

УДК 573.2:577.152.361

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

ОПТИМІЗАЦІЯ МОДЕЛІ РОБОТИ Na^+, K^+ -АТРази

А.М. Окань, Д.І. Санагурський

Кафедра біофізики та біоінформатики
 Львівський національний університет імені Івана Франка,
 вул. Грушевського, 4, 79005 Львів
 E-mail: biolog@franko.lviv.ua

Проаналізовано модель створену на основі класичної 4-ох стадійної схеми роботи Na^+, K^+ -АТРази і показано неможливість відтворити за її допомогою зміни активності ферменту в широкому діапазоні співвідношень концентрацій Na^+ і K^+ . Запропоновано схему роботи Na^+, K^+ -АТРази, що враховує конкуренцію іонів за центри зв'язування, та показано здатність моделі створеної на її основі відтворювати залежність гідролітичної активності ферменту від концентрації іонів. Запропоновано схему, що відображає роботу Na^+, K^+ -АТРази у вигляді двох незалежних реакційних циклів відповідальних за транспорт Na^+ і K^+ . Показано узгодженість, даних прогнозованих моделлю побудованою на основі цієї схеми, з експериментальними даними. Створено моделі, що відображають залежність швидкості транспорту іонів Na^+ і K^+ Na^+, K^+ -помпою від концентрації цих іонів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: Na^+, K^+ -АТРаза, модель, гідролітична активність, швидкість гідролізу АТР, швидкість транспорту K^+ , швидкість транспорту Na^+ .

Підтримання трансмембранного градієнту концентрацій іонів є обов'язковою умовою забезпечення життєдіяльності клітини. В цьому процесі виключно важлива роль належить системам активного транспорту іонів. В плазматичній мембрані тварин провідне місце серед таких систем займає Na^+, K^+ -АТРаза.

Na^+, K^+ -АТРаза (КФ 3.6.1.37) – інтегральний білок плазматичних мембран більшості тканин тварин, є одним з найбільш інтенсивно досліджуваних векторних ферментів біомембран. Na^+, K^+ -АТРаза – «молекулярна машина», яка забезпечує спряження гідролізу АТР з трансмембранним проти градієнтним переносом іонів Na^+ і K^+ . Іони Na^+ «перекачуються» через плазматичну мембрану з цитоплазми в позаклітинне середовище, а іони K^+ «закачуються» з середовища в цитоплазму [1,2,3].

За півстолітню історію дослідження Na^+, K^+ -АТРази зібрана величезна кількість експериментального матеріалу. Проте повного розуміння механізмів функціонування цієї складної іонтранспортної системи не досягнуто.

Для опису кінетичної поведінки метаболічних систем ефективним є застосування методів математичного моделювання [4]. В ряді випадків виправданим є застосування формальних підходів, які дозволяють створювати відносно прості моделі досліджуваних систем. Такі моделі не враховують тонких механізмів функціонування біологічної системи, проте здатні, з певною точністю, відтворювати їх поведінку [5,6].

Мета даної роботи – використовуючи знання та певні обґрунтовані припущення про механізми роботи Na^+, K^+ -АТРази, створити структурно-функціональну модель, яка б відображала залежність активності даної системи від концентрації іонів натрію та калію.

Математичні моделі створювалися на основі схем роботи Na^+, K^+ -АТРази, з використанням методу Альтмана-Кінга [7]. В рівняннях добуток і суми добутоків констант швидкості замінено коефіцієнтами, що спрощує математичний аналіз і

дозволяє представити їх в більш компактній формі. Дослідження створених моделей здійснювалося з використанням програм Mathcad 2001 Professional, а також Excel 2003.

В основі більшості сучасних моделей роботи Na^+, K^+ - АТРази лежить схема, запропонована в 60-х роках і названа за іменем її творців схемою Ольберса-Поста. Це 4-стадійна схема, яка передбачає цикл перетворень між двома основними конформаціями ферменту в фосфорильованому і нефосфорильованому станах [8]. За цією схемою Na^+, K^+ - АТРаза фосфорилується АТФ в присутності Na^+ і Mg^{2+} з утворенням фосфоферменту $\text{E}_1\text{-P}$, який розщеплюється АДФ і відносно нечутливий до іонів калію. Форма ферменту $\text{E}_1\text{-P}$ зазнає конформаційного переходу до $\text{E}_2\text{-P}$. Існує дві дефосфосформи ферменту: E_1 з високою спорідненістю до Na^+ , і E_2 з високою спорідненістю до K^+ .

На основі схеми (рис 1.), що відповідає основним положенням, які наведені вище, було створено модель, яка відображає залежність активності гідролізу АТФ Na^+, K^+ - АТРазою від концентрації іонів активаторів:

$$-\frac{d[\text{ATP}]}{dt} = [\text{E}_0] \frac{k_1[\text{Na}^+]^3[\text{K}^+]^2}{k_2[\text{Na}^+]^3 + k_3[\text{K}^+]^2 + k_4[\text{Na}^+]^3[\text{K}^+]^2}; \quad (1)$$

де k_1, k_2, k_3, k_4 – кінетичні коефіцієнти, $[\text{E}_0]$ – сумарна концентрація ферменту.

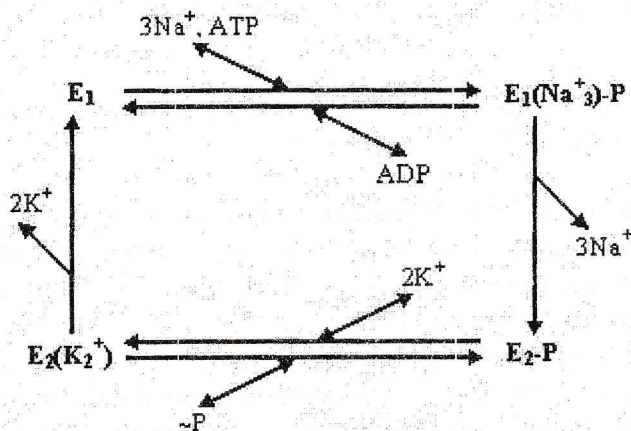


Рис. 1 Схема роботи Na^+, K^+ - АТРази.

Прогнозовану моделлю активність Na^+, K^+ - АТРази при різних співвідношеннях концентрацій іонів Na^+ і K^+ було порівняно з активністю, що спостерігається за тих же умов в експерименті. Для порівняння було взято літературні дані активності Na^+, K^+ - АТРази з мозку бика [9]. Теоретичну криву одержано використовуючи рівняння (1), при таких значеннях коефіцієнтів: $k_1=1,6$; $k_2=2,3$; $k_3=1$; $k_4=2,6$. Як видно з рис. 2, при відхиленні співвідношення концентрацій іонів від оптимального, активність Na^+, K^+ - АТРази, прогнозована моделлю, суттєво відхиляється від експериментальних даних.

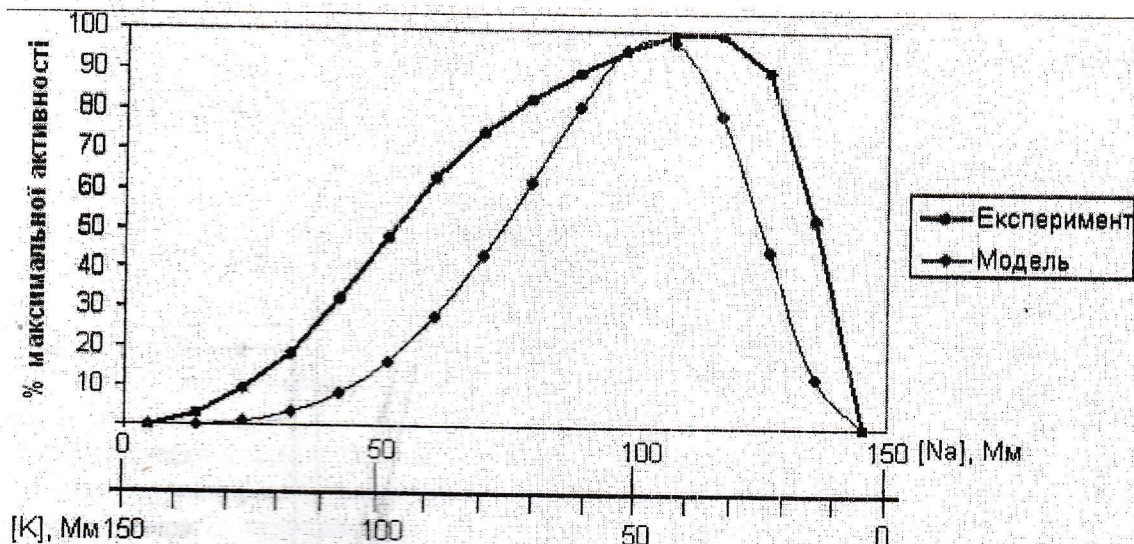
Оптимізація моделі роботи Na^+ , K^+ -АТРази.

Рис. 2. Порівняння активності Na^+ , K^+ - АТРази прогнозованої моделлю (1) з експериментальними даними.

Показано, що E_1 -конформація ферменту, яка вважається «натрієвою», може також зв'язувати (з нижчою афінністю) іони калію, а E_2 -конформація з нижчою спорідненістю може зв'язувати іони натрію [10,11]. При цьому підвищення концентрації K^+_{in} підвищує, а концентрації Na^+_{ex} знижує швидкість гідролізу АТФ Na^+ , K^+ - АТРазою [12]. Це свідчить про те, що зв'язування Na^+_{ex} до E_2 -Р форми ферменту призводить до утворення комплексу, який не зазнає подальших перетворень і тимчасово вилучає частину ферменту з реакційного циклу. Активація гідролізу АТФ при підвищенні концентрації K^+_{in} очевидно є результатом того, що зв'язування K^+_{in} до E_1 форми ферменту супроводжується гідролізом АТФ, а утворений комплекс зазнає подальших перетворень, включаючись в реакційний цикл. Виходячи з наведених вище міркувань, ми модифікували схему роботи Na^+ , K^+ -АТРази, врахувавши конкуренцію іонів за центри зв'язування (рис. 3).

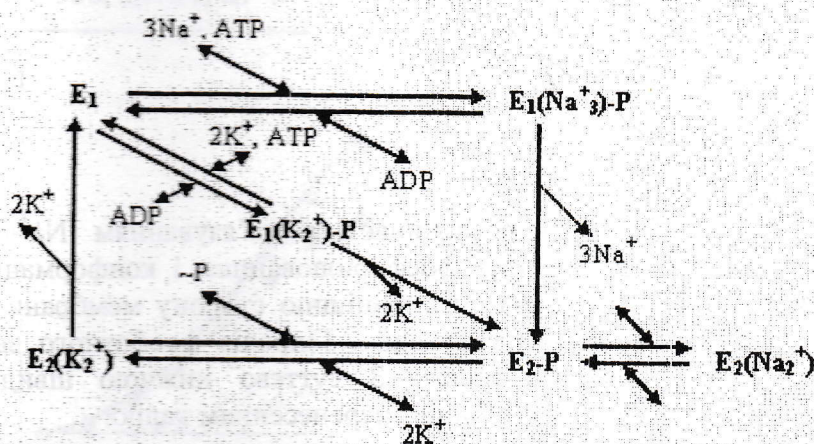


Рис. 3. Схема роботи Na^+ , K^+ - АТРази, що враховує конкуренцію іонів за центри зв'язування.

На основі схеми представленої на рис. 3, створено математичну модель (2) залежності активності гідролізу АТФ від концентрації іонів активаторів. Дані, прогнозовані математичною моделлю (2) (при $k_1=285$; $k_2=0,01$; $k_3=4$; $k_4=1$; $k_5=0,2$; $k_6=0,1$; $k_7=1$; $k_8=1$; $k_9=10000$), добре узгоджуються з експериментальними даними при всіх досліджених співвідношеннях концентрацій іонів натрію і калію.

$$\frac{d[ATP]}{dt} = [E_0] \frac{k1[Na^+]^3[K^+]^2 + k2[K^+]^4}{k3[K^+]^2 + k4[Na^+]^3[K^+]^2 + k5[Na^+]^3 + k6 + k7[K^+]^4 + k8[Na^+]^5 + k9[Na^+]^2[K^+]^2}; (2)$$

де $k5, k6, k7, k8, k9$ – коефіцієнти.

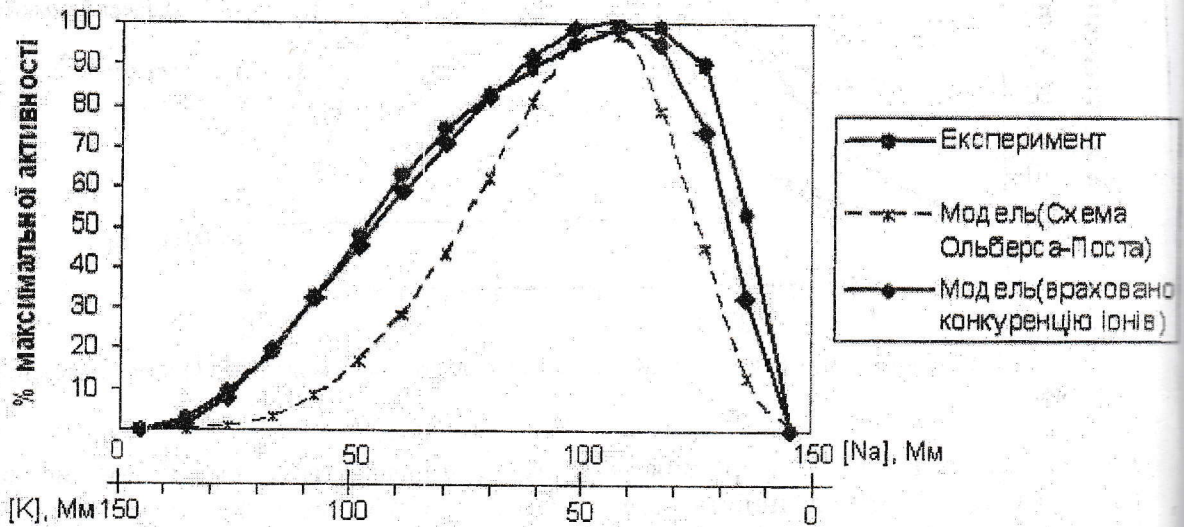


Рис. 4. Порівняння активності Na^+,K^+ -АТРази прогнозованої моделлю (1) і моделлю (2) з експериментальними даними.

Припускаючи існування незалежних потоків натрію і калію в транспорті іонів Na^+,K^+ -АТРазою, ми запропонували схему роботи ферменту, що включає два окремі цикли транспорту для натрію і для калію.

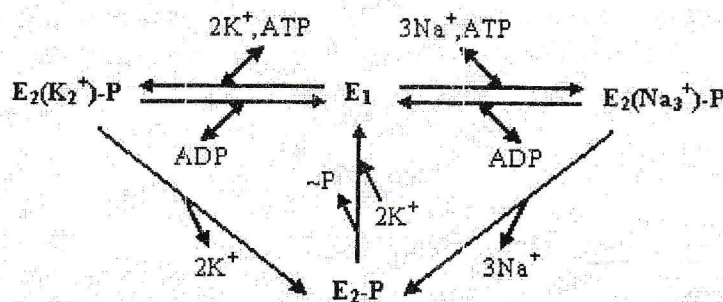


Рис.5 Схема транспорту Na^+ .

Цикл перенесення натрію (рис. 5) розпочинається зв'язуванням Na^+ з E_1 конформацією ферменту, що супроводжується фосфорилуванням і конформаційним переходом, внаслідок якого іони переносяться на зовнішню сторону мембрани. Далі відбувається дисоціація іонів від центрів зв'язування. Гідроліз фосфатного зв'язку форми E_2-P суттєво активується іонами калію. З суттєво нижчою швидкістю функціонує також альтернативний шлях, пов'язаний з перенесенням калію.

Оптимізація моделі роботи Na^+ , K^+ -АТРази.

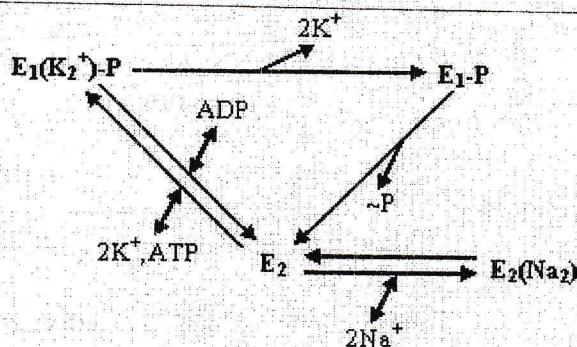


Рис. 6. Схема транспорту K^+ .

Зв'язування іонів калію з позаклітинної сторони мембрани до E_2 конформації ферменту також супроводжується фосфорилюванням і переходом в E_1 конформацію, під час якого відбувається транспорт іонів калію до цитоплазматичної сторони мембрани (рис. 6). Гідроліз фосфатного зв'язку і повернення ферменту в E_2 конформацію відбувається за наявності іонів натрію. Зв'язування Na^+ до E_2 конформації не супроводжується його транспортом, а утворений комплекс дисоціює.

На основі запропонованих схем створено математичні моделі.

Активність гідролізу АТФ під час транспорту Na^+ :

$$\frac{d[ATP]}{dt} = [E_0] \frac{k1[Na^+]^3[K^+]^2 + k2[K^+]^4}{k3[K^+]^2 + k4[Na^+]^3[K^+]^2 + k5[Na^+]^3 + k6[K^+]^4} \quad (3)$$

Активність гідролізу АТФ під час транспорту K^+ :

$$\frac{d[ATP]}{dt} = [E_0] \frac{k1[K^+]^2[Na^+]^2}{k2[Na^+]^2 + k3[K^+]^2[Na^+]^2 + k4[K^+]^2 + k5[Na^+]^4} \quad (4)$$

Використовуючи запропоновані моделі, побудовано криві залежності швидкості гідролізу АТФ від співвідношення концентрацій іонів Na^+ і K^+ в «натрієвому» циклі (при $k1=18$; $k2=0,02$; $k3=3,4$; $k4=1$; $k5=0,25$; $k6=0,1$), «калієвому» циклі (при $k1=490$; $k2=21$; $k3=550$; $k4=24$; $k5=20$), і криву, що відображає їх сумарну активність (рис. 7).

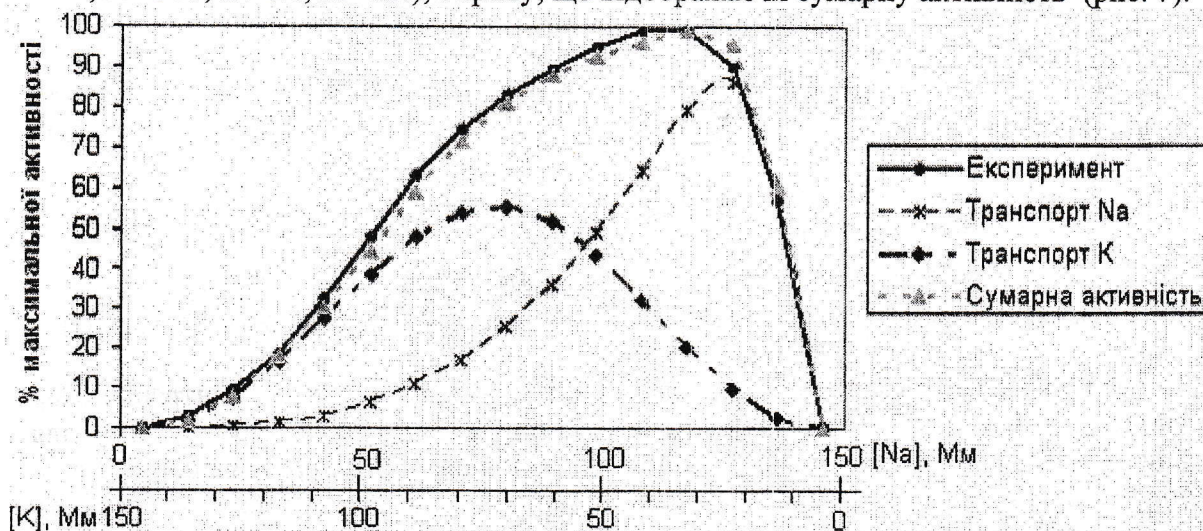


Рис 7. Порівняння прогнозованої активності гідролізу АТФ натрієвого, калієвого циклів, та їх сумарної гідролітичної активності з експериментальними даними.

Прогнозована моделлю гідролітична активність натрієвого циклу при низьких значеннях співвідношення концентрацій Na^+/K^+ є суттєво нижчою від сумарної Na^+,K^+ -

АТРазної активності. Пік активності виявляється при концентраціях 130 мМ Na^+ і 20 K^+ . При вищих співвідношеннях концентрацій Na^+/K^+ гідролітична активність натрієвого циклу наближається до загальної Na^+,K^+ - АТРазної активності.

Гідролітична активність калієвого циклу максимальна при середніх співвідношеннях концентрацій Na^+ і K^+ . При зниженні цього співвідношення швидкість гідролізу АТР калієвим циклом наближається до загальної Na^+,K^+ - АТРазної швидкості гідролізу. Зростання співвідношення концентрацій Na^+/K^+ вище 1 веде до зниження швидкості гідролізу АТР калієвим циклом.

Сумарна активність Na^+,K^+ - АТРази відповідає експериментальним даним при всіх досліджуваних співвідношеннях концентрацій іонів Na^+ і K^+ .

Рівняння (3), (4) не враховують трансмембранного градієнту концентрацій іонів, і можуть бути застосовані тільки для опису гідролітичної активності Na^+,K^+ - АТРази за умови, що фермент в E_1 і E_2 конформаціях має доступ до розчину з однаковою концентрацією іонів. При функціонуванні ферменту в нативній мембрані, концентрація іонів із зовнішньої і внутрішньої сторони мембрани відрізняється. Тому фермент в E_1 і E_2 конформаціях має доступ до іонів Na^+ і K^+ в різних концентраціях. Для опису гідролітичної і транспортної активності Na^+,K^+ - АТРази в плазматичній мембрані слід враховувати, що в E_1 конформації фермент має доступ до іонів з цитоплазматичної сторони мембрани, а в E_2 конформації – з позаклітинної сторони.

Враховуючи різницю концентрацій іонів по різні сторони мембрани, швидкість транспорту натрію «натрієвим циклом» описується наступним рівнянням:

$$\frac{d[\text{Na}]}{dt} = [E_0] \frac{k1[\text{Na}_{in}]^3 [\text{K}_{ex}]^2}{k2[\text{K}_{ex}]^2 + k3[\text{Na}_{in}]^3 [\text{K}_{ex}]^2 + k4[\text{K}_{in}]^2 + k5[\text{Na}_{in}]^3 + k6[\text{K}_{in}]^2 [\text{K}_{ex}]^2} \quad (5)$$

Згідно із запропонованою моделлю, швидкість транспорту натрію визначається цитоплазматичною концентрацією Na^+ і концентрацією K^+ з обох сторін мембрани.

На рис. 8 показано криву, що відображає прогнозовану моделлю залежність швидкості транспорту натрію з клітини від його концентрації, при типових значеннях концентрацій цитоплазматичного і позаклітинного калію.

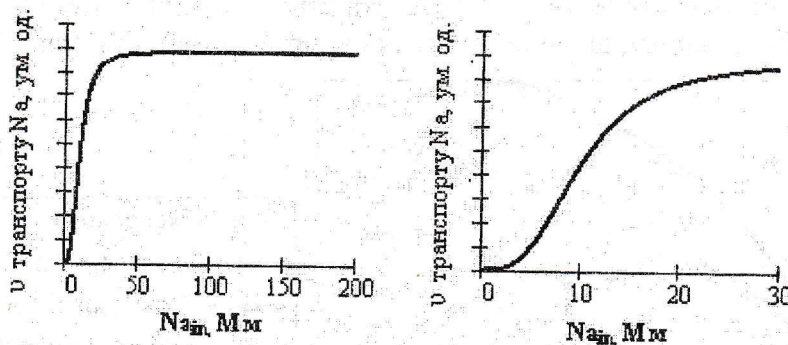


Рис. 8 Залежність швидкості транспорту натрію від концентрації Na_{in} (при $\text{K}_{ex} = 5$ мМ, $\text{K}_{in} = 155$ мМ).

Повільне зростання швидкості транспорту натрію при низьких концентраціях Na_{in} пояснюється конкуренцією між Na_{in} і K_{in} за центри зв'язування. В характерному для клітини діапазоні концентрацій Na_{in} (10-30 мМ) швидкість транспорту натрію активно змінюється при зміні його внутрішньоклітинної концентрації, що відображає здатність Na^+,K^+ - помпи гнучко пристосовуватися до потреб клітини.

Рис. 9 відображає залежність швидкості транспорту натрію від концентрацій калію по обидві сторони мембрани, яка описується рівнянням (5). Вже при наявності в середовищі низьких концентрацій K_{ex} швидкість транспорту натрію стрімко зростає і подальше підвищення концентрації позаклітинного калію практично не впливає на

активність транспорту натрію. K_{in} в низьких концентраціях практично не впливає на швидкість транспорту натрію з клітини, проте вже в фізіологічних концентраціях, які на порядок вищі від концентрації Na_{in} , знижує швидкість транспорту натрію.

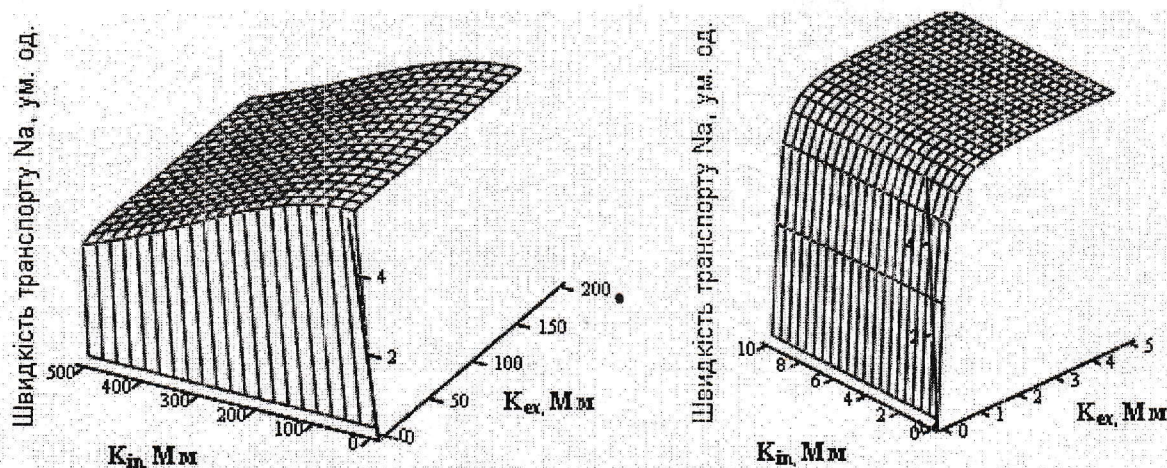


Рис. 9. Залежність швидкості транспорту натрію від концентрацій K_{ex} та K_{in} . $\text{Na}_{in}=20\text{мМ}$.

Швидкість транспорту калію Na^+ , K^+ - АТРазою за схемою представленою на рис. 6, враховуючи різницю концентрацій іонів по різні сторони мембрани:

$$\frac{d[K^+]}{dt} = [E_0] \frac{k1[K_{ex}]^2[Na_{in}]^2}{k2[Na_{in}]^2 + k3[K_{ex}]^2[Na_{in}]^2 + k4[K_{ex}]^2 + k5[Na_{ex}]^2[Na_{in}]^2}. \quad (6)$$

Як видно з рівняння (6), швидкість транспорту калію залежить від позаклітинної його концентрації, та концентрацій натрію з обох сторін мембрани.

При зростанні позаклітинної концентрації калію від 0 до 50 мМ швидкість транспорту калію плавно зростає (рис. 10). Іони натрію, як з зовнішньої, так і з внутрішньої сторони мембрани суттєво впливають на швидкість транспорту калію в клітину (рис. 11). Транспорт калію активується навіть низькими концентраціями внутрішньоклітинного натрію, подальше зростання його концентрації вище кількох мМ практично не збільшує швидкості транспорту калію в клітину. Позаклітинний натрій помітно інгібує швидкість транспорту калію в клітину, виявляючи конкуренцію за центри зв'язування. Швидкість транспорту калію при фізіологічних концентраціях Na_{ex} суттєво нижча ніж за його відсутності.

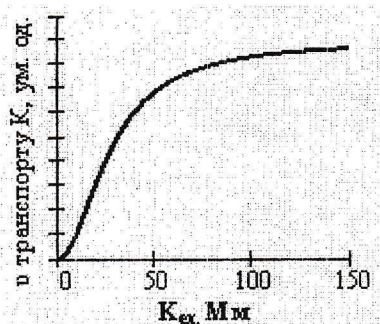


Рис. 10. Залежність швидкості транспорту калію від концентрації K_{ex} (при $\text{Na}_{ex}=145\text{мМ}$, $\text{Na}_{in}=15\text{мМ}$).

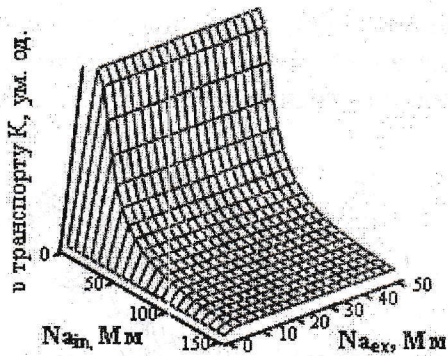


Рис.11. Залежність швидкості транспорту калію від концентрації Na_{ex} і Na_{in} (при $K_{ex}=5$ мМ).

Таким чином, показано можливість опису роботи Na^+, K^+ - АТРази, як двох реакційних циклів відповідальних за транспорт Na^+ і транспорт K^+ .

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болдырев А.А. Мельгунов В.И. Транспортные АТФазы/ Итоги науки и техники, сер. «Биофизика», М., ВИНТИ, 1985, т. 17, 241с.
2. Лопина О.Д. Na^+, K^+ - АТРаза: структура, механизм и регуляция активности//Биологические мембраны. – 1999. – т. 16 – № 6– С. 584- 603.
3. Rakowski R.F., Gadsby D. C., De Weer P.//J. Membr. Biol. – 1997. – V.155. – N.2. – P. 105-112.
4. Романовский Ю.М., Степанова Н.В., Чернавский Д.С. Математическое моделирование в биофизике. М.; Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2004. 472 с.
5. Гумецький Р.Я. Математична модель активного мембранного транспорту іонів//Актуальні проблеми, мед., біол., вет. та с/г. – Львів. – 1996. – Кн. 2 – С. 86-89.
6. Іваницька З.Я., Личковський Е.І., Санагурський Д.І. Поетапний опис моделі локалізації головних потенціалгенеруючих іонів у живих системах (I етап)//Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2006. - №3. – С. 114-118.
7. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики / Перевод Б. И. Курганова. -М.: Мир, 1979. – 280 с.
8. Post R.L., Kume T., Tobin B. et al// J.Gen. Physiol. –1969. – Vol. 54. –N 2. –P.306s-326s.
9. Болдырев А.А. Биохимические аспекты электромеханического сопряжения. Изд-во МГУ. 1977. с. 28.
10. Skore J.C. Further investigation on a Mg^{2+} , Na^+ , K^+ -activated adenosine triphosphatase possibly related to the active linked transport of Na^+ and K^+ across the nerve membrane// Biochim. et biophys. acta. – 1960. – V.42 – N. 1 – P. 6-23.
11. Skou J.C. Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane//Physiol. Revs. – 1965.- V.45 – N. 3.- P. 596-617.
12. Болдырев А.А. Твердислов В.А./Итоги науки и техники, сер. «Биофизика», М., ВИНТИ, 1978, т. 10, 148с.

УДК 5

Цел
кри
зам
рас
уст
мле
ско
дан
КЛ
зам

П
проц
одно

U(x)

Рис. 1
систе
состо

Д им
равн