупномасштабными структурными перестройками макромолекул в результате движений сравнительно крупных фрагментов белковых молекул вдоль небольшого числа выделенных степеней свободы. Статистические свойства МММ обусловлены тепловыми движениями отдельных атомов и небольших групп атомов макромолекулы. Тепловые флуктуации макромолекулярной конструкции позволяют "выбрать" из огромного числа возможных микросостояний именно те, которые обеспечивают протекание химической реакции в нужном направлении или реализацию направленного механического движения [2, 31–35].

В последнее десятилетие в изучении биологических макромолекулярных машин произошла настоящая революция — биофизики научились манипулировать отдельными молекулами биополимеров, используя лазерные и магнитные "пинцеты", измерять физико-химические характеристики индивидуальных макромолекул и непосредственно следить за их подвижностью (см., например, обзоры [7–15]). Методом рентгеноструктурного анализа расшифровано пространственное строение нескольких тысяч белков, изучена архитектура сложных белковых комплексов. Всё это в сочетании с современными биохимическими и молекулярно-биологическими методами исследования биополимеров раскрывает удивительную картину работы наноразмерных МММ.

Одно из самых актуальных направлений в биофизике связано с изучением вращающихся МММ. Исследованию молекулярной архитектуры и физико-химических механизмов работы таких устройств посвящена обширная научная литература (см., например, обзоры [7–16]). Биологические МММ, работа которых связана с направленным вращением их ротора, обычно встроены в биологическую мембрану, они приводятся в действие за счёт разности электрохимических потенциалов, генерируемой на мембране. Эти устройства обычно имеют в своей конструкции элементы типа "храповика" (ratchet), обеспечивающие направленность вращения ротора [31–35]. В настоящее время известны два семейства наноразмерных вращающихся "электромоторов" природного происхождения. К одному из них относятся бактериальные электромоторы, вращающие жгутики бактериальной клетки [32, 35]. Типичным представителем другого семейства молекулярных электромоторов является F_0F_1 -АТФ-синтаза [36, 37] — белковый комплекс, обеспечивающий синтез аденозинтрифосфорной кислоты, или АТФ (Adenosine Triphosphate, ATP) — основной энергетической "валюты" живой клетки (рис. 1). F_0F_1 -АТФ-синтаза является самым маленьким из всех известных электромоторов природного происхождения [32, 37–45].

Принципы работы бактериального электромотора и F_0F_1 -АТФ-синтазы одинаковы. Однако конструкция бактериального электромотора намного сложнее, чем конструкция F_0F_1 -АТФ-синтазы. Бактериальные электромоторы имеют статор, встроены в мембрану бактериальной клетки, и вращающийся ротор [32, 35]. Ротор соединён со жгутиком, длина которого на порядок превышает размер бактериальной клетки. Вращающийся спиралевидный жгутик служит "пропеллером",

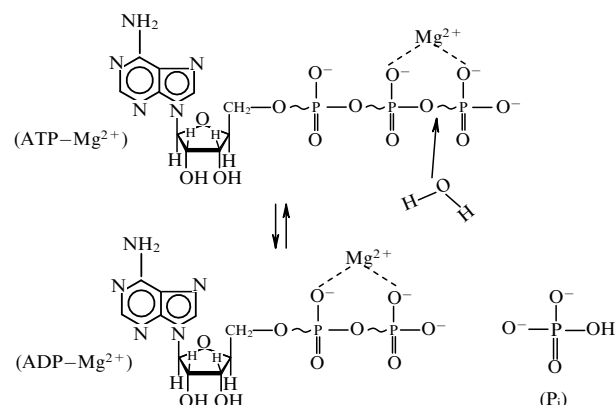


Рис. 1. Структурные формулы молекул аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и аденозиндифосфорной кислоты (АДП).

обеспечивающим поступательное движение бактерии. Источником энергии для вращения ротора бактериального электромотора служит трансмембранная разность электрических потенциалов. Это сложное наноразмерное устройство имеет особую молекулярную "коробку передач", которая позволяет изменять направление вращения ротора. Кроме того, бактериальная клетка имеет своеобразный молекулярный "процессор", являющийся макромолекулярным прообразом современного компьютера, который служит для управления поведением бактериальной клетки и её ориентации в пространстве. Этот макромолекулярный "процессор" получает, запоминает и перерабатывает информацию о химическом составе или освещённости окружающей среды, поступающую к нему от специализированных рецепторов, расположенных на поверхности клетки, а затем выдаёт соответствующие сигналы к переключению направления вращения ротора. Благодаря этому бактерии могут изменять направление своего движения и перемещаться в нужном направлении — приближаться к цели (движение в сторону "аттрактантов" — например, к субстратам питания) или, наоборот, удаляться из экологически неблагоприятной зоны, где присутствуют так называемые "репелленты".

F_0F_1 -АТФ-синтаза — один из наиболее важных, удивительно красивых и необычных молекулярных моторов живой клетки. Среди большого числа энергопреобразующих макромолекулярных устройств эти макромолекулярные конструкции занимают особое место. АТФ-синтазные белковые комплексы типа F_0F_1 осуществляют синтез подавляющего большинства молекул АТФ в клетке [46–49]. F_0F_1 -АТФ-синтаза является уникальным преобразователем энергии в живой клетке, она имеет в своём составе *два вращающихся мотора*. В режиме синтеза АТФ F_0F_1 -АТФ-синтаза работает как наноразмерный *электромотор*, приводимый в действие за счёт разности электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), генерируемой на мембране, в которую встроены этот фермент. Электрический ток, протекающий через белковый комплекс F_0 (мембранный фрагмент F_0F_1 -АТФ-синтазы), обеспечивает направленное вращение ротора этого электромотора, что, в свою очередь, вызывает периодические конформационные изменения в белковом комплексе F_1 , который непосредственно катализирует образование АТФ. F_0F_1 -АТФ-синтаза способна

не только синтезировать, но и расщеплять молекулы АТР. В этом случае "химическая" энергия, запасённая в молекулах АТР, используется для вращения ротора, находящегося внутри белкового комплекса F_1 . *Механо-химический мотор* F_1 приводит в действие ротор сцепленного с ним второго мотора — F_0 , выполняющего роль "протонной помпы", генерирующей $\Delta\mu_{H^+}$. Роторы обоих моторов (электромотора F_0 , работающего за счёт энергии $\Delta\mu_{H^+}$, и механо-химического мотора F_1 , работающего за счёт энергии АТР), конструктивно соединены друг с другом. Имеются прямые доказательства того, что во время работы F_0F_1 -АТФ-синтазы оба мотора вращаются (см. раздел 4).

В настоящее время хорошо изучены биохимические, механические и кинематические свойства F_0F_1 -АТФ-синтаз различного происхождения. Научная литература, посвящённая различным аспектам структурной организации и механизмам функционирования этого уникального макромолекулярного мотора, весьма обширна (см., например, обзорные статьи [31, 32, 36–45]). Цель настоящего обзора — проанализировать физико-химические механизмы работы F_0F_1 -АТФ-синтазы, а также рассмотреть теоретические модели, описывающие работу этой одной из самых важных и необычных молекулярных машин живого организма. Статья адресована широкому кругу читателей — физиков и биофизиков, которые интересуются вопросами работы молекулярных машин и "наноимоторов". Обзор структурирован по нескольким уровням детализации материала с целью сделать его доступным и, по возможности, интересным более широкому кругу читателей. Статья состоит из пяти разделов, которые содержат как общие сведения, необходимые для понимания физических механизмов работы молекулярных моторов (разделы 1 и 2), так и специальные, посвящённые новейшим достижениям в данной области (разделы 3 и 4). Раздел 5 посвящён математическому моделированию вращающихся молекулярных моторов.

2. АТФ — основная энергетическая "валюта" живой клетки

Встроенные в мембраны митохондрий, хлоропластов (специализированные энергопреобразующие органеллы животных и растительных клеток соответственно) и бактерий F_0F_1 -АТФ-синтазные комплексы катализируют синтез молекул аденозинтрифосфорной кислоты — АТФ (АТР) из аденозиндифосфорной кислоты — АДФ (АДР) и неорганического фосфата (P_i) (см. рис. 1). Как было сказано выше, молекула АТР является основной энергетической "валютой" живой клетки. Подавляющее большинство энергоёмких биологических процессов, таких как реакции биосинтеза, перенос различных молекул через биологические мембраны, мышечное сокращение и др., сопряжено с энергодонорной реакцией гидролиза АТР, в результате которой образуется АДР и неорганический фосфат (рис. 2).

Реакция гидролиза АТР ($ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i$) сопровождается выделением энергии, которая может быть использована для совершения полезной работы. Уменьшение свободной энергии системы, связанное с гидролизом АТР в водном растворе в так называемых "стандартных" условиях (при концентрациях реагентов, равных 1 М, при рН 7,0 и температуре 25 °С), равно

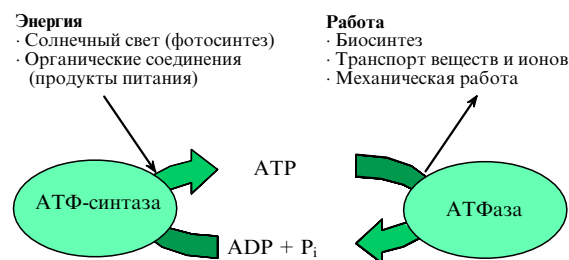


Рис. 2. Схема, иллюстрирующая роль молекулы АТР в сопряжении энергодонорных и энергоакцепторных процессов в клетке.

$\Delta G_{ATP}^0 = -7,3$ ккал моль⁻¹ (30,5 кДж моль⁻¹) [47–50]. "Стандартная" энтальпия гидролиза АТР, характеризующая тепловой эффект реакции, равна $\Delta H_{ATP}^0 = -5$ ккал моль⁻¹ [50]. Если гидролиз АТР происходит в водном растворе, то выделяющаяся при этом энергия рассеивается в тепло. В биологических системах большая часть энергии, выделяющейся при гидролизе АТР, не теряется бесполезно, преобразуясь в тепло, а используется для совершения полезной работы (см. рис. 2).

Реакции гидролиза и синтеза АТР обратимы ($ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i$). В клетке эти реакции катализируются ферментами (биокатализаторами), называемыми, соответственно, АТФазами и АТФ-синтазами. АТФазы — это ферменты, которые обеспечивают работу мышечных белков, реакции биосинтеза, перенос ионов через биологические мембраны и другие энергоёмкие процессы в живой клетке за счёт энергии гидролиза АТР. Наряду с энергодонорными реакциями гидролиза АТР в клетке происходят процессы регенерации АТР, которые компенсируют потребление АТР в ходе различных энергоёмких биохимических процессов (см. рис. 2). Синтез АТР из АДР и P_i осуществляется АТФ-синтазами и происходит за счёт энергии внешних источников (свет — у фотосинтезирующих организмов, органические соединения — в клетках бактерий и животных). АТФ-синтазные комплексы типа F_0F_1 , которым посвящена наша статья, в зависимости от условий могут катализировать обе реакции — синтез и гидролиз АТР.

Молекула АТР представляет собой трифосфорный эфир аденозина — производного аденина и рибозы (см. рис. 1). Несмотря на то что расщепление фосфорноэфирной связи в молекуле АТР, приводящее к образованию АДР и фосфорной кислоты (P_i), является энергетически выгодным процессом, без участия ферментов эта реакция протекает чрезвычайно медленно (например, в водном растворе молекула АТР сохраняет свою структуру в течение многих месяцев). Это связано с тем, что для разрыва ковалентной связи между атомами фосфора и кислорода в молекуле АТР нужно совершить работу по преодолению сравнительно высокого энергетического барьера. В присутствии ферментов, способных катализировать гидролиз АТР, эта реакция протекает существенно быстрее. Характерные времена оборота АТФаз различного происхождения составляют $\sim 10^{-4} - 10^{-2}$ с.

Синтез АТР — энергетически невыгодный процесс. Одна из главных причин этого состоит в том, что в водных растворах фосфатные группы молекул АДР и P_i несут отрицательные заряды, и поэтому для их сближения, которое необходимо для образования ковалентной фосфорноэфирной связи в молекуле АТР, требуется преодолеть высокий энергетический барьер. В клетке

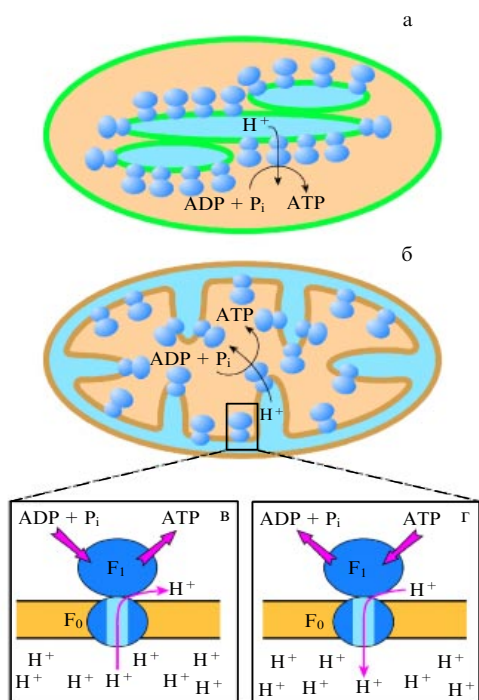


Рис. 3. Схема строения хлоропласта (а) и митохондрии (б) — энергопреобразующих органелл растительной и животной клеток. Тёмные участки соответствуют областям с повышенным протонным потенциалом ("кислотные резервуары"); в хлоропластах это внутри-тилакоидное пространство, в митохондриях это пространство между внутренней и внешней мембраной. Светлые участки — области с пониженным протонным потенциалом ("щелочные резервуары"); в хлоропластах это пространство стромы, в митохондриях это пространство, называемое матриксом. Внизу на схемах в и г показано расположение в сопрягающей мембране протонной АТФ-синтазы, работающей в режиме синтеза (в) или гидролиза (г) АТФ.

образование подавляющего большинства молекул АТФ из АДП и P_i катализируется специальными белковыми комплексами (АТФ-синтазы), которые встроены в энергопреобразующие мембраны. В каталитических центрах АТФ-синтаз создаются условия, благоприятные для синтеза АТФ (см. раздел 3).

Для работы фермента, катализирующего синтез АТФ, необходима энергия внешнего источника (см. рис. 2). У фотосинтезирующих организмов таким источником энергии является солнечный свет, в клетках животных и бактерий — свободная энергия, выделяющаяся в результате биологического окисления органических соединений (см. подробнее, например, [46–49]). У растений образование АТФ связано с работой фотосинтетической цепи переноса электронов в хлоропластах (рис. 3а). У животных подавляющее большинство молекул АТФ образуется в митохондриях — "энергетических фабриках" животной клетки (рис. 3б), которые используют энергию, выделяющуюся при окислении ("сгорании") органических соединений (углеводы, жиры, белки) в результате так называемого клеточного дыхания. В основе этого процесса лежит последовательное окисление органических соединений до CO_2 . Эти процессы сопряжены с переносом электронов к молекулярному кислороду (O_2) по сложной цепи электронного транспорта, расположенной в мембранах митохондрии, в результате чего поглощается O_2 (клеточное дыхание). Процессы электронного транспорта, происходящие на внутренней мем-

бране митохондрии, сопряжены с трансмембранным переносом протонов. В результате генерируется трансмембранная разность электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), служащая источником энергии для работы АТФ-синтазы. В хлоропластах $\Delta\mu_{H^+}$ возникает на мембране тилакоидов — замкнутых пузырьков, расположенных внутри хлоропласта (рис. 3а), которые содержат фотосинтетическую цепь переноса электронов. Работа фотосинтетической цепи переноса электронов, генерирующей $\Delta\mu_{H^+}$, обеспечивается за счёт энергии солнечного света.

Трансмембранная разность электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$), образующаяся на мембране (называемой часто "сопрягающей" мембраной), в которую встроены АТФ-синтазные комплексы (рис. 3в), является "протон-движущей силой", приводящей в действие АТФ-синтазы. Величина $\Delta\mu_{H^+}$ равна:

$$\Delta\mu_{H^+} = F\Delta\varphi + RT \ln \frac{[H^+]_i}{[H^+]_o}, \quad (1)$$

где $\Delta\varphi = (\varphi_i - \varphi_o)$ — трансмембранная разность электрических потенциалов, $[H^+]_i$ и $[H^+]_o$ — активности (концентрации) ионов водорода по обе стороны сопрягающей мембраны, R — универсальная газовая постоянная, T — температура [К], F — постоянная Фарадея.

В энергопреобразующих органеллах клеток животных и растений (митохондрии, хлоропласты) и в клетках бактерий "протонный потенциал" $\Delta\mu_{H^+}$ составляет 160–220 мВ (11,6–19,3 кДж M^{-1}). Большая часть этой энергии используется для синтеза АТФ из АДП и P_i .

Из формулы (1) видно, что величина $\Delta\mu_{H^+}$, которую часто называют "протонным потенциалом", складывается из двух составляющих: а) электрической $\Delta\varphi = \varphi_i - \varphi_o$ и б) концентрационной, которая обусловлена разностью активностей (концентраций) ионов водорода. Концентрационную составляющую обычно выражают через трансмембранную разность рН, $\Delta pH = pH_o - pH_i = -\lg([H^+]_i/[H^+]_o)$. Значение $\Delta\mu_{H^+}$, выраженное в электрических единицах [В], при $T = 298$ К можно записать в виде

$$\Delta\mu_{H^+} = \Delta\varphi + 0,06 \Delta pH [В]. \quad (2)$$

Известно, что обе составляющие $\Delta\mu_{H^+}$ (электрическая и концентрационная) способны приводить в действие протонные АТФ-синтазы [51]. В митохондриях основной вклад в величину $\Delta\mu_{H^+}$ вносит разность электрических потенциалов $\Delta\varphi$. Это связано с тем, что внутренняя мембрана митохондрии, в которую встроены АТФ-синтазные комплексы, является хорошим диэлектриком. Митохондриальная мембрана слабо проницаема для ионов и потому хорошо держит трансмембранную разность электрических потенциалов $\Delta\varphi$. При этом разность рН сравнительно мала. Это обусловлено ионообменными процессами, в результате которых протоны, переносимые через внутреннюю митохондриальную мембрану, связываются с белками и другими молекулами, вытесняя из них в межмембранное пространство другие ионы (например, K^+). При этом вследствие электронейтральности ионообменных реакций (замена одного положительного иона на другой) сохраняется трансмембранная разность потенциалов ($\Delta\varphi \approx 180–200$ мВ) [46–48].

У растений наблюдается обратная ситуация. Трансмембранная разность электрических потенциалов $\Delta\varphi$ шунтируется из-за сравнительно высокой проводимости мембран тилакоидов для ионов Mg^{2+} , K^+ , Na^+ и Cl^- , присутствующих в растительной клетке. В результате этого стационарная разность электрических потенциалов обычно невелика ($\Delta\varphi < 10-20$ мВ), но за счёт постоянного трансмембранного потока протонов в результате работы электронно-транспортной цепи может поддерживаться достаточно высокая трансмембранная разность рН ($\Delta pH \approx 1,5-2,5$ [51–54]).

3. Структурно-функциональная организация протонных АТФ-синтаз

В последние два-три десятилетия были выяснены строение и основные принципы функционирования протонных АТФ-синтаз типа F_0F_1 . За решающий вклад в расшифровку пространственной структуры белкового комплекса F_1 , входящего в состав этой молекулярной машины, английский исследователь Д. Уокер в 1997 г. был удостоен Нобелевской премии по химии. Свою часть премии он разделил с американским биохимиком П. Бойером, который внёс решающий вклад в выяснение механизма синтеза АТР. Ниже мы кратко рассмотрим структурные и функциональные свойства АТФ-синтазы.

3.1. Строение протонной АТФ-синтазы

На рисунке 4 представлена структурная схема АТФ-синтазы типа F_0F_1 , встроенной в энергопреобразующую мембрану. Характерная толщина мембраны, состоящей из молекул липидов (жироподобные молекулы, составляющие основу биологических мембран), составляет 5 нм. Макромолекулярный комплекс F_0F_1 -АТФ-синтазы состоит из трёх морфологически выделенных фрагментов: двух сравнительно крупных белковых комплексов F_1 и F_0 — один из них (F_1) экспонирован в водную фазу, другой встроен в мембрану (F_0) — и "ножки", с помощью которой эти два фрагмента соединены друг с другом. В ранних работах, посвящённых исследованию АТФ-синтаз, белковые комплексы F_1 и F_0

получили название "факторов сопряжения" F_1 и F_0 [46–49]. Мембранная часть этого ферментного комплекса (F_0) представляет собой гидрофобный (нерастворимый в воде) белковый комплекс. Второй крупный фрагмент — "фактор сопряжения" F_1 — заметно выступает из мембраны в виде сферического образования. В хлоропластах F_0F_1 -АТФ-синтаза встроена в мембраны тилакоидов (на рис. 3а они схематически изображены в виде замкнутых продолговатых пузырьков), при этом фактор сопряжения F_1 ориентирован во внешнюю сторону, называемую стромой. В митохондриях F_0F_1 -АТФ-синтаза встроена во внутреннюю мембрану, при этом комплекс F_1 обращён в сторону матрикса (внутренняя часть митохондрии).

У растений и бактерий белковый комплекс F_1 состоит из девяти белковых субъединиц ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$). В нём находятся каталитические центры, в которых непосредственно происходят реакции синтеза и гидролиза АТР. Изолированный (отделённый от мембраны) комплекс F_1 является *аденозинтрифосфатазой* (АТФазой), т.е. ферментом, катализирующим гидролиз АТР. Встроенный в мембрану "фактор сопряжения" F_0 (белковый комплекс ab_2c_n) содержит протон-проводящий канал: этот комплекс обеспечивает сопряжение между энергодонорными процессами переноса протонов через мембрану и энергоакцепторными реакциями синтеза АТР, происходящими непосредственно в каталитических центрах F_1 . Белковые комплексы F_1 и F_0 у бактерий, цианобактерий и хлоропластов высших растений имеют одинаковый состав белковых субъединиц, $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ и ab_2c_n , соответственно. F_0F_1 -АТФ-синтаза митохондрий содержит дополнительно ещё несколько минорных белковых субъединиц [47, 48].

Работа АТФ-синтазы в режиме синтеза АТР сопряжена с переносом через неё протонов, путь которых протекает через F_0 и направлен в сторону F_1 (рис. 3в). В режиме гидролиза АТР протоны переносятся через комплекс F_0 в обратном направлении (рис. 3г). В этом случае фермент работает как протонная помпа ("мотор-генератор"), генерирующая $\Delta\mu_{H^+}$ за счёт энергии молекул АТР.

3.1.1. Белковый комплекс F_1 . Состав и пространственное строение белкового комплекса F_1 хорошо изучены. Детали пространственного строения АТФ-синтаз различного происхождения были установлены методом рентгеноструктурного анализа. Первая атомная структура комплекса F_1 из митохондрий сердца быка (F_1 -АТФаза) с разрешением 2,8 Å была получена Д. Уокером с сотрудниками в 1994 г. [55]. Впоследствии были опубликованы структуры F_1 -АТФаз бактериального и растительного происхождения [56, 57].

Каждая из изученных F_1 -АТФаз напоминает шарообразную глобулу диаметром ≈ 10 нм, образованную тремя субъединицами α и тремя субъединицами β , образующими гексамер $\alpha_3\beta_3$ — ансамбль, состоящий из шести белковых субъединиц. Субъединицы α и β гомологичны, они состоят из полипептидных цепей, которые, несмотря на некоторые различия, имеют сходный состав и последовательности аминокислот. Отметим, что все три субъединицы β гексамера $\alpha_3\beta_3$ имеют одинаковый химический состав, но при этом заметно различаются по конформации. То же самое относится к субъединицам α . В центральной полости $\alpha_3\beta_3$ расположена протяжённая и

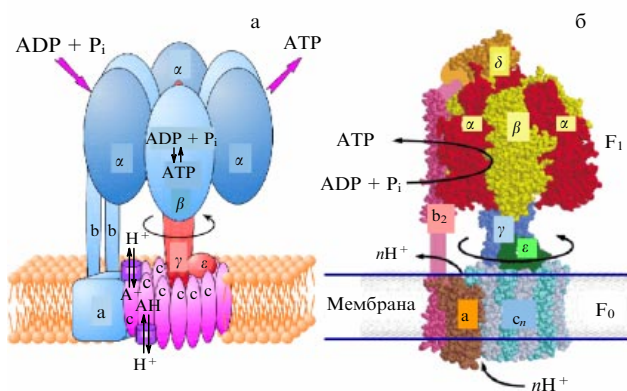


Рис. 4. (а) Схема пространственного строения F_0F_1 -АТФ-синтазы. Светлыми изображены белковые субъединицы, образующие "статор", тёмным изображён "ротор", вращение которого сопряжено с переносом ионов водорода из "кислотного резервуара" (нижняя часть рисунка) в "щелочной резервуар" (верхняя часть рисунка). (б) Реконструкция пространственного строения F_0F_1 -АТФ-синтазы на основании данных рентгеноструктурного анализа [55, 56, 59].

слегка изогнутая белковая субъединица γ , которая заметно выступает из шарообразного гексамера $\alpha_3\beta_3$ (рис. 4а). На рисунке 4б показана модель пространственного строения F_0F_1 -АТФ-синтазы, реконструированная на основании данных рентгеноструктурного анализа [55]. На этом рисунке разные субъединицы фермента имеют разные оттенки.

Белковый ансамбль $\alpha_3\beta_3$ имеет вид слегка приплюснутого шара высотой 8 нм и шириной 10 нм. В центре этого шара имеется полость, внутрь которой погружена субъединица γ , напоминающая слегка изогнутый продолговатый стержень длиной около 9 нм. Часть субъединицы γ выступает из гексамера $\alpha_3\beta_3$ на 3 нм в сторону мембранного комплекса F_0 . С этим фрагментом субъединицы γ связана сравнительно небольшая субъединица ϵ , которая выполняет регуляторную роль в работе фермента. Субъединицы γ и ϵ подвижны, они входят в состав "ротора", который может вращаться относительно "статора" (гексамер $\alpha_3\beta_3$). Субъединица δ расположена на внешней стороне F_1 . Она выполняет структурную роль — с ней связаны субъединицы b , выступающие из мембранной части белкового комплекса F_0 . Состоящий из семи субъединиц белковый комплекс $\alpha_3\beta_3\gamma$ представляет собой ту минимальную структуру, которая способна катализировать гидролиз АТФ. Белковый комплекс $\alpha_3\beta_3$ содержит каталитические центры фермента, в которых происходят реакции синтеза и гидролиза АТФ.

3.1.2. Белковый комплекс F_0 . Погружённый в мембрану гидрофобный (нерастворимый в воде) белковый комплекс F_0 служит основанием, к которому присоединён комплекс F_1 . В его состав входят: одна белковая субъединица типа a , две субъединицы b , а также несколько идентичных копий более мелкой субъединицы c (от 9 до 14). Экспонированный в водную фазу комплекс F_1 связан с комплексом F_0 с помощью двух субъединиц b , выступающих из мембраны в сторону F_1 . Эти субъединицы выполняют роль неподвижных кронштейнов, соединяющих F_1 с F_0 . Один α -спиральный участок субъединицы b погружён в мембрану, остальная часть субъединицы b выступает из мембраны в сторону комплекса F_1 и прикрепляется к расположенной на его поверхности субъединице δ (см. рис. 4). Кроме этого, белковые комплексы F_1 и F_0 связаны друг с другом с помощью субъединицы γ , которая выступает из гексамера $\alpha_3\beta_3$ и зацепляется за расположенное в мембране кольцо c_n .

Кольцо c_n образовано из n субъединиц c , объединённых в единый ансамбль. Каждая из субъединиц c , входящих в комплекс c_n , представляет собой сравнительно небольшой белок, состоящий из двух гидрофобных α -спиралей, соединённых друг с другом короткой гидрофильной петлёй, ориентированной в сторону F_1 . У растений кольцо c_n состоит из $n = 14$ субъединиц c [58], у митохондрий дрожжей $n = 10$ [59]. К кольцу c_n примыкает гидрофобная белковая субъединица a , которая также погружена в мембрану. Её полипептидная цепь образует шесть α -спиральных участков, которые насквозь пересекают мембрану. За центральную часть "барабана" c_n зацеплена субъединица γ , выступающая из комплекса F_1 .

3.1.3. Протон-проводящий путь. Работа F_0F_1 -АТФ-синтазы связана с направленным вращением её "ротора",

состоящего из барабана c_n и соединённых с ним субъединиц γ и ϵ (см. рис. 4). Момент сил, приводящий в движение ротор, возникает за счёт потока протонов через F_0F_1 -АТФ-синтазу. В случае хлоропластов — это поток протонов, направленный наружу, из внутритилакоидного пространства в строму. В случае митохондрий — это поток ионов водорода, направленный внутрь, из межмембранного пространства в митохондриальный матрикс. Протонный канал, по которому ионы водорода переносятся из области с высоким протонным потенциалом ("кислотный резервуар") в область с низким протонным потенциалом ("щелочной резервуар"), связан с белковым комплексом F_0 . Блокирование этого канала с помощью ингибиторов подавляет вращение ротора и синтез АТФ.

Протоны переносятся через F_0F_1 -АТФ-синтазу, проходя через F_0 по специальным "каналам", расположенным на границе между субъединицами a и c . Путь переноса протонов включает следующие функционально важные элементы макромолекулярной конструкции (см. рис. 4):

1. Кольцо c_n . Каждая из субъединиц c в своей центральной части содержит протонируемую карбоксильную группу, которая способна присоединять протон, поступающий из кислотной области ($R-COO^- + H^+ \rightarrow R-COOH$), и отдавать его в щелочную область ($R-COOH \rightarrow R-COO^- + H^+$).

2. Два протонных канала, расположенных в мембранной части F_0F_1 -АТФ-синтазы. Один из них находится ближе к стороне мембраны, обращённой в область с повышенной концентрацией ионов водорода ("кислотный резервуар"). Этот канал обеспечивает поступление протонов к контактирующей с ним депротонированной карбоксильной группе c -субъединицы ($R-COO^- + H^+ \rightarrow R-COOH$). Другой канал, обращённый в противоположную сторону мембраны, обеспечивает диссоциацию протонов в область с пониженной концентрацией ионов водорода ("щелочной резервуар"). Эти каналы не связаны друг с другом непосредственно, поскольку они расположены несососно.

Главную роль в работе протонных каналов F_0F_1 -АТФ-синтазы играют аминокислотные остатки субъединиц a и c , содержащие протонируемые группы, которые способны удерживать протоны и передавать их друг другу. Такие группы содержатся в аминокислотных остатках аспарагиновой кислоты (Asp), аргинина (Arg), гистидина (His) и глутаминовой кислоты (Glu). У бактерии *E. coli* ключевую роль в переносе протонов через F_0F_1 -АТФ-синтазу играет карбоксильная группа аспарагиновой кислоты, расположенной на c -субъединице (Asp61, цифра 61 обозначает порядковый номер аминокислоты, отсчитываемый от N-конца полипептидной цепи субъединицы c). Другой важной аминокислотой, связанной с переносом протонов, является аргинин (Arg210), входящий в состав субъединицы a . Гуанидиновая группа, входящая в аминокислотный остаток Arg210, имеет положительный заряд. Схема возможного расположения этих групп и основные стадии переноса протонов через F_0 показаны на рис. 5. В переносе протонов через F_0F_1 -АТФ-синтазу участвуют, по-видимому, и другие аминокислотные остатки a -субъединицы, однако их роль в создании вращательного момента не столь существенна, как Asp61 и Arg210.

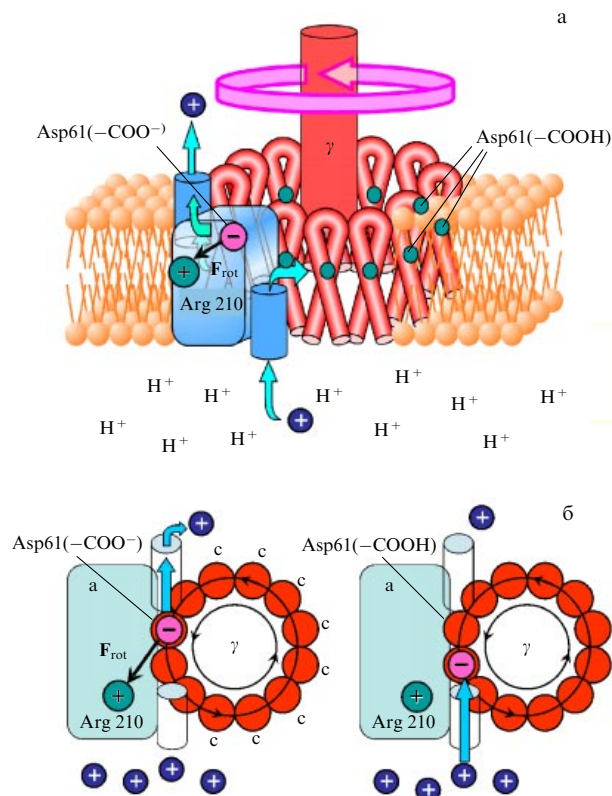


Рис. 5. Схемы, иллюстрирующие трансмембранный перенос протонов через мембранный фрагмент F_0F_1 -АТФ-синтазы и механизм генерации силы F_{rot} , создающей вращательный момент. Подробности работы протон-проводящего пути, по которому ионы водорода переносятся из "кислотного" в "щелочной" резервуар, см. в тексте.

3.2. Механизмы функционирования F_0F_1 -АТФ-синтазы

3.2.1. Каталитические центры протонной АТФ-синтазы.

Реакции синтеза и гидролиза молекул АТР происходят в каталитических центрах F_0F_1 -АТФ-синтазы, расположенных в белковом комплексе F_1 . Отделённый от мембраны комплекс F_1 теряет способность синтезировать АТР, поскольку он не может использовать энергию трансмембранной разности протонных потенциалов $\Delta\mu_{H^+}$. В то же время изолированный комплекс F_1 , представленный даже в его минимальной "комплектации" $\alpha_3\beta_3\gamma$, может эффективно катализировать гидролиз АТР: эта реакция энергетически выгодна и не требует энергии внешнего источника.

Известно, что F_1 содержит шесть центров связывания нуклеотидов (АТР или АДФ) [36, 37]. Три из них являются каталитическими центрами, в которых протекают реакции синтеза или гидролиза АТР. Три других центра прочно удерживают связанные с ними нуклеотиды, но непосредственного участия в реакциях синтеза или гидролиза АТР не принимают. Считается, что эти центры играют регуляторную роль в работе фермента [36, 37].

Каталитические центры находятся в щелях ("карманах") гексамера $\alpha_3\beta_3$, расположенных между смежными субъединицами α и β (рис. 6). Большая часть функционально важных аминокислотных групп, участвующих в формировании каталитических центров, принадлежит субъединицам β . Опыты по направленному мутагенезу с избирательной заменой аминокислот показали, что ключевую роль в реакциях синтеза и гидролиза АТР играют четыре аминокислотных остатка: три амин-

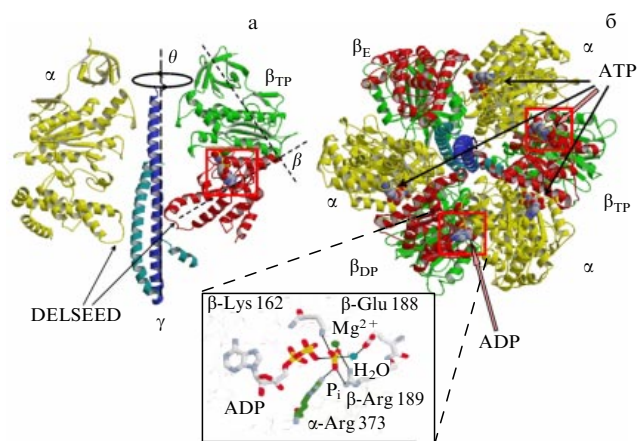


Рис. 6. Пространственное строение белкового комплекса $\alpha_3\beta_3\gamma$. (а) Вид сбоку (показаны только три субъединицы $\alpha\beta\gamma$); (б) вид сверху. Толстыми стрелками показано расположение молекул АТР и АДФ в каталитических центрах фермента. Тонкими стрелками показано расположение трёх молекул АТР в некаталитических центрах связывания. На вставке внизу показаны молекулы АДФ и P_i и их ближайшее окружение внутри каталитического центра F_1 -АТФазы. Приведённые структуры соответствуют данным рентгеноструктурного анализа для F_1 -АТФазы митохондрий сердца быка [55].

кислотных остатка субъединицы β (β -Lys162, β -Arg189 и β -Glu188) и один аминокислотный остаток, принадлежащий субъединице α (α -Arg373) (см. рис. 6, номенклатура аминокислот соответствует F_1 -АТФазе из митохондрий сердца быка [55]). Эти аминокислотные остатки создают "благоприятное" окружение субстратов реакции (АДФ и P_i), способствующее образованию АТР. Положительно заряженные группы аминокислотных остатков β -Lys162, β -Arg189 и α -Arg373 вместе с ионом Mg^{2+} , связанным с молекулой АДФ, экранируют отрицательные заряды, локализованные на атомах кислорода молекул АДФ и P_i . Благодаря этому снижается энергетический барьер реакции образования АТР из АДФ и P_i .

Три каталитических центра F_1F_0 -АТФ-синтазы имеют разное сродство к молекулам АТР, АДФ и P_i . Это связано с тем, что все три белковые субъединицы α и все три белковые субъединицы β , формирующие каталитические центры фермента, в каждый момент времени имеют разные конформации по причине своей конформационной лабильности. Рентгеноструктурный анализ F_1 -АТФазы (комплекс $\alpha_3\beta_3\gamma$) из митохондрий сердца быка [55] показал следующее. В закристаллизованном белке один из каталитических центров содержал молекулу АТР (точнее, её негидролизующий аналог АМР-РNP). В молекуле АМР-РNP атом кислорода атома вторым и третьим атомами фосфора заменён азотом, что предотвращает гидролиз АМР-РNP в ходе кристаллизации фермента. Во втором каталитическом центре находилась молекула АДФ, третий центр был свободен. Очевидно, что различное сродство этих центров к нуклеотидам (АТР и АДФ)¹ обусловлено их струк-

¹ Здесь и далее подразумевается (если не оговорено особо), что молекулы АТР и АДФ, обладающие высоким сродством к ионам Mg^{2+} , образуют комплексы АТР- Mg^{2+} и АДФ- Mg^{2+} (см. рис. 1). Известно, что ионы Mg^{2+} являются обязательными участниками событий, протекающих в каталитических центрах подавляющего большинства известных в природе АТФаз [36, 49].

турными различиями. Каталитический центр, содержащий АТР, находится в "закрытой" конформации ($\beta_{\text{ТР}}$), в этом центре молекула АТР прочно связана с белком. Каталитический центр, содержащий АДФ, также закрыт, но его конформация $\beta_{\text{ДР}}$ несколько отличается от конформации $\beta_{\text{ТР}}$. Свободный центр имеет "открытую" конформацию $\beta_{\text{Е}}$. В отличие от центров $\beta_{\text{ТР}}$ и $\beta_{\text{ДР}}$, проникновение субстратов в каталитический центр $\beta_{\text{Е}}$ не затруднено стерическими препятствиями. Эти особенности строения F_1 -АТФазы характерны также для F_1 -АТФаз, выделенных из других организмов [57]. Следует, однако, заметить, что для некоторых из изученных кристаллических структур $\alpha_3\beta_3\gamma$ заполнение каталитических центров $\beta_{\text{ТР}}$ и $\beta_{\text{ДР}}$ было иным. Согласно [60, 61], два каталитических центра содержали молекулы АТР, третий был свободен. Эти различия, вероятно, отражают разные зафиксированные конформационные состояния фермента, зависящие от условий кристаллизации.

Различия в свойствах каталитических центров $\beta_{\text{Е}}$, $\beta_{\text{ДР}}$ и $\beta_{\text{ТР}}$ обусловлены асимметрией белкового комплекса $\alpha_3\beta_3\gamma$. Вследствие того что внутри гексамера $\alpha_3\beta_3$ находится протяжённая изогнутая субъединица γ , субъединицы β (так же как и субъединицы α) приобретают разные конформации. Вариативность конформации обусловлена гибкостью белковых субъединиц α и β , вследствие чего их структура изменяется при вращении субъединицы γ . Субъединица β состоит из двух крупных доменов (на рис. 7 — тёмного и светлого), соединённых "шарниром". Угол β , характеризующий взаимное расположение этих доменов, при повороте изогнутой субъединицы γ изменяется приблизительно на 30° (см. рис. 7а и 7б). При этом субъединицы α также изменяют свои конформации, но незначительно.

Итак, благодаря структурной гибкости три субъединицы β , контактирующие с разными сторонами изогнутой субъединицы γ , приобретают разные конформации. Этим определяются структурные различия каталитических центров, проявляющиеся в их разном сродстве к АТР, АДФ и P_i . Следует особо подчеркнуть, что именно

наличие изогнутой субъединицы γ обуславливает асимметрию комплекса $\alpha_3\beta_3\gamma$ и, соответственно, различие свойств каталитических центров $\beta_{\text{Е}}$, $\beta_{\text{ДР}}$ и $\beta_{\text{ТР}}$. Действительно, как показал рентгеноструктурный анализ, искусственно сконструированный гексамерный комплекс $\alpha_3\beta_3$, не содержащий субъединицы γ , является симметричным (симметрия C_3), при этом все субъединицы β (так же как все субъединицы α) имеют одинаковые конформации [63].

Среди важных структурных особенностей субъединицы β следует обратить внимание на характерную петлю, выступающую в сторону субъединицы γ (см. рис. 6, 7). Этот фрагмент полипептидной цепи, называемый DELSEED (в соответствии с последовательностью аминокислот), содержит пять отрицательно заряженных аминокислотных остатков (D — аспартат, E — глутамат), один положительно заряженный (L — лизин) и один нейтральный (S — серин). Участок полипептидной цепи субъединицы γ , контактирующий с DELSEED, содержит в основном положительно заряженные аминокислотные остатки. Взаимодействие расположенных вблизи друг от друга заряженных участков субъединиц β и γ обеспечивает механическое сопряжение между этими двумя важнейшими узлами макромолекулярной конструкции F_1 -АТФазы. Вследствие тесного контакта этих фрагментов, при изменении конформации субъединицы β , индуцированном связыванием АТР каталитическим центром фермента, создаётся момент силы, вызывающий поворот ротора (вращение субъединицы γ при гидролизе АТР).

С другой стороны, принудительное вращение субъединицы γ , связанной с ротором электромотора F_0 (крутящегося за счёт энергии $\Delta\mu_{\text{H}^+}$), вызывает конформационные изменения субъединицы β . В результате этого изменяются состояния каталитических центров F_1 и происходит синтез АТР из АДФ и P_i . Проводя аналогию с макроскопическими моторами, можно сказать, что в этом случае вращающаяся за счёт работы электромотора F_0 эксцентрическая субъединица γ выполняет роль молекулярного "коленчатого вала"², толкающего субъединицы β .

3.2.2. Каталитические циклы реакций синтеза и гидролиза АТР. Работа F_0F_1 -АТФ-синтазы связана с её структурными перестройками, в результате которых синхронно изменяются состояния всех трёх каталитических центров. В настоящем разделе мы рассмотрим, какие изменения каталитических центров происходят при вращении "ротора" (субъединица γ) внутри гексамера $\alpha_3\beta_3$ и как эти структурные изменения белка связаны с реакциями синтеза и гидролиза АТР.

Уницентриальный катализ. Механохимия реакции гидролиза АТР. Рассмотрим сначала простейший сценарий событий, приводящих к гидролизу АТР в одном каталитическом центре фермента. Этот сценарий соответствует

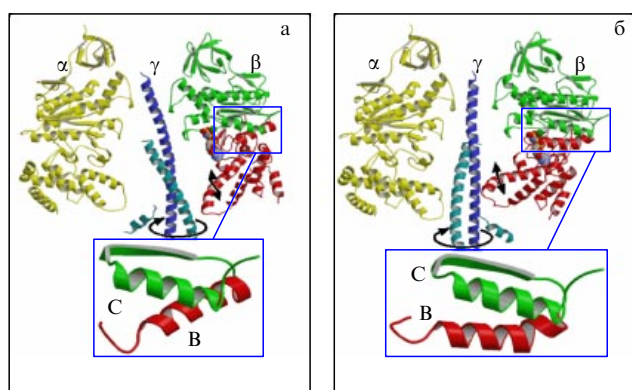
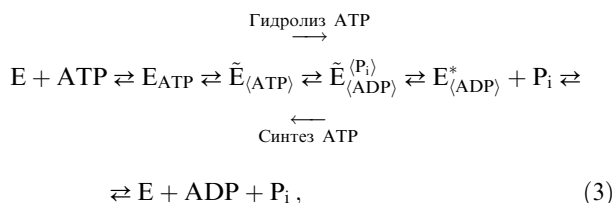


Рис. 7. Расположение субъединицы γ между противоположными субъединицами α и β : (а) "открытая" конформация каталитического центра, не содержащего субстратов, (б) "закрытая" конформация каталитического центра, содержащего Mg^{2+} –АТР. Структуры соответствуют данным рентгеноструктурного анализа для F_1 -АТФазы митохондрий сердца быка [55]. Врезки внизу показывают изменение взаимного расположения α -спиральных участков В и С в области "шарнира" субъединицы β , сопряжённое со структурными изменениями субъединицы β в результате связывания молекулы АТР (модифицированный рис. 3 из [62]).

² На сайте Д. Уокера (J. Walker) в Интернете представлены в открытом доступе анимационные фильмы, иллюстрирующие конформационные изменения АТФ-синтазы и её субъединиц (<http://www.mrc-mbu.cam.ac.uk/research/atp-synthase/molecular-animations-atp-synthase>). В ряде статей Г. Остера (G. Oster) в списке литературы читатель также найдёт ссылки на разнообразные анимации этого фермента.

так называемому уницентральному механизму катализа, который реализуется при исключительно низких концентрациях АТФ (~ 1 нМ), когда из трёх центров связывания только один каталитический центр содержит молекулу АТФ. Исследования уницентрального механизма катализа позволили оценить энергетику ключевых стадий гидролиза АТФ [36, 64–68].

Последовательность этих событий можно упрощённо записать следующим образом:



где символом E обозначен свободный каталитический центр; $E_{\text{АТФ}}$ и $\tilde{E}_{(\text{АТФ})}$ — каталитический центр, содержащий слабо и прочно связанную молекулу АТФ соответственно; $\tilde{E}_{(\text{АТФ})}^{(P_i)}$ — каталитический центр, содержащий АДР и P_i ; $E_{(\text{АТФ})}^*$ — каталитический центр, содержащий АДР.

Реакции гидролиза и синтеза АТФ рассматриваются как последовательность частных реакций (3), протекающих в разных направлениях.

Рассмотрим энергетику процессов, описываемых схемой (3). Первым актом в цепи событий, приводящих к гидролизу АТФ, является связывание АТФ ферментом. Свободный каталитический центр обладает высоким сродством к молекуле АТФ. Связывание АТФ ферментом — энергетически выгодный процесс, который в "стандартных" условиях, как это следует из биохимических данных [64–68], характеризуется уменьшением свободной энергии системы³ $\Delta G_{(\text{АТФ})}^0 \approx \approx -(14-16)$ ккал моль⁻¹. Связывание АТФ можно рассматривать как последовательность нескольких элементарных стадий. Первая стадия — это диффузия молекулы АТФ из раствора в открытую щель между близлежащими субъединицами α и β , внутри которой находится каталитический центр. Эта стадия ускоряется с ростом концентрации АТФ в растворе. Посадка АТФ в каталитический центр индуцирует структурные перестройки белка, в результате которых открытый каталитический центр становится закрытым (рис. 8). Анализ структуры F_1 -АТФазы и расчёты методом молекулярной динамики, выполненные Остером с сотрудниками [69], позволили реконструировать последовательность событий, связанных с сорбцией молекулы АТФ. Вслед за проникновением АТФ в открытую щель каталитического центра происходит последовательное образование 15–20 водородных связей между АТФ и аминокислотными остатками каталитического центра. Конформационные изменения белка, индуцированные посадкой АТФ, затрагивают прежде всего пространственную

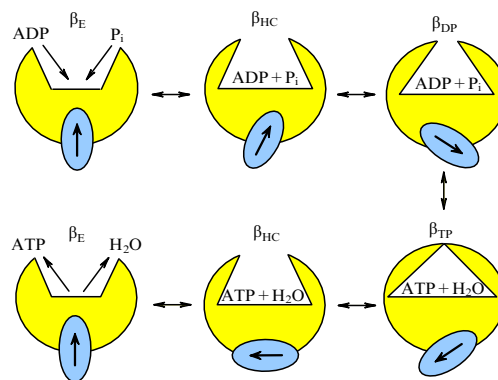


Рис. 8. Схема, иллюстрирующая связь химических превращений АТФ, P_i и АТФ со структурными изменениями субъединицы β (переходы каталитического центра "открытое" $\leftrightarrow$ "закрытое" состояние) и вращением ротора F_0F_1 -АТФ-синтазы. Символы β_E , β_{DP} и β_{TP} обозначают различные конформационные состояния каталитического центра (см. объяснения в тексте), символом β_{HC} обозначено "полузакрытое" состояние каталитического центра.

структуру субъединицы β — происходит поворот одного из доменов субъединицы β относительно другого. Эти изменения, как было сказано выше, сопряжены с поворотом субъединицы γ (см. раздел 3.2.1). В результате таких изменений открытый каталитический центр переходит в закрытое состояние, в котором он прочно удерживает молекулу АТФ за счёт образовавшихся водородных связей. По мере закрытия каталитического центра число водородных связей, удерживающих молекулу АТФ, увеличивается, достигая 15–20. В итоге молекула АТФ оказывается зажатой между двумя петлями субъединицы β и положительно заряженным аминокислотным остатком α -Arg373, принадлежащим субъединице α . Важную роль в переходе АТФ из слабо связанного состояния в прочно связанное играет ион Mg^{2+} . Есть мнение [70], что энергия сорбции молекулы АТФ частично ($\approx 40\%$) трансформируется в энергию упругих деформаций белка, связанных с изгибом субъединицы β и деформацией её полипептидной цепи на участках, непосредственно формирующих каталитический центр. Считается, что энергия упругих деформаций субъединицы β , с которой связывается молекула АТФ, используется для работы других каталитических центров F_1 -АТФазы [70].

Внутри закрытого каталитического центра создаются условия для быстрого гидролиза АТФ. Как установил Бойер с сотрудниками [36], в закрытом центре происходят многочисленные (~ 50 раз) обратимые взаимопревращения АТФ и АДР ($\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{АДР} + P_i$), которые не требуют энергии внешнего источника. Константа равновесия этой реакции близка к единице ($K_{\text{eq}} \approx 0,5-2,9$ [64–68]), откуда следует, что свободная энергия реакции $\text{АТФ} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{АДР} + P_i$, протекающей в закрытом каталитическом центре, близка к нулю, $\Delta G_{(\text{АТФ} \rightleftharpoons \text{АДР} + P_i)}^0 \approx \approx 0$ ккал моль⁻¹. Иными словами, реакции гидролиза и синтеза АТФ, протекающие внутри каталитического центра, не требуют энергии внешнего источника. Это означает, что окружение молекул АДР и P_i в каталитическом центре благоприятствует образованию ковалентной связи между их фосфатными группами.

Продукты гидролиза АТФ (молекулы АДР и P_i) диссоциируют в раствор. Очевидно, что этому способствует отталкивание отрицательных зарядов располо-

³ Подчеркнём, что приводимые здесь значения ΔG^0 относятся к изменениям свободной энергии в "стандартных" условиях (концентрации реагентов 1 М, температура 25 °С, рН = 7,0), которые вычисляются по формуле $\Delta G^0 = -RT \ln K_{\text{eq}}$, где K_{eq} — константа равновесия химической реакции, R — универсальная газовая постоянная, T — температура [К]. Вследствие зависимости свободной энергии гидролиза АТФ от концентраций реагентов, $\Delta G_{\text{АТФ}} = \Delta G^0 + RT \ln \{([\text{АДР}] \cdot [P_i])/[\text{АТФ}]\}$, в реальных условиях значение $\Delta G_{\text{АТФ}}$ может существенно отличаться от ΔG^0 [49].

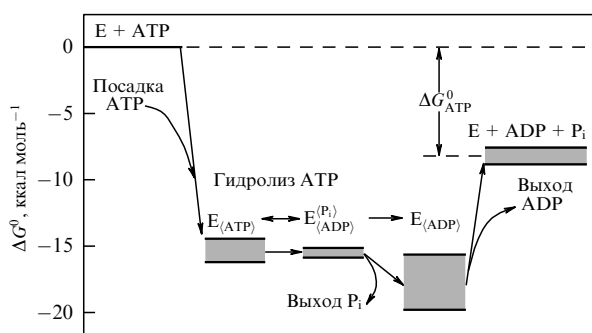


Рис. 9. Диаграмма изменений свободной энергии ΔG^0 при гидролизе АТФ F_1 -АТФазой в "стандартных" условиях. (E — молекула фермента.) Значения ΔG^0 рассчитаны по формуле $\Delta G^0 = -RT \ln K_{eq}$. Константы равновесия K_{eq} частных реакций, представленных на диаграмме, получены на основании кинетических данных для F_1 -АТФаз, выделенных из митохондрий сердца быка [64, 65] и бактерии *E. coli* [66].

женных вблизи молекул ADP и P_i , которое ослабляет связь P_i с каталитическим центром. Известно [64–68], что диссоциация P_i — это энергетически выгодный процесс, $\Delta G^0_{(P_i)} \approx -(0,5-4)$ ккал моль $^{-1}$. Оставшаяся после диссоциации P_i молекула ADP сохраняет сродство к каталитическому центру, "стандартная" свободная энергия диссоциации ADP равна $\Delta G^0_{(ADP)} \approx \approx 7-12$ ккал моль $^{-1}$. Полный цикл реакции гидролиза АТФ (рис. 9) является энергетически выгодным процессом ($\Delta G^0_{ATP \rightarrow ADP+P_i} \approx -(7-8)$ ккал моль $^{-1}$), который может протекать самопроизвольно.

Реализация процессов, описываемых схемой (3), в направлении синтеза АТФ, энергетически невыгодна, для этого требуется энергия внешнего источника. Поэтому изолированная F_1 -АТФаза сама по себе не способна синтезировать АТФ. Однако, как мы увидим ниже (см. раздел 4.1), в определённых экспериментальных условиях за счёт внешней силы, вызывающей вращение субъединицы γ , даже изолированная F_1 -АТФаза способна синтезировать АТФ. Теперь подробнее обсудим вопросы о том, насколько ферментативный катализ ускоряет реакции синтеза и гидролиза АТФ и от чего зависят скорости этих реакций.

Мультицентральный катализ. Функция фермента — ускорение реакции, которая сама по себе (например, самопроизвольный гидролиз АТФ), без фермента, протекает очень медленно. Как было сказано выше, последняя стадия в цепи реакций (3) в направлении гидролиза АТФ — диссоциация ADP — энергетически невыгодный процесс ($\Delta G^0_{(ADP)} > 0$), который должен замедлять результирующую скорость гидролиза АТФ. Этим, вероятно, объясняется то, что гидролиз АТФ по уницентральному механизму происходит на пять-шесть порядков медленнее, чем в реальных условиях, когда в работу фермента вовлечено сразу несколько каталитических центров (мультицентральный катализ [36, 37]). В настоящем разделе на примере ферментативного синтеза и гидролиза АТФ мы увидим, что кооперация нескольких каталитических центров, работающих кооперативно ("концертно"), приводит к значительному (в 10^5 – 10^6 раз) ускорению работы фермента. Суть такой кооперации заключается в том, что реализации энергоёмкой стадии (например, освобождению ADP из каталити-

ческого центра, $\Delta G^0_{(ADP)} > 0$) способствует энергетически выгодный процесс (связывание АТФ, $\Delta G^0_{(ATP)} < 0$), протекающий в другой части фермента. Каталитические центры, в которых происходят *энергодонорный* и *энергоакцепторный* процессы, разнесены в пространстве, однако они тесно *сопряжены* друг с другом с помощью общих "деталей" макромолекулярной конструкции (в случае F_0F_1 -АТФ-синтазы — это субъединица γ , контактирующая с разными субъединицами гексамера $\alpha_3\beta_3$).

После предварительных замечаний, касающихся кооперативности в работе фермента, рассмотрим подробнее каталитический цикл реакции синтеза АТФ. Заметим, что в клетке концентрации АТФ и ADP достаточно высоки ($\sim 1-10$ mM), поэтому в реальных условиях реализуется мультицентральный режим работы фермента, когда одновременно несколько нуклеотидов (два или три) связаны с разными каталитическими центрами. В этих условиях все каталитические центры, вовлечённые в реакции синтеза или гидролиза АТФ, работают кооперативно. Центральная роль в обеспечении согласованной работы разных каталитических центров принадлежит вращающейся субъединице γ . При вращении субъединицы γ состояния всех трёх каталитических центров изменяются синхронно. В результате этого каждый центр поочерёдно изменяет своё сродство к субстратам и продуктам реакции.

Рассмотрим процессы синтеза АТФ с учётом кооперативного взаимодействия всех субъединиц фермента. На рисунке 10 условно изображены три каталитических центра: 1 — "открытый" центр, доступный для посадки субстратов (молекул ADP и P_i); 2 — "закрытый" центр, с которым прочно связаны молекулы ADP и P_i , способные превратиться в АТФ; 3 — "закрытый" центр, с которым связана молекула АТФ. Свободный каталитический центр (открытый центр 1) связывает ADP и P_i . В результате конформационных перестроек фермента, вызванных вращением ротора на 120° , этот каталитический центр закрывается (переход "состояние 1 → состояние 2"), а молекулы ADP и P_i оказываются в условиях, которые благоприятны для энергетически "бесплатного" образования АТФ. Как было сказано выше, образование АТФ из ADP и P_i внутри закрытого каталитического центра не требует энергии внешнего источника.

В результате следующего поворота субъединицы γ на 120° каждый из трёх каталитических центров переходит в новое состояние. Каталитический центр, находившийся в состоянии 2, перейдёт в состояние 3, в котором он

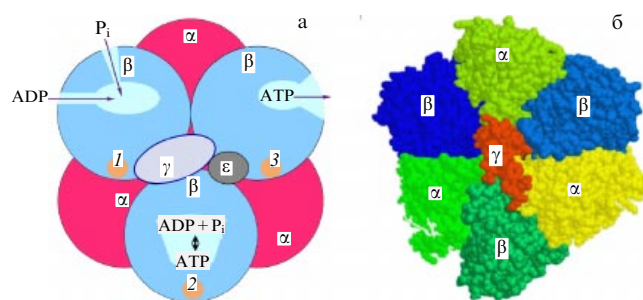


Рис. 10. (а) Схема, иллюстрирующая энергозависимые изменения состояний каталитических центров F_0F_1 -АТФ-синтазы. (б) Взаимное расположение субъединиц α , β , γ (см. также рис. 6) в F_1 -АТФазе, полученное на основании данных рентгеноструктурного анализа [55].

содержит молекулу АТР, образовавшуюся из АДФ и P_i без затраты энергии. Подчеркнём, что в этом нет никакого нарушения закона сохранения энергии. Действительно, образовавшаяся "бесплатно" (с точки зрения энергетического баланса) молекула АТР прочно связана с ферментом, она находится в закрытом каталитическом центре, а потому не может быть использована для совершения полезной работы. Для того чтобы освободить молекулу АТР и сделать её доступной для "потребителей" энергии, необходима энергия внешнего источника. Таким источником энергии является разность электрохимических потенциалов ионов водорода $\Delta\mu_{H^+}$, за счёт которой вращается ротор электромотора F_0 . После следующего поворота ротора на 120° снова изменяются состояния каталитических центров, в результате чего связь молекулы АТР с ферментом ослабевает и она диссоциирует в раствор. Свободный каталитический центр возвращается в исходное состояние 1 (переход $3 \rightarrow 1$).

Важно отметить, что описанные выше последовательные изменения конформационных состояний каталитических центров (см. рис. 10, переходы $1 \rightarrow 2 \rightarrow 3$) происходят в результате структурных перестроек фермента, инициированных вращением ротора за счёт энергии внешнего источника ($\Delta\mu_{H^+}$). Эти перестройки имеют кооперативный характер — они одновременно затрагивают состояния всех трёх каталитических центров, расположенных в гексамере $\alpha_3\beta_3$. В результате трёх последовательных поворотов ротора на 120° , т.е. за один полный оборот ротора на 360° , каждый из трёх каталитических центров последовательно свяжет молекулы АДФ и P_i и освободит одну молекулу АТР в раствор. Таким образом, поскольку АТФ-синтаза содержит три каталитических центра, после каждого поворота ротора на 120° в растворе будет появляться одна новая молекула АТР.

Описанная выше схема событий соответствует так называемому "binding-change" механизму, предложенному Бойером [36, 37]. Гипотеза Бойера включает в себя два фундаментальных положения: 1) синтез АТР из АДФ и P_i в активном центре фермента не требует энергии внешнего источника; 2) энергозатратной стадией образования АТР является стадия освобождения прочно связанной молекулы АТР из каталитического центра, ослабление связи АТР с каталитическим центром фермента обусловлено энергозависимыми кооперативными структурными перестройками фермента (см. историю вопроса и различные варианты "binding-change" механизма в обстоятельных обзорах [36]). Отметим, что экспериментальные данные о строении F_0F_1 -АТФ-синтазы хорошо согласуются с представлениями Бойера о механизме работы этого фермента. Экспериментальные доказательства того, что работа F_0F_1 -АТФ-синтазы сопряжена с вращением её ротора, будут подробно рассмотрены в разделе 4.1.

Как было сказано выше, F_0F_1 -АТФ-синтаза является обратимой молекулярной машиной. Это означает, что при избытке молекул АТР и в отсутствие протонного потенциала вращение субъединицы γ может происходить в противоположном направлении. В этих условиях фермент будет катализировать гидролиз АТР: связывание АТР $\rightarrow$ гидролиз АТР $\rightarrow$ диссоциация P_i и АДФ. Обычно считается, что реакция гидролиза АТР является обращением реакции синтеза АТР (3). Следует, однако,

подчеркнуть, что конкретные пути реакций синтеза и гидролиза АТР могут не совпадать [2, 71]. Это обусловлено тем, что структурные состояния одного и того же фермента, катализирующего прямую (синтез АТР) и обратную (гидролиз АТР) реакции, могут заметно различаться. Существуют специальные биофизические и биохимические механизмы регуляции активности F_0F_1 -АТФ-синтазы, обеспечивающие переключения режимов её работы (катализ прямой или обратной реакции, см. подробнее [71]). Это позволяет оптимизировать биоэнергетические процессы в клетке при изменениях её метаболического состояния (соотношение АТР/АДФ и др.). Важную роль в переключении режимов работы F_0F_1 -АТФ-синтазы (синтез/гидролиз АТР) играет субъединица ϵ , связанная с субъединицей γ и расположенная вблизи барабана c_n . Подробный анализ данного вопроса выходит за рамки настоящего обзора.

4. Протонная АТФ-синтаза — вращающийся молекулярный мотор

4.1. Экспериментальные доказательства вращения ротора

В настоящее время существуют убедительные экспериментальные доказательства вращения ротора при работе F_0F_1 -АТФ-синтазы. К первой группе доказательств относятся результаты опытов, свидетельствующие о потере активности фермента при фиксации ротора относительно статора. Вторая группа опытов — визуализация вращения ротора биофизическими методами.

Первые экспериментальные доказательства вращения ротора F_1 -АТФазы были получены в опытах по химическому "пришиванию" субъединицы γ к одной из трёх субъединиц β , содержащей радиоактивную метку, с помощью дисульфидных $-S-S-$ мостиков, связывающих близлежащие цистеиновые остатки субъединиц β и γ [72–74]. Оказалось, что такая искусственная иммобилизация субъединицы γ блокирует как гидролиз, так и синтез АТР. После разрыва сшивки ($-S-S- \rightarrow -SH + HS-$) активность фермента восстанавливалась, он работал — гидролизовал АТР. Затем, после того как фермент поработал определённое время после разрыва сшивок, снова сшивали субъединицы β и γ , после чего анализировали, между какими субъединицами появились новые сшивки. Оказалось, что новые сшивки были равномерно распределены между всеми тремя субъединицами β , а не локализовались только в меченой, к которой исходно была "пришита" субъединица γ . Из этого следовало, что в присутствии АТР происходило вращение субъединицы γ .

В работах Юнге с соавторами [75–77] вращение субъединицы γ , сопряжённое с работой F_1 -АТФазы (гидролиз АТР), было зарегистрировано с помощью флуоресцентного красителя эозина, ковалентно связанного с субъединицей γ .

Прямое наблюдение вращения ротора отдельной молекулы F_1 -АТФазы было впервые осуществлено группой японских учёных в 1997 г. [78]. С помощью искусственных "хвостиков", пришитых к субъединицам β , макромолекулярный комплекс $\alpha_3\beta_3\gamma$ был закреплён на поверхности твёрдой подложки. Для визуализации вращения субъединицы γ к её концу, выступающему из гексамера $\alpha_3\beta_3$, прикрепили макромолекулярный мар-

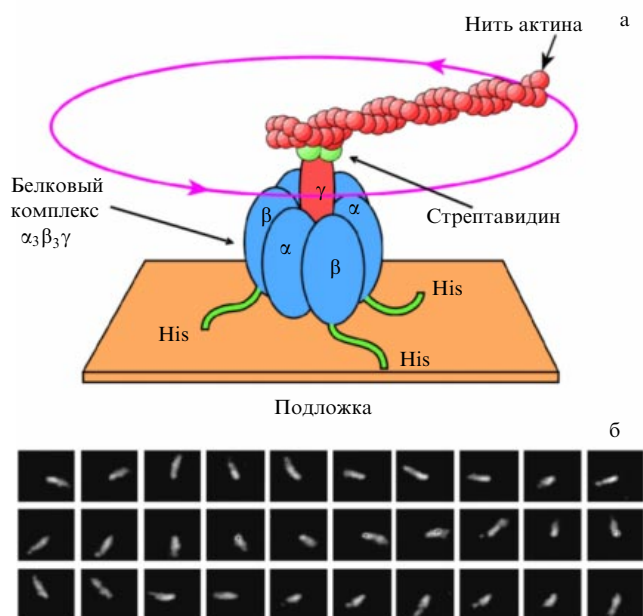


Рис. 11. Схема опыта по визуализации вращения ротора F_1 -АТФазы (по данным работы [78]): (а) конструкция гибридной системы; (б) последовательные изменения положения нити актина — временные интервалы между изображениями равны 133 мс.

кёр — протяжённый фибриллярный белок актин длиной ~ 1 мкм, помеченный флуоресцентным красителем (рис. 11а). Путём наблюдения с помощью микроскопа за положением флуоресцирующего маркера удалось зарегистрировать кинематику направленного (против часовой стрелки) вращения субъединицы γ относительно обездвиженного гексамера $\alpha_3\beta_3$ (рис. 11б). Оказалось, что направленное вращение субъединицы γ происходит только при наличии химического "топлива" — молекул АТФ. Направление вращения в точности соответствовало предсказанию на основании рентгеноструктурных данных о заполнении каталитических центров молекулами АТФ и АДФ [78–80]. Вращения происходили дискретными скачками, с шагом, равным 120° . Средняя скорость вращения ротора увеличивалась с ростом концентрации АТФ в растворе, омывающем фермент, а также при укорочении длины маркера, достигая примерно 10 оборотов в секунду. В отсутствие АТФ наблюдались лишь редкие случайные повороты в обоих направлениях, обусловленные тепловыми флуктуациями. Впоследствии появились сообщения о направленном вращении маркеров, пришитых не только к субъединице γ , но и к другим элементам ротора — к кольцу c_n или к субъединице ε [81]. Наконец, была показана "относительность" вращательного движения, инициируемого гидролизом АТФ. В опытах, когда иммобилизованным (фиксированным на подложке) было кольцо c_n , наблюдали вращение маркера, "пришитого" к комплексу $\alpha_3\beta_3$ [82].

В более поздних экспериментах (см., например, [83]) вместо длинного актинового хвоста (~ 1 мкм) в качестве маркера использовали наноразмерные (диаметр 40 нм) золотые бусинки (рис. 12а). Это позволило значительно уменьшить гидродинамическое сопротивление среды, тормозящее движение ротора. Вращение бусинки, прочно "приклеенной" к субъединице γ с помощью белка

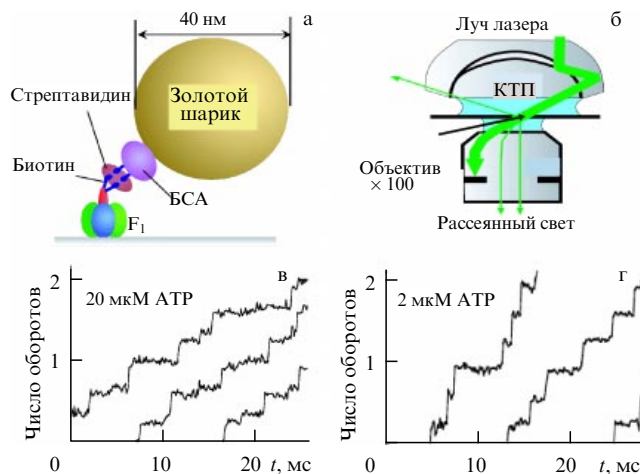


Рис. 12. Иллюстрации к эксперименту по наблюдению вращения ротора, основанному на явлении рассеяния света (по данным работы [83]): (а) конструкция гибридной системы для наблюдения за вращением ротора (БСА — бычий сывороточный альбумин); (б) схема экспериментальной установки (в объектив микроскопа попадает свет, рассеянный бусинкой, КТП — конденсор тёмного поля); (в, г) типичные картины вращений бусинки, иллюстрирующие дискретный характер поворотов ротора в системе, содержащей 20 мкМ (в) или 2 мМ (г) АТФ.

стрептавидина, наблюдали с помощью микроскопа (рис. 12б). Измерительную ячейку, содержащую такую химерную систему, помещали перед объективом микроскопа и освещали пучком лазерного света. Конструкция экспериментальной установки была такова, что в объектив микроскопа проникал только свет, рассеянный золотой бусинкой. За вращением бусинки следили по изменению положения пятна рассеянного света. Использование такой системы позволило повысить временное разрешение вращения ротора F_1 -АТФазы. На рисунке 12в, г показаны типичные картины вращений наноразмерной бусинки при гидролизе АТФ, полученные при разных концентрациях АТФ [83]. В случае низких концентраций АТФ (20 мкМ) чётко видно, что каждый поворот ротора на 120° включает в себя две фазы. После быстрого поворота на 80° – 90° (за время $\leq 0,25$ мс) наблюдается пауза (≈ 2 мс), за которой следует вращение ротора на 40° – 30° . Считается [83], что первая фаза (поворот на 80° – 90°) связана со стадиями посадки АТФ и её гидролиза в каталитическом центре; вторая фаза (поворот на 40° – 30°) связана с диссоциацией продуктов реакции (АДФ и/или P_i).

С увеличением концентрации АТФ средняя скорость вращений бусинки возрастает. Очевидно, что при высокой концентрации АТФ сокращается время её ожидания свободным каталитическим центром. При этом две фазы вращения ротора практически сливаются друг с другом (рис. 12г). Вероятно, это связано с тем, что почти сразу после освобождения одного из каталитических центров (фаза 40° – 30°) происходит быстрая посадка в него молекулы АТФ, инициирующая поворот на 80° – 90° .

Связь между кинематикой вращения ротора и биохимическими стадиями реакции гидролиза АТФ была подробно исследована в работах [84–89]. Изменения свойств каталитических центров, инициированные вращением ротора, схематически показаны на рис. 13. На

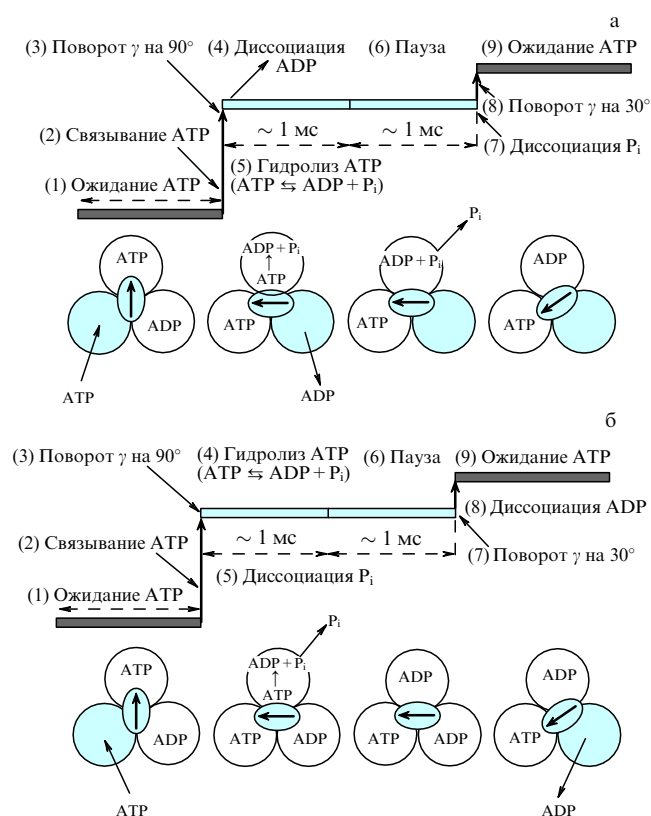


Рис. 13. Схемы, иллюстрирующие связь между различными стадиями каталитического цикла гидролиза АТФ и вращением ротора F_1 -АТФазы: (а) двухцентровый механизм гидролиза АТФ; (б) трёхцентровый механизм гидролиза АТФ.

этом рисунке представлены два возможных сценария, иллюстрирующие связь между механическими (вращение ротора) и химическими процессами (связывание АТФ ферментом, гидролиз АТФ в каталитическом центре, диссоциация продуктов реакции ADP и P_i). Эти сценарии относятся к двухцентровому (рис. 13а) и трёхцентровому (рис. 13б) механизмам гидролиза АТФ (о различии этих сценариев см. подробнее [36, 37, 90–94]).

В 2004 г. появилась удивительная работа [95], в которой было непосредственно доказано, что изолированная F_1 -АТФаза, имеющая минимальную "комплектацию" белковых субъединиц $\alpha_3\beta_3\gamma$, работает как *обратимая молекулярная машина*. Показано, что в зависимости от направления принудительного вращения ротора F_1 -АТФаза может работать в одном из двух режимов — синтезировать или гидролизовать АТФ. Для того чтобы вращать ротор в заданном направлении, к субъединице γ "пришили" магнитную "ручку" (стироловый шарик, наполненный магнитными частицами, рис. 14а). Молекулы F_1 -АТФазы с намагниченными "ручками" фиксировали в специальной ячейке, окружённой системой управляемых электромагнитов, с помощью которых можно было вращать субъединицы γ в направлении по или против часовой стрелки (рис. 14б).

Результаты эксперимента оказались впечатляющими! При вращении ротора по часовой стрелке (если смотреть на молекулу F_1 -АТФазы со стороны субъединицы γ , выступающей из $\alpha_3\beta_3$) происходил синтез АТФ из ADP и P_i . При этом число образующихся молекул АТФ увеличивалось с ростом скорости вращения магнитной

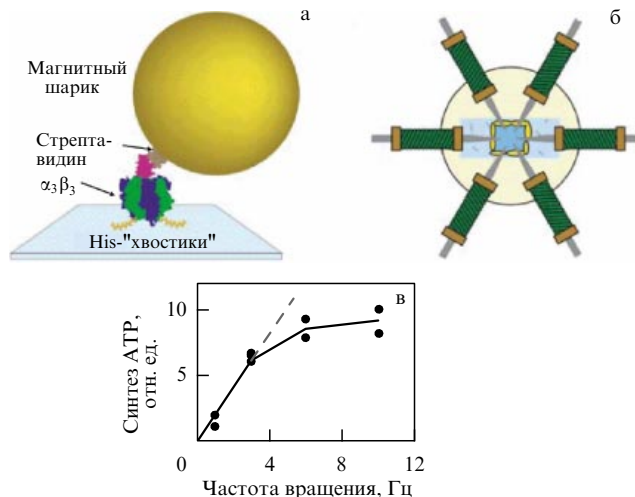


Рис. 14. Схема опыта по принудительному вращению ротора с помощью магнитного шарика (модифицированные рис. 1 и рис. 4 из работы [95]): (а) общий вид мотора (фрагмента F_1) с присоединённой к нему намагниченной бусинкой; (б) вид экспериментальной установки сверху; (в) зависимость скорости синтеза АТФ от скорости принудительного вращения ротора.

"ручки" (рис. 14в). При вращении "ручки" в обратном направлении наблюдали гидролиз АТФ. Так впервые было доказано, что изолированная F_1 -АТФаза способна работать как обратимая молекулярная машина, синтезирующая или гидролизующая АТФ в зависимости от направления вращения ротора.

В случае, когда F_0F_1 -АТФ-синтаза встроена в биологическую мембрану, направление вращения ротора определяется тем, какой из двух моторов создаёт вращающий момент. Вращение ротора мембранного электромотора (барабан c_n) за счёт энергии протонного потенциала $\Delta\mu_{H^+}$ обеспечивает синтез АТФ. В режиме гидролиза АТФ (избыток АТФ, низкие значения $\Delta\mu_{H^+}$) работает механохимический мотор, вращающий субъединицу γ в обратном направлении. При этом за счёт энергии АТФ происходит генерация $\Delta\mu_{H^+}$. Невольно напрашивается аналогия с динамо-машиной, которая может функционировать в двух режимах — как генератор эдс, работающий за счёт принудительного вращения ротора, или как электромотор, вращающийся в противоположном направлении при подключении источника эдс к обмотке электромагнита. Поэтому комплекс F_0F_1 можно назвать "мотор-генератором".

Ещё один биофизический метод регистрации вращения ротора F_0F_1 -АТФ-синтазы связан с использованием хорошо известного в оптике и широко применяемого в биофизике явления резонансного переноса энергии между флуоресцирующими красителями (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) [12, 96, 97]. Суть этого метода заключается в том, что к исследуемой системе (в данном случае идёт речь о макромолекулярном комплексе $\alpha_3\beta_3\gamma$) "пришивают" две молекулы флуоресцирующих красителей (рис. 15). Один из красителей (молекула $Cy3$, прикрепленная к неподвижной субъединице β) возбуждается светом с длиной волны 532 нм и испускает свет с $\lambda_{max} = 570$ нм. Другая молекула ($Cy5$) прикрепляется к вращающейся субъединице γ . Эта молекула испускает свет с большей длиной волны, $\lambda_{max} = 670$ нм. При достаточно близком расположении

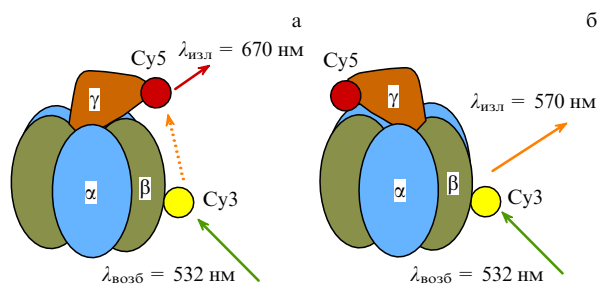


Рис. 15. Схема, иллюстрирующая возможность регистрации вращения ротора молекулярного мотора методом резонансного переноса энергии между флуоресцирующими красителями Cy3 и Cy5. Донор энергии (Cy3) прикреплен к статору — к одной из трёх субъединиц β молекулы F_1 . Акцептор энергии (Cy5) прикреплен к ротору (субъединица γ). (По данным работы [96].) Молекулы донора и акцептора сближаются (а) или удаляются (б) в результате вращения ротора.

этих двух красителей молекула Cy3, возбуждаемая светом с длиной волны 532 нм, передаёт возбуждение молекуле Cy5, о чём можно судить по появлению флуоресценции молекулы Cy5 с $\lambda_{\text{max}} = 670$ нм (рис. 15а). При удалении красителя Cy5 от молекулы Cy3 в результате вращения ротора свечение с $\lambda_{\text{max}} = 670$ нм затухает и наблюдается лишь флуоресценция молекулы Cy3 с $\lambda_{\text{max}} = 570$ нм (рис. 15б). Этот метод используется в биофизике для регистрации движения различных макромолекулярных моторов [12].

Методом FRET было изучено вращение ротора F_0F_1 -АТФ-синтазы. Преимущество этого метода заключается в том, что в данном случае вращение ротора не отягощено движением сравнительно крупных маркёров (нить актина или наноразмерные бусинки). Кроме того, работу F_0F_1 -АТФ-синтазы, помеченной с помощью низкомолекулярных флуоресцентных красителей, можно изучать в модельных системах, максимально приближенных к естественным энергопреобразующим системам клетки. Так, например, флуоресцентно-меченные молекулы F_0F_1 -АТФ-синтазы были встроены в липосомы (наноразмерные пузырьки из мембран, сформированных с помощью молекул липидов), напоминающие тилакоиды хлоропластов. Было показано, что в такой гибридной системе субъединица γ вращается как в режиме гидролиза АТФ, так и в режиме синтеза АТФ. В первом случае мотор работал за счёт энергии молекул АТФ. В последнем случае F_0F_1 -АТФ-синтаза приводилась в действие за счёт вращения второго мотора — барабана c_n . Барабан c_n , входящий в состав мембранного фрагмента F_0 , вращался за счёт тока протонов через F_0 при создании искусственной трансмембранной разности рН (ΔpH) на мембране липосомы [97]. Так было доказано, что вращения ротора происходят как при гидролизе АТФ, так и в режиме синтеза АТФ, когда источником энергии служит ΔpH .

4.2. Механизмы генерации вращательного момента, эффективность работы мотора

4.2.1. Механо-химический мотор F_1 -АТФазы. Структурные исследования показали, что имеются два участка тесного контакта ротора (субъединица γ) со статором (см. рис. 6а, 7). Эти участки служат своеобразными "воротами", которые определяют доступ субстратов

и продуктов реакции к каталитическим центрам F_1 -АТФазы. Один из них расположен внутри центрального "кармана" гексамера $\alpha_3\beta_3$ ("ворота 1"), куда погружён вытянутый эксцентрический "хвост" субъединицы γ . Другой участок контакта находится снаружи, вблизи от наружного края полости гексамера $\alpha_3\beta_3$, где субъединица γ контактирует с петлёй DELSEED субъединицы β ("ворота 2"). Согласно [31], доступ АТФ к свободному каталитическому центру происходит через "ворота 1" ($G1 = \gamma\text{Gln255}$). Выход P_i из каталитического центра после гидролиза АТФ контролируется, вероятнее всего, "воротами 2" ($G2 = \gamma\text{Arg228}$). На этом же участке возникает момент силы, вызывающий поворот субъединицы γ в ходе конформационной перестройки примыкающей к ней субъединицы β .

Действительно, опыты с мутантными формами F_1 -АТФаз, у которых субъединицы γ имели укороченные "хвосты" (и потому они были лишены контакта со статором в глубине полости), показали, что даже у таких дефектных молекул субъединицы γ вращались в правильном направлении. Это доказывает, что вращательный момент создаётся в основном за счёт взаимодействия субъединиц β и γ не в глубине полости, а на периферийном участке, расположенном на краю полости. Структурные данные и результаты расчётов показали [98], что основной вклад в создание вращательного момента вносят электростатические взаимодействия заряженных аминокислотных остатков в области контакта субъединиц β и γ . Как было отмечено выше (раздел 3.2.1), большинство аминокислотных остатков полипептидной цепи субъединицы β на участке DELSEED, непосредственно примыкающем к субъединице γ , заряжены отрицательно. Контактующие с ними аминокислотные остатки субъединицы γ несут положительные заряды.

Хотя нижняя часть "хвоста" субъединицы γ , вероятно, и не играет существенной роли в генерации вращающего момента, она выполняет важную конструктивную роль. Область контакта субъединиц β и γ внутри полости ($G1$) служит "точкой опоры", которая обеспечивает правильную ориентацию субъединицы γ относительно статора. У коротких роторов такая механическая "юстировка" может нарушаться. Как показали недавние опыты, выполненные Киноситой с соавторами [99–101], укороченная субъединица γ , не имеющая точки опоры, при вращении начинает болтаться из стороны в сторону, что замедляет её вращение по сравнению с нормальными моторами, имеющими удлинённую субъединицу γ . У длинных роторов нижняя точка опоры препятствует возникновению вредных биений при вращении.

Экспериментальные данные [80, 83], а также теоретический анализ различных режимов работы мотора F_1 -АТФазы свидетельствуют, что скорость вращения субъединицы γ во время её поворота остаётся постоянной [31, 32]. Отсюда следует, что вращательный момент N также остаётся постоянным во время вращения. Величина N была определена на основании измеренной зависимости средней скорости вращения ротора F_1 -АТФазы от длины актиновой нити, "пришитой" к ротору. Вращательный момент, создаваемый за счёт гидролиза АТФ, $N \approx 40–50$ пН нм [79, 80]. Учитывая, что радиус ротора составляет приблизительно 1 нм, можно вычислить, что развиваемая мотором сила

$F \approx 40-50$ пН. Это самая большая из всех известных в настоящее время сил, развиваемых природными молекулярными моторами, которые приводятся в действие за счёт энергии гидролиза нуклеотидов. При повороте ротора на 120° мотор производит работу против сил гидродинамического трения, равную $W \approx 80-90$ пН нм ($\approx 20 k_B T$), которая примерно равна изменению свободной энергии $\Delta G_{\text{АТР}}$ при гидролизе одной молекулы АТР. Эти оценки показывают, что эффективность использования свободной энергии гидролиза АТР для совершения работы по вращению отягощённого ротора близка к 100 %.

Очевидно, что высокая эффективность работы мотора F_1 -АТФазы ($\eta = W/\Delta G_{\text{АТР}}$), совершающего работу против внешних сил (гидродинамическое сопротивление среды, тормозящей вращение длинного "хвоста"), обусловлена малыми потерями энергии на трение при вращении субъединицы γ внутри полости гексамера $\alpha_3\beta_3$. Малое трение определяется конструктивными особенностями мотора. Во-первых, удлинённая субъединица γ имеет мало непосредственных контактов со стенками внутренней полости. Во-вторых, вытянутый "хвост" субъединицы γ , погружённый в полость гексамера $\alpha_3\beta_3$, и сама полость обладают гидрофобными свойствами — они не содержат заряженных групп, которые могли бы взаимодействовать электростатически и тем самым препятствовать вращению ротора. Это свойство мотора можно уподобить наличию гидрофобной (жирной) "смазки" между ротором и статором, существенно уменьшающей потери на трение.

4.2.2. Мембранный электромотор F_0 . Схема, иллюстрирующая перенос протонов через мембранную часть F_0F_1 -АТФ-синтазы, изображена на рис. 5а. Два вертикальных цилиндра символизируют протон-проводящие каналы. Через нижний канал протоны подходят к с-субъединицам со стороны "кислотного резервуара", где концентрация протонов повышена. Через верхний канал протоны отводятся в сторону "щелочного резервуара", где концентрация ионов водорода понижена. Карбоксильная группа аминокислотного остатка Asp61, расположенного в центральной части субъединицы с, может находиться в двух состояниях: депротонированном ($-\text{COO}^-$) и протонированном ($-\text{COOH}$). Заряд этой группы зависит от её положения относительно верхнего и нижнего протон-проводящих каналов. При контакте карбоксильной группы с нижним каналом, соединённым с "кислотным резервуаром", где концентрация ионов водорода повышена, карбоксильная группа протонируется ($-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow -\text{COOH}$). Карбоксильная группа соседней субъединицы с, расположенной вблизи от канала, обращённого в сторону щелочного резервуара, депротонируется — протон диссоциирует и уходит наружу ($-\text{COOH} \rightarrow -\text{COO}^- + \text{H}^+$), в результате чего карбоксильная группа этой субъединицы с заряжается отрицательно⁴.

Вращение барабана c_n обеспечивается за счёт взаимодействия положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков, находящихся на границе внутримембранной белковой субъединицы а и одной из субъединиц с олигомерного комплекса c_n . Ключевую роль в создании вращающего момента играет положительный заряд аминокислотного остатка Arg210, принадлежащего мембранной белковой субъединице а, и отрицательный заряд депротонированной карбоксильной группы ($-\text{COO}^-$) аминокислотного остатка аспарагиновой кислоты (Asp61) (см. рис. 5). Расстояние между атомами, на которых локализованы эти заряды, составляет приблизительно $2,5-3$ Å [44]. Притяжение разноимённых зарядов создаёт крутящий момент (рис. 5б, левый рисунок), под действием которого барабан поворачивается на угол $\Delta\theta = 360^\circ/n$, где n — число субъединиц с, входящих в белковый комплекс c_n . После поворота барабана депротонированная карбоксильная группа приблизится к нижнему каналу, получит доступ к "кислотному резервуару" и станет электронейтральной ($-\text{COO}^- + \text{H}^+ \rightarrow -\text{COOH}$) (рис. 5б, правый рисунок). После следующего шага вращение барабана c_n эта протонированная субъединица с удалится от субъединицы а, унося с собой протон, полученный из "кислотного резервуара". Двигаясь вместе с барабаном c_n по кругу против часовой стрелки, после n шагов вращение эта протонированная субъединица подойдёт к верхнему каналу и отдаст протон "щелочному резервуару", приобретя отрицательный заряд ($-\text{COOH} \rightarrow -\text{COO}^- + \text{H}^+$). Так, "путешествуя" по кругу вместе с вращающимся барабаном c_n , протон будет переноситься из "кислотного резервуара" в "щелочной".

Источником энергии для вращение ротора электромотора служит трансмембранная разность электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$). Электрический ток, протекающий через F_0 (носителями заряда являются протоны), обеспечивает периодическое протонирование/депротонирование карбоксильных групп субъединиц с, создавая условия для направленного вращения ротора электромотора. Барабан c_n тесно сопряжён с субъединицей γ — ротором механо-химического мотора F_1 -АТФазы. Благодаря этому вращательный момент, создаваемый электромотором F_0 , передаётся субъединице γ , вследствие чего субъединица γ вращается, обеспечивая синтез АТР.

4.2.3. Эффективность работы мотора F_1 -АТФазы. В связи с приведёнными в разделе 4.1 оценками к.п.д. мотора следует сделать некоторые пояснения. В экспериментальных работах [79, 80] эффективность работы мотора F_1 -АТФазы вычисляли следующим образом. Из кинематических данных определяли $\langle\omega\rangle$ — среднюю скорость вращения отягощённого ротора (тяжёлый маркёр, движущийся в вязкой среде). Из геометрических характеристик вращающегося "хвоста" (длина цилиндрического стержня L , радиус r) вычисляли коэффициент трения ξ по

⁴ Заметим, что изменение зарядового состояния карбоксильной группы (протонирование или депротонирование) может происходить не только вследствие её контакта с "кислотным" или "щелочным" резервуаром, но также и за счёт разности электрических потенциалов по обе стороны мембраны. Сродство карбоксильной группы к протону повышается с ростом электрического потенциала и, соответственно, уменьшается с понижением потенциала. Таким

образом, даже в отсутствие трансмембранной разности рН, при создании трансмембранной разности электрических потенциалов (положительный потенциал ϕ_i — со стороны "кислотного", отрицательный потенциал ϕ_o — со стороны "щелочного" резервуара) будет возникать направленный поток протонов через F_0 . Этим можно объяснить энергетическую эквивалентность электрической ($\Delta\phi$) и концентрационной ($\Delta\mu_{\text{H}^+}$) составляющих $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ [51].

формуле [80]

$$\xi = \frac{4\pi\eta L^3}{3[\ln(L/r) - 0,447]} \quad (4)$$

Средний вращающий момент, создаваемый мотором, равен $\langle N \rangle = \xi \langle \omega \rangle$. Механическая работа против сил вязкого трения за один оборот равна $\xi \langle \omega \rangle 2\pi$. Химическая энергия, затраченная на эту работу, равна $3\Delta G_{\text{АТР}}$, где $\Delta G_{\text{АТР}}$ — свободная энергия гидролиза одной молекулы АТР, значение которой можно вычислить для заданных условий эксперимента (концентрации реагентов, pH, температура).

Эффективность использования химической энергии молекул АТР для вращения отягощённого ротора может быть вычислена следующим образом:

$$\eta_{\text{Стокс}} = \frac{\overbrace{\xi \langle \omega \rangle 2\pi}^{\text{работа}}}{\underbrace{3\Delta G_{\text{АТР}}}_{\text{свободная энергия}}} \quad (5)$$

Заметим, что определённый таким способом коэффициент $\eta_{\text{Стокс}}$ — коэффициент полезного действия по Стоксу — не вполне соответствует традиционному определению к.п.д. для машин, работающих против консервативных сил. В данном случае работа совершается против диссипативной силы — силы гидродинамического сопротивления водной среды. Оценки, сделанные в [79, 80], показывают, что работа против внутренних сил трения пренебрежимо мала по сравнению с работой, затрачиваемой на вращение внешней нагрузки. Высокая эффективность работы мотора против диссипативных внешних сил (к.п.д. $\approx 90-100\%$), как было сказано выше, обусловлена малыми внутренними потерями энергии, что определяется конструктивными особенностями F_1 -АТФазы.

Теоретический анализ экспериментальных данных по вращению субъединицы γ , отягощённой длинным активным "хвостом", в зависимости от его длины и концентрации АТР, проведённый Остером и Вангом [31, 32], показал, что необходимым условием для обеспечения высокого к.п.д. работы F_1 -АТФазы ($\eta_{\text{Стокс}} \approx 90-100\%$) является постоянство вращательного момента. Мотор должен генерировать постоянный вращательный момент ($N(\theta) \approx \text{const} = 40-45$ пН·нм) во время всего цикла вращения ротора, а не создавать лишь кратковременные, но сильные удары в моменты быстрых поворотов. Это означает, что мотор F_1 -АТФазы не может работать по механизму так называемого "броуновского храповика", когда вращение происходит в результате редких, но мощных ударов, напоминающих дельта-функцию (три коротких удара в течение одного полного оборота). Согласно [31, 32], вращательный момент $N(\theta) \approx \text{const}$ может генерироваться в результате большого числа последовательных стадий, каждая из которых сопровождается малыми изменениями свободной энергии ($\sim k_B T$). При работе механо-химического мотора F_1 такое постепенное снижение свободной энергии может происходить по мере последовательного образования многих ($\sim 15-20$) водородных связей между молекулой АТР и аминокислотными остатками каталитического центра [69].

5. Математические модели F_0F_1 -АТФ-синтазы

Теоретическому исследованию МММ посвящены многочисленные труды отечественных и зарубежных авторов (см. работы [31–34, 98, 102–116] и ссылки в них). Одно из актуальных направлений в области биофизики связано с построением математических моделей, описывающих направленное вращение различных наноразмерных моторов. В настоящем разделе мы кратко рассмотрим работы, посвящённые теоретическому исследованию F_0F_1 -АТФ-синтазы. Результаты биохимических и структурных исследований F_0F_1 -АТФ-синтазы в совокупности с данными по кинематике вращения ротора дают обширный экспериментальный материал для построения количественной теории работы этого фермента с использованием методов математической и теоретической физики. Актуальность таких исследований очевидна. Математическое моделирование является удобным (а иногда и единственным) инструментом для анализа различных сценариев событий, происходящих при работе МММ, для оценок энергетических и динамических характеристик МММ.

5.1. Динамические модели работы протонной АТФ-синтазы

5.1.1. Простейшая динамическая модель вращения ротора F_0 . Первые наиболее обстоятельные математические модели вращения роторов F_0F_1 -АТФ-синтазы описаны в работах Остера и Ванга с соавторами [102, 103]. Эти модели мы рассмотрим подробнее ниже (раздел 5.1.2). В настоящем разделе мы начнём анализ задачи о вращении ротора с рассмотрения более простой динамической модели вращения ротора электромотора (вращение погружённого в мембрану барабана c_n), предложенной в работах [115, 116].

Качественное описание механизма генерации момента, вызывающего направленное вращение мембранного ротора c_n , было дано выше (раздел 4.2.2, см. рис. 5). Динамическое уравнение, описывающее вращение ротора в такой системе, и его решения были рассмотрены в работах [115, 116]. Это уравнение в упрощённом варианте модели имеет вид

$$I \frac{d^2\theta(t)}{dt^2} + 4\pi\eta R^2 h \frac{d\theta(t)}{dt} + M(\theta(t)) - \frac{R}{4\pi\epsilon_0} \frac{|q_1 q_2|}{\epsilon r_1^2} \sin[\alpha\theta(t) + \varphi_0] = 0, \quad (6)$$

где $\theta(t)$ — угол поворота барабана c_n ; I — момент инерции барабана c_n , погружённого в мембрану и соединённого в своей верхней части с субъединицей γ ; R — радиус барабана; h — толщина барабана c_n ; η — коэффициент вязкости цитоплазмы; $M(\theta(t))$ — момент упругих сил, возникающих при скручивании субъединицы γ ; q_1 и q_2 — заряды аминокислотных остатков Arg210 и Asp61, разнесённых на расстояние r_1 ; ϵ — диэлектрическая постоянная среды, разделяющей эти заряды; α и φ_0 — коэффициенты, зависящие от геометрии системы и числа n субъединиц s .

Вращение ротора c_n происходит скачками. При наличии в барабане n субъединиц s , поворот ротора на 120° сопряжён с прохождением через F_0 нескольких протонов, число которых должно быть не менее чем

$m = n/3$. Субъединица γ , закреплённая с одной стороны за барабан c_n , а с другой погружённая внутрь гексамера $\alpha_3\beta_3$, рассматривается как упругая пружина. После каждого поворота барабана на угол $\Delta\theta = 2\pi/n$ субъединица γ закручивается. Гипотеза о том, что субъединица γ закручивается при каждом повороте барабана c_n на угол $2\pi/n$ вплоть до его поворота на угол $2\pi/3$ (120°), а накапливаемая при этом энергия упругих деформаций используется для структурных перестроек гексамера $\alpha_3\beta_3$, ранее была использована в работах [117–119]. После переноса m протонов напряжение кручения субъединицы γ достигает предела, после чего происходит её скачкообразное проворачивание внутри гексамера $\alpha_3\beta_3$. Другие силы, действующие на ротор, для простоты считаем отсутствующими. Момент, создаваемый силой упругого натяжения, обусловленного скручиванием ротора, можно представить в виде

$$M(\theta(t)) = \frac{\pi R_\gamma^4 E}{4h_\gamma(1+\sigma)} [\theta(t) + n\theta_\tau], \quad (7)$$

где $R_\gamma = 8 \text{ \AA}$ — радиус субъединицы γ , $h_\gamma = 60 \text{ \AA}$ — длина субъединицы γ , E — модуль Юнга ротора, σ — отношение Пуассона (для большинства белков $\sigma = 0,4$), θ_τ — угол скручивания γ -субъединицы при прохождении одного протона.

Тогда уравнение (6) принимает вид

$$I \frac{d^2\theta(t)}{dt^2} + 4\pi\eta R^2 h \frac{d\theta(t)}{dt} + \frac{\pi R_\gamma^4 E}{4h_\gamma(1+\sigma)} [\theta(t) + n\theta_\tau] - \frac{R}{4\pi\epsilon_0} \frac{|q_1 q_2|}{r_1^2} \sin[\alpha\theta(t) + \varphi_0] = 0. \quad (8)$$

Полученные решения в целом правильно описывают исследуемое явление, но лишь на качественном уровне. Действительно, рассчитанный вращательный момент ($N \sim 4 \text{ пН нм}$) на порядок меньше, чем экспериментальное значение $N_{\text{exp}} \approx 40\text{--}50 \text{ пН нм}$. Соответственно работа, совершаемая вращающимся барабаном, существенно меньше энергии, необходимой для синтеза одной молекулы АТФ. Отметим, что в данной модели не учитываются электростатические взаимодействия зарядов с протонами, находящимися во "входном" и "выходном" протонных каналах. Проблематичной является оценка диэлектрической постоянной ϵ в разных слоях модельной системы. Кроме этого, в модели в явном виде не учитывается взаимодействие субъединицы γ с гексамером $\alpha_3\beta_3$. Вероятно, поэтому рассчитанные значения моментов "сил сопротивления" оказались заниженными по сравнению с экспериментально измеренными значениями, а характерные времена поворота — на три порядка меньше реальных. Однако, несмотря на количественные расхождения, описанная выше сравнительно простая модель позволяет наглядно представить механизм вращения барабана. Она вполне может быть скорректирована и улучшена на основании результатов расчётов, описанных ниже (раздел 5.1.2).

5.1.2. Описание вращения роторов протонной АТФ-синтазы методами стохастической динамики. В случае макромолекулярного мотора, имеющего сравнительно малый момент инерции ротора, инерционным членом в динамическом уравнении, описывающем вращение ротора, можно пренебречь по сравнению с другими членами. Поэтому в рамках подхода, основанного на использова-

нии стохастического уравнения Ланжевена, уравнение вращения ротора в самом общем виде можно записать следующим образом [102, 103]:

$$\zeta \frac{d\theta}{dt} = F_E(\theta, s) + F_M(\theta, s) - \tau + f(t), \quad (9)$$

где θ — угол поворота ротора; ζ — суммарный коэффициент трения; $F_E(\theta, s)$ — момент электростатических сил, действующих на барабан со стороны субъединицы a ; $F_M(\theta, s)$ — момент "гидрофобных" сил, действующих на барабан со стороны мембраны; τ — момент сил, действующих на субъединицу γ со стороны гексамера $\alpha_3\beta_3$; $f(t)$ — момент случайных воздействий с "амплитудой" $\sqrt{2\zeta k_B T}$; символ s характеризует дискретные состояния системы, различающиеся заполнением протон-связывающих центров мотора F_0 . Принято, что момент "гидрофобных" сил $F_M(\theta, s)$ возникает за счёт энергетического барьера ($\sim 45 k_B T$), препятствующего смещению заряженных (депротонированных) с-субъединиц в область мембраны. Учитываются четыре состояния протонируемых групп: а) протон связан с карбоксильной группой Asp61 субъединицы с, экспонированной в сторону "кислотного резервуара"; б) протон связан с карбоксильной группой Asp61 субъединицы с, экспонированной в сторону "щелочного резервуара"; в) обе карбоксильные группы протонированы; г) обе карбоксильные группы депротонированы. В модели учитываются взаимодействия отрицательных зарядов депротонированных карбоксильных групп субъединиц с, движущихся вместе с барабаном, и неподвижного положительного заряда Arg210, а также зарядов других аминокислотных остатков статора (Glu219, His245). Деформации субъединицы γ , вызванные вращением барабана c_n , в работе [102] не учитывались. Предполагается, что гуанидиновая группа аминокислотного остатка Arg210 всегда заряжена положительно ($q_{\text{Arg210}} = +1$). Заряд карбоксильной группы субъединицы с может изменяться, эта группа характеризуется значением pK_a (pK_a равно величине pH , при которой вероятность протонирования кислотной группы равна 50 %).

Кинематика вращательного движения ротора определяется решением уравнения Ланжевена (9) с учётом марковского процесса, описывающего протонирование и депротонирование с-субъединиц, контактирующих с протонными каналами. В рамках этой модели было получено вполне реалистичное описание работы электромотора [102]. Показано, что система может работать в двух режимах: как генератор $\Delta\mu_{H^+}$ и как электромотор, вращающийся за счёт энергии $\Delta\mu_{H^+}$. Установлено, что вращение ротора тесно сопряжено с потоком протонов через мембрану: один полный оборот ротора связан с транслокацией 12 протонов, что соответствует переносу четырёх протонов в расчёте на одну синтезируемую молекулу АТФ. Показана ключевая роль аминокислотного остатка Arg210 в генерации вращательного момента и в обеспечении тесной связи вращений ротора с трансмембранным переносом протонов. Наличие Arg210 препятствует утечке протонов, которая может происходить в результате случайных вращений ротора в противоположном направлении. Оптимальный режим работы электромотора реализуется при значениях $pK_a \approx 7$ для Asp61, что хорошо согласуется с экспериментальными данными о роли Asp61 в генерации вращательного момента [120–123].

Отметим, что использование уравнения Ланжевена для описания динамики вращения ротора макромолекулярного электродвигателя было всесторонне обосновано в статье [124], описывающей работу бактериального электромотора, вращающего жгутик бактериальной клетки. Конструкция бактериального электромотора намного сложнее по сравнению с F_1F_0 -АТФ-синтазой. В этой же работе построены "цепочки" марковских переходов, характеризующих состояние ротора и статора мотора. Методика, развитая в [124], была использована при построении других моделей нанодвигателей [125].

Следующая работа Остера и Ванга [103] была посвящена моделированию действия механо-химического мотора F_1 -АТФазы с учётом изменений состояний каталитических центров $(\beta_1, \beta_2, \beta_3)$, расположенных в гексамере $\alpha_3\beta_3$, и различной нагрузки ротора (субъединица γ). Система уравнений, описывающих вращение ротора F_1 -АТФазы, имеет вид

$$\zeta \frac{d\theta}{dt} = \tau(\theta, \beta_1, \beta_2, \beta_3) - T_L + T_B(t), \quad (10)$$

$$\frac{d\beta_i}{dt} = K(\theta, \beta_{i-1}, \beta_{i+1}) \beta_i, \quad (11)$$

где $i = 1, 2, 3$ — номера субъединиц β ; ζ — коэффициент вязкого трения, обусловленного нагрузкой на ротор; $\tau(\theta, \beta_1, \beta_2, \beta_3)$ — вращательный момент, прикладываемый к субъединице γ со стороны гексамера $\alpha_3\beta_3$; T_L — дополнительный момент, создаваемый нагрузкой (например, со стороны лазерного пинцета); $T_B(t)$ — вращательный момент за счёт тепловых флуктуаций; функция $\tau(\theta, \beta_1, \beta_2, \beta_3) = -\partial V(\theta, \beta_1, \beta_2, \beta_3)/\partial\theta$ определяется потенциалом $V(\theta, \beta_1, \beta_2, \beta_3)$, который учитывает геометрические и упругие свойства рассматриваемой системы; $K(\theta, \beta_{i-1}, \beta_{i+1})$ — матрица, описывающая скорости переходов между 64-мя возможными состояниями каталитических центров, зависящие от угла поворота субъединицы γ и "химического" состояния системы.

Предполагается, что реакции гидролиза и синтеза АТР обратимы, при этом каждый каталитический центр Е может находиться в четырёх возможных состояниях: 1) Е — свободный центр, 2) E_T — центр занят молекулой АТР, 3) E_D — занят молекулой АDP, 4) E_{DP} — занят молекулами АDP и P_i . В молекуле фермента имеются три каталитических центра, поэтому максимальное число состояний, в которых может находиться фермент, равно $4^3 = 64$ (четыре возможных состояния трёх каталитических центров).

Решение системы уравнений (10), (11) позволило количественно описать основные закономерности вращения ротора F_1 -АТФазы: ступенчатые повороты на угол $2\pi/3$, генерацию вращательного момента $N \approx 45$ пН·нм, потребление в среднем одной молекулы АТР на один поворот на угол $2\pi/3$, значение к.п.д., близкое к 100 %. Результаты расчётов хорошо согласуются с представлениями о том, что энергия связывания АТР запасается в форме энергии упругих деформаций, которая используется для вращения субъединицы γ благодаря тесному сопряжению механических и химических стадий работы F_1 -АТФазы (см. подробнее раздел 5.4).

Описанная в работе [103] модель работы F_1 -АТФазы примыкает к классу математических моделей, получивших название "мезоскопические модели", или модели

Маркова – Фоккера – Планка ("МФП-модель"). Модели этого типа являются промежуточным случаем между моделированием методами молекулярной динамики, описывающей движение каждого атома, и кинетическими моделями, описывающими переходы между сравнительно небольшим числом дискретных химических ("марковских") состояний. Важнейшим этапом построения МФП-моделей является выбор небольшого числа выделенных степеней свободы, которые рассматриваются в явном виде, и построение поверхностей свободной энергии, для которых эти степени свободы являются геометрическими координатами. Для построения таких поверхностей обычно используются структурные (данные рентгеноструктурного анализа) и биохимические данные, которые позволяют выделить наиболее важные взаимодействия между различными субъединицами.

Классическим примером модели класса МФП, используемой для описания F_0F_1 -АТФазы, является модель, предложенная Остером с соавторами в работе [126]. В этой работе предполагается, что реакции гидролиза и синтеза АТР, протекающие по схеме (3), обратимы, а каждый каталитический центр Е может находиться в четырёх возможных состояниях: Е, E_T , E_D и E_{DP} . Вероятность нахождения в каждом из этих состояний ρ_s можно описать уравнением Колмогорова – Фоккера – Планка, которое имеет вид

$$\frac{\partial \rho_s}{\partial t} = -\frac{D}{k_B T} \frac{\partial}{\partial \theta} \left(-\frac{\partial \hat{G}(\theta, s)}{\partial \theta} + \tau \right) \rho_s + D \frac{\partial^2 \rho_s}{\partial \theta^2} + \sum_{s'} K_{ss'} \times \rho_{s'}, \quad (12)$$

где $D = 1,5 \times 10^4$ рад² с⁻¹ — коэффициент диффузии для вращательного движения ротора механо-химического мотора F_1 (субъединица γ), τ — крутящий момент, создаваемый ротором электромотора F_0 .

Для простоты принимается, что $\tau = \text{const} = 45$ пН·нм. Вращательный момент, действующий на субъединицу γ со стороны субъединиц β , определяется потенциалом взаимодействия субъединицы γ с субъединицами β , $-\partial \hat{G}(\theta, s)/\partial \theta$. Потенциал $\hat{G}(\theta, s)$ представляет собой сумму потенциалов взаимодействия субъединицы γ с тремя разными субъединицами β :

$$\hat{G}(\theta, s) = G(\theta)_{s_1} + G\left(\theta + \frac{2\pi}{3}\right)_{s_2} + G\left(\theta + \frac{2\pi}{3}\right)_{s_3}. \quad (13)$$

Форма потенциала $\hat{G}(\theta, s)$ описана в работе [126]. Там же приведены значения членов матрицы $K_{ss'}$, характеризующие кинетику переходов из одного состояния в другое. В приложении к статье [126] дана наглядная анимационная картина, иллюстрирующая работу описываемой системы.

Результаты проведённого в работе [126] исследования показали, что модель адекватно описывает на "мезоскопическом" уровне (миллисекундная шкала времён, наноразмерная система) механо-химические свойства F_0F_1 -АТФ-синтазы в режиме синтеза АТР. Угол поворота субъединицы γ (переменная θ) может быть использован как обобщённая ("коллективная") координата — суррогат многомерной периодической траектории координат атомов, входящих в каталитические центры. Результаты стационарных решений уравнений (12), (13),

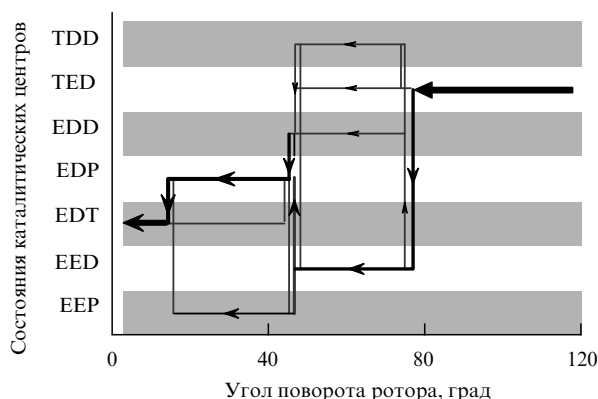


Рис. 16. Схема, иллюстрирующая различные пути эволюции F_1 -АТФазы при вращении её ротора. Буквами Т, D и E обозначены три возможных состояния каталитических центров: Т — центр содержит АТР, D — центр содержит АDР, E — свободный каталитический центр. Толщина каждой линии, символизирующей переход, пропорциональна статистическому весу данного перехода. (По данным работы [126].)

$\partial \rho_s / \partial t = 0$, относящиеся к работе F_0F_1 -АТФазы в режиме синтеза АТР, показывают хорошее согласие с экспериментальными данными [126]. Другой интересный результат моделирования работы F_0F_1 -АТФ-синтазы состоит в том, что в реальных физиологических условиях существует не одна, а множество траекторий перехода между разными состояниями фермента. Результаты такого моделирования позволяют оценить статистический вес этих траекторий и вычленил так называемый "основной кинетический путь" (рис. 16). Модель также позволила объяснить давно известное, но долгое время остававшееся загадкой для биохимиков явление ингибирования F_1 -АТФазы молекулами АDР [36].

5.2. Электростатические взаимодействия и энергетика гидролиза АТФ

Конформационные перестройки F_1 -АТФазы, индуцированные связыванием молекулы АТР каталитическим центром, гидролиз АТР и диссоциация продуктов реакции сопровождаются перераспределением электрических зарядов в молекуле белка. В этой связи представляют определённый интерес оценки вклада электростатических взаимодействий в энергетiku реакции гидролиза АТР [111–114]. Один из наиболее простых способов расчёта энергии электростатических взаимодействий заряженных групп F_1 -АТФазы и всех реагентов, связанных с ферментом, был описан в наших работах [127, 128].

Для оценки энергии электростатических взаимодействий E_{el} было использовано приближение точечных зарядов, расположенных в геометрических центрах соответствующих атомов. Энергию E_{el} фермент-субстратного комплекса определяли по формуле

$$E_{el} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^M \sum_{j=1}^M \frac{Q_i Q_j}{\epsilon_{eff} |\mathbf{R}_i - \mathbf{R}_j|} + \sum_{i=1}^M \sum_{k=1}^N \frac{Q_i q_k}{\epsilon_{eff} |\mathbf{R}_i - \mathbf{r}_k|} + \frac{1}{2} \sum_{k=1}^N \sum_{m=1}^N \frac{q_k q_m}{\epsilon_{eff} |\mathbf{r}_k - \mathbf{r}_m|}, \quad (14)$$

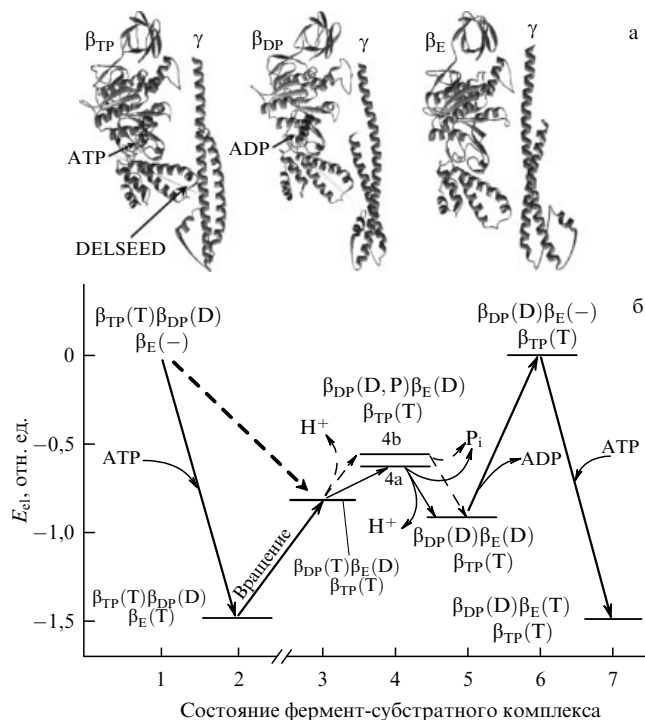


Рис. 17. (а) Три возможных конформации субъединицы β , соответствующие каталитическим центрам β_{TP} , β_{DP} и β_E . (б) Диаграмма изменений электростатической составляющей энергии (E_{el}) для различных состояний каталитических центров F_1 -АТФазы [127].

где Q_i — электрический заряд i -го атома молекул субстрата или продукта, расположенного в каталитическом центре; q_k — заряд k -го атома молекулы белка; N — число заряженных атомов молекулы белка; M — число заряженных атомов субстратов (ATP^{4-} , ADP^{3-} , HPO_4^{2-} и Mg^{2+}), $\mathbf{R}_i$ ($i = 1, \dots, M$) и $\mathbf{r}_k$ ($k = 1, \dots, N$) — координаты атомов молекул субстрата и фермента соответственно; ϵ_{eff} — эффективная диэлектрическая проницаемость, которая является параметром модели.

В работе [127] учитывались заряды аминокислотных остатков лизина, аргинина, аспартата, глутамата и гистидина. Предполагалось, что для аминокислотных остатков лизина точечный заряд $q_{Lys} = +1$ сосредоточен на атоме азота аминогруппы. Для аргинина рассматривались точечные заряды $q_{Arg} = +0,5$, локализованные на двух концевых атомах азота. В случае гистидинов заряды $q_{His} = +0,5$ были приписаны двум атомам азота имидазольного кольца. Для карбоксильных групп глутамата и аспартата одинаковые парциальные заряды $q = -0,5$ были распределены между двумя атомами кислорода.

Предполагается, что изменения конформации всех субъединиц фермента, сопровождающиеся вращением субъединицы γ , происходят согласованно. В каждом из состояний фермент-субстратного комплекса, представленных на рис. 17а, один каталитический центр всегда находится в конформации β_{TP} , другой центр — в конформации β_{DP} , а третий центр — в конформации β_E . Будем считать для определённости, что в начальном состоянии, в закрытом каталитическом центре, имеющем конформацию β_{TP} , содержится АТР (состояние $\beta_{TP}(T)$). Состояние $\beta_{TP}(T)$ характеризуется высоким сродством к АТР. Второй центр, имеющий "закрытую" конформацию β_{DP} , содержит АDР (состояние $\beta_{DP}(D)$).

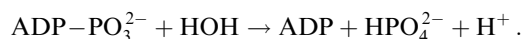
Третий каталитический центр свободен, он находится в "открытой" конформации (состояние $\beta_E(-)$).

Рассмотрим, как изменяется электростатическая энергия белка в ходе каталитического цикла гидролиза АТР в случае трёхцентрового сценария работы фермента (рис. 176). Первая стадия цикла — посадка АТР в свободный каталитический центр $\beta_E(-)$. Эта стадия, как известно из биохимических данных (см. раздел 3.2.2), сопровождается понижением свободной энергии, с чем согласуются результаты наших расчётов величины E_{el} . Расчёты показали, что связывание АТР с ферментом, находящимся в состоянии $\beta_{TR}(T) \beta_{DP}(D) \beta_E(-)$, сопровождается заметным снижением электростатической энергии системы (переход $\beta_{TR}(T) \beta_{DP}(D) \beta_E(-) + \text{АТР} \rightarrow \beta_{TR}(T) \beta_{DP}(D) \beta_E(T)$). Как было сказано выше, энергетически выгодное связывание АТР индуцирует конформационные перестройки фермента, связанные с изменением угла наклона двух крупных доменов субъединицы β , соединённых "шарниром" (см. рис. 7), которые, в свою очередь, сопряжены с поворотом субъединицы γ .

В работе [127] были рассмотрены несколько вариантов развития событий, инициированных связыванием АТР свободным центром $\beta_E(-)$. Различия касаются в основном того, какая стадия каталитического цикла непосредственно следует за связыванием АТР — вращение субъединицы γ или гидролиз АТР в центре $\beta_{TR}(T)$. Согласно одному из сценариев, часть энергии, освобождающейся после связывания АТР (переход $\beta_{TR}(T) \beta_{DP}(D) \beta_E(-) + \text{АТР} \rightarrow \beta_{TR}(T) \beta_{DP}(D) \beta_E(T)$), используется для вращения субъединицы γ внутри гексамера $\alpha_3\beta_3$. Согласно [31, 32], изгибание субъединицы β может создавать удар, приводящий к вращению субъединицы γ (рис. 176, переход "состояние 2 $\rightarrow$ состояние 3") и к соответствующим изменениям конформации остальных субъединиц АТФазного комплекса. Непосредственное взаимодействие между субъединицами β и γ , ответственное за энергетическое сопряжение в F_1 -АТФазе, происходит на консервативном участке субъединицы β ($\beta^{380}\text{DELSEED}^{386}$). Как видно из рис. 176, структурный переход "состояние 2 $\rightarrow$ состояние 3" сопровождается повышением электростатической составляющей энергии фермент-субстратного комплекса. Можно предположить, что оба перехода — "состояние 1 $\rightarrow$ состояние 2" (энергодонорный процесс) и "состояние 2 $\rightarrow$ состояние 3" (энергоакцепторный процесс) — происходят кооперативно. Это означает, что энергия, выделяемая в ходе первого процесса, не рассеивается полностью в тепло, а используется для реализации второго процесса. Благодаря конструктивным особенностям системы обеспечивается кооперация структурных перестроек в различных субъединицах белкового комплекса: сила, создаваемая при изгибании субъединицы $\beta_E(T)$, обеспечивает поворот субъединицы γ , который, в свою очередь, вызывает изменения состояния других каталитических центров. Таким образом, после связывания АТР свободным каталитическим центром $\beta_E(-)$ изменяются конформации всех трёх каталитических центров (переход $\beta_{TR}(T) \beta_{DP}(D) \beta_E(T) \rightarrow \beta_{DP}(T) \beta_E(D) \beta_{TR}(T)$).

На следующем этапе каталитического цикла происходит гидролиз АТР: переход $\beta_{DP}(T) \beta_E(D) \beta_{TR}(T) \rightarrow \beta_{DP}(D, P) \beta_E(D) \beta_{TR}(T)$ (переход "состояние 3 $\rightarrow$ состояние 4"). Реакция гидролиза АТР включает стадию образования интермедиата — пентаэдрического

комплекса, возникающего в результате нуклеофильной атаки третьего фосфата АТР (γ -фосфат) молекулой воды, расположенной внутри каталитического центра в непосредственной близости от АТР (см. рис. 6). Считается, что активация молекулы воды, участвующей в реакции гидролиза АТР, осуществляется близлежащей депротонированной карбоксильной группой Glu188 [55]. Разрыв связи между ADP и γ -фосфатом сопровождается диссоциацией протона:



Были рассмотрены две возможности, касающиеся судьбы диссоциированного протона: а) перенос протона на карбоксильную группу Glu188 (рис. 176, переход на энергетический уровень 4а) с последующей диссоциацией протона в объёмную фазу раствора; б) диссоциация протона в раствор и затем гидролиз АТР (рис. 176, переход на энергетический уровень 4б). Как видно из рис. 176, различие между уровнями энергии 4а и 4б невелико по сравнению с выигрышем энергии, получающимся при связывании АТР.

Как было сказано выше, реакция гидролиза/синтеза АТР, протекающая в каталитическом центре F_1 -АТФазы, является обратимой и имеет константу равновесия, близкую к единице [36]. Это означает, что стандартная свободная энергия для реакции $\text{АТР} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{ADP} + \text{P}_i$, протекающей в активном центре фермента, близка к нулю. Это положение оспаривается Вебером и Сеньером (см. обзоры [91–93]), которые считают, что соотношение между АТР и ADP в "закрытом" каталитическом центре должно зависеть от направления процесса. В условиях синтеза АТР равновесие сдвинуто в сторону образования АТР, в условиях гидролиза АТР — в сторону образования ADP и P_i . Наши расчёты показали, что гидролиз АТР, протекающий в "закрытом" каталитическом центре β_i , сопровождается некоторым повышением электростатической части энергии фермент-субстратного комплекса. Заметим, что повышение энергии, связанное с гидролизом АТР ($\Delta E_{\text{АТР} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i}$), существенно меньше, чем выигрыш энергии при связывании АТР. Отметим, что при других сценариях развития событий, инициированных связыванием АТР, а также при рассмотрении электростатических взаимодействий с учётом вклада молекул воды, находящихся внутри белковой глобулы, получалось, что гидролиз АТР в каталитическом центре может происходить энергетически "бесплатно" (см. подробности в работе [127, 128]).

Важный вывод, который следует из анализа энергетической диаграммы, показанной на рис. 176, состоит в том, что при синтезе АТР в каталитическом центре $\beta_{DP}(T)$ (реакция $\text{ADP} + \text{P}_i \rightarrow \text{АТР} + \text{H}_2\text{O}$) электростатическая составляющая энергии фермент-субстратного комплекса не увеличивается, а уменьшается. Это согласуется с известными представлениями о том, что синтез АТР внутри каталитического центра происходит энергетически "бесплатно" [36].

Дальнейший ход событий, происходящих после гидролиза АТР, включает в себя стадии диссоциации продуктов реакции (P_i и ADP). Расчёты, выполненные в рамках электростатической модели [127, 128], показали, что диссоциация фосфата P_i (переход "состояние 4 $\rightarrow$ состояние 5") сопровождается снижением энергии

электростатических взаимодействий в фермент-субстратном комплексе (рис. 17б), что согласуется с биохимическими данными о низком сродстве P_i к F_1 -АТФазе [36, 64–68, 91–93].

С другой стороны, диссоциация ADP (переход "состояние 5 → состояние 6") сопровождается заметным повышением электростатической составляющей энергии ферментного комплекса, что должно препятствовать диссоциации ADP. Следует, однако, иметь в виду, что при избытке АТФ в растворе, окружающем фермент, рост энергии при диссоциации ADP будет скомпенсирован энергетически выгодным процессом связывания АТФ с освободившимся каталитическим центром (переход "состояние 6 → состояние 7"). Таким образом, в результате полного каталитического цикла АТФазы, сопровождающегося её структурными перестройками и направленным поворотом субъединицы γ на 120° , в водном растворе, окружающем фермент, станет на одну молекулу АТФ меньше, а вместо неё в растворе появляются молекулы ADP и P_i . В водной среде гидролиз АТФ характеризуется понижением свободной энергии, поэтому после каждого поворота ротора F_1 -АТФазы энергия всей системы (фермент, субстраты и продукты реакции, растворённые в среде) будет уменьшаться.

Приведённый выше пример показывает, что оценки изменений электростатической составляющей энергии фермент-субстратного комплекса, выполненные в рамках сравнительно простой модели, хорошо согласуются с известными экспериментальными данными о взаимодействии субстратов и продуктов реакции с F_1 -АТФазой. К сожалению, данные рентгеноструктурного анализа о структуре F_1 -АТФазы не содержат достоверных сведений о конформациях фермент-субстратного комплекса на промежуточных стадиях каталитического цикла. Тем не менее описание каталитического цикла F_1 -АТФазы даже в рамках модели, рассмотренной выше, оказалось полезным для анализа работы F_1 -АТФазы. В дальнейшем можно расширить эту модель, дополнительно включив в неё промежуточные состояния фермент-субстратного комплекса. Информация об этих состояниях может быть получена путём расчётов с использованием современных вычислительных методов, таких как методы молекулярной динамики и квантовой химии. Результаты вычислений, выполненных с использованием этих методов [111–114], подтверждают, что вклад электростатических взаимодействий в энергетику каталитического цикла гидролиза АТФ является существенным.

5.3. Стохастико-динамическая модель F_1 -АТФазы

5.3.1. Моделирование гидролиза АТФ изолированной F_1 -АТФазой. В настоящем разделе рассмотрена математическая модель, в которой динамические уравнения для описания вращения ротора F_1 -АТФазы описываются феноменологическими одномерными потенциалами [129, 130]. Эти потенциалы отражают конформационные изменения субъединиц β , происходящие во время каталитического цикла гидролиза АТФ. Ротору, положение которого характеризуется координатой θ , ставится в соответствие материальная точка, движущаяся в данном потенциале. Эти же потенциалы можно использовать для описания работы мотора в режиме синтеза АТФ, когда ротор вращается в противоположном направлении

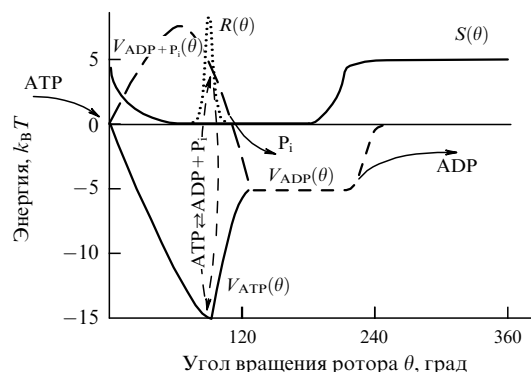


Рис. 18. Профили модельных потенциалов для каталитических центров F_1 -АТФазы, содержащих АТФ, ADP или $ADP + P_i$, в зависимости от угла поворота ротора θ . Модельные функции $R(\theta)$ и $S(\theta)$ характеризуют особенности протекания реакций синтеза/гидролиза АТФ в каталитических центрах и стерические ограничения, определяющие доступ реагентов к каталитическим центрам, соответственно (по данным работ [129, 130]).

под действием внешней силы, создаваемой мембранным комплексом F_0 .

Форма модельного потенциала $V(\theta)$ показана на рис. 18. Потенциал складывается аддитивно из нескольких функций. Функция $V_{ATP}(\theta - \theta_i)$ — потенциал, характеризующий связывание молекулы АТФ каталитическим центром, θ — угол поворота ротора, $\theta_i = 90^\circ, 210^\circ$ и 330° — значения координаты θ , соответствующие трём квазиравновесным положениям ротора. Вид функции $V_{ATP}(\theta - \theta_i)$ отражает тот факт, что связывание АТФ — энергетически выгодный процесс; в отсутствие АТФ потенциал для движения ротора не зависит от угла θ . Потенциал $V_{ADP+P_i}(\theta - \theta_i)$ соответствует наличию в активном центре продуктов реакции ADP и P_i . Близкое расположение двух отрицательно заряженных молекул энергетически невыгодно и должно привести к такому изменению конформации каталитической субъединицы, которое бы позволило одному из продуктов реакции выйти из активного центра. После диссоциации P_i функция $V_{ADP+P_i}(\theta - \theta_i)$ переходит в функцию $V_{ADP}(\theta - \theta_i)$. Горизонтальный участок функции $V_{ADP}(\theta - \theta_i)$ соответствует конформации каталитической субъединицы $\beta_{DP}(D)$.

Значения глубин потенциалов определены из оценок энергии электростатического взаимодействия заряженных групп молекулы F_1 -АТФазы и всех реагентов, находящихся в активных центрах фермента (см. предыдущий раздел). Глубина потенциала V_{ATP} равна $15 k_B T$. Высота потенциала V_{ADP+P_i} равна $10 k_B T$. Глубина потенциальной ямы V_{ADP} принята равной $5 k_B T$. Суммарное изменение энергии за один каталитический цикл гидролиза АТФ равно $20 k_B T$, что соответствует изменению свободной энергии при гидролизе одной молекулы АТФ при физиологических условиях [49]. Функция "реакционной способности" $R(\theta - \theta_i)$ отражает тот факт, что реакции синтеза/гидролиза АТФ происходят только в закрытом каталитическом центре. Функция $S(\theta - \theta_i)$ феноменологически описывает стерические ограничения, препятствующие доступу реагентов к закрытому реакционному центру.

Для однозначного определения формы потенциала необходимо учесть заполнение каталитических центров субстратами и продуктами реакции. С учётом этого

потенциал будет иметь следующий вид:

$$V(\theta - \theta_i) = \bar{\psi}_{\text{АТР}} V_{\text{АТР}}(\theta - \theta_i) + \bar{\psi}_{\text{АДР+Р}_i} V_{\text{АДР+Р}_i}(\theta - \theta_i) + \bar{\psi}_{\text{АДР}} V_{\text{АДР}}(\theta - \theta_i), \quad (15)$$

где функции $\bar{\psi}_{\text{АТР}}$, $\bar{\psi}_{\text{АДР}}$ и $\bar{\psi}_{\text{АДР+Р}_i}$ определяют наличие или отсутствие того или иного субстрата в каталитическом центре (см. подробнее [130]). Результирующий потенциал V_s складывается аддитивно из потенциалов для каждой из трёх каталитических субъединиц:

$$V_s(\theta) = V(\theta - \theta_1) + V(\theta - \theta_2) + V(\theta - \theta_3). \quad (16)$$

Уравнение, описывающее вращение ротора в поле потенциала V_s , имеет вид

$$J \frac{d^2\theta}{dt^2} + \xi \frac{d\theta}{dt} = -\frac{\partial V_s(\theta)}{\partial \theta} + f_1(t), \quad (17)$$

где J — момент инерции ротора, θ — угол вращения ротора; ξ — коэффициент трения, $f_1(t)$ — вращающий момент, обусловленный тепловыми флуктуациями. Характерные частоты вращения субъединицы γ составляют десятки герц. Учитывая значительную вязкость среды, в которой вращается нагруженный ротор ($\eta \approx 10^{-3}$ Н см $^{-2}$ и $\xi \approx 10^{-21}$ Н м с), а также малость момента инерции ротора с нагрузкой, вкладом инерционного члена $J d^2\theta/dt^2$ в уравнении (17) можно пренебречь. Уравнение необходимо дополнить системой кинетических уравнений, описывающих стохастические процессы посадки субстратов, их преобразование в каталитических центрах и выход продуктов (см. подробнее [130]).

На рисунке 19а приведены примеры расчётов, описывающих направленные вращения мотора при различных концентрациях АТР. В зависимости от концентрации АТР можно различить два крайних режима вращения ротора: а) преобладание пауз, связанных с ожиданием посадки АТР (при низких концентрациях АТР); б) преобладание пауз, связанных с ожиданием выхода АДР (высокие концентрации АТР). При промежуточных концентрациях АТР длительность обеих пауз примерно одинакова.

На рисунке 19б показано, как средняя скорость вращения ротора механо-химического мотора F_1 зависит от концентрации АТР при разных внешних нагрузках на ротор. Видно, что с увеличением концентрации АТР скорость направленного вращения ротора возрастает, достигая максимально возможного значения при $[\text{АТР}] \geq 1-2$ мМ. Предельная средняя скорость вращения ротора заметно падает с увеличением коэффициента трения ξ . На рисунке 20 показаны зависимости⁵ средней скорости направленного вращения мотора F_1 от длины филамента (нить актина), прикрепленного к ротору, рассчитанные для различных концентраций АТР. С увеличением длины филамента средняя скорость вращения ротора падает. Приведённые на рис. 19 и 20 теоретические кривые хорошо согласуются количественно с известными экспериментальными данными [80], что свидетельствует об адекватности модели.

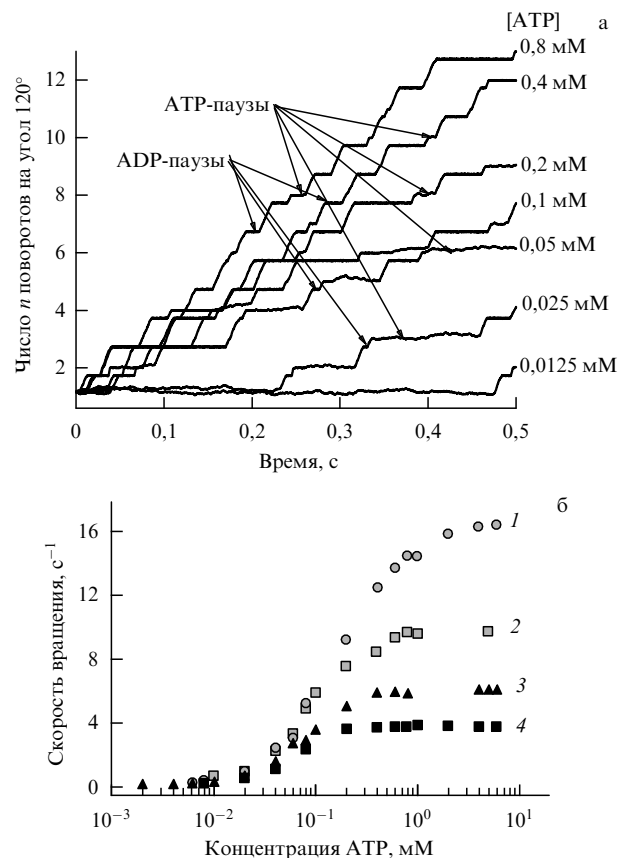


Рис. 19. (а) Результаты моделирования вращений ротора F_1 -АТФазы при различных концентрациях АТР. Коэффициент трения $\xi = 3 \times 10^{-21}$ [Н м с]. (б) Зависимость средней скорости вращения ротора F_1 -АТФазы от концентрации АТР при различных нагрузках ротора, которым соответствуют значения коэффициента вязкого трения ξ : 1 — $0,3 \times 10^{-21}$ [Н м с]; 2 — $0,5 \times 10^{-21}$ [Н м с]; 3 — 10^{-21} [Н м с]; 4 — 2×10^{-21} [Н м с].

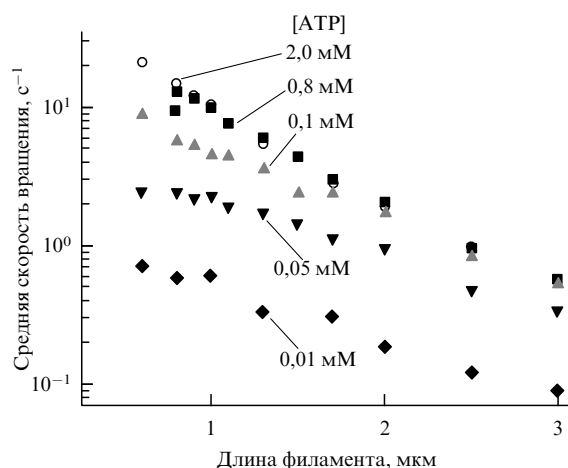


Рис. 20. Зависимость средней скорости вращения ротора F_1 -АТФазы от концентрации АТР и длины филамента L , прикрепленного к ротору (по результатам расчётов, представленных в [131]). Коэффициент вязкого трения ξ рассчитывали по формуле (4).

5.3.2. Моделирование синтеза АТР изолированной F_1 -АТФазой за счёт действия внешней силы. В этом разделе кратко суммированы результаты моделирования синтеза АТР изолированной F_1 -АТФазой, наблюдавшегося в опытах по вращению магнитной "ручки", прикрепленной к субъединице γ [95]. Вращение субъединицы γ под

⁵ Приведённые на рис. 19 и 20 результаты были получены совместно с А.Ф. Погребной (см. подробнее [129–132]).

действием внешней силы вызывает периодические изменения состояний каталитических центров, создавая условия для синтеза или гидролиза АТР, в зависимости от направления вращения ротора. Предполагается, что в режиме синтеза происходят все те же конформационные изменения, что и при гидролизе АТР, но в обратном порядке. Посадка АТР, P_i , синтез и диссоциация АТР рассматриваются как случайные события. Модель позволила описать синтез АТР без введения дополнительных предположений в систему уравнений и модельных потенциалов, описанных выше.

Результаты "численных экспериментов" по принудительному вращению ротора при разных концентрациях АТР показали, что скорость вращения ротора растёт с увеличением вращательного момента внешней силы при всех концентрациях АТР [131, 132]. Динамика вращения зависит от параметров модели (внешняя сила F_{ext} , концентрация АТР, коэффициент трения ξ), которые определяют характерные времена в системе. При малых F_{ext} вращение ротора имеет чётко выраженный шаговый характер с паузами, обусловленными ожиданием посадки АТР в каталитический центр, с ростом концентрации АТР длительность пауз уменьшается. При достаточно высоких значениях F_{ext} происходят повороты на 120° без синтеза АТР, эффективность работы фермента при этом падает.

5.4. "Триггерная" модель F_1 -АТФазы

В настоящем разделе кратко описана феноменологическая математическая модель, описывающая триггерный режим энергозависимых конформационных переходов субъединицы β ("открытая" конформация $\leftrightarrow$ "закрытая" конформация) [133, 134]. Основная цель этой простейшей модели — анализ влияния упругих деформаций субъединицы β при работе фермента, о которых говорится в работах Остера с соавторами [31, 70].

При избытке в среде молекул АТР F_1 -АТФаза работает без "сбоев", которые могли бы возникать вследствие диффузионных ограничений: очередная молекула АТР входит в открытый "карман" каталитического центра сразу же после освобождения этого центра. В противном случае, если концентрация АТР в среде мала, нужно учитывать случайные задержки моментов входа АТР в "карман" свободного каталитического центра. Будем считать, что концентрация АТР в среде велика и пренебрежём, в первом приближении, флуктуационным характером динамики субъединиц β и γ .

Искомые переменными в триггерной модели являются угол β_i (угол раскрытия субъединицы β_i , или угол между двумя крупными доменами этой субъединицы (рис. 6а)) и момент сил упругости τ_i ($i = 1, 2, 3$ — номера субъединиц β). Система уравнений для изменения угла β_i от $\pi/6$ до 0, характеризующих закрытие "кармана" каталитического центра, имеет вид

$$\zeta \frac{d\beta_i}{dt} = M(\beta_i) - \tau_i, \quad (18)$$

$$\mu \frac{d\tau_i}{dt} = kl^2 \beta_i - \tau_i - \tau_0, \quad (19)$$

где $M(\beta_i)$ — N-образный момент сил, возникающий при связывании молекулы АТР каталитическим центром β_i , амплитуда этого момента $A \approx 40$ пН нм; τ_i — момент сил упругости, возникающих при деформации субъединицы

β_i ; $\mu \approx 1-2$ мс — характерное время разрыва связи при гидролизе ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + P_i$) в каталитическом центре; $k = 4$ пН нм $^{-1}$ — коэффициент жёсткости конструкции; $l \approx 3$ нм — плечо момента сил упругости; $\zeta \sim 10^{-21}$ Н м с — коэффициент трения, величина которого определяется стоковым трением филамента или бусинки, присоединённых к ротору (если модель строится для иммобилизованной F_1 -АТФазы, работающей с механической нагрузкой). При этом считается, что участок DELSEED закрывающейся субъединицы β контактирует с субъединицей γ и "проворачивает" ротор. Изменение угла β на $\pi/6$ соответствует повороту ротора на угол $2\pi/3$. Моментом инерции и стоковым трением самих субъединиц β и γ в режиме закрытия мы пренебрегаем ввиду их малости. Параметр $\tau_0 \approx 20$ пН нм определяется остаточным упругим напряжением субъединицы β .

Запасание энергии упругой деформации происходит с запозданием по отношению к эволюции угла β , характеризующего наклон двух крупных доменов субъединицы β , соединённых шарниром (см. рис. 7). Динамика этого процесса выражается в первом приближении уравнением (19) для переменной τ_i . Для простоты предполагается, что при $0 < \beta_i < \pi/6$ "закрывающий" момент $M(\beta_i)$ линейно зависит от переменных β_i и τ_i . Угол β_i открывается от 0 до $\pi/6$ под действием момента $M_1(\beta_i)$. При этом

$$\varepsilon \frac{d\beta_i}{dt} = M_1(\beta_i) \approx -\alpha M(\beta_{i-1}) + \tau_i, \quad (20)$$

где $M(\beta_{i-1})$ — момент, который создаётся закрывающейся субъединицей β_{i-1} ($\alpha < 1$); $\varepsilon \ll \zeta$, так как при раскрытии (увеличении) угла β_i сопротивление или коэффициент трения ε очень малы.

Как было показано в работах [133, 134], уравнения (18)–(20) имеют периодические решения, если, как уже говорилось, концентрация АТР в среде велика. Начальные условия на каждом шаге определяются так, чтобы начальное отклонение угла β_i превышало некоторое малое пороговое значение. Анализ численных решений показал, что время изменения угла β_i на $\pi/6$ и соответственно время изменения угла поворота ротора θ на $2\pi/3$ порядка $\zeta/A \ll \mu$ (здесь A — амплитуда момента $M(\beta_i)$), что соответствует данным эксперимента (рис. 20в). Поэтому общее время T поворота ротора на угол 2π определяется в основном временем разрыва макроэргической связи:

$$T \approx 3\mu + 3 \frac{\zeta}{A}. \quad (21)$$

Увеличение периода происходит вместе с увеличением момента сил от внешней нагрузки, приложенного к ротору. Усложнение функции $M(\beta_i)$ позволяет моделировать двухшаговый режим изменения угла β в режиме гидролиза [133, 134].

В заключение данного раздела отметим, что теорию F_0F_1 -АТФ-синтазы нельзя считать завершённой. Перечислим лишь некоторые нерешённые задачи, которые могли бы заинтересовать физиков.

1. Как можно адекватно учесть в динамике молекулярных машин типа F_0F_1 -АТФ-синтазы шумы различной природы? Этот вопрос относится к анализу вклада тепловых шумов, а также дробовых шумов, обусловленных неравномерностью диффузионно-контролируемой "посадки" АТР и АТР в каталитические центры фер-

мента, и шумов, определяющихся разбросом времён разрыва макроэргической связи при гидролизе АТР (аналог фликкер-шумов).

2. Как рассчитать "упругость" элементов макромолекулярной конструкции при деформациях различных субъединиц (α , β и γ)?

3. Как можно использовать представления, развиваемые в теоретических работах о движении броуновских частиц в сложных потенциальных рельефах, энергия которых пополняется извне (см., например, [135]), для расчёта вращения ротора F_0F_1 -АТФ-синтазы?

В связи со сказанным хотелось бы коснуться ещё одной проблемы теоретической биофизики. В России имеется несколько научных школ, которые много лет успешно занимаются исследованием автоволновых процессов в биомембранах: в Нижнем Новгороде [136], в Пушкино [137, 138], в МГУ им. М.В. Ломоносова [139]. Этот список можно продолжить. Состояние дел в этой области за рубежом достаточно полно представлено в последнем издании монографии Дж. Мюррея (перевод на русский язык первого тома этого фундаментального труда вышел в 2009 г. [140]). Все авторы так или иначе используют нелинейные характеристики проводимости каналов мембран, которые часто задаются из общих соображений на основе рассмотрения экспериментальных данных. Нам представляется, что новые данные о структурно-функциональной организации мембранных АТФаз позволят в дальнейшем конкретизировать связь между теорией проводимости ионных каналов и нелинейными процессами, изучаемыми различными авторами при описании биомембран. Наконец, следует отметить работу [141], в которой прослеживается преемственность теории АТФ-синтазы и теории вращающегося флагеллярного бактериального мотора.

6. Заключение

В настоящей работе мы рассмотрели современные представления о физико-химических механизмах функционирования протонной АТФ-синтазы — одного из главных макромолекулярных устройств, катализирующих образование молекул АТР — основной "энергетической валюты" живой клетки. Встроенный в мембрану клетки АТФ-синтазный комплекс работает как энергопреобразующая макромолекулярная машина, которая приводится в действие за счёт трансмембранной разности электрохимических потенциалов ионов водорода ($\Delta\mu_{H^+}$). Электрический ток, проходящий через мембранный комплекс F_0 (носителями электрического тока являются протоны), обеспечивает вращение ротора (встроенный в мембрану барабан c_n). Барабан молекулярного "электромотора" c_n сочленён с ротором механо-химического мотора F_1 (субъединица γ), вращение которого обеспечивает синтез АТР из АДФ и P_i . F_0F_1 -АТФ-синтаза — обратимая молекулярная машина, способная

катализировать как синтез, так и гидролиз АТР. При вращении ротора мотора F_1 в направлении, противоположном вращению ротора электромотора F_0 (за счёт энергии гидролизующихся молекул АТР), F_0F_1 -АТФ-синтаза работает как протонная помпа, генерирующая $\Delta\mu_{H^+}$. Имеются прямые экспериментальные доказательства того, что роторы обоих моторов (F_0 и F_1), входящих в состав F_0F_1 -АТФ-синтазы, действительно вращаются при работе этого макромолекулярного устройства.

F_0F_1 -АТФ-синтаза — макромолекулярное устройство, которое характеризуется высокой эффективностью преобразования энергии ($\eta \approx 90-100\%$). Высокий к.п.д. F_0F_1 -АТФ-синтазы определяется тем, что конструкция этого мотора обеспечивает тесное сопряжение химических и механических стадий каталитического цикла, за счёт чего потери энергии в тепло минимальны. Можно сказать, что F_0F_1 -АТФ-синтаза является "энтальпийной" молекулярной машиной [1–3], при работе которой изменения энтропии незначительны ($\Delta S \approx 0$). Это означает, что F_0F_1 -АТФ-синтаза работает как молекулярная машина, которая, однако, не является тепловой машиной в общепринятом смысле. В отличие от макроскопических тепловых машин, для работы таких молекулярных моторов не требуется специальных конструкций типа "холодильника" или "нагревателя".

Протонная АТФ-синтаза является самым маленьким из всех известных в природе вращающихся моторов, её характерные размеры ≈ 10 нм. В то же время это, вероятно, наиболее "сильный" механо-химический молекулярный мотор природного происхождения, использующий в качестве химического "топлива" молекулы АТР. Вращательный момент, создаваемый одной молекулой F_1 -АТФазы (мотор F_1), $N \approx 40-45$ пН нм (развиваемая им сила $F \approx 40-45$ пН). Средняя скорость вращения ротора достигает 300 оборотов в секунду.

Мы рассмотрели работу F_0F_1 -АТФ-синтазы — лишь одной, но очень важной молекулярной машины живой клетки. Сотни миллиардов таких макромолекулярных моторов вращаются в каждом живом организме, обеспечивая воспроизводство "химического топлива" в виде молекул АТР. Уместно сказать, что в течение суток в организме одного взрослого человека синтезируется более 50 кг молекул АТР, которые за это же время расходуются организмом для совершения различных видов химической, осмотической и механической работы.

В таблице приведены сравнительные характеристики разных молекулярных моторов, включая так называемые "линейные" моторы (миозин, кинезин), которые перемещаются вдоль направляющих путей (нити актина и тубулиновые микротрубочки) и обеспечивают сократительные и транспортные потребности отдельных клеток и организмов, а также фермент РНК-полимеразу,двигающийся вдоль нити ДНК. Видно, что максимальная сила, создаваемая ротором механо-химического

Таблица. Сравнительные характеристики молекулярных моторов (по данным [142])

Мотор/путь	Шаг	Максимальная сила	Максимальный к.п.д.	Способ движения
α -, β - и γ -субъединицы F_1	Поворот на 120°	40 пН	$\approx 100\%$	Вращение
Миозин/Актин	Переменный	3–5 пН	$\approx 20\%$	Шаги, прыжки
Кинезин/Микротрубочка	Смещение на 8 нм	5 пН	$\approx 50\%$	Шаги
РНКполимераза/ДНК	Смещение на 0,34 нм	14 пН	$\approx 20\%$	"Ползание"

мотора F_1 , существенно превосходит силы, развиваемые "линейными" моторами. Очевидно, что вращение — это более экономный способ движения, чем поступательное движение "линейных" биологических моторов.

По сравнению с F_0F_1 -АТФ-синтазой флагеллярный электромотор бактериальной клетки, вращающий длинные спиралевидные жгутики, является конструктивно гораздо более сложным макромолекулярным устройством. Этот электромотор приводится в действие за счёт электрохимических потенциалов ионов водорода или ионов натрия. В состав статора и ротора флагеллярного электромотора входят десятки белков, включая так называемые моторные белки А и В, расположенных по кругу. Благодаря общим усилиям большого числа моторных белков создаётся значительный вращательный момент $N \approx 4000$ пН·нм. Несмотря на длинный вращающийся жгутик (~ 10 мкм), флагеллярные электромоторы работают с высокой скоростью (~ 400 – 1700 оборотов в 1 с). Один полный оборот ротора сопряжён с переносом через мотор около 1000 протонов. Эффективность работы бактериальных электромоторов очень велика. Бактерии плавают со средней скоростью поступательного движения 25 мкм s^{-1} (у некоторых бактерий — более 100 мкм s^{-1}), т.е. за одну секунду бактерия перемещается на расстояние, десятикратно превышающее её длину.

Рассмотренными выше примерами не ограничивается всё разнообразие молекулярных моторов, появившихся в природе более трёх миллиардов лет назад. Экспериментальные и теоретические исследования нерукотворных наноразмерных моторов природного происхождения продолжают. Важнейшая роль в изучении биофизических механизмов работы биологических машин и механизмов принадлежит современным физическим методам исследования, позволяющим не только следить за состоянием индивидуальных молекул белков и белковых комплексов, но и целенаправленно манипулировать отдельными макромолекулами.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект 09-04-00978). Авторы признательны А.Ф. Погребной и А.В. Карговскому за их неоценимый вклад в построение и численную реализацию математических моделей, описанных в разделах 5.2–5.4, а также М.К. Алиеву и И.Г. Минкевичу за труд по критическому прочтению нашей работы. Мы также благодарны сотрудникам Гумбольдтского университета в Берлине В. Эбелингу, Л. Шиманскому-Гайеру и А. Лавровой за плодотворные дискуссии по проблемам теории молекулярных моторов.

Список литературы

1. Блюменфельд Л А *Проблемы биологической физики* (М.: Наука, 1974) [Blumenfeld L A *Problems of Biological Physics* (Heidelberg: Springer-Verlag, 1981)]
2. Blumenfeld L A, Tikhonov A N *Biophysical Thermodynamics of Intracellular Processes: Molecular Machines of the Living Cell* (New York: Springer-Verlag, 1994)
3. Чернавский Д С, Чернавская Н М *Белок-машина: Биологические макромолекулярные конструкции* (М.: Янус-К, 1999)
4. Чернавский Д С, Хургин Ю И, Шноль С Э *Мол. биол.* **1** 419 (1967)
5. Романовский Ю М, Эбелинг В (Ред.) *Молекулярная динамика ферментов* (М.: Изд-во Московского университета, 2000)
6. Рубин А Б *Биофизика* Т. 1, 2 (М.: Изд-во Московского университета, 2004)
7. Asbury C L *Curr. Opin. Cell Biol.* **17** 89 (2005)
8. Carter N J, Cross R A *Curr. Opin. Cell Biol.* **18** 61 (2006)
9. Westermann S, Drubin D G, Barnes G *Annu. Rev. Biochem.* **76** 563 (2007)
10. Borgia A, Williams P M, Clarke J *Annu. Rev. Biochem.* **77** 101 (2008)
11. Marshall R A et al. *Annu. Rev. Biochem.* **77** 177 (2008)
12. Joo Ch et al. *Annu. Rev. Biochem.* **77** 51 (2008)
13. Herbert K M, Greenleaf W J, Block S M *Annu. Rev. Biochem.* **77** 149 (2008)
14. Hamdan S M, Richardson C C *Annu. Rev. Biochem.* **78** 205 (2009)
15. Gennerich A, Vale R D *Curr. Opin. Cell Biol.* **21** 59 (2009)
16. Moffitt J R et al. *Annu. Rev. Biochem.* **77** 205 (2008)
17. Block S M, Goldstein L S, Schnapp B J *Nature* **348** 348 (1990)
18. Svoboda K et al. *Nature* **365** 721 (1993)
19. Finer J T, Simmons R M, Spudis J A *Nature* **368** 113 (1994)
20. Vale R D *Cell* **112** 467 (2003)
21. Howard J, Hudspeth A J, Vale R D *Nature* **342** 154 (1989)
22. Rice S et al. *Nature* **402** 778 (1999)
23. Yildiz A et al. *Science* **303** 676 (2004)
24. Kon T et al. *Nature Struct. Mol. Biol.* **12** 513 (2005)
25. Grishchuk E L et al. *Nature* **438** 384 (2005)
26. McIntosh J et al. *Cell* **135** 322 (2008)
27. Block S M *Biophys. J.* **92** 2986 (2007)
28. Shiroguchi K, Kinoshita K (Jr.) *Science* **316** 1208 (2007)
29. Ebeling W, Schimansky-Gaier L, Romanovsky Yu M *Stochastic Dynamics of Reacting Biomolecules* (River Edge, N.J.: World Scientific, 2002)
30. Shaitan K V, in *Stochastic Dynamics of Reacting Biomolecules* (River Edge, N.J.: World Scientific, 2002) p. 285
31. Oster G, Wang H *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1458** 482 (2000)
32. Oster G, Wang H *Trends Cell Biol.* **13** 114 (2003)
33. Keller D, Bustamante C *Biophys. J.* **78** 541 (2000)
34. Bustamante C, Keller D, Oster G *Acc. Chem. Res.* **34** 412 (2001)
35. Xing J et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103** 1260 (2006)
36. Boyer P D *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1140** 215 (1993)
37. Boyer P D *Annu. Rev. Biochem.* **66** 717 (1997)
38. Junge W, Lill H, Engelbrecht S *Trends Biochem. Sci.* **22** 420 (1997)
39. Stock D et al. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10** 672 (2000)
40. Walker J (Ed.) *Biochim. Biophys. Acta* **1458** (2–3) (2000), Special Issue, Guest
41. *J. Bioenerg. Biomembr.* **32** (4–5) (2000), Minireview Series, ATP Synthesis in the Year 2000: Current Views about Structure, Motor Components, Energy Interconversions and Catalytic Mechanisms, Pt. 1, 2
42. Harvey W R, Boutilier R G, Nelson N (Eds) *J. Exp. Biol.* **203** (1) (2000), Special issue
43. Capaldi R A, Aggeler R *Trends Biochem. Sci.* **27** 154 (2002)
44. Von Ballmoos C, Wiedenmann A, Dimroth P *Annu. Rev. Biochem.* **78** 649 (2009)
45. Von Ballmoos C, Cook G M, Dimroth P *Annu. Rev. Biophys.* **37** 43 (2008)
46. Mitchell P *Theor. Exp. Biophys.* **2** 159 (1969)
47. Skulachev V P *Membrane Bioenergetics* (New York: Springer-Verlag, 1988)
48. Nicholls D G, Ferguson S J *Bioenergetics 3* (San Diego, Calif.: Academic Press, 2002)
49. Nelson D L, Cox M M *Lehninger Principles of Biochemistry* 4th ed. (New York: W.H. Freeman, 2005)
50. Alberty R A *J. Biol. Chem.* **244** 3290 (1969)
51. Gräber P *Curr. Topics Membr. Transp.* **16** 215 (1982)
52. Kramer D M, Sacksteder C A, Cruz J A *Photosynth. Res.* **60** 151 (1999)
53. Trubitsin B V, Tikhonov A N *J. Magn. Res.* **163** 257 (2003)
54. Tikhonov A N et al. *Biochim. Biophys. Acta* **1777** 285 (2008)
55. Abrahams J P et al. *Nature* **370** 621 (1994)
56. Leslie A G W, Walker J E *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **355** 465 (2000)
57. Groth G, Pohl E *J. Biol. Chem.* **276** 1345 (2001)
58. Seelert H et al. *Nature* **405** 418 (2000)
59. Stock D, Leslie A G W, Walker J E *Science* **286** 1700 (1999)
60. Menz R I, Walker J E, Leslie A G *Cell* **106** 331 (2001)
61. Kabaleeswaran V et al. *EMBO J.* **25** 5433 (2006)
62. Oster G, Wang H, in *Encyclopedia of Molecular Biology* (Ed. T Creighton) (New York: Wiley, 1999) p. 211
63. Shirakihara Y et al. *Structure* **5** 825 (1997)

64. Grubmeyer C, Cross R L, Penefsky H S *J. Biol. Chem.* **257** 12092 (1982)
65. Cunningham D, Cross R L *J. Biol. Chem.* **263** 18850 (1988)
66. Senior A E *J. Bioenerg. Biomem.* **24** 479 (1992)
67. Milgrom Y M, Murataliev M B, Boyer P D *Biochem. J.* **330** 1037 (1998)
68. Penefsky H S, Cross R L *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **64** 173 (1991)
69. Antes D et al. *Biophys. J.* **85** 695 (2003)
70. Sun S et al. *Eur. Biophys. J.* **32** 676 (2003)
71. Vinogradov A D *J. Exp. Biol.* **203** 41 (2000)
72. Duncan T M et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92** 10964 (1995)
73. Zhou Y et al. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1275** 96 (1996)
74. Zhou Y, Duncan T M, Cross R L *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 10583 (1997)
75. Sabbert D, Engelbrecht S, Junge W *Nature* **381** 623 (1996)
76. Sabbert D, Engelbrecht S, Junge W *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 4401 (1997)
77. Häsler K, Engelbrecht S, Junge W *FEBS Lett.* **426** 301 (1998)
78. Noji H et al. *Nature* **386** 299 (1997)
79. Yasuda R et al. *Cell* **93** 1117 (1998)
80. Kinoshita K et al. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* **355** 473 (2000)
81. Sambongi Y et al. *Science* **286** 1722 (1999)
82. Tanabe M et al. *J. Biol. Chem.* **276** 15269 (2001)
83. Yasuda R et al. *Nature* **410** 898 (2001)
84. Shimabukuro K et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 14731 (2003)
85. Nishizaka T et al. *Nature Struct. Mol. Biol.* **11** 142 (2004)
86. Kinoshita K, Adachi K, Itoh H *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **33** 245 (2004)
87. Ueno H et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 1333 (2005)
88. Sakaki N et al. *Biophys. J.* **88** 2047 (2005)
89. Adachi K et al. *Cell* **130** 309 (2007)
90. Boyer P D *FEBS Lett.* **512** 29 (2002)
91. Weber J, Senior A E *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1319** 19 (1997)
92. Weber J, Senior A E *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1458** 300 (2000)
93. Senior A, Nadanaciva S, Weber J *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1553** 188 (2002)
94. Weber J, Senior A E *J. Biol. Chem.* **276** 35422 (2001)
95. Itoh H et al. *Nature* **427** 465 (2004)
96. Yasuda R et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 9314 (2003)
97. Diez M et al. *Nature Struct. Mol. Biol.* **11** 135 (2004)
98. Ma J et al. *Structure* **10** 921 (2002)
99. Furuike S et al. *Science* **319** 955 (2008)
100. Hossain M D et al. *Biophys. J.* **95** 4837 (2008)
101. Suzuki T et al. *J. Biol. Chem.* **277** 13281 (2002)
102. Elston T, Wang H, Oster G *Nature* **391** 510 (1998)
103. Wang H, Oster G *Nature* **396** 279 (1998)
104. Grabe M, Wang H, Oster G *Biophys. J.* **78** 2798 (2000)
105. Wang H, Oster G *Europhys. Lett.* **57** 134 (2002)
106. Jain S, Nath S *FEBS Lett.* **476** 113 (2000)
107. Sun S X, Wang H, Oster G *Biophys. J.* **86** 1373 (2004)
108. Ditttrich M, Hayashi S, Schulten K *Biophys. J.* **85** 2253 (2003)
109. Böckmann R A, Grubmüller H *Nature Struct. Biol.* **9** 198 (2002)
110. Böckmann R A, Grubmüller H *Biophys. J.* **85** 1482 (2003)
111. Yang W et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 874 (2003)
112. Strajbl M, Shurki A, Warshel A *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 14834 (2003)
113. Gao Y Q et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** 11339 (2003)
114. Романовский Ю М, Карговский А В, в сб. *Нелинейные волны 2008* (Под ред. А В Гапонова, В И Некоркина) (Н. Новгород: ИПФ РАН, 2009) с. 223
115. Нарциссов Я Р, Машковцева Е В *Биофизика* **50** 1048 (2005) [Nartsissov Ya R, Mashkovtseva E V *Biophysics* **50** 905 (2005)]
116. Nartsissov Y R, Mashkovtseva E V *J. Theor. Biol.* **242** 300 (2006)
117. Pänke O, Rumberg B *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1412** 118 (1999)
118. Cherepanov D A, Mulikidjanian A Y, Junge W *FEBS Lett.* **449** 1 (1999)
119. Pänke O et al. *Biophys. J.* **81** 1220 (2001)
120. Rastogi V K, Girvin M V *Nature* **402** 263 (1999)
121. Fillingame R H et al. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1458** 387 (2000)
122. Fillingame R H, Angevine C M, Dmitriev O Y *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1555** 29 (2002)
123. Fillingame R H, Dmitriev O Y *Biochim. Biophys. Acta (BBA) — Bioenergetics* **1565** 232 (2002)
124. Xing J, Wang H, Oster G *Biophys. J.* **89** 1551 (2005)
125. Xing J et al. *Biophys. J.* **87** 2148 (2004)
126. Xing J, Liao J-C, Oster G *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102** 16539 (2005)
127. Тихонов А Н, Погребная А Ф, Романовский Ю М *Биофизика* **48** 1052 (2003) [Tikhonov A N, Pogrebnaya A F, Romanovsky Yu M *Biophysics* **48** 970 (2003)]
128. Pogrebnaya A F, Romanovsky Y M, Tikhonov A N *Proc. SPIE* **5068** 27 (2003)
129. Pogrebnaya A F, Romanovsky Y M, Tikhonov A N *Proc. SPIE* **5330** 120 (2004)
130. Pogrebnaya A, Romanovsky Y, Tikhonov A *Fluct. Noise Lett.* **5** L217 (2005)
131. Погребная А Ф, Дисс. ... канд. физ.-мат. наук (М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. Биол. фак., 2005)
132. Погребная А Ф *Компьютерные исследования и моделирование* **1** 217 (2009)
133. Карговский А В, Романовский Ю М, Тихонов А Н *Биофизика* **54** 5 (2009) [Kargovsky A V, Romanovsky Yu M, Tikhonov A N *Biophysics* **54** 1 (2009)]
134. Карговский А В и др., в сб. *Динамические модели процессов в клетках и субклеточных наноструктурах* (Под общ. ред. Г Ю Ризниченко, А Б Рубина) (М. – Ижевск: РХД, 2009) с. 69
135. Fiasconaro A, Ebeling W, Gudowska-Nowak E *Eur. Phys. J. B* **65** 403 (2008)
136. Некоркин В И *УФН* **178** 313 (2008) [Nekorkin V I *Phys. Usp.* **51** 295 (2008)]
137. Иваницкий Г Р, Кринский В И, Сельков Е Е *Математическая биофизика клетки* (М.: Наука, 1978)
138. Борисюк Г Н и др. *УФН* **172** 1189 (2002) [Borisjuk G N et al. *Phys. Usp.* **45** 1073 (2002)]
139. Plusnina T Yu et al. *J. Biol. Syst.* **16** 197 (2008)
140. Murray J D *Mathematical Biology I. An Introduction* (Berlin: Springer-Verlag, 2002) [Мюррей Дж *Математическая биология Т. 1 Введение* (М. – Ижевск: РХД. Ин-т компьют. исслед., 2009)]
141. Elston T C, Oster G *Biophys. J.* **73** 703 (1997)
142. Kinoshita K (Jr.) et al. *Cell* **93** 21 (1998)

Molecular energy transducers of the living cell. Proton ATP synthase: a rotating molecular motor

Yu.M. Romanovsky, A.N. Tikhonov

Physics Department, M.V. Lomonosov Moscow State University,

Vorob'evy Gory, 119991 Moscow, Russian Federation

Tel. (7-495) 939-29 73. E-mail: yuromanovsky@yandex.ru, an_tikhonov@mail.ru, an_tikhonov@physics.msu.ru

The free energy released upon the fermentative hydrolysis of adenosine triphosphate (ATP) is the main source of energy for functioning of the living cell and all multicellular organisms. The overwhelming majority of ATP molecules are formed by proton ATP synthases, which are the smallest macromolecular electric motors in nature. This paper reviews the modern concepts of the molecular structure and functioning of the proton ATP synthase, and real-time biophysical experiments on the rotation of the 'rotor' of this macromolecular motor. Some mathematical models describing the operation of this nanosized macromolecular machine are described

PACS numbers: **87.10. – e**, **87.15. – v**, **87.16. – b**

Bibliography — 142 references

Uspekhi Fizicheskikh Nauk **180** (9) 931–956 (2010)

DOI: 10.3367/UFNr.0180.201009b.0931

Received 26 March 2010, revised 23 April 2010

Physics – Uspekhi **53** (9) (2010)