

Научно-исследовательский институт цитохимии и молекулярной  
фармакологии

На правах рукописи

**Ивонцин Леонид Андреевич**

**Молекулярно-динамическое моделирование протонных  
полуканалов бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазы**

Специальность 1.5.8.

«Математическая биология, биоинформатика»

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

кандидат физико-математических наук, доцент

Нарциссов Ярослав Рюрикович

Москва — 2025

## Оглавление

|   |           |
|---|-----------|
| Введение . . . . .  | 4         |
| <b>Глава 1. Обзор литературы . . . . .</b>  | <b>12</b> |
| 1.1. $F_0F_1$ -АТФсинтаза и ее роль в преобразовании энергии в клетке .   | 12        |
| 1.2. Структура $F_0F_1$ -АТФсинтазы . . . . .   | 14        |
| 1.2.1. Структура каталитического фактора $F_1$ . . . . .  | 16        |
| 1.2.2. Структура трансмембранного фактора $F_0$ . . . . .   | 18        |
| 1.2.2.1. Структура <i>a</i> -субъединицы . . . . .  | 19        |
| 1.2.2.2. Структура и стехиометрия <i>c</i> -субъединиц . . . . .  | 23        |
| 1.2.2.3. Структура <i>b</i> -субъединицы . . . . .  | 25        |
| 1.3. Каталитический цикл $F_0F_1$ -АТФсинтазы . . . . .   | 25        |
| 1.4. Изучение возможной структуры протонных полуканалов<br>АТФсинтазы <i>E. coli</i> с помощью мутационного анализа . . . . . | 29        |
| 1.5. Роль молекул воды в процессе протонного транспорта через<br>полуканалы АТФсинтазы . . . . .                              | 32        |
| 1.6. Влияние липидного состава мембраны на активность ферментов<br>окислительного фосфорилирования . . . . .                  | 36        |
| 1.7. Исследование механизма работы трансмембранного фактора $F_0$<br>АТФсинтазы . . . . .                                     | 40        |
| <b>Глава 2. Исследование структуры протонных полуканалов<br/>бактериальной <math>F_0F_1</math>-АТФсинтазы . . . . .</b>       | <b>55</b> |
| 2.1. Анализ структуры мембранного фактора $F_0$ -АТФсинтазы на<br>основе данных криоэлектронной микроскопии . . . . .         | 56        |
| 2.2. Оценка гидратации полуканалов с помощью модели твердых сфер  | 60        |
| 2.3. Предсказание локализации молекул воды в полуканалах с<br>учетом электростатических взаимодействий . . . . .              | 66        |
| 2.4. Молекулярно-динамическое моделирование мембранной части<br>АТФсинтазы в гомогенном липидном бислое . . . . .             | 70        |
| 2.4.1. Подготовка модельной системы . . . . .   | 71        |
| 2.4.2. Параметры молекулярно-динамического моделирования .  | 72        |
| 2.4.3. Параметры структурного анализа и визуализация . . . . .  | 74        |

|  |            |
|--|------------|
| 2.4.4. Исследование потенциальной траектории движения протона через мембрану . . . . .   | 77         |
| 2.5. Выводы по главе . . . . .   | 85         |
| <b>Глава 3. Оценка влияния липидного состава мембраны на структуру и гидратацию протонных полуканалов <math>F_0F_1</math>-АТФсинтазы . . . . .</b> | <b>89</b>  |
| 3.1. Подготовка модельных систем с различными типами мембран . . . . .   | 89         |
| 3.2. Моделирование в мембранах, содержащих кардиолипины . . . . .  | 94         |
| 3.3. Выводы по главе . . . . .   | 102        |
| <b>Глава 4. Мутационный анализ существенных аминокислотных остатков, оказывающих влияние на протонный транспорт . . . . .</b>                      | <b>106</b> |
| 4.1. Подготовка модельных систем с различными мутациями аминокислотных остатков $\alpha$ -субъединицы . . . . .                                    | 107        |
| 4.2. Оценка влияния мутаций на стабильность структуры $\alpha$ -субъединицы . . . . .  | 109        |
| 4.3. Исследование роли существенных аминокислотных остатков в процессе протонного транспорта . . . . .   | 116        |
| 4.3.1. Мутации $\alpha$ Arg210 . . . . .   | 116        |
| 4.3.2. Мутации $\alpha$ Glu219 . . . . .   | 118        |
| 4.3.3. Мутации $\alpha$ His245 . . . . .   | 120        |
| 4.3.4. Мутации $\alpha$ Asn214 . . . . .   | 124        |
| 4.3.5. Мутации $\alpha$ Gln252 . . . . .   | 124        |
| 4.3.6. Мутации аминокислот выходного полуканала . . . . .  | 126        |
| 4.4. Выводы по главе . . . . .   | 127        |
| <b>Заключение . . . . .</b>  | <b>132</b> |
| <b>Выводы . . . . .</b>  | <b>135</b> |
| <b>Список сокращений . . . . .</b>   | <b>137</b> |
| <b>Словарь терминов . . . . .</b>  | <b>139</b> |
| <b>Список литературы . . . . .</b>   | <b>140</b> |

## Введение

Важнейшую роль в биохимических реакциях играет аденозинтрифосфат (АТФ), макроэргическое соединение, которое обеспечивает различные анаболические и транспортные процессы в живых организмах. АТФ может синтезироваться путём субстратного, окислительного и фотосинтетического фосфорилирования [1]. В клетке образование АТФ в основном осуществляется белковым комплексом  $F_0F_1$ -АТФсинтазой из АДФ и неорганического фосфата с использованием энергии трансмембранной разности электрохимических потенциалов сопрягающих ионов, в качестве которых в большинстве случаев выступают ионы водорода ( $\Delta\mu H^+$ ) [2].

Особенности структуры  $F_0F_1$ -АТФсинтаз из разных организмов были детально изучены в экспериментах методами рентгеноструктурного анализа, а также с помощью криоэлектронной микроскопии единичного фермента. Установлено, что у различных видов макромолекулярный белковый комплекс состоит из двух морфологически выделенных фрагментов. Один из них — встроенный в мембрану гидрофобный фактор  $F_0$  — содержит протонпроводящие полуканалы, обеспечивающие перенос протонов через мембрану [3]. Другой — экспонированный в водную фазу гидрофильный фактор  $F_1$  — содержит каталитические центры, в которых непосредственно происходят реакции синтеза и гидролиза АТФ [4]. Следует отметить, что несмотря на заметные отличия в стехиометрии и субъединичном составе, белковый комплекс имеет сходную архитектуру у всех организмов. Более того, высоко консервативен и сам принцип работы фермента.

Каталитический цикл  $F_0F_1$ -АТФсинтазы — сложный механизм, состоящий из нескольких одновременно происходящих процессов: трансмембранного переноса протонов, вращения ротора и самой реакции синтеза/гидролиза АТФ [5]. Основным фактором, определяющим скорость работы фермента, является непосредственно каталитическая реакция. Вращение ротора, обусловленное в основном электростатическими взаимодействиями, примерно в 100 раз быстрее синтеза, тем не менее, этот процесс крайне зависим от липидного состава и свойств мембраны [6]. При этом транспорт протонов является самым быстрым процессом в каталитическом цикле фермента, однако, предполагается что именно на этом этапе происходит сопряжение передачи энергии электрохимиче-

ского градиента ионов водорода для последующего формирования химической энергии макроэргической связи АТФ [7].

**Актуальность темы.** Преобразование энергии с помощью АТФсинтазы является сложным и эффективным процессом, который обеспечивает снабжение клеток достаточным количеством энергии (АТФ) для выполнения всех необходимых функций. Данный механизм является ключевым для поддержания жизни организмов и является объектом множества исследований в области биоэнергетики, молекулярной и структурной биологии.

Одним из этапов сопряжения энергии градиента ионов водорода и энергии образования макроэргической связи АТФ является протонный транспорт. Примечательно, что в отличие от множества белковых каналов в клетках мембранная часть белка представляет собой не полую пору, а два несоосных полуканала со сложной траекторией движения протона, в связи с чем экспериментальная оценка параметров его транспорта затруднена. Тем не менее, вопрос о механизме переноса протонов может быть решен с помощью методов математического и теоретического моделирования. При этом бактериальные АТФсинтазы, представляя из себя самую простую форму в виде мономера, служат важными модельными системами для изучения универсального механизма переноса протонов.

В соответствии с общепринятой гипотезой предполагается, что протонный транспорт через  $a$ -субъединицу мембранного фактора  $F_0$  осуществляется под действием  $\Delta\mu\text{H}^+$ , однако эта модель была хорошо применима к впервые полученной структуре АТФсинтазы, где  $a$ -субъединица была ориентирована перпендикулярно плоскости мембраны, и направление действия трансмембранного градиента совпадало с направлением движения протонов. Прогресс разрешения в криоэлектронной микроскопии позволил получать структуры крупных мембранно-белковых комплексов с разрешением близким к атомному. В 2015 году это привело к открытию уточненной структуры  $a$ -субъединицы вращающихся АТФсинтаз, где полуканалы были ориентированы латерально относительно плоскости мембраны, и эффект трансмембранного протонного градиента теперь не так очевиден. Эти данные позволили определить возможное расположение протонных полуканалов, однако, совокупность структурных элементов, непосредственно участвующих в транспорте протонов, до сих пор экспериментально не подтверждена.

**Степень разработанности темы.** Появление структур  $F_0F_1$ -АТФсинтазы различных организмов привело к необходимости пересмотра научных исследований процессов каталитического цикла в факторе  $F_0$ , поскольку в более ранних работах предполагалась другая ориентация  $a$ -субъединицы. В последнее десятилетие произошло значительное расширение знаний о молекулярном механизме реакции синтеза/гидролиза АТФ, а также о вращении ротора в липидном бислое. Был получен ряд структурных моделей протонных полуканалов. Однако, точная траектория движения протонов до сих пор не установлена, и ряд вопросов по этому процессу остается нерешенным. В частности, новые данные не внесли полной ясности в понимание того, как  $H^+$  перемещается внутри канала, какие именно аминокислотные остатки оказывают влияние на его движение, где расположены входы и выходы протонов из полуканалов.

Кроме того, при моделировании динамических изменений структуры мембранных белков в ходе каталитического цикла существует ряд ключевых аспектов, определяющих процесс мембранного транспорта. К таким факторам относится наличие и расположение молекул воды в мембранных каналах, а также окружающие белок фосфолипиды. Проникая внутрь протонных полуканалов АТФсинтазы, вода, обладая высокой диэлектрической проницаемостью, способна экранировать электростатические взаимодействия зарядов ионизируемых групп аминокислотных остатков, тем самым определяя движение протона. Однако, большинство доступных в базе PDB структур  $F_0F_1$ -АТФсинтаз не содержат молекул воды, поскольку определение их точных координат внутри белка на основе экспериментальных методов (рентгеноструктурный анализ, крио-ЭМ) является сложной задачей. Этот важный вопрос может быть успешно решен с помощью теоретического моделирования. Липидный состав мембраны также оказывает сильное влияние на эффективное вращение ротора в вязкой среде без утечки протонов. Особенность структуры  $a$ -субъединицы нарушает липидную упаковку вокруг ротора  $F_0$  и определяет области движения протонов. Тем не менее, вопросы структурной и функциональной стабильности полуканалов АТФсинтазы в случае изменения содержания основных фосфолипидов все еще не решены.

Таким образом, на текущий момент не существует полного описания структуры протонных полуканалов в такой динамической системе, как  $F_0F_1$ -АТФсинтаза, учитывающего не только взаимное расположение субъединиц белка, но и влияние окружающей среды. Использование молеку-

лярно-динамического моделирования мембранно-белкового комплекса вместе с обобщенными результатами экспериментальных исследований АТФсинтаз из мутантных штаммов бактерий позволит детально описать критические элементы структуры и оценить их роль в процессе протонного транспорта.

**Целью** данной работы является определение структурных и функциональных характеристик полуканалов бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазы для установления потенциальной траектории движения протонов с использованием молекулярного моделирования.

Для достижения цели в работе были поставлены и решены следующие **задачи**:

1. Определить структурно-динамические характеристики протонных полуканалов в мембранно-белковом комплексе бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазы с применением методов атомистической молекулярной динамики.
2. В структуре фермента исследовать совокупность пространственных положений боковых групп полярных аминокислотных остатков, которые оказывают существенное влияние на транспорт протонов.
3. Установить уровень гидратации полуканалов и определить роль молекул воды в процессе переноса протона.
4. Провести оценку влияния липидного состава мембраны, а именно, разного уровня содержания кардиолипинов, на структуру и гидратацию протонных полуканалов.
5. Исследовать влияние мутаций существенных аминокислот на стабильность структуры  $\alpha$ -субъединицы, а также сохранность цепи переноса протона.

**Объект и предмет исследования.** Объектом исследования является молекулярная модель фермента  $F_0F_1$ -АТФсинтазы из *E. coli*, построенная на основе кристаллической структуры из базы данных PDB [PDB ID: 6VWK]. Предметом исследования является анализ структурной динамики протонных полуканалов в мембранном факторе  $F_0$ .

**Научная новизна.** В работе получены структурные и функциональные характеристики входного и выходного полуканалов бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазы, в том числе при различном липидном составе мембраны. Выявлена совокупность полярных аминокислотных остатков и молекул воды, которые оказывают существенное влияние на транспорт протонов. Определены

области локализации трех консервативных структурных кластеров молекул воды (W1-W3), необходимых для замыкания цепи переноса протона. Впервые обнаружены устойчивые пространственные положения (SP) боковых групп существенных аминокислот (*a*Asn214, *a*Gln252) *a*-субъединицы, переключение между которыми обеспечивает непрерывность протонного транспорта. Показано, что наличие кардиолипина в мембране увеличивает гидратацию полуканалов. С помощью мутационного анализа выявлено, что замены некоторых полярных остатков входного полуканала приводят к значительным изменениям гидратации, вплоть до полного исчезновения кластеров молекул воды W1-W3, и как следствие, разрыву цепи переноса протона.

**Теоретическая и практическая значимость.** Полученная в работе последовательность центров связывания протона, состоящая из полярных аминокислотных остатков и молекул воды, может быть использована для моделирования траекторий движения протона через мембранную часть белка с учетом всех внешних полей, количественной оценки электрофизиологических параметров переноса протона в реальных биологических условиях, а также анализа границы адаптивности функционирования фермента при нарушении целостности и характеристик биологических мембран. Кроме того, предложенный в данной работе алгоритм применим для изучения структурно-динамических характеристик протонных полуканалов АТФсинтаз из других организмов. Новые данные могут быть использованы для описания процесса переноса энергии в полуканалах, что будет являться еще одним этапом в понимании сложности функционирования  $F_0F_1$ -АТФсинтазы, а также позволят выявить особенности энергетического обеспечения клетки как в норме, так и при патологии.

Исследование каталитического механизма работы фермента актуально не только для понимания фундаментальных принципов работы молекулярных машин и клеточной биоэнергетики, но также представляет значительный прикладной интерес. Недостаточное энергетическое обеспечение тканей и органов является одной из самых частых причин возникновения патологических состояний. Известно, что даже незначительное снижение уровня АТФ в клетке может привести к дисфункции и повышению апоптотической активности. Поэтому с практической точки зрения детальное понимание каталитического цикла  $F_0F_1$ -АТФсинтазы является важным шагом на пути к разработке более

современных подходов к диагностике и терапии в различных областях медицинской науки.

**Методология и методы исследования.** Работа выполнена с применением методов атомистической молекулярной динамики (МД). МД моделирование было проведено с помощью программного пакета NAMD и использования силового поля CHARMM36. Оценка гидратации фермента проведена с помощью разработанного алгоритма (модель твердых сфер), который основан на стохастическом подходе и реализован методами компьютерного моделирования, а также в рамках электростатического подхода с помощью программы Dowser++. Анализ влияния мутаций на стабильность структуры фермента основан на расчете изменения свободной энергии Гиббса сворачивания белка  $\Delta\Delta G$  и реализован в программных пакетах FoldX и Eris, а также с применением методов предсказания структуры мутантного белка с использованием системы искусственного интеллекта AlphaFold. Большинство процедур обработки данных и визуализация производились с применением программы VMD и собственных tcl-скриптов.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Входной полуканал бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазы имеет комбинированную структуру, включающую в себя полость в белковой  $\alpha$ -субъединице, ограниченную трансмембранными  $\alpha$ -спиралями ТМС1-4, и последовательность консервативных аминокислотных остатков ( $\alpha$ Glu219,  $\alpha$ Asp119,  $\alpha$ His245,  $\alpha$ Asn214,  $\alpha$ Gln252) со структурными кластерами молекул воды около  $\alpha$ Asp61. При этом выходной полуканал представляет собой ограниченное пространство, экспонированное в цитоплазму, расположенное между ТМС5-6  $\alpha$ -субъединицы и ТМС2  $\alpha$ -субъединицы.
2. При молекулярно-динамическом моделировании белка в составе гомогенной мембраны, состоящей из фосфотидилхолина (РС), во входном полуканале определены области локализации трех структурных кластеров молекул воды (W1-W3), необходимых для замыкания цепи переноса протона. Кластер W1 наблюдается около  $\alpha$ Asp61, W2 расположен между  $\alpha$ Asp119 и  $\alpha$ His245, а кластер W3 обнаруживается вблизи  $\alpha$ Glu219.
3. Наличие кардиолипина в мембране увеличивает гидратацию полуканалов и оказывает влияние на функциональные элементы белковой структуры АТФсинтазы *E. coli*. Наблюдается уменьшение расстояний

- между *a*Glu219 и *a*Asp119/*a*His245, а также *a*Gln252 и *c*Asp61 менее 3 Å.
4. Во всех рассмотренных составах модельных мембран наблюдаются устойчивые пространственные положения боковых групп существенных аминокислотных остатков (*a*Asn214, *a*Gln252) *a*-субъединицы, обозначенные как SP1, SP2, SP3. Изменение локализации положения боковой группы *a*Asn214 в SP1 или SP3 является необходимым условием для обеспечения протонного транспорта.
  5. Мутации существенных полярных остатков входного полуканала приводят к изменениям гидратации. При замене консервативного *a*Arg210 на Ala, Lys наблюдается формирование непрерывного пространства трансмембранного канала, заполненного мобильными молекулами воды. Остатки *a*His245 и *a*Asn214 являются критическими для процесса протонного транспорта, их замены на неполярные аминокислоты приводят к разрыву предполагаемого пути переноса, а молекулы воды или боковые группы соседних полярных остатков не могут заменить их.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность результатов диссертационной работы обосновывается использованием актуальных методов исследования, которые соответствуют цели работы и поставленным задачам. Сформулированные в тексте работы положения и выводы основаны на расчетах, проведенных с применением современных методов атомистической молекулярной динамики. Основные результаты работы докладывались на следующих научных конференциях: European Bioenergetics Conference (Рива-дель-Гарда, Италия, 2016; Будапешт, Венгрия, 2018); XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, Россия, 2017); Bioenergetics Gordon Research Conference (Андвер, США, 2017); 42<sup>nd</sup> Federation of European Biochemical Societies Congress (Иерусалим, Израиль, 2017); Second International meeting of Italian Group of Biomembranes and Bioenergetics (Виесте, Италия, 2019); Съезд биофизиков России (Сочи, Россия, 2019; Краснодар, Россия, 2023); Международная конференция «Математика. Компьютер. Образование» (Дубна, Россия, 2022, 2024); Конференция OpenBio (Кольцово, Россия, 2022, 2024); 11-я Московская конференция по вычислительной молекулярной биологии (Москва, Россия, 2023); II международная научно-практическая конференция

«Математическое моделирование систем и процессов» (Псков, Россия, 2023); International Conference Biomembranes (Долгопрудный, Россия, 2024).

**Личный вклад.** Основные идеи, методология и результаты, представленные в диссертации, разработаны и получены автором лично. В постановке задач, обсуждении результатов и подготовке к печати рукописей научных публикаций принимали участие соавторы: научный руководитель, заведующий Сектором математического моделирования и статистической обработки результатов, кандидат физико-математических наук, доцент Нарциссов Я.Р. и директор НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, кандидат физико-математических наук Машковцева Е.В.

**Публикации.** Основные результаты по теме диссертации изложены в 6 статьях в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI.

**Объем и структура работы.** Диссертация состоит из введения, 4 глав и заключения. Полный объем диссертации составляет 161 страницу, включая 58 рисунков и 4 таблицы. Список литературы содержит 214 наименований.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. $F_0F_1$ -АТФсинтаза и ее роль в преобразовании энергии в клетке

Для нормального функционирования живых организмов необходимо постоянное обеспечение энергией, которая является основой всех жизненных процессов. В 1941 году Фриц Липман доказал, что основным источником энергии в клетке для многих биохимических процессов является молекула АТФ, которая состоит из фосфорной кислоты, рибозы и аденина. Это макроэргическое соединение, при гидролизе которого высвобождается большое количество энергии [1]. АТФ является универсальным переносчиком энергии, который используется для обеспечения активного транспорта ионов через биологические мембраны, работы мышечных белков, реакций биосинтеза и других энергозатратных процессов [8].

Преобразование энергии в форме АТФ является одной из ключевых биохимических реакций в живой клетке. АТФ может синтезироваться путём субстратного, окислительного и фотосинтетического фосфорилирования АДФ:  $АДФ + P_i + \text{энергия} \rightarrow АТФ + H_2O$  [9]. В клетке образование АТФ в основном осуществляется белковым комплексом  $F_0F_1$ -АТФсинтазой с использованием электрохимического градиента ионов водорода ( $\Delta\mu H^+$ ) [2]. Интересно, что некоторые бактерии для синтеза АТФ способны использовать электрохимический градиент ионов натрия ( $\Delta\mu Na^+$ ) [10].

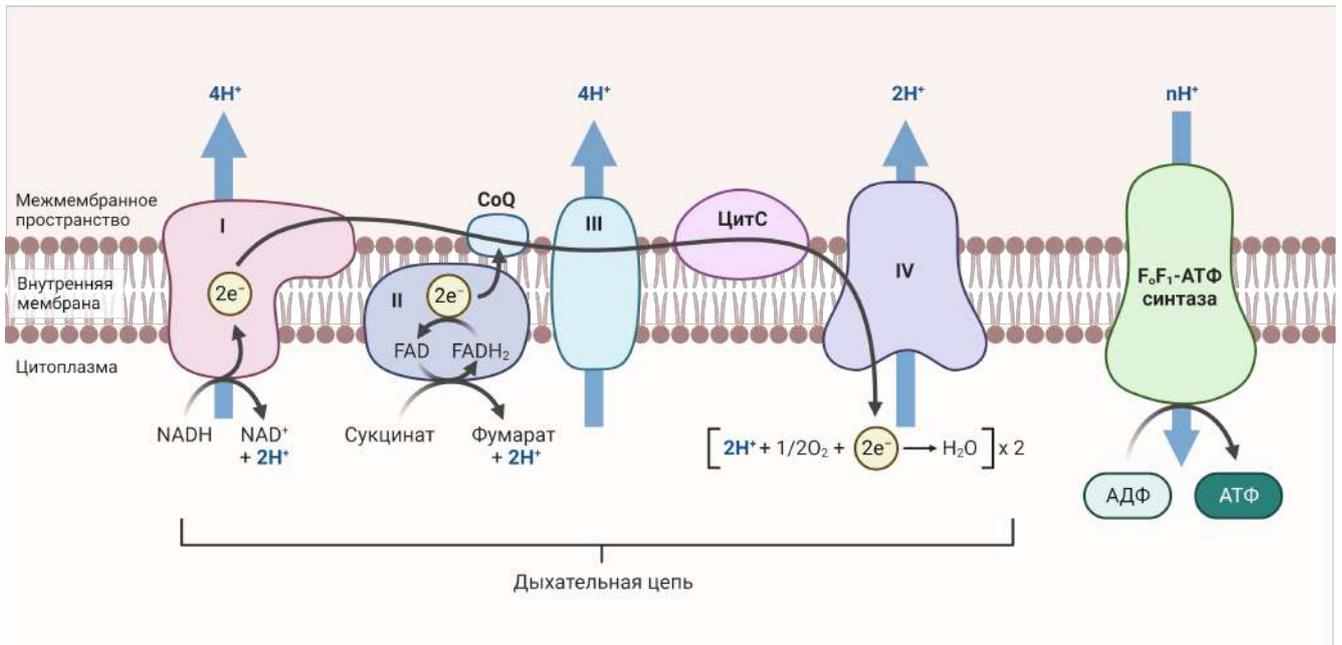
Среди энергопреобразующих мембран, имеющих наибольшее биологическое значение, можно выделить такие структуры как цитоплазматическая мембрана бактерий, внутренняя мембрана митохондрий, а также мембрана тилакоидов хлоропластов [11]. Любая мембрана, выполняющая энергетическую функцию, способна обратимо преобразовывать химическую энергию окисляемых субстратов в электрическую энергию, а именно — в трансмембранную разность электрических потенциалов [12].

Для объяснения энергетических механизмов, лежащих в основе сопряжения процессов дыхания и синтеза АТФ, была предложена хемиосмотическая теория Митчелла, которая постулирует, что белки дыхательной цепи работают как «насосы», накачивая протоны из матрикса/цитоплазмы в межмембранное

пространство. Накопленную энергию протонного градиента ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) использует  $F_0F_1$ -АТФсинтаза для синтеза АТФ (Рисунок 1.1). Величина  $\Delta\mu_{H^+}$  равна:

$$\Delta\mu_{H^+} = F\Delta\varphi + RT \ln \frac{[H^+]_i}{[H^+]_o} \quad (1.1)$$

где  $\Delta\varphi = \varphi_i - \varphi_o$  — трансмембранная разность электрических потенциалов,  $[H^+]_i$  и  $[H^+]_o$  — концентрации ионов водорода по обе стороны мембраны,  $R$  — универсальная газовая постоянная,  $T$  — температура,  $F$  — число Фарадея [13].



**Рисунок 1.1.** Синтез АТФ по механизму хемиосмотического сопряжения.

Помимо АТФаз F-типа, к вращающимся АТФазам также относятся эукариотические вакуолярные АТФазы V-типа [14] и АТФазы А-типа [15] архей и некоторых экстремофильных бактерий. *In vivo* F-АТФсинтазы митохондрий и хлоропластов работают только в режиме синтеза АТФ, тогда как бактериальные способны работать в любом направлении, в зависимости от условий роста. V-АТФазы гидролизуют АТФ, тем самым вызывая подкисление внутриклеточных компартментов [16]. При этом А-АТФазы способны синтезировать АТФ с использованием энергии протонного градиента, как АТФазы F-типа, и в тоже время работать как АТФ-зависимые ионные насосы, как АТФазы V-типа [17].

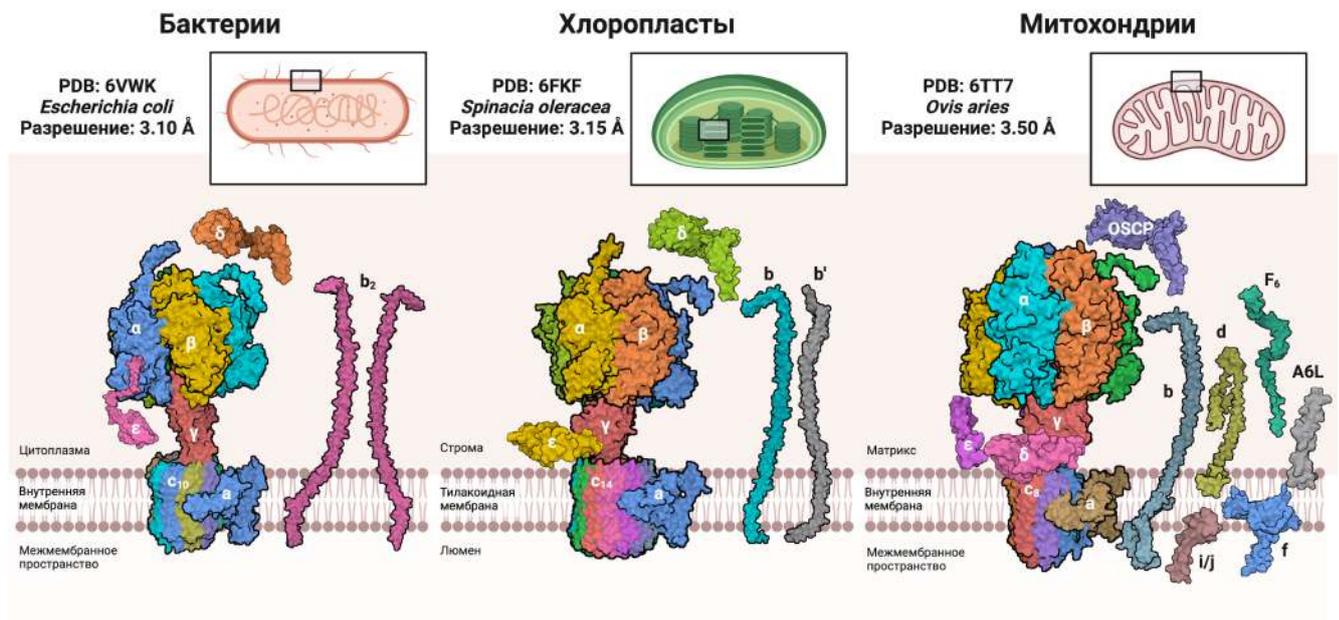
## 1.2. Структура $F_oF_1$ -АТФсинтазы

Преобразование энергии с помощью  $F_oF_1$ -АТФсинтазы является сложным и эффективным процессом, который обеспечивает снабжение клеток достаточным количеством энергии (АТФ) для выполнения всех необходимых функций. Данный механизм является ключевым для поддержания жизни организмов и является объектом множества исследований в области биоэнергетики, молекулярной и структурной биологии.

Особенности структуры  $F_oF_1$ -АТФсинтаз из разных организмов были детально изучены в экспериментах методами рентгеноструктурного анализа [18, 19], а также с помощью криоэлектронной микроскопии единичного фермента [20—29]. Установлено, что у различных видов макромолекулярный белковый комплекс состоит из двух морфологически выделенных фрагментов (Рисунок 1.2). Один из них — встроенный в мембрану гидрофобный фактор  $F_o$  [3], другой — гидрофильный фактор  $F_1$  — экспонирован в водную фазу, заметно выступает из мембраны (более чем на 11 нм) в виде сферического образования и может быть легко отделен от нее [4].

В бактериях  $F_oF_1$ -АТФсинтаза встроена в цитоплазматическую мембрану, а фактор  $F_1$  ориентирован в цитоплазму. В хлоропластах белок встроен в мембраны тилакоидов, а фактор  $F_1$  ориентирован во внешнюю сторону, называемую стромой. При этом фермент встречается у бактерий и хлоропластов в виде мономеров, в то время как митохондриальная АТФсинтаза организована в виде рядов димеров, которые изгибают внутреннюю мембрану, облегчая образование митохондриальных крист, а фактор  $F_1$  обращен в сторону матрикса [30].

Несмотря на то, что субъединичное строение  $F_oF_1$ -АТФсинтаз различных организмов несколько отличается, основные восемь субъединиц («каталитическое ядро») можно рассмотреть на примере бактерии *Escherichia coli*, которые широко используются в качестве модельной системы единичного фермента. Так фактор  $F_1$  состоит из пяти белковых субъединиц в стехиометрии  $\alpha_3\beta_3\gamma\epsilon\delta$ . В нем находятся каталитические центры связывания нуклеотидов и неорганического фосфата ( $P_i$ ), в которых непосредственно происходят реакции синтеза/гидролиза АТФ. Встроенный в мембрану фактор  $F_o$  (белковый комплекс  $a_1b_2c_{8-17}$ ) содержит протон-проводящие полуканалы, обеспечивающие перенос протонов через мембрану [31]. Хотя некоторые бактериальные АТФазы



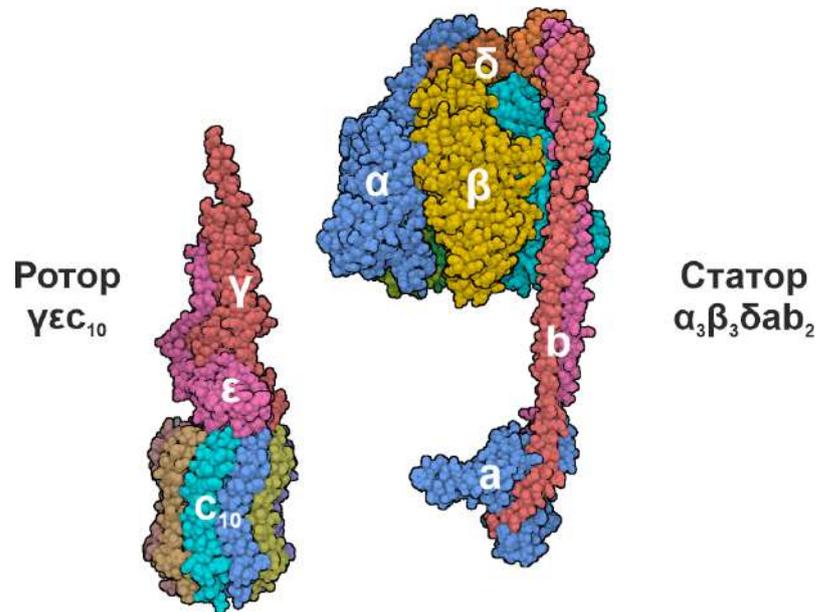
**Рисунок 1.2.** Структура «каталитического ядра»  $F_0F_1$ -АТФсинтазы, универсальная для большинства организмов. Субъединицы, составляющие периферический стержень, а также  $\delta$ ,  $\epsilon$  и OSCP субъединицы вынесены отдельно для всех видов.

F-типа вместо протонов могут использовать ионы натрия [32]. При этом селективность будет определяться генетически запрограммированной геометрией боковых цепей аминокислотных остатков, координирующих ионы в олигомере из  $c$ -субъединиц [33].

Два фактора фермента соединены при помощи двух стержней, один из которых ( $\gamma\epsilon$ ) расположен примерно в центре белка, а другой ( $\delta b_2$ ) на периферии. Тем не менее, они могут быть разделены, а затем вновь реконструированы с восстановлением функций фермента. При этом изолированный фактор  $F_1$  способен с высокой скоростью гидролизовать АТФ, в то время как изолированный фактор  $F_0$  может без затрат энергии переносить протоны через мембрану под действием  $\Delta\mu H^+$  [34].

Таким образом, АТФсинтазы F-типа различных организмов имеют сходную архитектуру белкового комплекса. Более того, высоко консервативен и каталитический цикл фермента: в процессе работы происходит вращение одних субъединиц ( $\gamma\epsilon c_{10}$ ), называемых «ротором», относительно других ( $\alpha_3\beta_3\delta ab_2$ ), образующих «статор» (Рисунок 1.3). Перенос протонов через мембранный

фактор  $F_o$  вызывает вращение ротора, что в свою очередь приводит к конформационным изменениям в каталитических сайтах фактора  $F_1$  и, как следствие, синтезу АТФ [11].



**Рисунок 1.3.** Субкомплексы бактериальной АТФсинтазы, вращающиеся друг относительно друга в процессе катализа [PDB ID: 6VWK].

### 1.2.1. Структура каталитического фактора $F_1$

Фактор  $F_1$  — часть фермента, где происходит синтез/гидролиз АТФ [35]. В бактерии *E. coli* белковый комплекс  $F_1$  имеет вид слегка приплюснутого шара диаметром 8 нм. Он образуется тремя  $\alpha$ -субъединицами и тремя  $\beta$ -субъединицами, которые вместе составляют гексамер  $\alpha_3\beta_3$  [36]. Субъединицы  $\alpha$  и  $\beta$  гомологичны, они состоят из полипептидных цепей, которые имеют сходные состав и последовательности аминокислот. На поверхности между  $\alpha$  и  $\beta$  расположены шесть нуклеотидсвязывающих участков: на  $\beta$ -субъединице они каталитические, на  $\alpha$ -субъединице — некаталитические [37].

Анализ кристаллических структур и опыты по направленному мутагенезу с избирательной заменой аминокислот позволили выявить существенные аминокислотные остатки, которые образуют каталитические сайты связывания субстрата (нумерация представлена для фермента *E. coli*). Показано, что остатки  $\beta$ Thr156,  $\beta$ Glu185 и  $\beta$ Asp242 являются критическими для связывания иона

магния [38]. Наиболее плотный контакт с фосфатными группами нуклеотидов наблюдался у остатков  $\beta$ Lys155 и  $\beta$ Thr156 [39]. Поэтому предполагается, что данные аминокислоты непосредственно принимают участие в связывании нуклеотидов и катализе. Также важную роль в реакциях синтеза и гидролиза АТФ играют три аминокислоты субъединицы  $\beta$  ( $\beta$ Glu181,  $\beta$ Arg182 и  $\beta$ Arg246) [40, 41] и один аминокислотный остаток, принадлежащий  $\alpha$ -субъединице (консервативный  $\alpha$ Arg376, так называемый «аргининовый палец», присутствующий у всех организмов [42, 43]). Эти аминокислотные остатки создают «благоприятное» окружение субстратов реакции (АДФ/ $P_i$ ), способствующее образованию АТФ. Положительно заряженные группы остатков  $\beta$ Lys155,  $\beta$ Arg182 и  $\alpha$ Arg246 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 АТФ из АДФ и  $P_i$ . Следует отметить, что все три  $\beta$  субъединицы гексамера  $\alpha_3\beta_3$  заметно различаются по конформации [44] (см. раздел 1.3).

В центре гексамера  $\alpha_3\beta_3$  имеется полость, внутрь которой погружена субъединица  $\gamma$ , напоминающая изогнутый продолговатый стержень длиной около 9 нм. Часть субъединицы  $\gamma$  выступает из  $\alpha_3\beta_3$  на 3 нм в сторону мембранного комплекса  $F_o$ , где она прочно, но обратимо связывается с  $c$ -кольцом с помощью ряда солевых мостиков [45]. Субъединица  $\gamma$  связана со сравнительно небольшой субъединицей  $\epsilon$  (у митохондриального фермента она называется  $\delta$ ), которые вместе образуют центральный стебель [46].  $\epsilon$ -субъединица усиливает взаимодействие с  $c$ -кольцом, а также выполняет регуляторную роль в работе фермента [47]. Она аутоингибирует некоторые бактериальные АТФсинтазы, взаимодействуя с фрагментом полипептидной цепи  $\beta$ -субъединицы, называемым DELSEED (в соответствии с последовательностью аминокислот) [48].

Результаты экспериментов с присоединенным к  $\gamma$ -субъединице актиновым филаментом, окрашенным флюоресцентным красителем, показали вращение  $\gamma$ -субъединицы относительно неподвижного гексамера  $\alpha_3\beta_3$  [49, 50]. Дальнейшие исследования вращательных состояний с помощью крио-ЭМ структур интактной АТФсинтазы *E. coli* позволили выявить три разных положения  $\gamma$ -субъединицы [25, 51]. Таким образом, центральный стебель передает крутящий момент, генерируемый  $F_o$ , на каталитическую головку  $F_1$ . В процессе вращения  $\gamma$ -субъединица останавливается в трех различных положениях с шагом  $\sim 120^\circ$ . Переходы между состояниями заставляют  $\alpha$ -/ $\beta$ -субъединицы

принимать различные конформации с неодинаковым средством к АТФ или АДФ/Pi.

Субъединица  $\delta$  (OSCP в митохондриях) расположена на внешней стороне фактора  $F_1$ . Она выполняет структурную роль — соединяет периферическую ножку ( $b_2$ -субъединица), выступающую из мембранной части белкового комплекса, с  $F_1$ , тем самым предотвращая вращение гексамера  $\alpha_3\beta_3$  [52]. До недавнего времени считалось, что  $\delta$ -субъединица образует жесткую связь между  $F_1$  и периферическим стеблем. Однако новые структурные данные различных вращательных состояний АТФсинтаз, полученные с помощью криоэлектронной микроскопии, показывают, что  $\delta$ -субъединица действует как шарнир, обеспечивая вращение всего фактора  $F_1$  совместно с центральным стеблем в течение первых 20-30° рабочего хода [53].

Эксперименты по направленной реконструкции с использованием отдельных очищенных субъединиц показали, что состоящий из семи субъединиц белковый комплекс  $\alpha_3\beta_3\gamma$  представляет собой ту минимальную структуру, которая способна катализировать гидролиз АТФ [54]. Следует отметить, что  $\gamma$ -субъединица не принимает непосредственного участия в формировании каталитических сайтов фермента, а ее функция заключается лишь в дополнительной координации конформационных переходов трех нуклеотидсвязывающих участков в процессе катализа.

### 1.2.2. Структура трансмембранного фактора $F_o$

Погружённый в мембрану гидрофобный фактор  $F_o$  служит основанием, к которому присоединён фактор  $F_1$  [55]. Его характерными компонентами, которые имеют сходные структурные особенности у ферментов из разных организмов, являются: одна белковая субъединица  $a$ , две субъединицы  $b$ , а также несколько идентичных копий более мелкой субъединицы  $c$  (от 8 до 17) [56]. Субъединицы  $a$  и  $c$  образуют два трансмембранных несоосных полуканала, через которые осуществляется перенос протонов через мембрану [57].

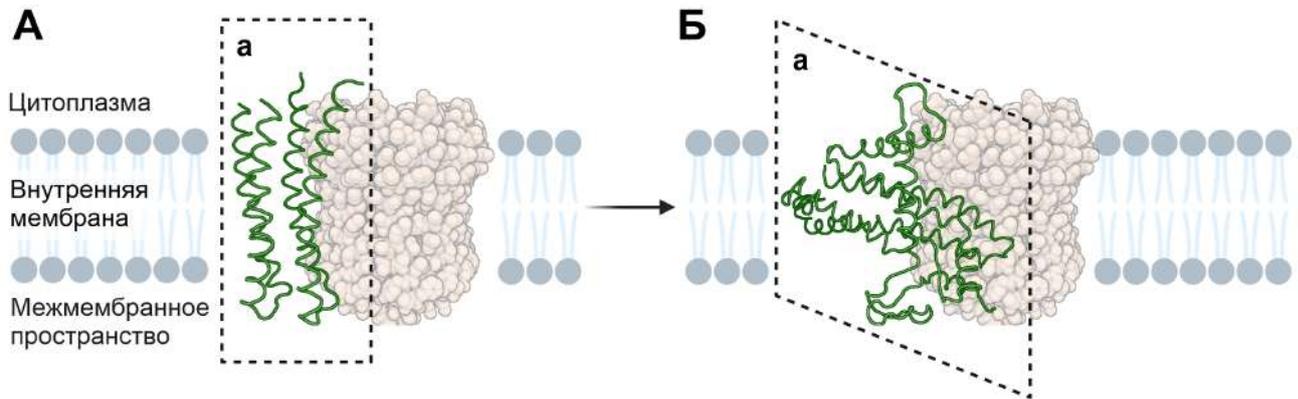
### 1.2.2.1. Структура *a*-субъединицы

*a*-субъединица — самая крупная из субъединиц мембранного фактора  $F_o$ , состоящая из 271 аминокислотного остатка [58]. В мембранной части фермента она действует как статор, который удерживается периферическим стеблем относительно *c*-кольца. Основная роль *a*-субъединицы заключается в обеспечении доступа протонов к существенному аминокислотному остатку *c*Asp61 у *E. coli* (или Glu у других видов) *c*-субъединицы, который может находиться в протонированном/депротонированном состоянии, что в свою очередь приводит в движение механизм вращательного катализа.

На протяжении десятилетий *a*-субъединица оставалась самой трудно определяемой частью молекулярной машины. Исследования методом ядерного магнитного резонанса [59], а также многочисленные эксперименты по сайт-специфическому мутагенезу [60, 61] и с поперечной сшивкой (cross-linking) [62] еще в 1998 году показали, что в *E. coli* эта субъединица состоит из пяти обычных трансмембранных  $\alpha$ -спиралей, четыре из которых образуют пучок (*a*ТМС2-5), ориентированный перпендикулярно плоскости мембраны [63] (Рисунок 1.4А). Опубликованные результаты экспериментов подтвердили расположение *a*ТМС4 и *a*ТМС5 на периферии *c*-кольца, а также установили положение *a*ТМС2 и *a*ТМС3 [64, 65]. Данные также позволили обнаружить соседство *a*ТМС4 *a*-субъединицы и *c*ТМС2 *c*-субъединицы [64]. Поддающиеся поперечной сшивке участки этих спиралей включают *c*Asp61 в *c*ТМС2 и аминокислоты в *a*ТМС4, окружающие существенный остаток *a*Arg210, что говорит о их возможном участии в процессе протонного транспорта [65].

Однако появление детекторов прямых электронов [66], которые могут записывать электронные микрофотографии биологических образцов с высоким разрешением, а также разработка программного обеспечения для обработки этих микрофотографий [67], существенно улучшили метод криоэлектронной микроскопии. Революция разрешения в крио-ЭМ позволила получать с разрешением близким к атомному структуры крупных мембранно-белковых комплексов, которые либо нестабильны, либо слишком динамичны для рентгеновской кристаллографии [68]. В том числе, в 2015 году это привело к открытию уточненной структуры *a*-субъединицы вращающихся АТФсинтаз, которые по своей природе динамичны [20].

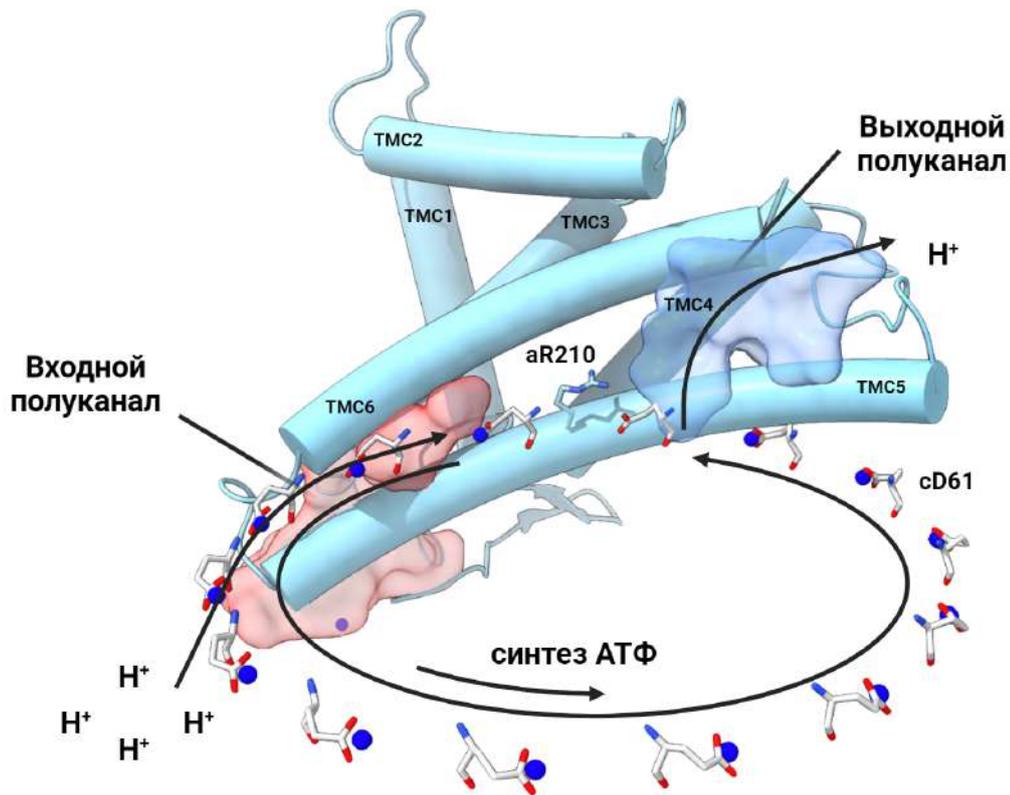
Согласно новым данным, *a*-субъединица состоит из шести *a*ТМС, пять из которых расположены в мембране. *a*ТМС1 расположена вертикально, в то время как *a*ТМС3-6 представляют собой две пары длинных, горизонтально расположенных в мембране спиралей, прилегающих к кольцу из *c*-субъединиц. *a*ТМС2 проходит вдоль поверхности мембраны со стороны цитоплазмы (Рисунок 1.4Б) [21, 22, 28].



**Рисунок 1.4.** Различные модели структуры *a*-субъединицы: (А) вертикальная модель [PDB ID: 1C17], (Б) горизонтальная модель [PDB ID: 6VWK].

Эти данные позволили уточнить возможное расположение протонных полуканалов. В старой структуре, где *a*-субъединица была ориентирована перпендикулярно плоскости мембраны, предполагалось, что полуканал, отвечающий за вход протонов со стороны периплазмы, расположен между *a*ТМС2-5, а полуканал, отвечающий за выход протонов от центра мембраны к цитоплазматической стороне, расположен между *c*ТМС2 *c*-субъединицы и *a*ТМС4 *a*-субъединицы [65]. В новой структуре, где *a*-субъединица ориентирована латерально относительно плоскости мембраны, входной полуканал предположительно расположен между *a*ТМС3-6, а также его стенки могут быть образованы мембранной частью *b*-субъединицы [20]. Выходной полуканал оказался скорее всего расположен между *c*ТМС2 и *a*ТМС5-6 и имел воронкообразную форму, что, по-видимому, способствует высвобождению протонов в цитоплазму (Рисунок 1.5) [27]. Однако непосредственно структура протонных полуканалов до сих пор экспериментально не доказана.

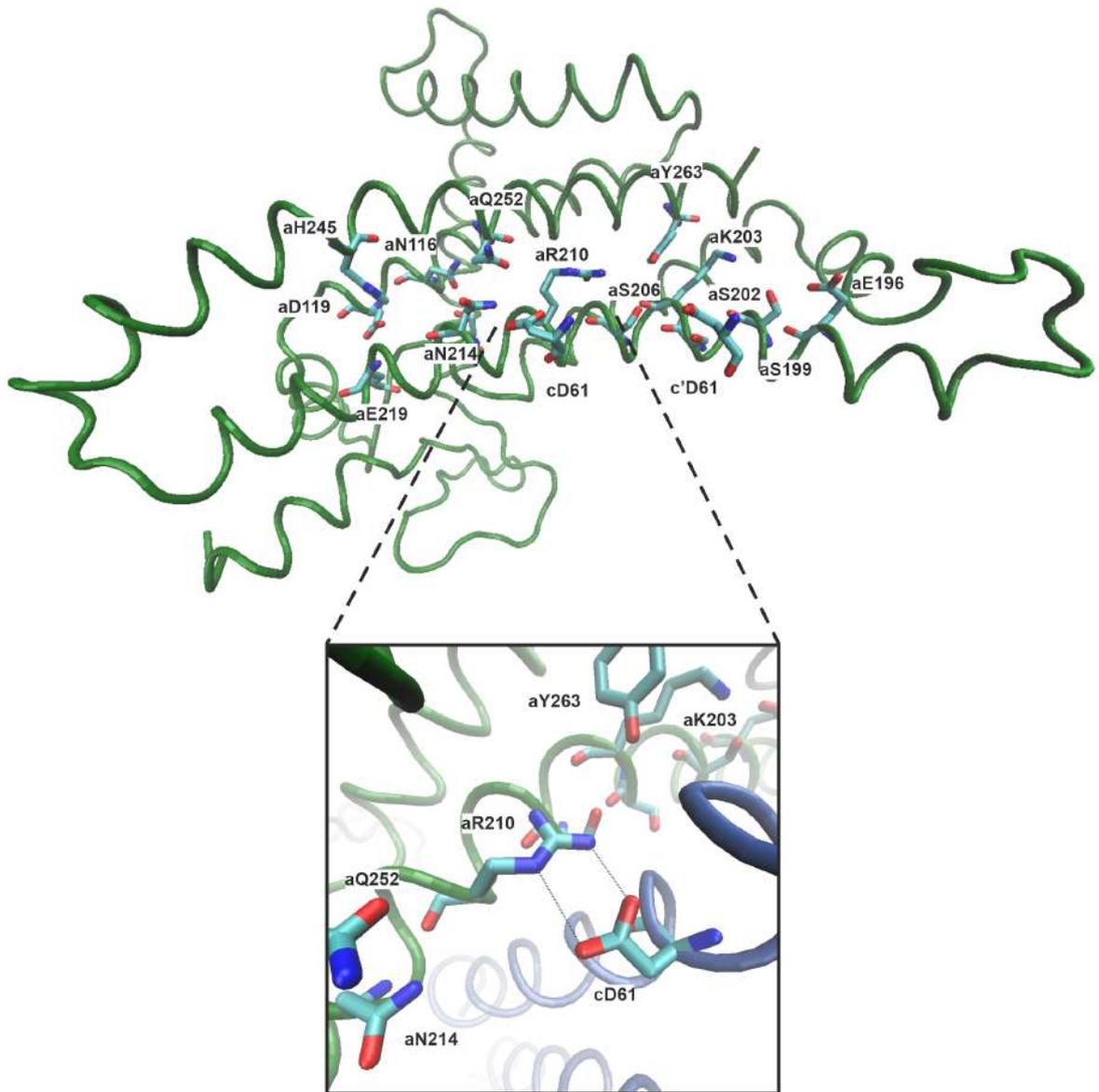
Главную роль в работе протонных полуканалов  $F_0F_1$ -АТФсинтазы играют полярные аминокислотные остатки, содержащие протонируемые группы, которые способны удерживать протоны и передавать их друг другу. На основе крио-ЭМ структур из *E. coli*, данных сайт-специфического мутагенеза, а также



**Рисунок 1.5.** Расположение протонных полуканалов в  $\alpha$ -субъединице: входной (полупрозрачный красный) и выходной (полупрозрачный синий). Показаны ключевые аминокислотные остатки ( $a\text{Arg}210$ ,  $c\text{Asp}61$ ), а также трансмембранные спирали (ТМС)  $\alpha$ -субъединицы. Стрелки указывают направление движения протонов в процессе синтеза АТФ. Адаптировано из [28]. Здесь и далее на изображениях используются однобуквенные обозначения аминокислотных остатков (см. список сокращений).

использования свойства  $\text{Ag}^+$  и  $\text{Cd}^{2+}$  взаимодействовать с остатками цистеина было показано, что полуканал, открывающийся в область межмембранного пространства (входной полуканал), включает несколько близко расположенных полярных аминокислотных остатков, которые оказывают существенное влияние на транспорт протонов ( $a\text{Asn}116$ ,  $a\text{Asp}119$ ,  $a\text{Ser}144$ ,  $a\text{Asn}214$ ,  $a\text{Glu}219$ ,  $a\text{His}245$ ,  $a\text{Gln}252$ ). Полуканал, открывающийся в область цитоплазмы (выходной полуканал), также включал существенные полярные аминокислоты, расположенные рядом с ключевым  $c\text{Asp}61$  ( $a\text{Glu}196$ ,  $a\text{Ser}199$ ,  $a\text{Ser}202$ ,  $a\text{Lys}203$ ,  $a\text{Ser}206$  и  $a\text{Tyr}263$ ) (Рисунок 1.6) [24, 69, 70].

Кроме того, взаимодействие  $a\text{Arg}210$  в  $a\text{TMC}5$  с  $c\text{Asp}61$  из  $c\text{TMC}2$  является важным этапом в цикле протонирования/депротонирования [12, 71]. Именно



**Рисунок 1.6.** Существенные аминокислотные остатки фактора  $F_0$  АТФсинтазы, возможно принимающие участие в переносе протонов (на примере *E. coli*). Сверху изображены шесть ТМС  $a$ -субъединицы. Снизу крупно показано взаимодействие двух ключевых аминокислот ( $a$ Arg210,  $c$ Asp61).

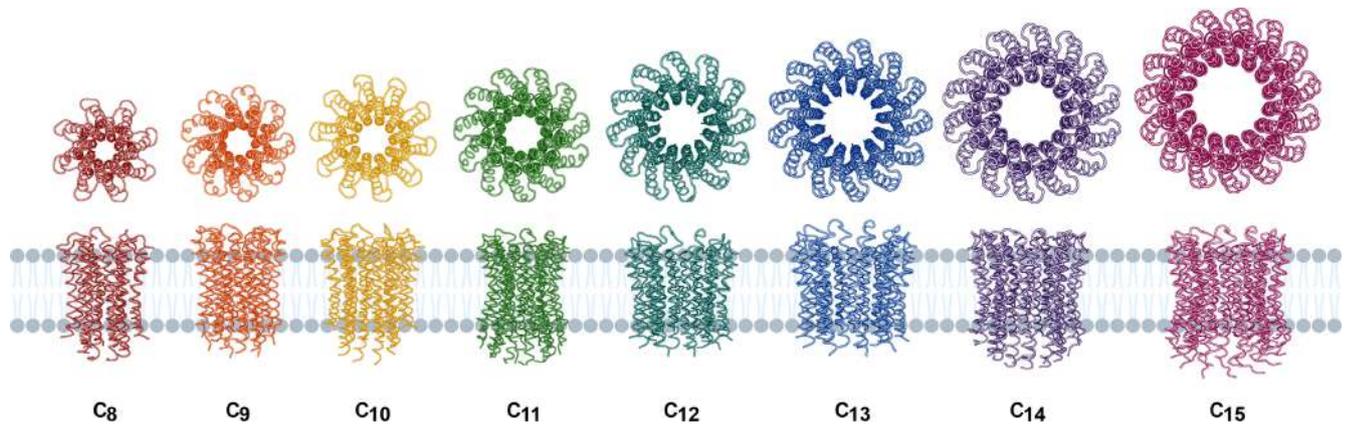
$a$ Arg210 служит положительно заряженным остатком, который предотвращает утечку протонов между полуканалами, а также способствует вращению ротора  $F_0F_1$ -АТФсинтазы (Рисунок 1.6). Однако непосредственного участия в процессе переноса протонов через мембрану данный аминокислотный остаток не принимает [36].

### 1.2.2.2. Структура и стехиометрия *c*-субъединиц

*c*-субъединица *E. coli* состоит из 79 аминокислотных остатков, которые складываются в мембране в виде двух гидрофобных  $\alpha$ -спиралей, соединённых друг с другом короткой гидрофильной петлей, ориентированной в сторону  $F_1$  [72]. Данный гидрофильный участок контактирует с  $\gamma$ - и  $\varepsilon$ -субъединицами [73]. Олигомер из десяти *c*-субъединиц образует компактный полый цилиндр с внешним диаметром 5,5-6 нм и внутренним диаметром 1,1-1,2 нм [74].

Стехиометрия *c*-субъединиц в различных организмах варьируется от 8 субъединиц (в митохондриях млекопитающих) до 17 (у патогенной бактерии *Burkholderia pseudomallei*) [56, 75]. У *E. coli* *c*-кольцо состоит из 10 субъединиц (Рисунок 1.7) [24]. Следует обратить внимание на то, что стехиометрия *c*-колец определяет количество ионов, которые переносятся через мембрану за полный цикл АТФсинтазы. При этом, как было сказано выше, синтез и гидролиз АТФ происходят на трех каталитических сайтах фактора  $F_1$ . Этот факт свидетельствует о том, что соотношение  $H^+/ATP$ , которое определяет минимальную  $\Delta\mu_{H^+}$ , отличается у различных организмов [76–78]. Большее число *c*-субъединиц требует меньших значений  $\Delta\mu_{H^+}$  для синтеза АТФ. Так, например, в бактериальной АТФсинтазе *E. coli* с кольцом из 10 *c*-субъединиц для синтеза АТФ необходима  $\Delta\mu_{H^+}$  порядка 14 кДж/моль (соответствует  $\Delta\varphi \approx -140$  мВ) [79], в то время как для митохондриального белка с 8 *c*-субъединицами требуется около 20 кДж/моль (соответствует  $\Delta\varphi \approx -200$  мВ) [80].

Однако, установлено, что в пределах одного вида размер колец остается постоянным и зависит от точной последовательности и радикалов аминокислот в области контакта между соседними субъединицами, что запрограммировано генетически [81]. Мотив взаимодействия, который обеспечивает плотную упаковку внутренних спиралей друг относительно друга, представляет собой повтор GxGxGxGxG, расположенный во внутренней N-концевой спирали *c*-субъединицы, где G — небольшой гидрофобный остаток (чаще всего Gly или Ala), а x — более крупный гидрофобный (Val, Ile, Phe) или полярный остаток (Asn) [82, 83]. Кроме того, существует гипотеза, что количество субъединиц в



**Рисунок 1.7.** Сравнение структур  $c$ -колец различных организмов:  $c_8$  — *Bos taurus* [PDB ID: 2XND],  $c_9$  — *Mycobacterium smegmatis* [PDB ID: 7NKB],  $c_{10}$  — *Escherichia coli* [PDB ID: 6VWK],  $c_{11}$  — *Ilyobacter tartaricus* [PDB ID: 1YCE],  $c_{12}$  — *Bacillus pseudofirmus OF4* [PDB ID: 3ZO6],  $c_{13}$  — *Alkalihalophilus pseudofirmus OF4* [PDB ID: 2X2V],  $c_{14}$  — *Spinacia oleracea* [PDB ID: 2W5J],  $c_{15}$  — *Spirulina platensis* [PDB ID: 2WIE].

$c$ -кольце является адаптацией к оптимальным условиям роста или к физиологической среде, в которой функционируют АТФазы [84].

Ключевым аминокислотным остатком, необходимым для переноса протонов, является  $cAsp61$  у *E. coli* (или Glu у других видов), расположенный в середине внешней  $cTMC2$  [72]. Для протонирования/депротонирования  $cAsp61$ ,  $cTMC2$  должна находиться в непосредственной близости с  $aTMC5-6$ , которые образуют протон-проводящие полуканалы [85]. Установлено, что две соседние  $c$ -субъединицы могут одновременно располагаться напротив концевых участков полуканалов. При этом  $cAsp61$ , который находится напротив входного полуканала, должен быть в депротонированном состоянии, а  $cAsp61$ , который находится напротив выходного полуканала, в протонированном. Одновременное протонирование/депротонирование отрицательно заряженных карбоксильных групп соседних  $c$ -субъединиц приводит к изменению взаимодействия между этими остатками и  $aArg210$ , вследствие чего происходит вращение олигомера  $c$ -субъединиц. После вращения  $c$ -кольца, аспартаты других  $c$ -мономеров занимают положения, описанные выше [57].

### 1.2.2.3. Структура *b*-субъединицы

*b*-субъединица из *E. coli* состоит из 156 аминокислотных остатков и образует гомодимер [86]. Было показано, что 80% ее структуры представляют собой  $\alpha$ -спирали, а 14% формируют  $\beta$ -складчатые слои, что свидетельствует о том, что *b*-субъединица представляет собой не просто жесткий стержень, связывающий  $F_o$  и  $F_1$ . Ее гибкость позволяет запасать энергию упругой деформации, генерируемую вращательными движениями внутри фермента [87].

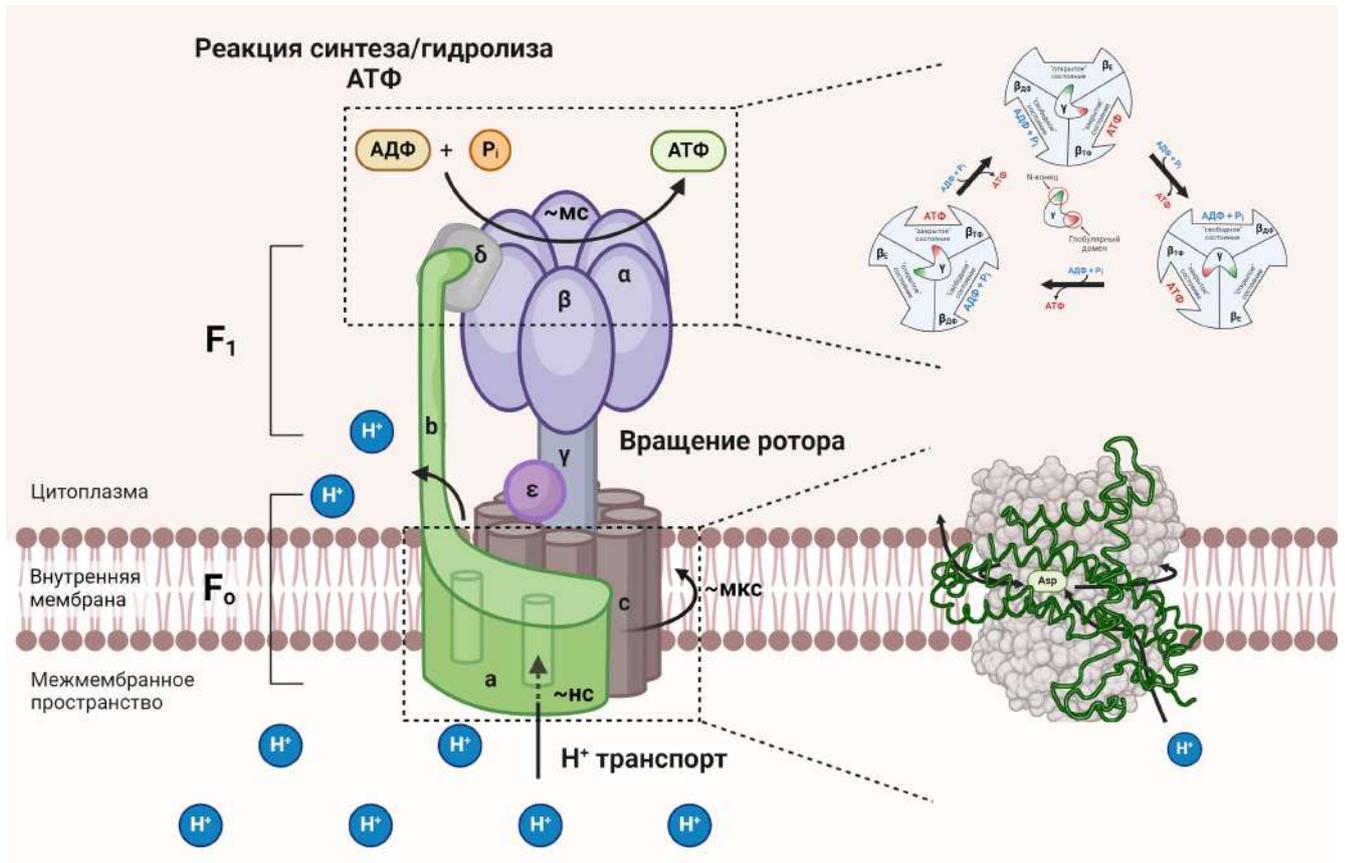
Центральный стебель, состоящий из  $\gamma$ - и  $\varepsilon$ -субъединиц, служит торсионной пружинкой, в то время как периферический стебель (*b*<sub>2</sub>-субъединицы) выполняет роль эластичной опоры, которая выравнивает энергетические минимумы между вращательными состояниями [25, 28]. При этом вся конструкция обладает высокой устойчивостью за счет того, что части субъединиц *b* выступают из мембраны примерно на 11 нм в сторону комплекса  $F_1$  и прикрепляются к расположенной на его поверхности субъединице  $\delta$ , а также взаимодействуют с *a*-субъединицей в толще мембраны [88] (Рисунок 1.3).

Таким образом, бактериальные и хлоропластные АТФсинтазы имеют простую структуру и состоят из минимального набора субъединиц ( $F_1 - \alpha_3\beta_3\gamma\varepsilon\delta$ ,  $F_o - ab_2c_n$ ), тогда как периферические стебли митохондриальных АТФсинтаз более сложны и имеют дополнительный субъединичный состав (*d, f, i/j, A6L, F<sub>6</sub>*), необходимый для образования димеров [21, 27] (Рисунок 1.2).

## 1.3. Каталитический цикл $F_oF_1$ -АТФсинтазы

Каталитический цикл  $F_oF_1$ -АТФсинтазы — сложный механизм, состоящий из нескольких одновременно происходящих процессов: трансмембранного переноса протонов, вращения белкового комплекса *c*-субъединиц и непосредственно самой реакции синтеза/гидролиза АТФ (Рисунок 1.8).

Считается, что движение сопрягающих ионов ( $H^+$  или  $Na^+$ ) при синтезе АТФ происходит в *a*-субъединице мембранного фактора  $F_o$  по двум несоосным полуканалам (присвоено такое название, поскольку они представляют собой не просто полую пору, пронизывающую мембрану насквозь, а простираются от



**Рисунок 1.8.** Механизм работы F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФсинтазы на примере *E. coli*.

края мембраны до ее середины). При этом полуканал, открывающийся в межмембранное пространство (на положительно заряженную сторону мембраны) принято называть входным, тогда как полуканал, открывающийся в цитоплазму (на отрицательно заряженную сторону мембраны) — выходным.

Предполагается, что протонный транспорт через мембранный фактор F<sub>0</sub> осуществляется под действием  $\Delta\mu\text{H}^+$ , однако эта модель была хорошо применима к впервые полученной структуре АТФсинтазы, где *a*-субъединица была ориентирована перпендикулярно плоскости мембраны, и направление действия трансмембранного градиента совпадало с направлением движения протонов [89]. В уточненной с помощью крио-ЭМ структуре *a*-субъединицы полуканалы ориентированы латерально относительно плоскости мембраны, и эффект трансмембранного протонного градиента теперь не так очевиден [20].

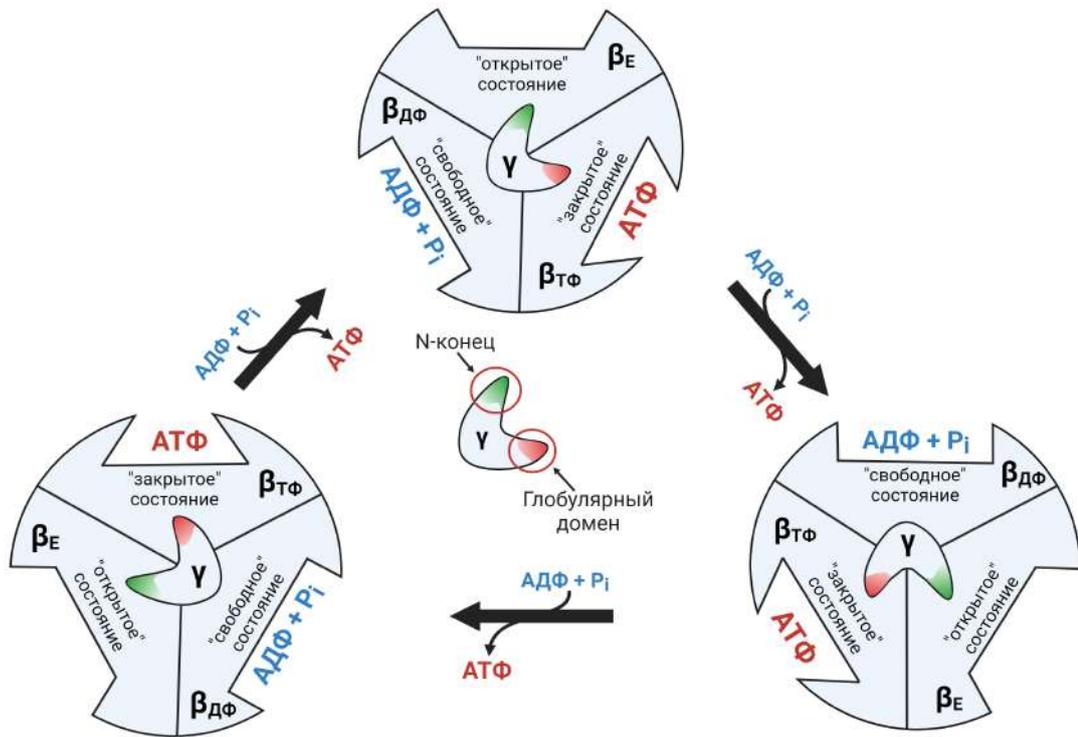
Ряд аминокислотных остатков (см. подробнее ниже в разделе 1.4) в *a*-субъединице формируют входной и выходной полуканалы и обеспечивают доступ протонов к карбоксильной группе существенного аминокислотного остатка *cAsp61* у *E. coli* (или *Glu* у других видов) *c*-субъединицы. Кроме того, существенное влияние на транспорт протонов также оказывают и молекулы воды.

Протонирование/депротонирование отрицательно заряженных карбоксильных групп  $c$ -субъединиц приводит к изменению взаимодействия этих остатков с консервативным  $a\text{Arg}210$ , что в свою очередь вызывает вращение олигомера из  $c$ -субъединиц относительно  $a$ -субъединицы [85]. Вместе с  $c$ -кольцом вращается и  $\gamma$ -субъединица, которая является частью фактора  $F_1$ . Однако, в связи с тем, что нижний конец  $\gamma$ -субъединицы связан с  $c_n$ -кольцом, а верхний делает три шага по  $\sim 120^\circ$  внутри  $\alpha_3\beta_3$ -гексамера, в процессе вращения происходит накопление энергии, которая преобразуется в энергию скручивания  $\gamma$ -субъединицы. При этом вращение субъединицы  $\gamma$  внутри  $\alpha_3\beta_3$ -гексамера вызывает последовательное изменение конформации каталитических сайтов в  $\beta$ -субъединицах. После поворота ротора на  $120^\circ$  накопленной энергии натяжения  $\gamma$ -субъединицы достаточно для синтеза и высвобождения одной молекулы АТФ [90].

Гипотеза обменно-связывающего механизма синтеза АТФ была предложена П. Бойером в 1979 году [91]. Согласно этой гипотезе три каталитических сайта фактора  $F_1$  имеют разное сродство к молекулам АТФ, АДФ и  $P_i$  по причине своей конформационной лабильности. Каждый из трех сайтов последовательно проходит через три различных состояния ( $\beta_{T\Phi}$ ,  $\beta_{D\Phi}$ ,  $\beta_E$ ). Каталитический сайт, содержащий АТФ, находится в «закрытой» конформации  $\beta_{T\Phi}$ , в этом сайте молекула АТФ прочно связана с белком. Каталитический сайт, содержащий АДФ, также закрыт, но его конформация  $\beta_{D\Phi}$  несколько отличается от конформации  $\beta_{T\Phi}$ . Свободный сайт имеет «открытую» конформацию  $\beta_E$ . При этом конформационные изменения в одном сайте приводят к изменению состояния двух других. АДФ и  $P_i$  связываются со свободным сайтом, что приводит к изменению конформации второго сайта, с которым плотно связаны нуклеотиды, где происходит синтез АТФ, а с третьего сайта АТФ освобождается (Рисунок 1.9) [92–94].

При гидролизе АТФ происходит обратная последовательность событий: связывание и расщепление молекулы АТФ приводит к изменению конформации каталитических сайтов, что в свою очередь инициирует вращение  $\gamma$ -субъединицы и  $c$ -кольца. В результате этого вращения происходит транспорт протонов через мембрану и генерация  $\Delta\mu\text{H}^+$  [54, 95].

Таким образом, в результате этих трех одновременно происходящих процессов предполагается сопряжение передачи энергии электрохимического градиента ионов водорода для последующего формирования химической энергии макроэргической связи АТФ. Основным фактором, определяющим



**Рисунок 1.9.** Схема, иллюстрирующая обменно-связывающий механизм синтеза АТФ в факторе  $F_1$ . Конформационные состояния каталитического сайта обозначены как  $\beta_{TF}$  — сайт, содержащий связанный АТФ,  $\beta_{DF}$  — сайт, содержащий связанный АДФ и  $P_i$ ,  $\beta_E$  — пустой сайт, без связанных нуклеотидов.

скорость работы фермента, является непосредственно каталитическая реакция синтеза/гидролиза АТФ [5]. Вращение ротора, обусловленное в основном электростатическими взаимодействиями, примерно в 100 раз быстрее синтеза, однако этот процесс крайне зависим от липидного состава и свойств мембраны [6]. При этом транспорт протонов является самым быстрым процессом в каталитическом цикле фермента [7].

Появление структурных данных  $F_0F_1$ -АТФсинтазы различных организмов, полученных с помощью методов криоэлектронной микроскопии высокого разрешения, в последнее десятилетие привели к более полному пониманию молекулярных механизмов реакции синтеза/гидролиза АТФ, а также вращения олигомера из  $c$ -субъединиц в липидном бислое. Это также позволило получить ряд структурных моделей протонных полуканалов, проливающих свет на механизм транспорта. Однако, точная траектория движения протонов до сих пор не установлена, и ряд вопросов по этому процессу остается нерешенным. В частности, новые данные не внесли полной ясности в понимание того, как  $H^+$

перемещается внутри канала, какие именно аминокислотные остатки оказывают влияние на его движение, где расположены входы и выходы протонов из полуканалов и какую роль в этом процессе играют молекулы воды.

#### 1.4. Изучение возможной структуры протонных полуканалов АТФсинтазы *E. coli* с помощью мутационного анализа

Особый интерес представляют бактериальные АТФсинтазы F-типа, которые имеют большое значение для мутационных исследований, поскольку митохондрии и хлоропласты не так легко поддаются генетическим манипуляциям [96]. Большинство функционально значимых аминокислотных остатков были выявлены и изучены с использованием мутантов *E. coli*. Кроме того, бактериальные АТФазы, представляя из себя самую простую форму в виде мономера, служат важными модельными системами для изучения универсального механизма переноса протонов.

Поскольку АТФсинтаза является необходимой для процесса окислительного фосфорилирования, эффективность ее мутантов часто была исследована с использованием корреляции с ростом в среде, содержащей ограниченное количество сукцината. Экспериментально было показано, что мутации в *a*-субъединице влияют на F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФсинтазу либо путем нарушения сборки мембранного фактора F<sub>0</sub> из-за структурного дефекта, либо изменяя аминокислоту, важную для процесса протонного транспорта. Для оценки влияния конкретной мутации на перенос протонов было проведено исследование проницаемости мембранных везикул, лишенных фактора F<sub>1</sub>. Мутации, влияющие на F<sub>0</sub>-опосредованный перенос протонов, обычно снижают его способность использовать протонные градиенты. Кроме того, для оценки способности АТФаз осуществлять перенос H<sup>+</sup>, сопряженный с гидролизом АТФ, использовалось АТФ-индуцированное подкисление везикул с инвертированной мембраной [70].

Чтобы исследовать роль аминокислотного остатка *cAsp61* *c*-кольца (Рисунок 1.6) в процессе протонного транспорта, была изменена длина боковой цепи в этом положении. Для этого был рассмотрен мутант, в котором *cAsp61* был заменен на Glu. Данный мутант рос за счет окислительного фосфорилирования на сукцинатной среде, но с эффективностью 50% от дикого типа, что указывает на

нарушение сопряжения между синтезом АТФ и протонным транспортом даже при сохранении карбоксильной группы [97]. Также были рассмотрены мутанты, в которых *cAsp61* был заменен на Gly, Ser или Asn. Ни один из этих трех мутантных штаммов не продемонстрировал обнаруживаемой АТФ-зависимой генерации протонного градиента на везикулах с инвертированной мембраной, что является результатом ингибирования активности мембранной части АТФазы [98]. В то же время при поиске ревертантов для неактивного штамма с мутацией *cAsp61Gly* была обнаружена замена *cGly24Asp*, при которой наблюдался рост на сукцинате с эффективностью 60% от дикого типа. Функциональность таких мутантов ревертантов, по-видимому, обусловлена близким расположением двух остатков на соседних трансмембранных спиральях [97, 99]. Кроме того, при изменении положения *cAsp61* (перенос карбоксильной группы из положения 61 в 58, 60 или 62) мутантные штаммы были не способны к росту на сукцинатной среде [97]. Таким образом, даже незначительные изменения в длине или положении карбоксильной группы в 61 позиции *c*-субъединицы могут существенно снизить функциональную активность АТФсинтазы, а ее отсутствие приводит к полной остановке работы фермента.

Еще одним высококонсервативным остатком в структуре фермента является *aArg210* (Рисунок 1.6). Замены этого остатка на Ala, Lys, Ile, Val, Glu или Gln показали невозможность роста мутантных штаммов на сукцинатной среде (т.е. отсутствие синтеза АТФ) и приводили к потере АТФ-зависимого протонного градиента [70, 100]. Наблюдение за тройным мутантом *aPro204Trh/aArg210Gln/aGln252Arg* показало частичное сохранение активности АТФсинтазы при взаимной замене консервативных остатков *aArg210* и *aGln252*, находившихся на С-концевой  $\alpha$ ТМС6. Эксперименты с ростом на сукцинате показали, что синтез АТФ в ревертантном штамме находился на уровне, близком к нормальному, но данный штамм был неспособен перекачивать протоны в процессе гидролиза АТФ. При этом на процесс сборки фермента вышеописанные мутации никакого влияния не оказывали [101]. Данные мутационные исследования показали, что расположенный между полуканалами фактора  $F_o$  *aArg210* обеспечивает связанное с протонным транспортом вращение *c*-кольца, особенно во время синтеза АТФ, а также предотвращает утечку протонов через мембрану.

Также мутационный анализ показал, что для протонного транспорта в АТФсинтазе *E. coli* функционально важными являются следующие аминокис-

лотные остатки: *aGln252*, *aAsn214*, *aHis245*, *aGlu219*, *aAsp119* (Рисунок 1.6). В случае замены *aGln252* на заряженную аминокислоту Glu существенного эффекта не наблюдалось, в то время как замены на незаряженные остатки Leu или Val, существенно снижали активность фермента [102]. Эти данные позволяют предположить, что *aGln252*, вероятно, не принимает участия непосредственно в процессе протонного транспорта, однако это положение играет важную роль в поддержании стабильности *a*-субъединицы. Замены *aAsn214* на Val, Leu, Gln или Glu не полностью блокировали АТФ-зависимую протонную проводимость, однако замена этого остатка на His снижала активность фермента на 95%, и роста на сукцинатной среде не наблюдалось [70].

Замена *aHis245* аминокислотами с малой боковой цепью (Gly, Ser, Cys) приводила к полной потере функции АТФсинтазы, о чем свидетельствовала неспособность расти на минимальной сукцинатной среде [60]. Это предполагает, что молекулы воды или соседние боковые цепи полярных аминокислот не могут заменить *aHis245*. Примечательно, что положения остатков *aGlu219* и *aHis245* из *E. coli* меняются местами в митохондриальных АТФсинтазах некоторых организмах, таких как млекопитающие (*aHis168* и *aGlu203*) или дрожжи (*aHis185* и *aGlu223*). Соответственно, некоторые аминокислотные замены (*aGlu219His* или *aGlu219His/aHis245Glu*) в положениях 219 и 245 в *E. coli* оказались частично функциональными, наблюдался АТФ-зависимый протонный транспорт, хотя и меньший, чем у фермента дикого типа [103]. Единичная замена *aGlu219* на Gln привела к образованию штамма, который плохо рос на сукцинате. Мембранные препараты данного мутанта были плохо проницаемы для протонов, а активность  $F_1$ -АТФазы ингибировалась примерно на 50% при связывании с мембранным фактором  $F_o$  [104]. Мутация *aAsp119His* не нарушала сборки мембранной части фермента и не приводила к полной потере функции, о чем судили по наличию чувствительности АТФазной активности к дициклогексилкарбодимиду (ДЦКД, специфический ингибитор переноса протонов). Однако наблюдалось снижение протонной проводимости через фактор  $F_o$ , также как и снижение АТФ-зависимого протонного транспорта [105].

Функционально важными аминокислотными остатками выходного канала оказались *aGlu296*, *aSer199*, *aSer202* и *aSer206* (Рисунок 1.6). Одиночные замены *aSer199Ala*, *aSer202Ala*, *aSer206Ala* не вызывали заметных фенотипических изменений по сравнению с диким типом. Ни одна из этих аминокислотных замен не повлияла на способность клеток осуществлять окислительное фосфо-

рилирование [106, 107]. Замены *a*Glu196 на Asp, Gln, His, Asn, Lys, Ala, Ser, Pro оказывали влияние на пассивную протонную проницаемость через  $F_o$  и на АТФ-зависимый перенос протонов в различной степени, но не предотвращали рост на минимальной сукцинатной среде [108]. Исходя из результатов мутационного анализа, предполагается, что эти аминокислоты не являются обязательными компонентами цепи переноса протона, но опосредованно влияют на транспорт.

*b*Gly9Asp является единственной мутацией в *b*-субъединице *E. coli*, которая приводит к собранной, но нефункциональной АТФсинтазе [109], тогда как множественные мутации в N-конце *b*-субъединицы нарушают либо сборку фермента, либо гидролиз АТФ [110].

Результаты мутационного анализа различных субъединиц мембранной части  $F_oF_1$ -АТФсинтазы показывают, что замены многих консервативных заряженных аминокислотных остатков приводят лишь к частичной потере протонной проводимости через  $F_o$ . Эти наблюдения позволяют предположить, что роль указанных полярных остатков может заключаться не обязательно в непосредственном участии в транспорте протонов. Вероятно, наличие данных остатков может способствовать поддержанию гидрофильной среды внутри полуканалов, что, в свою очередь, может облегчить их гидратацию. Такая роль аминокислотных остатков позволяет различным организмам использовать уникальные наборы полярных остатков для формирования своих протонных полуканалов, и их изменчивость предполагает удивительно гибкий механизм переноса протонов в высокоэффективной макромолекулярной машине.

### 1.5. Роль молекул воды в процессе протонного транспорта через полуканалы АТФсинтазы

Молекулы воды оказывают существенное влияние на свойства белков и играют важную роль в функционировании ферментов. Существует множество экспериментальных и теоретических исследований, подтверждающих активную роль молекул растворителя в процессе фолдинга белков, а также в управлении структурной стабильностью и динамикой биомолекул [111–113]. Вода принимает участие во многих важных биологических процессах, таких как катализ, белок-субстратные взаимодействия, распознавание белков друг

другом [114—116]. Кроме того, молекулы воды способны проникать внутрь ферментов, становясь неотъемлемой частью их структуры [117]. Обладая высокой диэлектрической проницаемостью, вода способна экранировать электростатические взаимодействия зарядов ионизируемых групп аминокислотных остатков, тем самым определяя движение молекул и их связи друг с другом [118].

Например, наиболее известной и дискутируемой моделью переноса протона на большие расстояния внутри белков является механизм Гротгуса [119], который требует наличия цепочек внутренних молекул воды, связанных водородными связями с аминокислотными остатками белка. Данные цепи ведут себя согласованным образом, передавая протонный заряд посредством быстрого обмена между катионами Занделя ( $\text{H}_5\text{O}_2^+$ ) или Эйгена ( $\text{H}_9\text{O}_4^+$ ). Таким образом, скорость переноса  $\text{H}^+$  по механизму Гротгуса может быть намного выше, чем скорость свободной диффузии.

Возможность переноса протона через мембранный фактор  $F_o$  АТФсинтазы по механизму Гротгуса впервые была предложена Борисом Фенюком на основе наблюдения высокой скорости переноса протонов через  $F_o$  ( $6240 \text{ H}^+ \text{ c}^{-1}$  при разнице потенциалов 100 мВ) в изолированных хроматофорных везикулах фотосинтетической бактерии *Rhodobacter capsulatus* [7]. Примечательно, что недавние исследования структур АТФсинтаз обнаружили крио-ЭМ плотности вблизи аминокислотных остатков полуканалов, соответствующие молекулам воды [120—122].

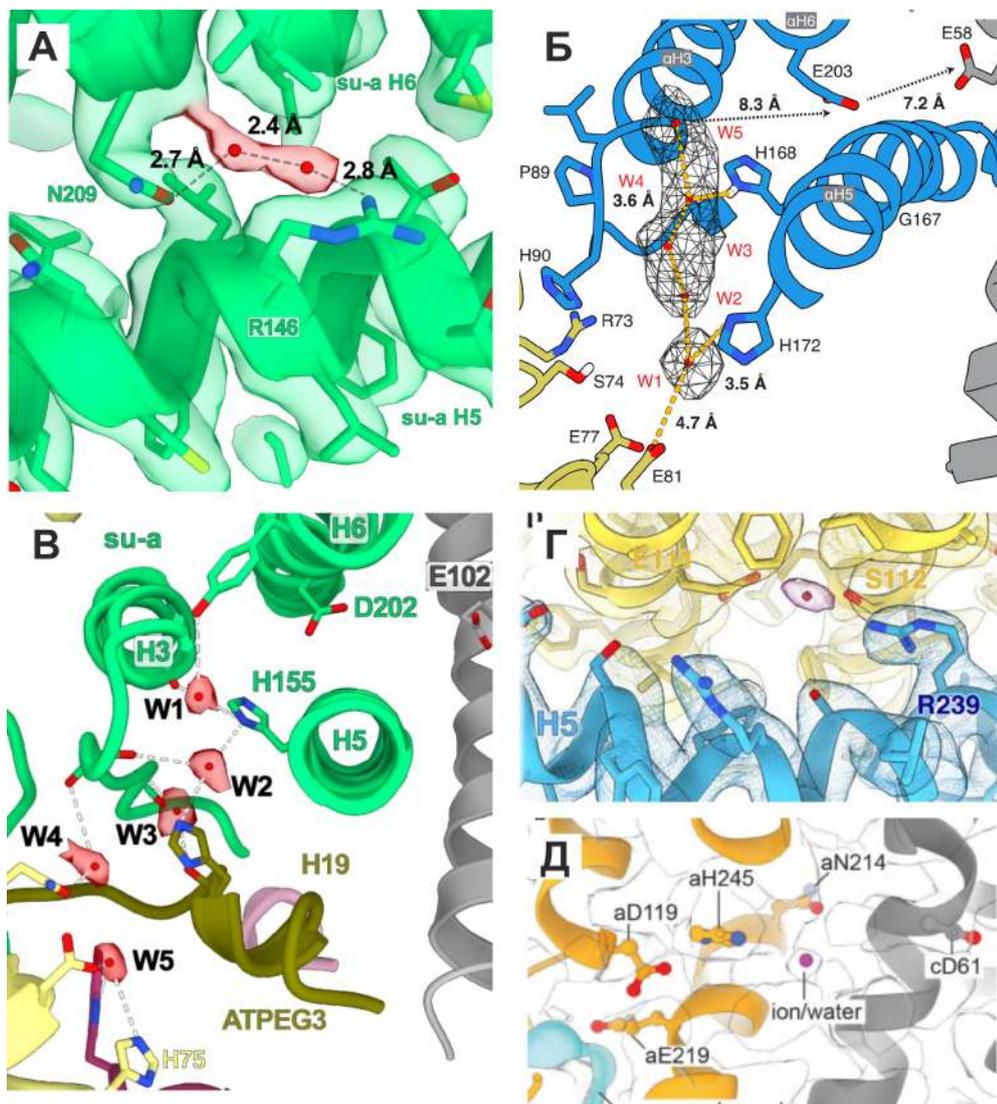
В структурах интактного димера митохондриальной АТФсинтазы из *Trypanosoma brucei* были обнаружены две молекулы воды в области входного полуканала около ключевого *cGlu102*, которые координировались аминокислотами *aArg146* и *aAsn209* (Рисунок 1.10А) [120]. Подобная локализация наблюдалась и в структуре АТФсинтазы из *Polytomella* [121]. В структурах фактора  $F_o$  из митохондрий сердца быка были обнаружены пять молекул воды (Рисунок 1.10Б) (подобные молекулы воды наблюдались и у *T. Brucei* (Рисунок 1.10В)), способных образовывать сеть водородных связей с полярными аминокислотными остатками, расположенными в начале входного полуканала. По данной сети протоны из межмембранного пространства могли достигать высококонсервативного остатка *aGlu203*, расположенного в месте, где входной полуканал проходит через *aTMC5-6* (начало узкой части входного полуканала), а оттуда перемещаться к ключевому глутамату на *c*-субъединице [122]. Однако, поскольку некоторые расстояния между обнаруженными молекулами воды

и аминокислотными остатками структуры слишком велики для образования водородной связи, предполагают наличие других, пока еще не определенных, молекул воды.

В более открытом выходном полуканале наблюдалась крио-ЭМ плотность, соответствующая специфически связанной молекуле воды вблизи *aArg159* и обращенной к нему гидроксильной части *aTyr221* у млекопитающих (*aArg239* и *aSer112* у *Polytomella*) (Рисунок 1.10Г). Это подтверждает идею о том, что глутамат *c*-кольца может быть депротонирован молекулой воды, поскольку расстояние между *cGlu58* и близлежащими полярными остатками слишком велико для прямого переноса [121, 122]. При этом предполагается, что выход протонов в матрикс может происходить через цепочку воды, как во входном полуканале, путем последовательных переносов через аминокислоты (*aGlu145*, *aHis127*, *aHis223*, *aAsp224*) или просто путем диффузии в объем растворителя [123].

При изучении крио-ЭМ карт структуры АТФсинтазы из *E. coli* также наблюдалась плотность на границе раздела ротор/статор рядом с функционально важными остатками *aAsn214* и *aHis245* (Рисунок 1.10Д). Поскольку расстояния до соседних полярных атомов были слишком велики для образования водородной связи, а радиус Ван-дер-Ваальса полости, в которой находилась обнаруженная плотность, составлял около 3 Å, было выдвинуто предположение, что данная плотность может соответствовать кластеру молекул воды или гидратированному иону, которые могут способствовать протонированию *cAsp61* в процессе вращения *c*-кольца. При этом обнаружить какую-либо водоподобную плотность рядом с остатком *aGlu219* (эквивалентным *aGlu203* из митохондрий сердца быка) экспериментально не удалось [24].

Таким образом, вне всякого сомнения, локализация молекул воды внутри белка является ключевым звеном в процессе трансмембранного переноса протонов через  $F_0F_1$ -АТФсинтазу. Вода способна проникать внутрь фермента, образовывать сети водородных связей с функциональными группами полярных аминокислотных остатков, которые служат «протонными проводниками». Однако, определение точных координат молекул воды в структуре белка на основе вышеприведенных водоподобных крио-ЭМ плотностей при разрешении  $\sim 3$  Å является сложной задачей, которая требует дополнительных исследований. В связи с этим, большинство доступных в базе PDB структур  $F_0F_1$ -АТФсинтаз (PDB ID: 6VWK [24], 5T4O [25], 6FKF [28]) не содержат молекул воды.



**Рисунок 1.10.** Молекулы воды в крио-ЭМ структурах  $\alpha$ -субъединицы различных организмов. (А) Крупный план высококонсервативных остатков  $\alpha$ Arg146 и  $\alpha$ Asn209 из *T. Brucei*, которые координируют две молекулы воды (красные) между  $\alpha$ TMC5-6 (зеленые) [120]. (Б) Подробный вид на начало входного полуканала (bovine) с полярными аминокислотными остатками, которые могут образовывать водородные связи с молекулами воды. Красной сеткой показана предполагаемая цепочка из пяти молекул воды, ведущая к  $\alpha$ Glu203, а затем к  $\epsilon$ Glu58 [122]. (В) Цепочка упорядоченных молекул воды W1-W5 (красные) в начале входного полуканала *T. Brucei* [120]. (Г) Аминокислотные остатки  $\alpha$ Arg239  $\alpha$ -субъединицы (синяя) и  $\epsilon$ Ser112,  $\epsilon$ Glu111  $\epsilon$ -субъединиц (желтые), которые координируют молекулу воды (фиолетовая плотность) в выходном полуканале *Polytomella* [121]. (Д) Вид изнутри мембраны на существенные аминокислоты входного полуканала *E. coli*. Пурпурной сферой выделена плотность, предположительно соответствующая молекуле воды или иону между остатками  $\alpha$ His245 и  $\alpha$ Asn214 [24].

Тем не менее, этот важный вопрос может быть успешно решен с помощью теоретического моделирования. Самый простой способ, не требующий больших вычислительных мощностей, — чисто геометрический подход по размещению молекул воды в виде твердых сфер, который не учитывает сил межмолекулярных взаимодействий. Учет не только геометрии, но и электростатических взаимодействий между атомами исследуемой системы и минимизации их энергетических значений может быть реализован с помощью различных версий программного пакета Dowser [124]. При этом использование методов классической молекулярной динамики позволит получить детальное атомное описание взаимодействий белка с молекулами растворителя.

### **1.6. Влияние липидного состава мембраны на активность ферментов окислительного фосфорилирования**

Несколько десятилетий назад считалось, что мембранные белки свободно плавают внутри биологических мембран. Однако эта точка зрения была поставлена под сомнение быстро растущим количеством доказательств специфических взаимодействий между липидами и мембранными белками с помощью различных методов, включая световую спектроскопию, рентгеновскую кристаллографию, электронную микроскопию и молекулярно-динамическое моделирование [125]. В настоящее время признано, что липиды являются основными факторами сборки белков, а липидный состав мембраны влияет на стабилизацию суперкомплексов, функционирование и регуляцию ферментов [126].

При экспериментальных и теоретических исследованиях белков в липидных бислоях обычно используют простые модельные мембраны, такие как 1-пальмитоил-2-олеоилфосфохолин (POPC) или 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин (POPE). Фосфатидилхолин (PC) и фосфатидилэтаноламин (PE) (Рисунок 1.11) являются одними из наиболее распространенных молекул биологических мембран [127–129]. Помимо структурной функции, PC является важным источником образования вторичных мессенджеров и липидных медиаторов [130, 131], а нарушение его синтеза может препятствовать клеточной пролиферации и дифференцировке [127].

При этом PE необходим для процессов аутофагии, деления клеток и фолдинга белков [132, 133].

|   | PC   | PE   | PG*          | CL*  | PS* | MGDG | DGDG | SQDG* | Другие |
|---|------|------|--------------|------|-----|------|------|-------|--------|
| <b>Бактерии</b>   |      |      | ┌──────────┐ |      |     |      |      |       |        |
|    |      | ~75% | ~20-25%      |      | ~1% |      |      |       | <1%    |
| <b>Митохондрии</b>  |      |      |              |      |     |      |      |       |        |
|    | ~40% | ~30% | ~2%          | ~15% | ~5% |      |      |       | <1%    |
| <b>Хлоропласты</b>  |      |      |              |      |     |      |      |       |        |
|  |      |      | ~7%          |      |     | ~53% | ~27% | ~7%   | <2%    |

**Рисунок 1.11.** Липидный состав энергопреобразующих мембран: цитоплазматическая мембрана бактерий [134], внутренняя мембрана митохондрий [135], мембрана тилакоидов хлоропластов [136]. Звездочкой отмечены липиды, имеющие отрицательный заряд.

Важную роль в регуляции окислительного фосфорилирования как у животных, так и у микроорганизмов, играет специфический анионный фосфолипид кардиолипин (CL), который имеет четыре ацильные цепи и две фосфатные группы [137]. При этом во внутренней митохондриальной мембране PC и PE являются наиболее распространенными фосфолипидами и составляют 40% и 30% соответственно от общего количества липидов, а уровень CL составляет 15%. Кроме того, митохондриальные мембраны содержат ~5% фосфатидилсерина (PS) и фосфатидной кислоты (PA), а также более низкие уровни сфинголипидов и холестерина [135]. Бактериальная цитоплазматическая мембрана содержит ~75% PE в качестве наиболее распространенного цвиттер-ионного липида и 20-25% отрицательно заряженных липидов, включая фосфатидилглицерин (PG) и кардиолипин (CL) [134]. Примечательно,

что липидный бислой тилакоидной мембраны хлоропластов растений кардинально отличается от бактериального и митохондриального. Преимущественно он состоит из четырех уникальных классов липидов: моногалактозилдиацилглицерина (MGDG, ~53%), дигалактозилдиацилглицерина (DGDG, ~27%), сульфохиновозилдиацилглицерина (SQDG, ~7%) и фосфатидилглицерина (PG, ~7%) [136] (Рисунок 1.11). Использование галактолипидов вместо фосфолипидов в качестве основного компонента мембраны тилакоидов растений объясняется сохранением фосфатов для других важных процессов [138].

Следует отметить, что согласно концепции полиморфизма липидов PC имеют цилиндрическую форму (площадь поперечного сечения головной группы аналогична площади поперечного сечения ацильных цепей), поэтому в водной среде они способны самоорганизовываться в липидный бислой. Напротив, PE и CL являются небислойными липидами. Они имеют коническую форму (площадь поперечного сечения головной группы меньше площади поперечного сечения ацильных цепей), поэтому предпочтительно образуют структуры с отрицательной кривизной, такие как инвертированная гексагональная фаза [139]. Несмотря на то, что некоторые биологические мембраны содержат высокий уровень небислойных липидов (например, *E. coli* содержит ~75% PE), экспериментальные данные показали, что в живой клетке они предпочтительно образуют липидный бислой. Хотя при определенных условиях (например, в присутствии двухвалентных катионов для CL) и значительных энергозатратах они могут локально образовывать искривленные структуры, меняя латеральное давление. Это может оказывать влияние на стабильность и активность интегральных мембранных белков [140].

Считается, что наличие CL является необходимым условием оптимальной активности белков дыхательной цепи, включая комплекс I (НАДН-убихинон-оксидоредуктаза) [141], комплекс III (цитохром-*bc*<sub>1</sub>) [142], комплекс IV (цитохром-*c*-оксидаза) [143] и F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФсинтазу [125]. Было показано, что CL прочно связывается с высокоспецифичными сайтами в комплексе III и комплексе IV, а при его отсутствии активность ферментов снижается [144, 145].

Наличие CL также оказывает влияние на активность АТФсинтазы [146]. Для правильной работы фермента требуется эффективное вращение *c*-кольца в вязкой липидной среде без утечки протонов. Эта проблема усугубляется также необычной структурой *a*-субъединицы, которая нарушает липидную упаковку вокруг ротора F<sub>o</sub>. Результаты исследований показали наличие специфических

временных взаимодействий CL с *c*-кольцом, которые приводят к стабилизации вращения ротора, выступая в качестве «смазки» [125, 147]. Кроме того, существует предположение, что CL взаимодействуют с ферментом на входе и выходе трансмембранных полуканалов, выполняя функцию протонной ловушки (так называемые «протонные антенны») и локализуя поток протонов в примембранном слое [143, 148]. На основе статистического анализа криоэлектронных томограмм везикул митохондриальных крист показано, что наличие CL способствует образованию димерных рядов АТФсинтаз [149].

CL-белковые взаимодействия не ограничиваются ферментами окислительного фосфорилирования, о чем свидетельствует довольно большой список белков, работа которых специфически связана с кардиолипинами: АТФ/АДФ-антипортер [150], осмосенсорные транспортеры [151], транслоказы [152] и другие. Также было показано, что CL влияет на фолдинг [153], жесткость и конформационные изменения белков [154]. Кроме того, повышенное содержание CL в мембране дополнительно обеспечивает выживаемость бактерий в неблагоприятных условиях [151].

В природе бактерии часто сталкиваются с различными неблагоприятными условиями, такими как ограничение питательных веществ, осмотическое давление, экстремальные температуры, кислоты и противомикробные препараты [155]. Адаптация к бактериальному стрессу зависит от успешного развития соответствующего клеточного ответа, который включает ремоделирование клеточной мембраны [155–157], изменения в экспрессии генов [158] или метаболические корректировки [159]. Все эти процессы требуют значительного количества энергии в форме АТФ, которая в клетке обычно синтезируется  $F_0F_1$ -АТФсинтазой.

Для *E. coli* повышение содержания CL в мембране является важным механизмом адаптации к условиям стресса и нарушению энергетического обмена, однако верхний предел концентрации CL пока неизвестен [151]. Считается, что такие модификации цитоплазматической мембраны позволяют поддерживать целостность липидного бислоя [160]. В экспериментальных исследованиях были успешно получены мутантные штаммы *E. coli* с высоким содержанием CL или PE, показывающие жизнеспособность в определенных условиях. Изменение содержания основных фосфолипидов не приводило к значительным изменениям скорости окисления глюкозы, а также не было обнаружено значительной разницы в значении мембранного потенциала по сравнению с диким типом. Однако,

наблюдалось снижение активности дегидрогеназ, что скорее всего приводило к снижению уровня АТФ и увеличению окислительного стресса. Тем не менее, результаты экспериментов позволяют предположить, что дыхательная цепь и  $F_oF_1$ -АТФсинтаза продолжают функционировать, тем самым увеличивая выживаемость в крайне неблагоприятных условиях [161, 162].

Таким образом, изменение содержания основных фосфолипидов мембраны оказывает сильное влияние на энергетический обмен [161]. Однако вопросы структурной и функциональной стабильности мембранной части АТФсинтазы в случае бактериального стресса все еще не решены, и использование молекулярно-динамического моделирования мембранно-белкового комплекса с высоким уровнем СL или РЕ может помочь раскрыть эти нерешенные аспекты.

### 1.7. Исследование механизма работы трансмембранного фактора $F_o$ АТФсинтазы

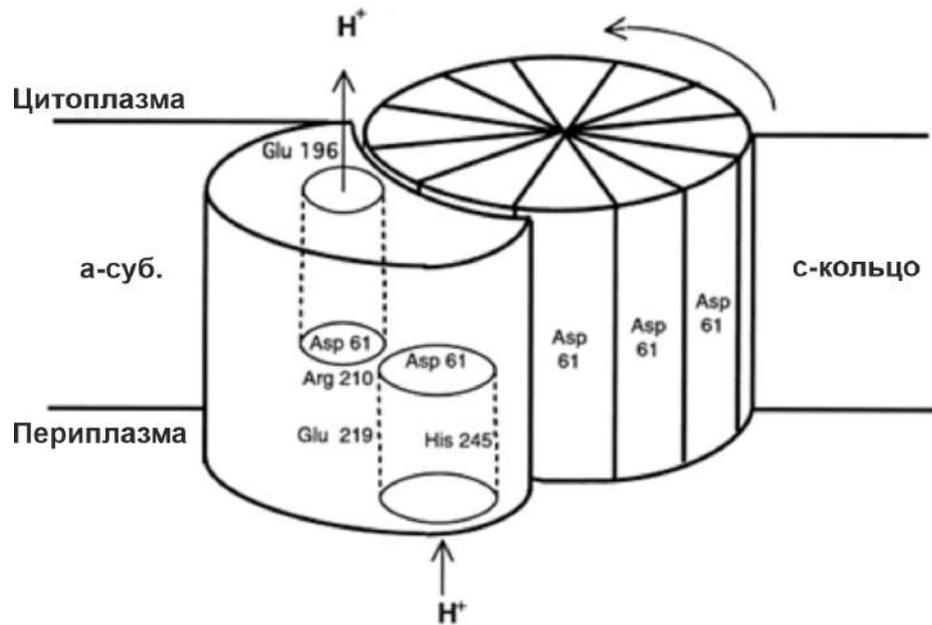
Результаты биохимических и структурных исследований  $F_oF_1$ -АТФсинтазы, в сочетании с экспериментами по кинематике вращения ротора, предоставляют большой объем данных, который может быть использован для изучения механизма работы фермента с применением методов математической и теоретической физики. Математическое моделирование является эффективным инструментом для анализа различных сценариев событий, происходящих в процессе работы молекулярной машины.

В качестве фундаментального механизма работы трансмембранного фактора  $F_o$ , основная роль которого заключается в переносе протонов, широкое признание получила модель, предложенная Виком и Антонио в 1994 году [163]. Данная модель предполагала наличие двух протонных полуканалов, внутренняя полость которых проходит внутри белка так, что их концы располагаются рядом с аминокислотой-переносчиком (*cAsp61*) протона в середине *c*-субъединиц. Кроме того, авторы отмечают, что *cAsp61* у двух соседних в *c*-кольце субъединиц, расположенных рядом с двумя полуканалами, могут быть протонированы не одинаково, что подчеркивает необходимость вращения *c*-кольца для перемещения протонов через мембрану.

В модели протонированный *aArg210* *a*-субъединицы взаимодействует с двумя непротонированными *cAsp61* соседних *c*-субъединиц. Остальные *c*-субъединицы имеют протонированный *cAsp61* и находятся в контакте с липидным окружением, тем самым формируя состояние с высоким  $pK_a$ . Один из *cAsp61*, взаимодействующий с *aArg210*, может протонироваться  $H^+$ , приходящим из периплазмы через входной полуканал. Предполагалось, что боковые группы остатков *aHis245* и *aGlu219* могли контролировать перенос протона. После протонирования *cAsp61* *c*-олигомер мог свободно повернуться на одну *c*-субъединицу. Это вращение осуществляется за счет электростатических взаимодействий, поскольку положительно заряженный *aArg210* будет сильно притягивать к себе оставшийся непротонированный *cAsp61*. В процессе вращения протонированный *cAsp61* перемещается из липидного окружения в контакт с *a*-субъединицей. В этой среде  $pK_a$  *cAsp61* смещается вниз из-за более полярной среды, что приводит к возможности освобождения протона (Рисунок 1.12) [60]. Такое взаимное расположение ключевых аминокислотных остатков гарантировало однонаправленное вращение, и многие последующие теоретические исследования были основаны на этой модели [12, 35, 164].

Элстон и др. расширили модель Вика и Антонио до количественной математической модели, в которой сосредоточили внимание на переключении электростатического притяжения между протонированными/депротонированными остатками *cAsp61* *c*-кольца и консервативным *aArg210* *a*-субъединицы. Было показано, что положительно заряженный *aArg210* играет ключевую регуляторную роль в функционировании фермента [36]. Эта модель была также применена к натриевой  $F_oF_1$ -АТФсинтазе, предполагая, что она отражает универсальную природу фактора  $F_o$  [165, 166].

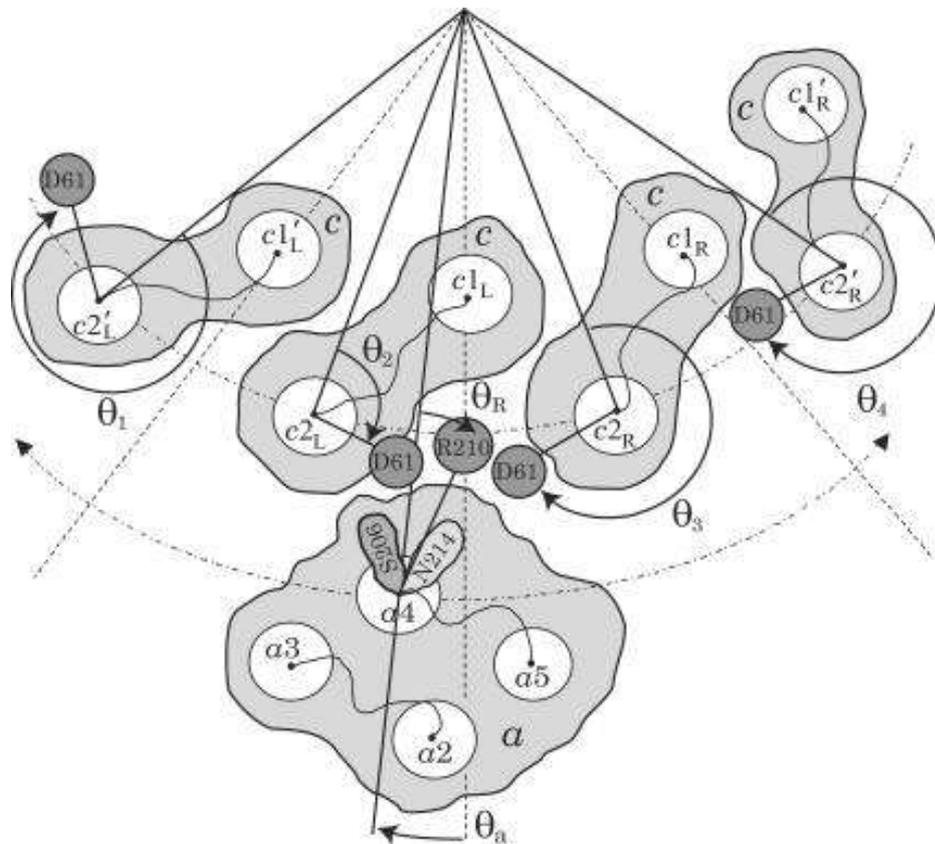
В отличие от одномерной модели храпового механизма Элстона, Акиментьев и др. использовали структуры с низким разрешением [89, 167] для определения взаимного расположения *a*-субъединицы и *c*-кольца. На основе этих структур они провели полноатомное молекулярно-динамическое моделирование, которое позволило им получить все геометрические параметры для стохастической модели [168]. Было показано, что генерация крутящего момента происходит на границе *a*- и *c*-субъединиц через боковые группы *aSer206*, *aArg210*, *aAsn214* и *cAsp61*. Боковая группа *aArg210* ориентирует боковые группы *cAsp61*, вызывая вращение отдельных *a*-спиралей *c*-субъединиц и тем самым обеспечивая перенос протонов к полуканалам через *aSer206* и



**Рисунок 1.12.** Модель механизма работы трансмембранного фактора  $F_0$ , предложенная Виком и Антонио [163]. Два несоосных протонных полуканала внутри  $\alpha$ -субъединицы показаны пунктирными линиями. Схематично изображено кольцо  $c$ -субъединиц, где ключевая аминокислота-переносчик протона  $cAsp61$  расположена приблизительно в центре мембраны. Отмечены существенные для протонного транспорта аминокислотные остатки  $\alpha$ -субъединицы ( $\alpha Glu196$ ,  $\alpha Arg210$ ,  $\alpha Glu219$ ,  $\alpha His245$ ). Стрелками показано предполагаемое направление движения протонов.

$\alpha Asn214$ , предотвращая при этом утечку протонов между полуканалами (Рисунок 1.13). Предложенная математическая модель доказывала возможность создания крутящего момента указанным механизмом при нагрузках, характерных для синтеза АТФ.

Таким образом, было теоретически подтверждено, что двигатель  $F_0$  обеспечивает вращательное движение за счет кинетики переноса протона и связанных с этим эффектов изменения электростатических взаимодействий. Однако осталось несколько вопросов относительно структуры и функции  $\alpha$ -субъединицы: по какому пути протоны достигают  $cAsp61$ , какие аминокислотные остатки участвуют в его переносе, участвует ли  $\alpha$ -субъединица в образовании выходного полуканала, и если да, то что он собой представляет. Дальнейшие исследования, включая модификации и расширения модели Вика и Антонио, а также ее применение к другим системам, успешно объяснили экспериментальные данные и дали основание для последующих теоретических работ.

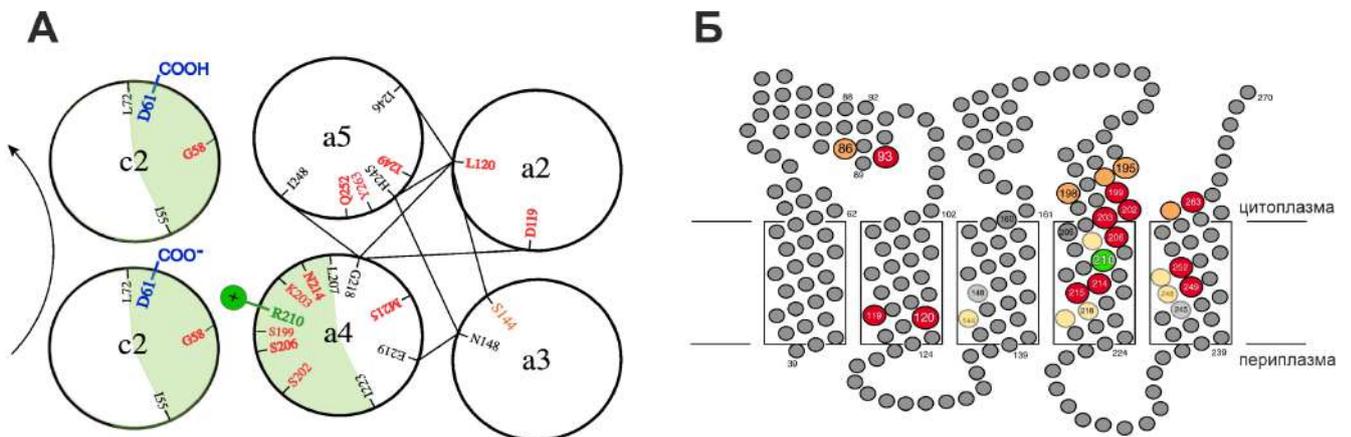


**Рисунок 1.13.** Стохастическая модель фактора  $F_0$  АТФсинтазы. Показаны четыре из 10  $c$ -субъединиц и  $a$ -субъединица (вид из цитоплазмы).  $c_{10}$ -кольцо фиксировано, а  $a$ -субъединица может двигаться в любом направлении (описывается углом  $\theta_a$ ). Вторая трансмембранная спираль ( $c_2$ ) каждой  $c$ -субъединицы может вращаться (углы  $\theta_1$ - $\theta_4$ ), перемещая ключевые остатки  $c$ Asp61, которые являются сайтами связывания протонов; спирали  $c_1$  не вращаются. Аналогично, только четвертая спираль  $a$ -субъединицы ( $a_4$ ) может вращаться (угол  $\theta_R$ ), перемещая остаток  $a$ Arg210; спирали  $a_2$ ,  $a_3$  и  $a_5$  не вращаются. Перенос протона происходит между конечным остатком  $a$ Asn214 входного полуканала и сайтом связывания  $c$ Asp61 на спирали  $c_{2R}$ , а также между сайтом связывания  $c$ Asp61 на  $c_{2L}$  и конечным остатком  $a$ Ser206 выходного полуканала [168].

Для выяснения механизма протонного транспорта был описан ряд мутантов  $a$ - и  $c$ -субъединиц [70, 97, 98, 105] (см. раздел 1.4). Предполагалось, что заряженные остатки в  $a$ -субъединице, которые не являются существенными, но мутации которых влияют на протонную проводимость, выстилают полуканалы [169]. Однако, полученные фенотипы было трудно интерпретировать из-за отсутствия структуры с высоким разрешением мембранного фактора  $F_0$ .

Позднее структура  $c$ -кольца была получена методом ядерного магнитного резонанса [167, 170], в то время как топология  $a$ -субъединицы, а также ее поверх-

ность контакта с *c*-кольцом, во внутренней мембране *E. coli* была предсказана путем введения поперечных Cys сшивок (cross-linking) [62, 64, 65]. Предполагалось, что *a*-субъединица состоит из четырех трансмембранных  $\alpha$ -спиралей (*a*ТМС2-5), которые образуют пучок, ориентированный перпендикулярно плоскости мембраны. При этом *a*ТМС4 и *a*ТМС5 были расположены на периферии *c*-кольца (Рисунок 1.14А) [69, 171]. Кроме того, за счет использования свойства  $Ag^+$  и  $Cd^{2+}$  взаимодействовать с остатками Cys, было произведено картирование аминокислотных остатков, которые выстилают стенки полуканалов и могут оказывать влияние на перенос протона (Рисунок 1.14Б) [69, 172, 173].



**Рисунок 1.14.** Топология *a*-субъединицы и поверхность ее контакта с *c*-кольцом, предсказанная на основе поперечных Cys сшивок. (А) Расположение четырех ТМС *a*-субъединицы (*a*ТМС2-5) и двух ближайших к ним ТМС2 *c*-субъединиц (*c*ТМС2). Восемь поперечных связей, образованных между парами Cys, которые вводились в различные ТМС *a*-субъединицы, показаны линиями между сшиваемыми остатками. Стрелкой показано направление вращения ротора во время синтеза АТФ. (Б) Предположительное расположение *a*ТМС1-5 внутри липидного бислоя. Красным выделены остатки, у которых Cys замены были наиболее чувствительны к  $Ag^+$  (>85% ингибирования), оранжевым — умеренно чувствительные остатки (66-85% ингибирования) [69].

Впервые электропроводность мембранного фактора  $F_o$  АТФсинтазы была определена Б. Фенюком на изолированных хроматофорных везикулах фотосинтетической бактерии *R. capsulatus* [7]. Фотосинтетические ферменты можно запускать вспышкой света для создания протондвижущей силы, а затем отслеживать выброс протонов через  $F_o$ . При этом за спадом напряжения можно следить по электрохромному сдвигу полос нативных каротиноидных пигментов, а реакции связывания и высвобождения протонов можно отслеживать с

помощью соответствующих индикаторов рН [174]. В данной модели скорость переноса протонов незначительно зависела от рН и не зависела от  $\Delta\psi$ . Максимальная проводимость 10,5 фС наблюдалась при рН 8, что составляет примерно  $6500 \text{ H}^+ \text{ c}^{-1}$  при разнице потенциалов 100 мВ. Таким образом, скорость работы фермента без фактора  $F_1$  была примерно в 10 раз выше, чем в полном ферменте  $F_0F_1$ -АТФсинтазе [7].

Характеристики протонного транспорта могут быть оценены и с помощью математического моделирования. Например, методом молекулярной динамики было показано образование водородных связей между центрами связывания протона (полярные аминокислоты или молекулы воды) [168]. Предполагается, что эти связи способны переносить протоны в пикосекундном временном масштабе путем коллективного туннелирования [175]. Однако, наиболее вероятной считается модель классического прыжкового перехода [36, 168]. Вероятность переноса протона сильно зависит от расстояния между сайтами его связывания, а также от рН по обе стороны мембраны (наличие протонного градиента). Тем не менее, на молекулярном уровне переход может быть облегчен за счет конформационной подвижности трансмембранных спиралей белка, которая может привести к уменьшению расстояния внутри донорно-акцепторной пары [176].

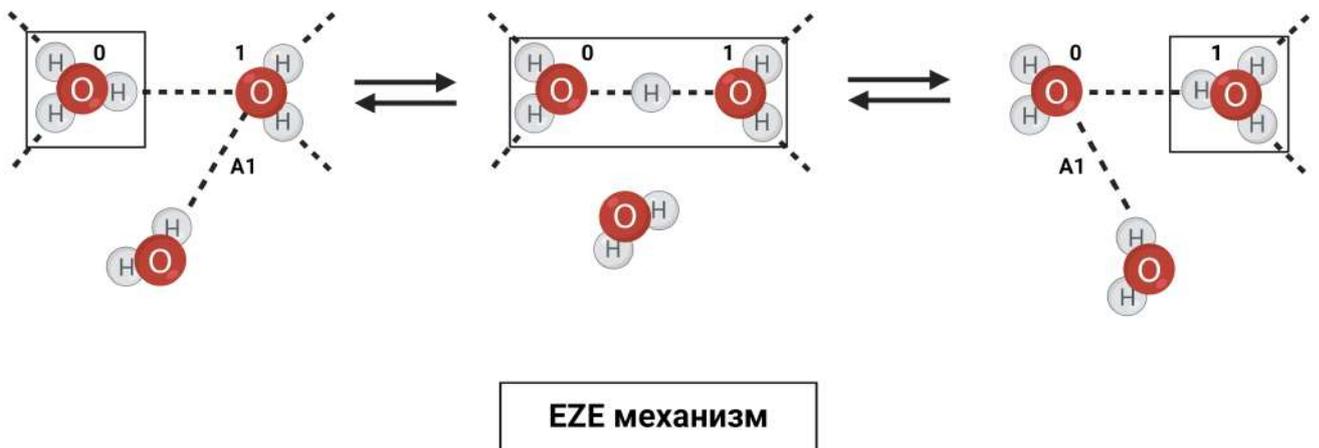
Для описания транспорта протонов через полуканалы АТФсинтазы и оценки характеристик движения в научных исследованиях применяется диффузионное приближение [36, 177]. Используя соотношение Эйнштейна – Смолуховского из молекулярно-кинетической теории, отражающее взаимосвязь количественных характеристик броуновского движения с диффузионными свойствами дисперсных систем, можно оценить временные параметры, необходимые для диффузии протонов через мембрану:

$$\bar{t} = \frac{l^2}{6D} \quad (1.2)$$

где  $l$  — расстояние перехода,  $D$  — коэффициент диффузии. В исследовании Е. Машковцевой установлено, что время перемещения протона из примембранного пространства к остатку аспартата  $c$ -субъединицы и на противоположную поверхность мембраны составляет от 2 до 15 нс в зависимости от коэффициента диффузии протонов [177]. Однако следует отметить, что применение диффузионного подхода представляет собой приблизительную оценку, поскольку линейные размеры каналов большинства белков сопоставимы с величинами свободных пробега частиц. Кроме того, в отличие от ионов металлов, ионы

водорода необязательно перемещаются из одной точки пространства в другую, а могут передаваться с ближайшего донора на акцепторный участок, что лишь частично соответствует закономерностям обычной диффузии.

Другая наиболее известная модель, объясняющая причины аномально быстрой диффузии протона по сравнению с диффузией других ионов, была сформулирована Гротгусом [178]. Механизм Гротгуса предполагает, что протон может перескакивать от одних молекул воды к другим из-за изомеризации между двумя протонированными водными конформациями: более стабильным комплексом  $\text{H}_9\text{O}_4^+$  (катион Эйгена) и переходной структурой  $\text{H}_5\text{O}_2^+$  (катион Занделя), так называемый переход «Эйген–Зандель–Эйген» (EZE) (Рисунок 1.15). Конечным результатом является перемещение протона с одного конца ориентированной цепочки молекул воды к другому, а после каждого акта переноса протона необходима переориентация цепочки водного проводника для подготовки следующего акта [179, 180]. Данный подход реализуется в рамках *ab initio* молекулярной динамики — вычислительного метода, при котором не используются эмпирические потенциалы или силовые поля, а взаимодействия между атомами вычисляются непосредственно из электронной структуры системы с использованием квантовой механики [181].



**Рисунок 1.15.** Схема переноса протона по цепи из молекул воды по «Эйген–Зандель–Эйген» (EZE) механизму. Слева: кислород 0 представляет собой ион гидроксония, а кислород 1 находится в своей первой сольватной оболочке, принимая водородную связь (A1) из второй сольватной оболочки. В центре: промежуточное соединение Занделя. Справа: образование нового иона гидроксония на кислороде 1 [180].

Применение высокопроизводительных вычислительных средств открывает возможности прямого использования стохастического подхода — методики, основанной на расчете случайной траектории теплового движения частицы, которая моделируется при помощи стохастического разностного уравнения, обеспечивающего приближенное решение уравнения движения [182].

$$M \frac{X_{i+1} + X_{i-1} + 2X_i}{\Delta t^2} + \frac{dU}{dX_i} = \varepsilon_{i+1} \quad (1.3)$$

где  $X_i$  — вектор координат в момент времени  $i$  (решение уравнения Ньютона),  $M$  — матрица массы,  $U$  — потенциальная энергия,  $\varepsilon_{i+1}$  — вектор ошибок (мера отклонения конечной разности от точного решения уравнения Ньютона). Такой подход позволяет рассчитывать частоты событий и потоки частиц, однако его недостатком является высокая вычислительная сложность и необходимость определения вероятностей элементарных случайных событий молекулярного уровня.

При квантово-механическом подходе описания протонного транспорта рассматривается потенциал, создаваемый как фиксированными атомами полуканала, внешним источником поля, так и подвижными зарядами. В этом потенциале решается уравнение Шредингера для протонов:

$$-\nabla \frac{\hbar^2}{2m(\vec{r})} \nabla \Psi_E(\vec{r}) + V(\vec{r}) \Psi_E(\vec{r}) = E \Psi_E(\vec{r}) \quad (1.4)$$

$$V(\vec{r}) = q\Phi(\vec{r}) + V_{Ext}(\vec{r}) \quad (1.5)$$

Полученное решение позволяет определить значение оператора тока и сравнить его с экспериментальными данными:

$$I = q \iint \frac{\hbar}{2mi} [\Psi_E^*(\vec{r}) \nabla \Psi_E(\vec{r}) - \Psi_E(\vec{r}) \nabla \Psi_E^*(\vec{r})] e^{\frac{-(E-\mu p)}{k_B T}} d\vec{r} dE \quad (1.6)$$

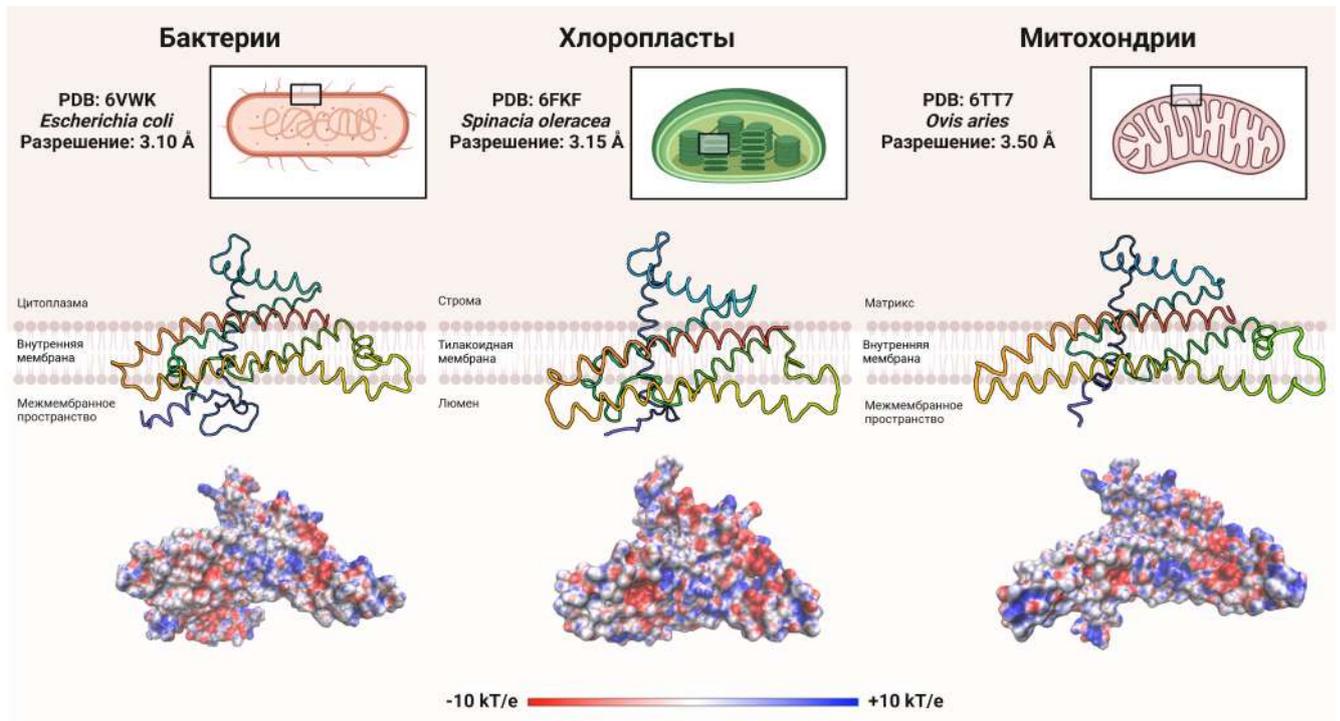
Отметим, что в общем случае волновая функция протонов, полученная в результате решения уравнения Шредингера, оказывает влияние на распределение потенциала в полуканале. Строгое рассмотрение такой модели требует решения самосогласованной задачи [183]. Кроме того, решение трехмерного уравнения Шредингера приводит к сложной системе собственных функций, причем состояние объекта описывается линейной комбинацией таких функций. Получение точного решения такой задачи сопряжено с колоссальными вычислительными трудностями. С другой стороны, добиться высокой точности модели и

приемлемой вычислительной сложности можно за счет применения комбинированного подхода, в котором вероятности переноса протона с одного заряженного центра на другой определяются в квантово-механической модели одномерного движения для учета чисто квантовых эффектов, характерных для микрочастиц (эффект туннелирования и локализация связанных состояний), а задача транспорта через последовательность заряженных центров в полуканале решается в рамках стохастического подхода.

Тем не менее, для понимания механизма протонного транспорта на молекулярном уровне требуются структуры высокого разрешения полного комплекса  $F_o$ , которые позволят понять особенности его регуляции, а также тонкости, приводящие к различиям в стехиометрии [184]. До 2015 года существовала всего одна структура  $a$ -субъединицы АТФсинтазы [PDB ID: 1C17], в которой она представляла собой пучок из четырех ТМС, вертикально ориентированных в мембране (Рисунок 1.4А), т.е. протонные полуканалы были расположены перпендикулярно плоскости мембраны [89]. В 2015 году метод криоэлектронной микроскопии произвел революцию в разрешении структур мембранных белков. Были получены крио-ЭМ структуры  $F_o$  фактора с разрешением  $\sim 7 \text{ \AA}$  [20, 21]. По новым данным  $a$ -субъединица состояла из шести ТМС, четыре из которых представляли собой две пары длинных, горизонтально расположенных в мембране спиралей, прилегающих к кольцу из  $c$ -субъединиц (Рисунок 1.4Б). Данная структура соответствовала модели Вика и Антонио [163], однако теперь конфигурация полуканалов была не совсем очевидна, так же, как и эффект трансмембранного протонного градиента. Кроме того, в новых структурах отсутствовала информация о боковых группах аминокислот, и разрешения по-прежнему было недостаточно для понимания процесса переноса протонов.

Дальнейшие исследования позволили получить атомные модели  $a$ -субъединицы бактерий [22, 24, 25], хлоропластов [28] и митохондрий [21, 23, 29, 185] с разрешением  $\sim 3 \text{ \AA}$ . Сравнение этих структур показало их значительное сходство (Рисунок 1.16), что позволяет предположить консервативность механизма протонного транспорта у различных организмов [26]. Структуры с высоким разрешением позволили уточнить возможное расположение протонных полуканалов, а также идентифицировать существенные аминокислотные остатки, участвующие в переносе протонов. Важно отметить, что на протяжении десятилетий  $F_oF_1$ -АТФсинтаза из *E. coli* выступала в качестве модельной

системы для изучения работы фермента [45]. Новые данные обеспечат детальную структурную основу для интерпретации множества экспериментальных исследований, которые были выполнены с этим белком.



**Рисунок 1.16.** Структура  $a$ -субъединицы  $F_0F_1$ -АТФсинтазы, универсальная для большинства организмов (вид со стороны  $c$ -кольца). Внизу представлены карты электростатического потенциала, цветовая шкала варьируется от  $-10$  кТ/е до  $+10$  кТ/е.

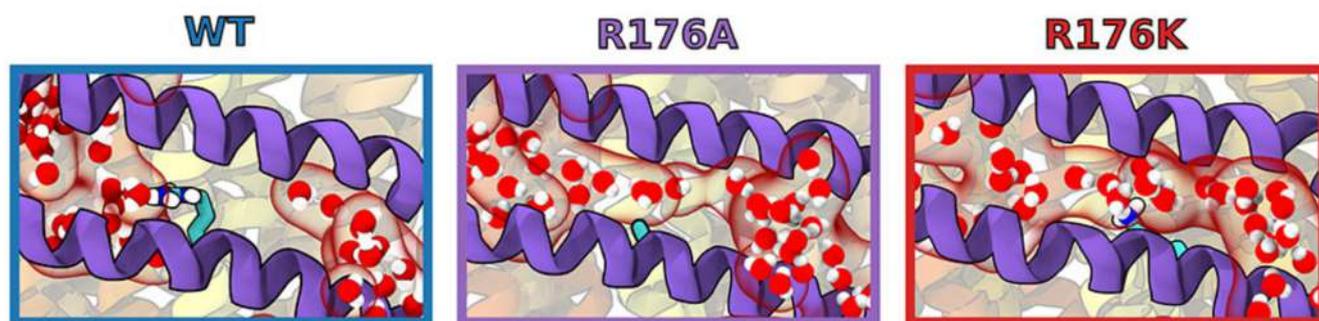
С учетом горизонтальной ориентации  $a$ -субъединицы предполагается, что в бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазе периплазматический полуканал состоит из полости между  $a$ ТМС 1, 3, 4 и 5  $a$ -субъединицы и достигает  $c$ -кольца через зазор между  $a$ ТМС 5 и 6, а цитоплазматический полуканал представляет собой полость на границе раздела  $a$ -субъединицы и  $c$ -кольца [22]. Оба полуканала были визуализированы при моделировании поверхности сферой размером  $1,4 \text{ \AA}$ , имитирующей молекулу воды [186]. В *E. coli* особенно точно были идентифицированы крио-ЭМ плотности  $a$ Arg210 и  $c$ Asp61, которые позволяют предположить, что эти ключевые аминокислотные остатки находятся в непосредственной близости друг от друга. Кроме того, было показано, что остатки  $a$ Asn214,  $a$ His245,  $a$ Asp119 и  $a$ Glu219, которые также известны из исследований мутагенеза [60, 70, 104, 105], образуют цепочку аминокислот в

периплазматическом полуканале. Однако, поскольку расстояния между боковыми группами близлежащих полярных аминокислот слишком велики для образования водородной связи, высоковероятно присутствие молекул воды [24]. Модель *a*-субъединицы показывает, что протонные полуканалы достаточно широкие, чтобы молекулы воды могли свободно проходить в них. Это наблюдение предполагает, что функция полярных аминокислотных остатков может заключаться не только в прямом переносе протонов. Их присутствие может помочь поддерживать гидрофильную среду внутри полуканалов для заполнения их водой [22]. В большинстве описанных выше крио-ЭМ структурах наблюдались плотности, соответствующие молекулам растворителя [120–122]. Однако, определение точных координат молекул воды в структуре белка при разрешении  $\sim 3$  Å является сложной задачей, которая требует дополнительных исследований. В связи с этим, большинство доступных в базе PDB структур  $F_0F_1$ -АТФсинтаз не содержат молекул воды.

Вопрос о локализации молекул воды в полуканалах АТФсинтазы может быть решен с помощью теоретического моделирования. Например, было проведено молекулярно-динамическое моделирование *c*-кольца из хлоропластов, встроенного в липидный бислои [187]. Показано образование широкого водного канала, простирающегося до ключевого остатка глутамата со стороны стромы (выходной полуканал). Удивительно, что этот водный канал не был направлен перпендикулярно поверхности мембраны, а составлял угол  $\sim 45^\circ$  к нормали. Предполагается, что такая геометрия приводит к изоляции полуканалов друг от друга, минимизируя утечку протонов, и предположительно способствует вращению *c*-кольца против часовой стрелки в режиме синтеза АТФ. Однако, в моделируемой структуре отсутствовала *a*-субъединица, ТМС которой в основном образуют полуканалы.

МД моделирование митохондриального фактора  $F_0$ , содержащего *a*-субъединицу, было проведено А. Марчиняк и др. [188]. Были определены средние плотности молекул воды в протонных полуканалах для фермента дикого типа, а также двух мутантов: *a*Arg176Ala и *a*Arg176Lys (Рисунок 1.17). Боковая группа аргинина действовала как «пробка», которая разделяла водные плотности на два четко определенных полуканала. Напротив, у обоих мутантов полуканалы образовывали сплошную водную пору, через которую молекулы воды могли быстро диффундировать через мембрану. Авторы рассчитали, что поток воды между двумя полуканалами оказался на 2 порядка больше у обоих

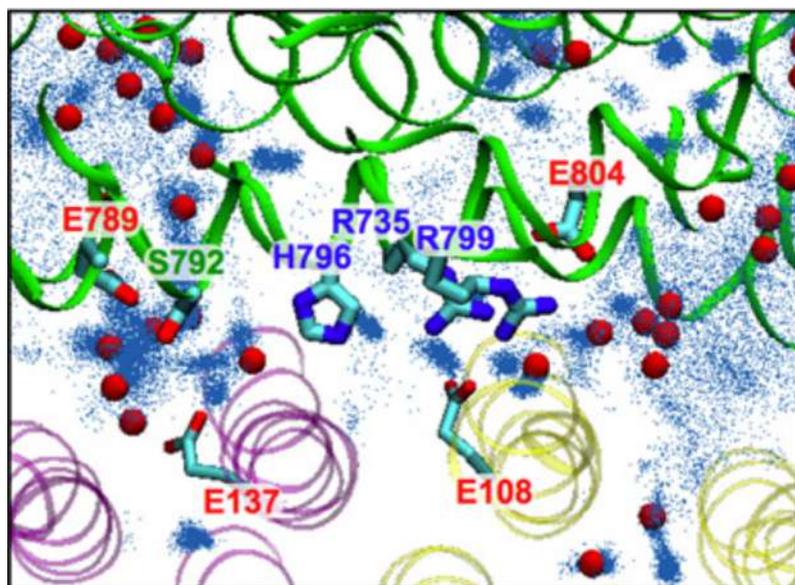
мутантов, чем у дикого типа (1,02, 0,83 и 0,03 молекул/нс для *aArg176Ala*, *aArg176Lys* и WT соответственно). Неожиданно высокое увеличение потока, наблюдаемое для *aArg176Lys*, предположительно обусловлено более высокой конформационной гибкостью боковой группы лизина, что препятствует его эффективному действию в качестве водной «пробки».



**Рисунок 1.17.** Распределения молекул воды (красные сферы) вокруг ключевого остатка *aArg176* для белка дикого типа (WT) и двух замен аргинина (*aArg176Ala*, *aArg176Lys*), полученные в результате МД моделирования. Синим показаны *aTMC5-6 a*-субъединицы [188].

Локализацию молекул воды в полуканалах можно предсказать при наличии крио-ЭМ структур ферментов с атомным разрешением. Ро и др. отметили возможные положения молекул воды в структуре  $V_o$ -АТФазы с разрешением 2,7 Å [189], используя программу «Find Waters» [190]. Кроме того, авторы также провели полноатомное МД моделирование и отметили частоты положений молекул воды в протонных полуканалах (Рисунок 1.18). Было обнаружено, что вода локализуется в области между полуканалами и *c*-субъединицей, что возможно обеспечивает передачу протона между *a*- и *c*-субъединицами. Интересно, что расположение этих молекул воды сильно зависело от состояния протонирования существенных аминокислотных остатков, предположительно участвующих в передаче протона. Следует отметить, что структура вакуолярных АТФаз сильно отличается от АТФсинтаз F-типа. Например, одна из *c*-субъединиц в  $V_o$  имеет заметные различия по сравнению с другими *c*-субъединицами. Поэтому до конца неясно, насколько хорошо механизмы  $V_o$  могут быть обобщены на  $F_o$ .

Хотя кристаллографические структуры предоставляют важные сведения о взаимном расположении субъединиц белка, что также позволяет предполагать наличие возможных изменений в конформационных состояниях, статические структуры не предоставляют всю полноту информации. В такой динамической системе, как  $F_oF_1$ -АТФсинтаза, целесообразно проводить исследования

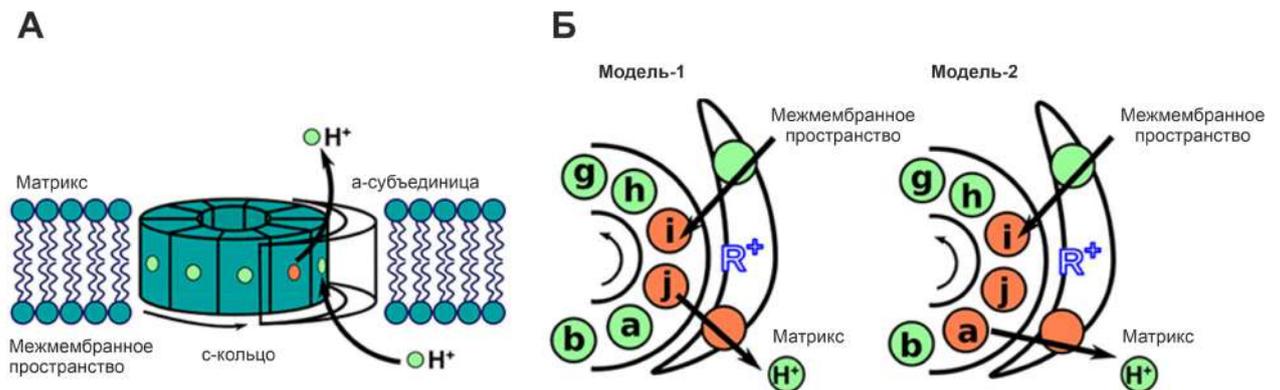


**Рисунок 1.18.** Молекулы воды на границе  $\alpha$ -субъединицы (зеленые спирали) и  $c$ -кольца (фиолетовые и желтые спирали) в структуре  $V_0$ -АТФазы. На спиралях выделены существенные аминокислотные остатки. Красными сферами отмечены возможные положения молекул воды, предсказанные с помощью программы «Find Waters». Синие точки отображают положения молекул воды, полученные в результате 500 нс МД моделирования [189].

конформационных изменений в кинетическом режиме для того, чтобы можно было соотнести различные ферментативные и транспортные состояния со структурой. Появление новых крио-ЭМ структур высокого разрешения привело к необходимости пересмотра научных исследований механизма вращения  $c$ -кольца в факторе  $F_0$  многими авторами, поскольку в их более ранних работах предполагалась другая ориентация  $\alpha$ -субъединицы.

Группой Варшеля было проведено крупнозернистое МД моделирование для оценки профиля свободной энергии в зависимости от угла вращения  $c$ -кольца при фиксированных состояниях протонирования/депротонирования [191]. Другими группами Марчиняк и др. [188], Ро и др. [189] также было выполнено полноатомное МД моделирование для оценки профиля свободной энергии вращения двигателей  $F_0$  и  $V_0$  соответственно. С. Кубо и С. Такада выполнили гибридное молекулярно-динамическое и Монте-Карло моделирование (МД/МК), где вращение двигателя  $F_0$  рассматривалось в рамках подхода МД, а перенос протона имитировался с помощью метода МК [192]. Результаты исследований показали возможность одновременного депротонирования Asp/Glu двух или трех  $c$ -субъединиц в процессе вращения [188, 192]. Хотя в более ранней

работе В. Леони и Х. Форальдо-Гомес была продемонстрирована возможность одновременного депротонирования лишь одной или двух *c*-субъединиц (Рисунок 1.19) [193]. Расхождения результатов могут быть связаны с разными организмами (первый был для  $F_o$  из *Polytomella sp.*, а второй — для дрожжей). Если два полуканала расположены достаточно близко друг к другу, то места для депротонирования дополнительной *c*-субъединицы не будет. Кроме того, эти различия могут возникать из-за разрешения исходных крио-ЭМ структур (3,6 Å для *Polytomella sp.* против 6,2 Å для дрожжей).



**Рисунок 1.19.** (А) Геометрия митохондриального мотора  $F_o$  АТФсинтазы. Указаны направление вращения *c*-кольца и движение протонов, необходимые для синтеза АТФ. (Б) Механизм переноса протонов между *a*-субъединицей и *c*-кольцом. Зеленые и оранжевые сферы представляют протонированный и депротонированный глутамат соответственно. Стрелки указывают на направление потока протонов во время синтеза АТФ.  $R^+$  (синий) — высококонсервативный остаток аргинина *a*-субъединицы. Модель-1 отображает возможность одновременного депротонирования лишь одной или двух *c*-субъединиц, Модель-2 — двух или трех *c*-субъединиц [194].

Гибридный подход МД/МК имеет много преимуществ для понимания механизма работы двигателя  $F_o$  на молекулярном уровне. Этот метод позволяет теоретически воспроизвести и отслеживать конформационную динамику вращения фермента с силой, эквивалентной экспериментально подтвержденному крутящему моменту, вместе с элементарными реакциями, такими как перенос протонов. Однако следует отметить, что эти методы основаны на многих предположениях и имеют ряд ограничений. Крупнозернистая МД не учитывает ориентацию боковых групп аминокислот, а соответствие моделируемого времени реальному не является идеальным. Использование полноатомной МД

позволяет решить эти проблемы, однако для исследования такой сложной системы, как двигатель  $F_0F_1$ -АТФсинтаза, требуются значительные вычислительные ресурсы. Широко используемое МД моделирование с постоянным рН, при котором состояния протонирования в соответствующих аминокислотах обновляются посредством метода МК, позволяет имитировать появление и исчезновение протонов в любых титруемых остатках вместо рассмотрения переноса протонов из одного места в другое. Однако, в проведенных исследованиях в качестве переноса протона рассматривалось лишь изменение протонирования остатков Asp/Glu на *c*-кольце. В принципе, вопрос протонного транспорта по полуканалам АТФсинтазы можно решить с помощью гибридного квантово-механического молекулярно-механического (КМ/ММ) моделирования, но вычислительные затраты выходят далеко за пределы современных возможностей [194]. Поэтому, гибридное МД/МК моделирование не может быть напрямую использовано для изучения движения протонов, и вопрос о пути их переноса через мембрану на атомном уровне остается открытым.

В организме АТФ является одним из самых часто обновляемых соединений. Запаса молекул практически не создается, и для нормальной жизнедеятельности необходимо постоянно их синтезировать; даже незначительный энергодефицит приводит к метаболическим нарушениям. Поэтому детальное понимание механизма работы  $F_0F_1$ -АТФсинтазы, основного энергосинтезирующего фермента клетки, является важной научной задачей. Несмотря на обилие экспериментальных и теоретических исследований, этапы каталитического цикла фермента, в частности, процесс протонного транспорта, еще до конца не ясны. Примечательно, что в отличие от множества белковых каналов в клетках мембранная часть белка представляет собой не полую пору, а два несоосных полуканала со сложной траекторией движения протона, в связи с чем экспериментальная оценка параметров его транспорта затруднена. Однако, теоретическое моделирование может позволить не только оценить электрофизиологические характеристики переноса протона в реальных биологических условиях, но и проанализировать границы адаптивности функционирования фермента при нарушении целостности и характеристик биологических мембран. Необходимо подчеркнуть, что с учетом консервативности структуры АТФсинтазы как у эукариот, так и у прокариот, основные выводы, полученные при моделировании локальных процессов на наноуровне, могут быть с достаточной степенью достоверности транспонированы от одного вида к другому.

## Глава 2. Исследование структуры протонных полуканалов бактериальной $F_0F_1$ -АТФсинтазы

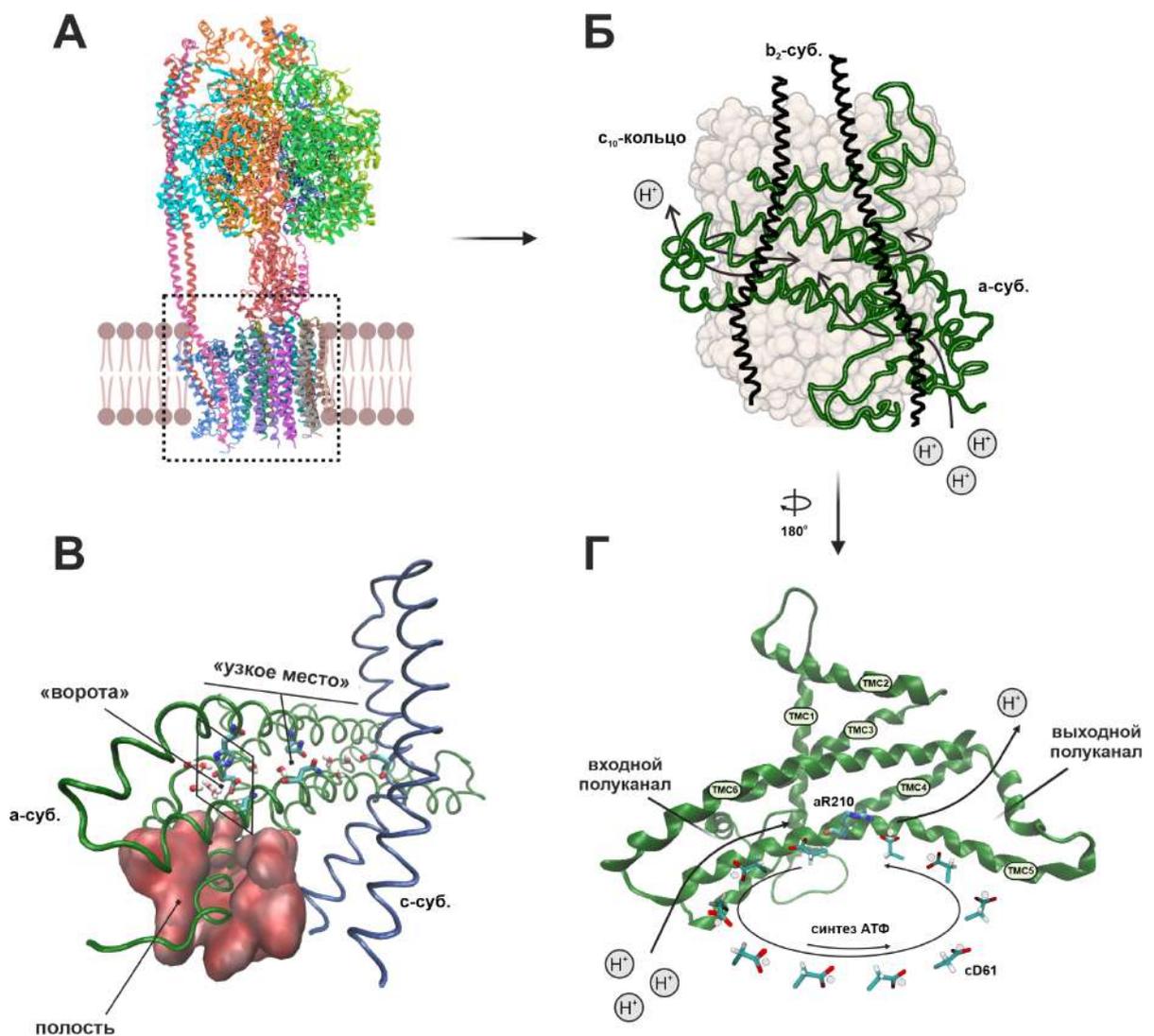
Одним из важнейших процессов в каталитическом цикле  $F_0F_1$ -АТФсинтазы является протонный транспорт. Перенос протонов осуществляется через мембранный фактор  $F_0$  по двум несоосным полуканалам, которые высокочувствительны к мутациям аминокислотных остатков, приводящим к блокировке работы всего фермента. Однако, в настоящий момент точные траектории движения протонов до сих пор не установлены, и экспериментальная оценка параметров этого процесса затруднена. Прежде чем приступить к изучению механизма протонного транспорта, необходимо установить возможные области его движения внутри фермента, а также структуру полуканалов. Главной локальной силой, которую испытывает на себе протон, является сила электростатического взаимодействия с боковыми группами полярных аминокислотных остатков белка. Кроме того, важной составляющей структуры полуканалов являются полярные молекулы воды.

В данном исследовании разрабатывается атомистическая модель полуканалов, включающая в себя области движения протонов, а также положения заряженных центров (таких как полярные аминокислоты и молекулы воды), способных оказывать влияние на его движение. При этом, координаты атомов белка могут быть установлены с использованием известных крио-ЭМ структур, в то время как определение локализации молекул воды в полуканалах требует дополнительного изучения, поскольку большинство структур АТФсинтаз представлены без явного указания их положений. Для решения данной задачи можно ограничиться стохастическим заполнением пустот в молекулярной структуре полуканалов модельными молекулами воды с учетом только Ван-дер-Ваальсовских радиусов атомов, а также с учетом электростатических взаимодействий. Однако, более строгое решение может быть достигнуто в рамках подхода молекулярной динамики (МД).

## 2.1. Анализ структуры мембранного фактора $F_o$ -АТФсинтазы на основе данных криоэлектронной микроскопии

Крио-ЭМ структура мембранной части  $F_oF_1$ -АТФсинтазы *E. coli* [PDB ID: 6VWK] с разрешением 3,3 Å была взята за основу для построения атомистической модели протонных полуканалов. Эта структура содержала *a*-субъединицу, кольцо из десяти *c*-субъединиц, а также две укороченные *b*-субъединицы (Рисунок 2.1А, 2.1Б). С помощью программного пакета VMD [195] были визуализированы области  $F_o$  фактора, в которых, как считается, происходит транспорт протонов.

Для анализа структуры входного полуканала (со стороны периплазмы) были подробно изучены участки между трансмембранными  $\alpha$ -спиралями *a*- и *b*-субъединиц. Чтобы достигнуть ключевой аминокислоты *cAsp61*, протон должен преодолеть две части полуканала: полость в *a*-субъединице на границе с мембраной, а также «узкое место» в области около остатков *aArg210* и *cAsp61* (Рисунок 2.1В). Входная часть полуканала формируется трансмембранными участками *aTMC1*, *aTMC4*, петлей между *aTMC3* и *aTMC4*, а также N-концом *a*-субъединицы (Рисунок 2.1Г). Кроме того, трансмембранный сегмент одной из *b*-субъединиц изолирует пространство полуканала в этом месте от окружающих липидов и водной среды. Все вместе эти компоненты образуют полость, внутренняя поверхность которой содержит значительное количество полярных аминокислотных остатков: *aAsn18*, *aGln20*, *aThr40*, *aAsn42*, *aAsp44*, *aSer45*, *aSer49*, *aAsp146* и *aAsn148*. Присутствие данных остатков способствует поддержанию гидрофильной среды внутри полости, вероятно, для заполнения ее водой. Далее за водной полостью наблюдается сужение входного полуканала, где он проходит между *aTMC3-6* вплоть до *aArg210* и *cAsp61*. В данном «узком месте» были выявлены все консервативные полярные аминокислоты (*aAsn116*, *aAsp119*, *aSer144*, *aAsn214*, *aGlu219*, *aHis245*, *aGln252*), вероятно, играющие важную роль в процессе переноса протона (Рисунок 2.2А). Было установлено, что *aGlu219*, вместе с *aAsp119* и *aHis245*, расположены на разных *aTMC* (на *aTMC4*, *aTMC3* и *aTMC5* соответственно) в самом начале «узкого места». При этом их боковые группы перекрывают полуканал, образуя что-то похожее на «ворота», которые регулируют проход протона глубже в полуканал к *cAsp61*. *aAsn214* и *aGln252* были расположены в самом конце входного полукана-

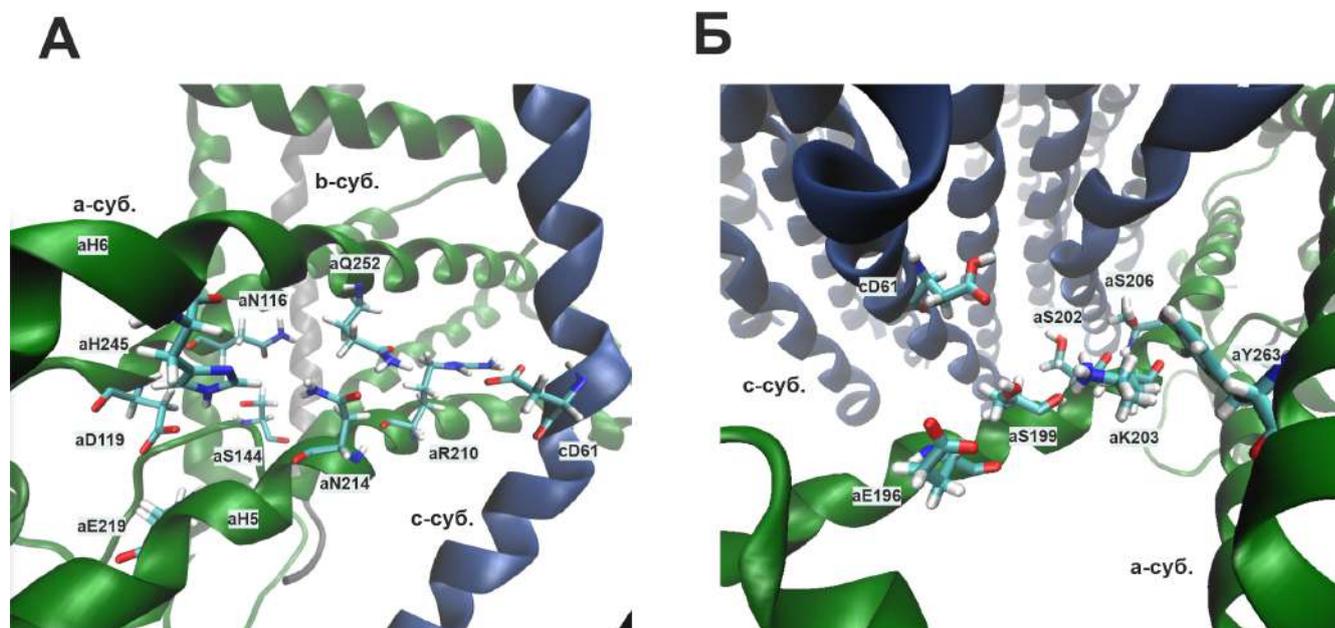


**Рисунок 2.1.** (А) Общая структура  $F_0F_1$ -АТФсинтазы из *E. coli* [PDB ID: 6VWK]. (Б) Субъединицы мембранного фактора  $F_0$ :  $a$ -субъединица (зеленые спирали),  $b_2$ -субъединицы (черные спирали),  $c_{10}$ -кольцо (серая поверхность). Стрелки указывают направление движения протонов во время синтеза АТФ. (В) Детальный вид на входной полуканал. Водная полость показана красной поверхностью. Отмечены аминокислоты, расположенные в «узком месте», а также боковые группы остатков, образующих «ворота». (Г) Расположение протонных полуканалов. Указаны трансмембранные спирали (ТМС)  $a$ -субъединицы и положения ключевых аминокислотных остатков ( $a$ Arg210,  $c$ Asp61).

нала около  $c$ Asp61 и могли являться донорами протона для него, в то время как остатки  $a$ Asn116 и  $a$ Ser144 находились несколько в стороне от основного направления движения.

Выходной полуканал, расположенный со стороны цитоплазмы, образован  $a$ ТМС5-6  $a$ -субъединицы (остатки 170-206, 265-271), а также  $c$ ТМС2

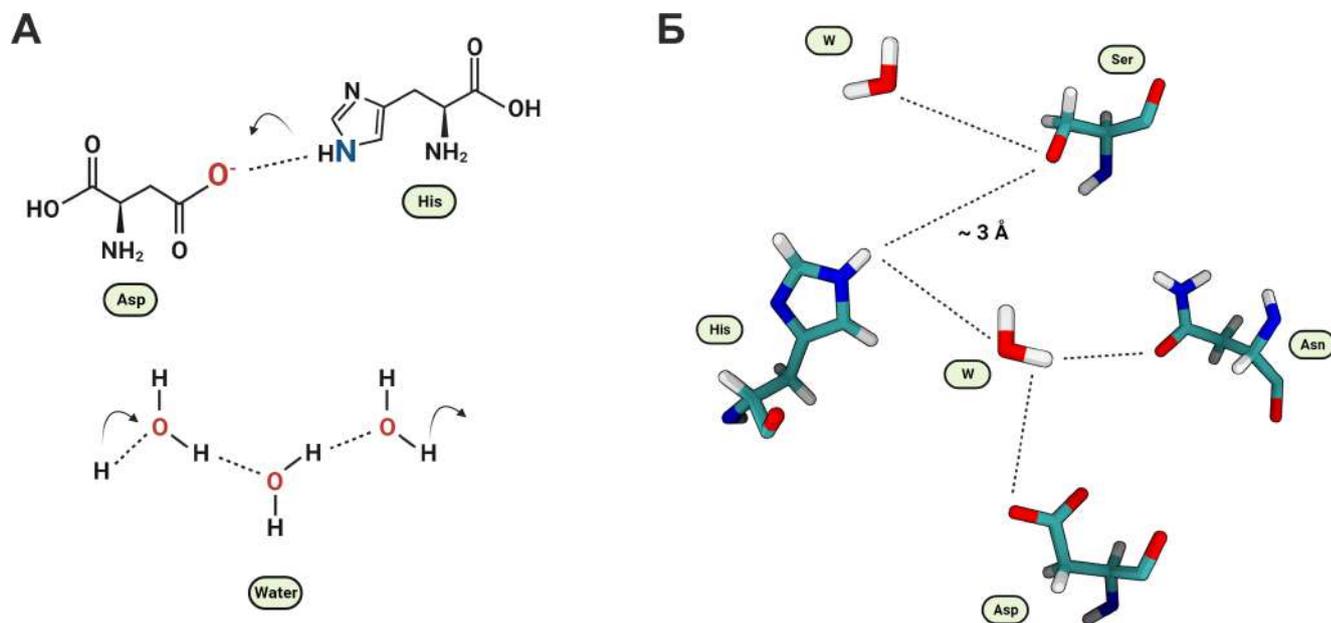
*c*-субъединицы (остатки 46-61) (Рисунок 2.1Г). Данный полуканал имел воронкообразную форму и представлял собой полость, на поверхности которой обнаружено значительное количество полярных аминокислот (аналогично полости во входном полуканале). Вблизи *cAsp61* было идентифицировано шесть аминокислотных остатков (*aGlu196*, *aSer199*, *aSer202*, *aLys203*, *aSer206* и *aTyr263*), которые могли образовывать цепь переноса протона (Рисунок 2.2Б).



**Рисунок 2.2.** Область вблизи *cAsp61* во входном (вид со стороны *b*-субъединицы) (А) и выходном (вид со стороны цитоплазмы) (Б) полуканалах. На спиральных показаны полярные аминокислоты, существенные для протонного транспорта. Здесь и далее субъединицы фактора  $F_0$  показаны как: *a*-субъединица (зеленая), *b*-субъединица (серая), *c*-субъединица (синяя).

Основываясь на многочисленных модельных экспериментах по исследованию протонного пути, предполагается, что движение протона по полуканалам АТФсинтазы происходит с участием боковых групп полярных аминокислотных остатков, а также молекул воды. В данной работе мы рассматриваем атомы кислорода молекул воды, атомы кислорода карбоксильных и гидроксильных групп и атомы азота амидных групп аминокислотных остатков, которые способны влиять на движение протона и образовывать с ним короткоживущие связанные состояния. Следует отметить, что боковые группы остатков аспарагина и глутамина могут функционировать как доноры/акцепторы протона за счет образования енольной формы [196]. Указанные атомы мы будем называть *центрами связывания протона*. При этом возможный путь движения протона

может быть определен, как последовательность аминокислот и молекул воды, расположенных на расстоянии около  $3 \text{ \AA}$ , что соответствует длине водородной связи (Рисунок 2.3).



**Рисунок 2.3.** Механизм протонного транспорта в полуканалах  $F_0F_1$ -АТФсинтазы. (А) Схема переноса  $H^+$  с участием аминокислотных остатков и молекул воды. (Б) Схема сети переноса протона, состоящей из аминокислотных остатков и молекул воды.

На основании данных крио-ЭМ структуры были рассчитаны расстояния между аминокислотными остатками полуканалов (Таблица 1, Таблица 2). Учет только аминокислот при прыжковом движении протона будет приводить к довольно низким значениям вероятности перехода с одного центра связывания на другой из-за их значительной удаленности друг от друга. Поэтому необходимо определить области локализации молекул воды в полуканалах, ввиду того что большинство структур АТФсинтаз представлены без явного указания их положений.

Таблица 1. Расстояния между аминокислотными остатками «узкого места» во входном полуканале, Å.

|                 | <i>a</i> Asp119 | <i>a</i> Ser144 | <i>a</i> Asn214 | <i>a</i> Glu219 | <i>a</i> His245 | <i>a</i> Gln252 | <i>c</i> Asp61 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| <i>a</i> Asn116 | 4,86            | 7,89            | 8,97            | 12,13           | 7,32            | 7,82            | 13,39          |
| <i>a</i> Asp119 |                 | 7,06            | 10,78           | 5,00            | 2,77            | 11,66           | 16,81          |
| <i>a</i> Ser144 |                 |                 | 10,29           | 8,44            | 7,96            | 10,98           | 15,43          |
| <i>a</i> Asn214 |                 |                 |                 | 13,65           | 9,03            | 4,07            | 6,11           |
| <i>a</i> Glu219 |                 |                 |                 |                 | 8,84            | 15,88           | 19,59          |
| <i>a</i> His245 |                 |                 |                 |                 |                 | 9,08            | 14,50          |
| <i>a</i> Gln252 |                 |                 |                 |                 |                 |                 | 6,47           |

Таблица 2. Расстояния между аминокислотными остатками в выходном полуканале, Å.

|                 | <i>a</i> Ser199 | <i>a</i> Ser202 | <i>a</i> Lys203 | <i>a</i> Ser206 | <i>a</i> Tyr263 | <i>c</i> Asp61 |
|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| <i>a</i> Glu196 | 3,67            | 10,05           | 6,16            | 13,05           | 11,92           | 6,86           |
| <i>a</i> Ser199 |                 | 6,56            | 3,85            | 9,56            | 8,78            | 4,80           |
| <i>a</i> Ser202 |                 |                 | 7,26            | 4,61            | 6,82            | 6,91           |
| <i>a</i> Lys203 |                 |                 |                 | 8,26            | 5,99            | 6,47           |
| <i>a</i> Ser206 |                 |                 |                 |                 | 4,11            | 9,97           |
| <i>a</i> Tyr263 |                 |                 |                 |                 |                 | 9,42           |

## 2.2. Оценка гидратации полуканалов с помощью модели твердых сфер

Для определения расположения молекул воды могут использоваться различные способы. Так, была разработана модель по размещению молекул воды в виде твердых сфер, учитывающая только геометрические параметры. Молекулы воды моделировались в виде атома кислорода и двух атомов водорода, взаимное расположение которых определено в соответствии с литературными данными [197]. Атомы представляют собой сферы с радиусами, равными радиусам Ван-дер-Ваальса (для кислорода 1,52 Å и для водорода 1,20 Å) [198]. Расстояние между центрами кислорода и водорода было принято равным 0,9584 Å, угол между ковалентными связями составил 104,45°.

В отличие от аминокислот, расположенных на спиральных полуканалах, молекулы воды обладают высокой подвижностью. В связи с этим отсутствуют рентгеноструктурные данные, позволяющие точно определить их положение в полуканале. Поэтому нами был разработан алгоритм, реализованный в программном пакете Matlab, который осуществляет стохастическое заполнение свободной области внутри полуканала молекулами воды с геометрическими параметрами, описанными выше.

На рисунке 2.4 приведена блок-схема алгоритма. Работа программы начинается с загрузки pdb-файла, который содержит информацию о структуре белка. По его данным строится домен моделирования в форме прямоугольного параллелепипеда, грани которого параллельны координатным осям, а размеры выбираются таким образом, чтобы массив точек pdb-структуры был вписан в параллелепипед. На первом этапе программы стохастически генерируется положение центра атома кислорода  $(x_O, y_O, z_O)$ , равномерно распределенное по домену. Далее выполняется проверка следующих условий:

- 1) атом кислорода находится внутри домена моделирования;
- 2) атом кислорода не перекрывается с атомами pdb-структуры (с учетом Ван-дер-Ваальсовых радиусов);
- 3) атом кислорода не перекрывается с атомами уже помещенных молекул воды в полуканале.

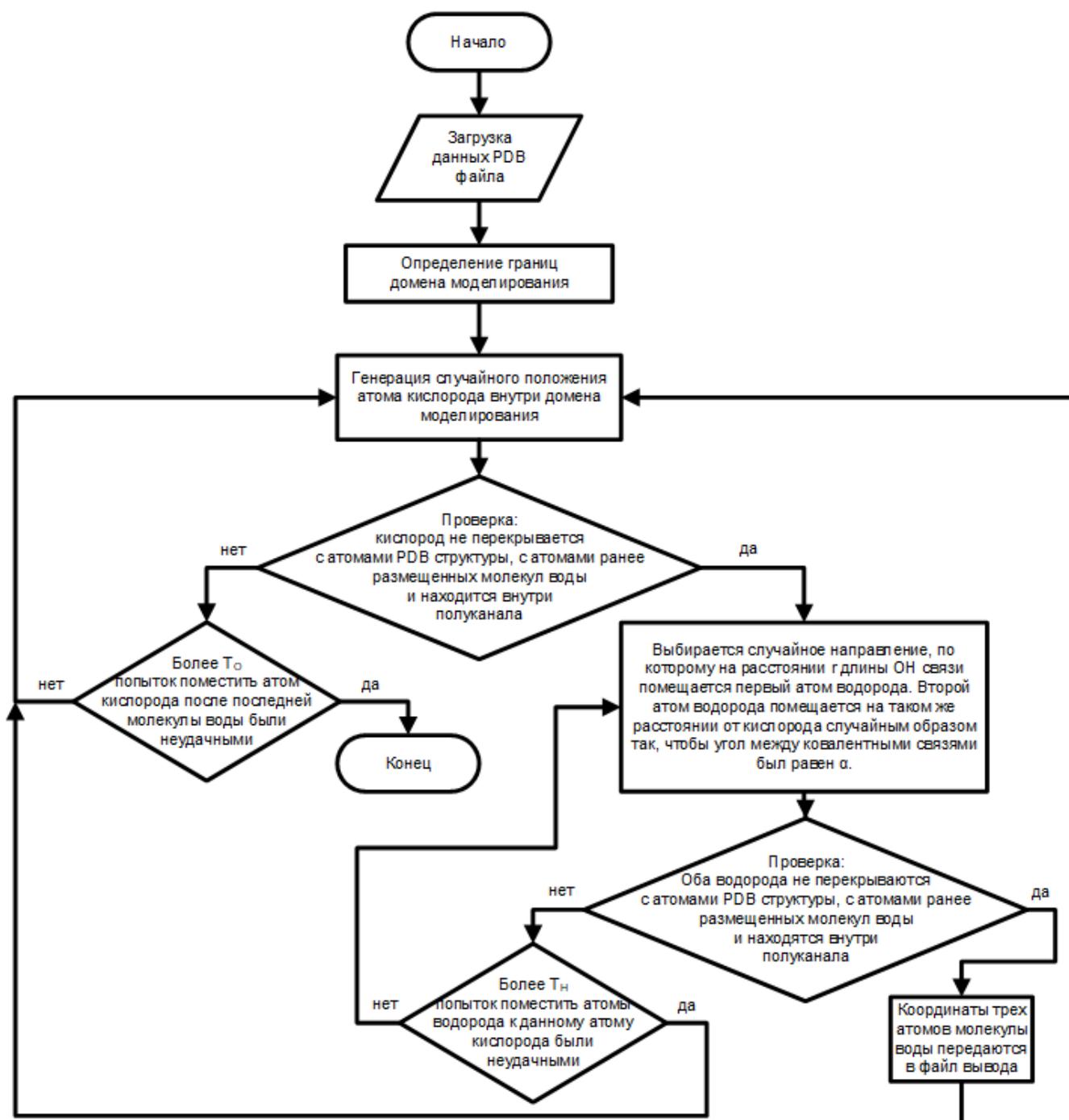
Если хотя бы одно из условий не выполняется, то положение атома кислорода генерируется еще раз, в противном случае программа переходит к генерации положений атомов водорода  $(x_{H1}, y_{H1}, z_{H1})$ . Первый из них может быть размещен произвольным образом на сфере радиуса  $r = 0,9584 \text{ \AA}$  с центром в середине атома кислорода. Для этого полярный  $\varphi$  и азимутальный  $\theta$  углы выбираются таким образом, чтобы все направления ковалентной связи были равновероятны:

$$\varphi = 2\pi\xi \quad (2.1)$$

$$\theta = \arccos(2\xi - 1) \quad (2.2)$$

где  $\xi$  — случайно распределенная величина от 0 до 1.

Далее необходимо разместить второй атом водорода  $(x_{H2}, y_{H2}, z_{H2})$ . Геометрическое место его возможных расположений — окружность, лежащая на



**Рисунок 2.4.** Блок-схема программы по размещению молекул воды в виде твердых сфер.

сфере радиуса  $r = 0,9584 \text{ \AA}$ , причем угол между ковалентными связями кислорода с атомами водорода должен составлять  $\alpha = 104,45^\circ$ . Это положение может быть задано случайным выбором одного полярного угла. Полученные атомы водорода должны быть проверены по условиям, аналогичным критериям, сформулированным для кислорода. Если их положение окажется недопустимым, то снова выполняется генерация угловых переменных. Попытки разместить атомы водорода при выбранном атоме кислорода повторяются  $T_n$  раз. Если последняя

попытка окажется неудачной, генерируется новый атом кислорода, размещение которого ограничивается  $T_0$  числом попыток. Если кислород и водороды проходят проверку, то координаты трех атомов, составляющих молекулу воды, записываются в файл. Далее процесс моделирования возобновляется для следующей молекулы.

Таким образом, зная положение центра атома кислорода и выбрав три случайные угловые переменные, задается положение и ориентация молекулы воды. В результате выполнения алгоритма получается набор координат всех размещенных атомов воды, а также общее количество размещенных молекул. Для оценки статистических свойств таких распределений алгоритм может выполняться многократно.

Необходимо отметить, что не все распределения, получаемые в результате работы программы, оптимальны с точки зрения плотности упаковки молекул воды. В ситуации, когда случайная расстановка приводит к образованию полости, размеры которой приближаются к размерам молекул, это пространство не будет занято другими молекулами. В рамках подходов, основанных на молекулярной динамике, отбор оптимальных состояний может быть основан на методе отжига, который включает в себя случайное изменение параметров системы с постепенным снижением температуры, что позволяет избежать застревания в локальных минимумах. В случае размещения молекул воды в виде твердых сфер такой подход не применим. Однако, основываясь на эргодической гипотезе, оптимизацию по времени можно заменить на оптимизацию по статистическому ансамблю. Таким образом, отбор оптимальных распределений выполняется статистически — из сгенерированных наборов выбирается тот, который характеризуется максимальной плотностью упаковки (максимальным числом молекул воды).

С одной стороны алгоритм должен решать задачу за разумное время, что обусловлено ограничением вычислительных ресурсов, а с другой обеспечивать приемлемое соответствие модели реальности, которое в нашем случае контролируется по макроскопической плотности воды. При выбранном подходе, когда атомы могут быть случайно распределены в полуканале, не существует строгого критерия, отвечающего на вопрос, можно ли разместить в полуканале еще одну молекулу воды в дополнение к имеющимся. Косвенным критерием служит невозможность отыскать допустимое положение молекулы после большого числа случайных попыток. Поэтому выбор предельного числа попыток

размещения атома ( $T_O$  и  $T_H$ ) при реализации алгоритма должен быть сделан с учетом всех этих факторов.

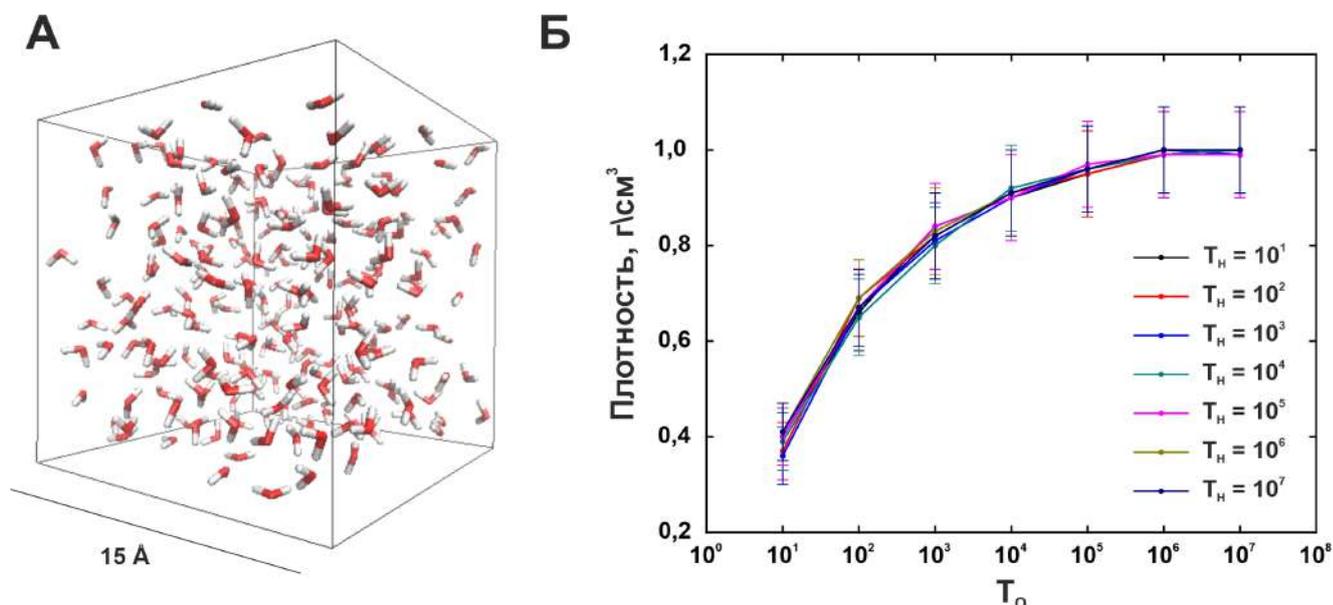
Для валидации алгоритма с его помощью заполнялась молекулами воды кубическая ячейка с длиной ребра 15 Å, имеющая объем близкий к характерному объему водных полостей внутри  $\alpha$ -субъединицы АТФсинтазы. При этом число попыток размещения атомов  $T_O$  и  $T_H$  варьировались от 10 с увеличением последующего значения на порядок до  $10^7$ . Для каждой пары значений  $T_O$  и  $T_H$  генерировалось десять распределений молекул воды в кубической ячейке, из которых отбиралось распределение с максимальным числом молекул воды. Зная число молекул воды  $N$ , размещенных в известном объеме  $V$ , можно оценить плотность:

$$\rho_{H_2O} = \frac{N \cdot M}{N_A \cdot V} \quad (2.3)$$

где  $M$  — молярная масса воды,  $N_A$  — число Авогадро.

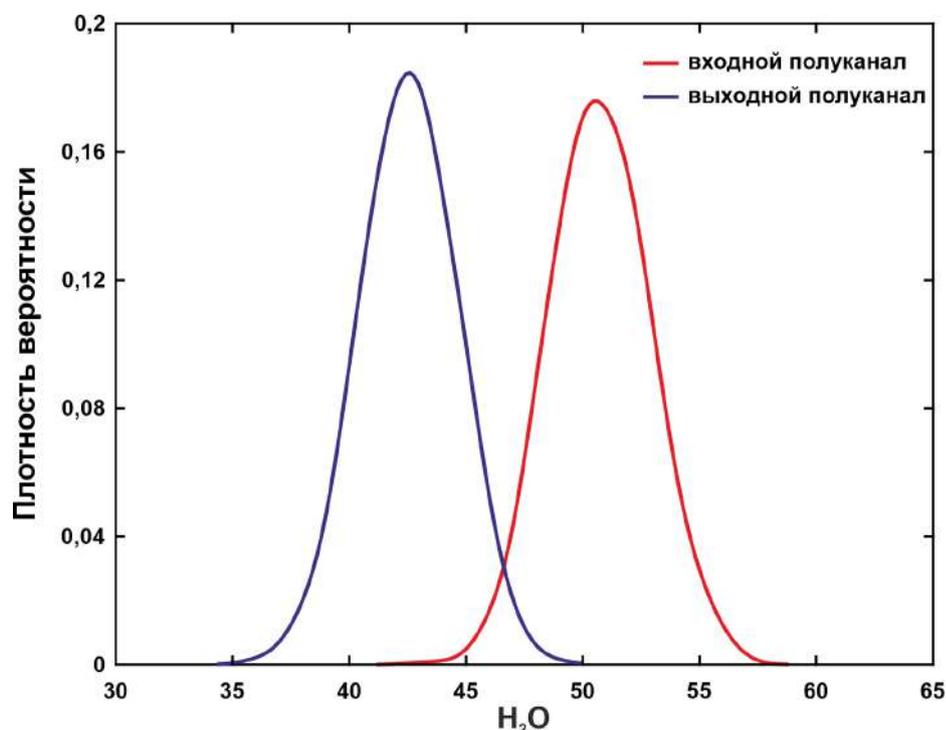
Полученные значения плотностей представлены на рисунке 2.5. Установлено, что изменение параметра  $T_H$  при фиксированном значении  $T_O$  не оказывает влияния на объемную плотность воды в кубической ячейке. При этом низкие значения параметра  $T_O$  приводят к недостаточно плотной упаковке молекул, и как следствие к заниженным значениям плотности воды. Например, при значениях  $T_O \leq 10^4$  относительное отклонение от табличного значения плотности воды составляет более 10%. При значениях  $T_O = 10^6$  для областей, близких по объему к характерному размеру полуканалов, наблюдается хорошее согласие с объемной плотностью воды, а увеличение предельного числа попыток  $T_O$  до  $10^7$  не приводит к значимому росту максимального числа молекул (выход на плато), которые удастся разместить в кубической ячейке по предложенному алгоритму. Поэтому в качестве параметров моделирования были выбраны значения  $T_H$  и  $T_O$  равные  $10^5$  и  $10^6$ , соответственно.

Описанный алгоритм размещения молекул воды позволяет провести оценку гидратации полостей в полуканалах АТФсинтазы. Следует отметить, что для входного полуканала оценка гидратации была выполнена только для полости на границе с мембраной, поскольку используемая модель твердых сфер плохо применима для плотноупакованных белковых участков, таких как «узкое место». Многократное выполнение программы привело к получению статистической выборки, содержащей 1000 распределений молекул воды для каждого полуканала. Поскольку координаты каждой молекулы задавались случайным



**Рисунок 2.5.** Валидация алгоритма по размещению молекул воды в виде твердых сфер. (А) Молекулы воды в кубической ячейке с длиной ребра 15 Å. (Б) Объемная плотность воды в кубической ячейке при различных значениях числа попыток размещения атомов кислорода  $T_O$  и водорода  $T_H$ .

образом, в полученной выборке наблюдаются распределения как с малым числом молекул, так и с довольно плотной упаковкой. На рисунке 2.6 представлена плотность вероятности количества молекул воды, которые могут быть размещены в полуканалах. В водной полости входного полуканала минимальное число молекул составило 43, а максимальное — 57; в выходном полуканале количество молекул варьировалось от 35 до 49. При этом в обоих полуканалах не было выявлено предпочтительных мест локализации молекул, а они были равномерно распределены по объему водных полостей.



**Рисунок 2.6.** Плотность распределения числа молекул воды во входном (красная) и выходном (синяя) полуканалах бактериальной АТФсинтазы, полученная с помощью модели твердых сфер (учитывает только геометрические параметры модельной системы).

### 2.3. Предсказание локализации молекул воды в полуканалах с учетом электростатических взаимодействий

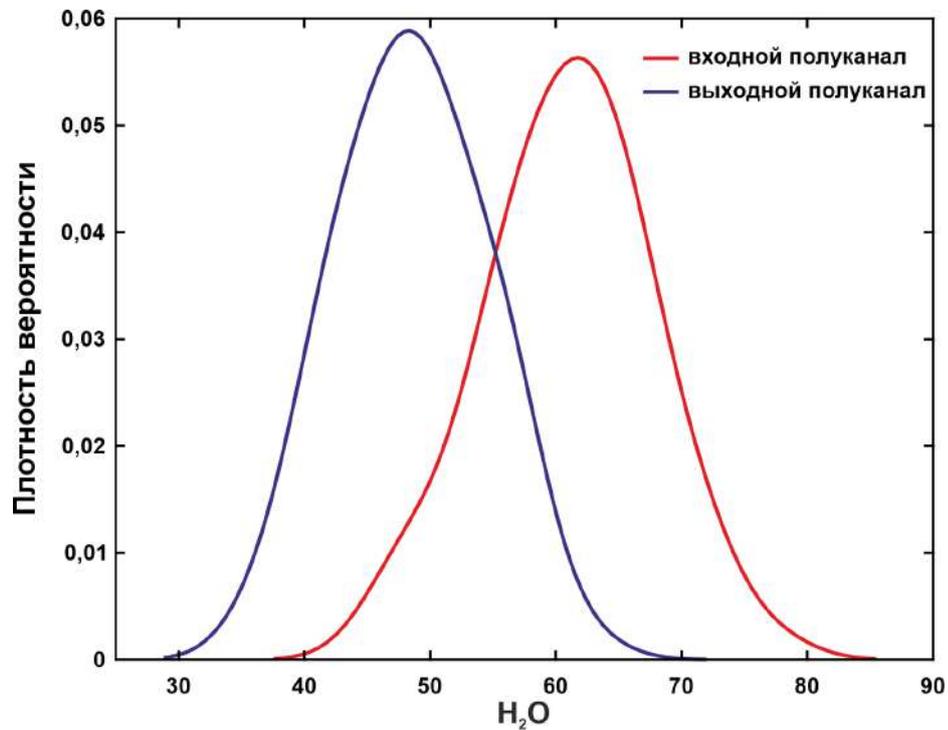
Описанный в предыдущем пункте алгоритм моделирования возможных положений молекул воды не учитывает электростатических взаимодействий молекул воды друг с другом и с аминокислотами белка. В связи с этим, полученные распределения могут содержать артефакты. Для учета не только геометрических размеров модельной системы, но и электростатических взаимодействий между атомами использовалась программа Dowser++ [124].

Dowser++ — широко используемый пакет, предназначенный для предсказания внутренних молекул воды в белковых структурах. Он был валидирован на основе набора из 15 кристаллических структур белков с высоким разрешением, содержащих большое количество размещенных внутренних молекул воды [124]. В качестве входного файла программа требует pdb-файл с координатами атомов белка, в качестве результата она создает другой pdb-файл с перечнем координат размещенных молекул воды вместе со значениями их

энергий. Для этого область моделирования разбивается на кубические ячейки размером  $15 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA} \times 15 \text{ \AA}$ . К каждой ячейке применяется алгоритм WaterDock [199], который находит внутренние полости в белке размером более  $1 \text{ \AA}$  и заполняет их молекулами воды методом минимизации энергии. Полная энергия представляет собой сумму потенциала Леннарда-Джонса и потенциала электростатического взаимодействия молекулы воды с окружающими ее зарядами атомов белка и другими молекулами воды. Для того, чтобы эффекты электронной поляризации были учтены должным образом, программа отбрасывает молекулы с энергиями более  $-4$  ккал/моль ( $-174$  мэВ), что является максимальной энергией связи молекулы воды в белке. Наконец, молекулы воды, предсказанные в каждой ячейке, собираются в один файл и сортируются по их значениям свободной энергии (в убывающем порядке абсолютных значений энергий). В случае, когда две молекулы имеют одинаковую энергию, выше по списку указывается молекула воды, которая была размещена первой. Если расстояние между молекулами воды из соседних ячеек составляет менее  $2,4 \text{ \AA}$ , молекула с меньшим абсолютным значением энергии отбрасывается. Чтобы гарантировать, что полученное распределение содержит молекулы только внутри белка, внешние молекулы удаляются с помощью утилиты drain, включенной в Dowser++.

С помощью программы Dowser++ была получена статистическая совокупность из 100 распределений молекул воды. В водной полости входного полуканала минимальное число молекул составило 40, а максимальное — 85. Наиболее вероятны были распределения с 62 молекулой. В выходном полуканале количество молекул варьировалось от 29 до 70. При этом наиболее часто встречающимися были распределения с 48 молекулами воды (Рисунок 2.7).

Кроме того, для выявления общих закономерностей расположения молекул воды в «узком месте» входного полуканала был проведен кластерный анализ с использованием алгоритма DBSCAN (Density-based spatial clustering of applications with noise, плотностной алгоритм пространственной кластеризации с присутствием шума) [200]. В качестве входных данных алгоритм требует множество объектов  $X$ , для которых задана метрическая функция расстояния  $\rho$ , а также максимальное расстояние между соседними объектами  $\epsilon$  и минимальное количество соседних объектов, необходимых для образования кластера minPts.



**Рисунок 2.7.** Плотность распределения числа молекул воды во входном (красная) и выходном (синяя) полуканалах бактериальной АТФсинтазы, полученная с использованием программы Dowser++ (учитывает не только геометрические размеры модельной системы, но и электростатические взаимодействия между атомами).

Основная идея метода заключается в том, что для каждой точки кластера окрестность заданного радиуса  $\varepsilon$  должна содержать как минимум  $\text{minPts}$  количество точек, т.е. плотность в окрестности должна превышать некоторый порог. Введем основные определения:

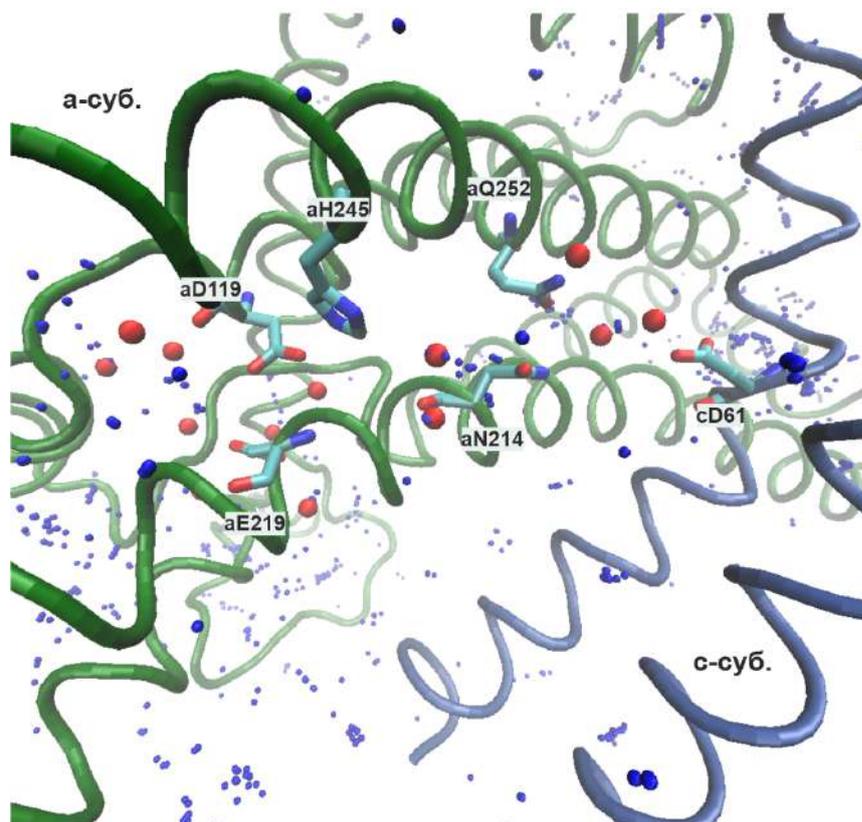
- объект  $p \in X$  называется корневым, если в  $\varepsilon$ -окрестности точки  $p$  находятся  $\text{MinPts}$  объектов (включая сам объект  $p$ ). Эти объекты называются напрямую достижимыми из  $p$ ;
- объект  $p \in X$  называется достижимым из  $p$ , если существует путь  $p_1, \dots, p_n$ , где  $p_1 = p$  и  $p_n = q$ , а каждый объект  $p_{i+1}$  напрямую достижим из  $p_i$ . Таким образом все объекты в пути, кроме объекта  $q$ , должны быть корневыми;
- шумом называются все объекты, недостижимые ни из одного другого объекта;
- кластером является множество корневых точек, достижимых друг из друга, а также граничные некорневые точки, которые достижимы из любой корневой точки кластера.

В данной работе параметр кластеризации  $\epsilon$  равнялся 1 Å, как характерный радиус молекулы воды, а параметр `minPts` варьировался таким образом, чтобы минимальное количество соседних объектов, необходимых для образования кластера, составляло более 70% от общей совокупности, а количество объектов, попавших в шум, было минимально.

Работа программы начинается с произвольного выбора необработанного объекта  $p$ , после чего он отмечается как обработанный. Затем находятся соседние объекты в  $\epsilon$ -окрестности объекта  $p$ , и если количество соседних объектов (с учетом его самого) больше или равно `MinPts`, то объект  $p$  помечается как корневой. Если объект  $p$  является корневым, то создаётся новый кластер и запускается поиск по необработанным объектам, находя все элементы кластера. В кластер добавляются все объекты, удаленные от объектов, уже отнесенных к кластеру, менее чем на  $\epsilon$ . Если объект  $p$  не является корневым, то он отмечается как шум.

Кластеры помеченных точек, сформированные в ходе этого алгоритма, максимальны (т.е. их нельзя расширить ещё одной точкой, чтобы удовлетворялись условия) и связны в смысле плотно-достижимости. Отсюда следует, что, если мы обошли не все точки, можно перезапустить обход из какого-нибудь другого корневого объекта, и новый кластер не поглотит предыдущий.

В данной работе входными данными для алгоритма кластеризации являлись координаты атомов кислорода молекул воды, полученные с помощью `Dowser++`. В результате проведенного анализа было кластеризовано 98% молекул, что свидетельствует о четкой организации их пространственного распределения внутри белка. Было обнаружено 13 различных кластеров (каждый кластер соответствует конкретному положению молекулы воды): восемь из них были расположены рядом с остатками *aGlu219*, *aAsp119* и *aHis245*, образующими «ворота» в самом начале «узкого места»; два — между остатками *aHis245* и *aAsn214*; три — в области около *cAsp61* (Рисунок 2.8).



**Рисунок 2.8.** Молекулы воды на границе *a*-субъединицы (зеленые спирали) и *c*-кольца (синие спирали) в структуре бактериальной  $F_0$ -АТФсинтазы. Синие точки отображают все положения молекул воды, полученные с помощью программы Dowser++. Красными сферами отмечены наиболее предпочтительные области локализации молекул воды в «узком месте» входного полуканала, полученные в результате кластерного анализа с использованием алгоритма DBSCAN. На спиралях выделены существенные аминокислотные остатки.

#### 2.4. Молекулярно-динамическое моделирование мембранной части АТФсинтазы в гомогенном липидном бислое

На основе кристаллографических данных о структурах АТФсинтаз, которые предоставляют важную информацию о взаимном расположении субъединиц мембранной части фермента, были описаны области протонных полуканалов, определены точные координаты атомов боковых групп существенных аминокислотных остатков, а также проведено моделирование возможных положений молекул воды внутри белка. Однако, эти статические структуры не дают полного понимания о возможной динамике белкового комплекса, различных конформационных состояниях и деталях его взаимодействия с локальным

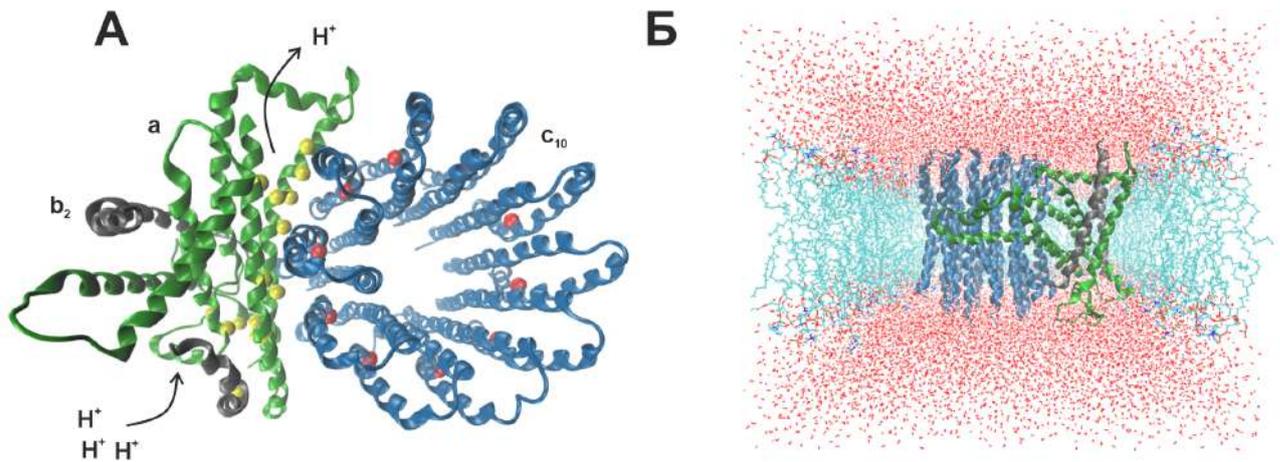
окружением. Для выяснения этих вопросов предлагается использовать метод молекулярно-динамического моделирования, который позволяет рассмотреть эволюцию функциональных процессов и исследовать структурные особенности и физико-химические свойства сложных биологических систем [201].

В основе метода молекулярной динамики лежит представление о многоатомной молекулярной системе как о классической системе взаимодействующих материальных точек. Потенциальная энергия системы определяется в виде суммы вкладов от различных типов взаимодействий между атомами: потенциальной энергии валентных связей, валентных углов, торсионных углов, кулоновских сил и взаимодействий Ван-дер-Ваальса. Однако, данный метод подразумевает малый шаг (фс) на временной сетке, что ограничивает его применение для оценки длительных *in vivo* процессов [202]. Тем не менее, современные вычислительные ресурсы позволяют проводить расчеты сложных биологических систем, таких как мембранные белки, в микросекундном временном масштабе. В связи с этим выбор МД моделирования в качестве подхода для исследования процесса протонного транспорта, который происходит в наносекундном временном масштабе, представляется обоснованным.

#### 2.4.1. Подготовка модельной системы

За основу была взята атомистическая модель мембранной части фермента [PDB ID: 6VWK], описанная в разделе 2.1. Молекулярная модельная система белка содержала *a*-субъединицу, кольцо из десяти *c*-субъединиц, а также мембранные части двух *b*-субъединиц (остатки с 4 по 35) (Рисунок 2.9А). С помощью веб-сервиса H<sup>++</sup> были рассчитаны протонированные состояния титруемых групп аминокислот при pH = 6,5,  $\epsilon_{\text{int}} = 2$  и  $\epsilon_{\text{ext}} = 80$  [203]. В *a*-субъединице существенные полярные аминокислоты *a*Asp119, *a*Ser144, *a*Glu196, *a*Lys203, *a*Glu219 находились в ионизированной форме, тогда как *a*Asn116, *a*Ser199, *a*Ser202, *a*Ser206, *a*Asn214, *a*His245, *a*Gln252 и *a*Tyr263 моделировались как нейтральные. *a*Arg210 находился в протонированном состоянии, т.е. имел положительный заряд, так как предполагается, что именно это состояние аргинина препятствует утечке протонов через мембрану и способствует вращению ротора. Ключевой *c*Asp61 всех *c*-субъединиц находился в прото-

нированном состоянии, за исключением аспартата, обращенного во входной полуканал. Кроме того, белок был встроен в гомогенный липидный бислои 1-пальмитоил-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC) с помощью плагина Membrane Builder [195] (Рисунок 2.9Б). Дополнительно в каждом листке мембраны внутрь *c*-кольца был встроен один PC липид. Систему сольватировали молекулами воды TIP3P [204], а также добавляли противоионы (150 мМ KCl) для нейтрализации общего заряда системы. Полная модельная система включала около 130 000 атомов, а общий размер составил  $130 \text{ \AA} \times 130 \text{ \AA} \times 90 \text{ \AA}$ .



**Рисунок 2.9.** Модельная система мембранной части бактериальной АТФ-синтазы, включающая *a*-субъединицу, кольцо из десяти *c*-субъединиц и две укороченные *b*-субъединицы. (А) Вид сверху (из цитоплазмы). Полярные аминокислотные остатки, предположительно участвующие в транспорте протонов, показаны желтыми сферами. Стрелки указывают предполагаемое направление движения протонов. (Б) Вид сбоку (из мембраны). Липидный POPC бислои и молекулы растворителя представлены голубыми и красными линиями соответственно.

#### 2.4.2. Параметры молекулярно-динамического моделирования

Для анализа возможных областей движения протона, исследования структурной динамики боковых групп аминокислот и гидратации белка было проведено молекулярно-динамическое моделирование с помощью программы

NAMD [205] при периодических граничных условиях с использованием силового поля CHARMM36 [206, 207]. При этом число атомов в системе, а также температура и давление оставались неизменными (NPT ансамбль). Для поддержания постоянной температуры 300 К и давления 1 бар использовали термостат и анизотропный поршневой баростат Ланжевена. Взаимодействия Ван-дер-Ваальса рассчитывались с отсечкой 12 Å, включая переключение после 10 Å. Дальнодействующие электростатические взаимодействия рассчитывались с использованием метода Particle Mesh Ewald (PME) с отсечкой 12 Å. Шаг интегрирования составил 2 фс, а запись координат осуществлялась каждые 2 пс.

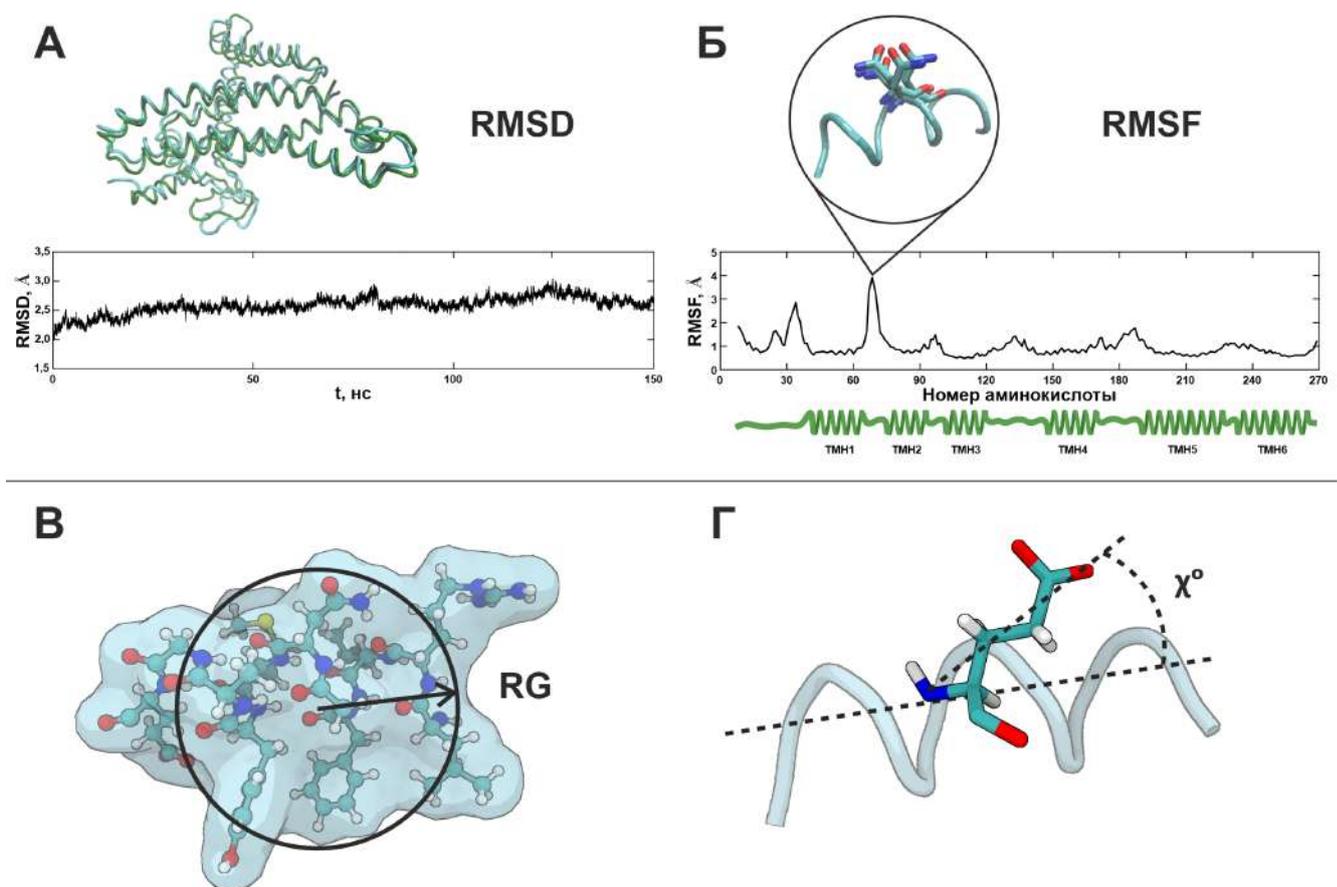
МД моделирование состояло из четырех этапов. На первых трех этапах производилась минимизация энергии и уравнивание модельной системы для коррекции возможных неестественных атомных позиций, возникших в результате ручного встраивания фермента в липидный бислой. На первом этапе все атомы системы, за исключением атомов ацильных цепей липидов, были жестко фиксированы в течение 5 нс (плавление липидных хвостов). На втором этапе проводилось уравнивание с ограниченным белком в течение 5 нс. Здесь отпускались атомы полярных головок липидов, ионов и молекул воды, в то время как на белок накладывались гармонические ограничения с использованием силовой константы 2 ккал/моль/Å<sup>2</sup>, чтобы обеспечить адаптацию окружающей среды к белку в его кристаллической форме. Также на этом этапе применялся tcl скрипт `keep_water_out` для предотвращения проникновения молекул воды в гидрофобные области во время уравнивания. После того как липиды были хорошо упакованы вокруг белка, а вода не попала в запрещенные области, были сняты гармонические ограничения с боковых групп аминокислотных остатков, однако белковый остов (N, C<sub>α</sub>, C, O атомы в каждой аминокислоте) оставался фиксированным. Уравнивание с частично освобожденным белком продолжалось в течение 5 нс. На последнем этапе, который называется производственный цикл, МД моделирование проводилось без ограничений в течение 150 нс. Для оценки воспроизводимости процесса моделирование повторялось три раза в независимых запусках, которые отличались только случайными начальными скоростями движения атомов системы (запуск1-3).

### 2.4.3. Параметры структурного анализа и визуализация

Наше внимание было сфокусировано на  $\alpha$ -субъединице, поскольку именно в ней расположены протонные полуканалы. Для оценки структурной стабильности фермента в каждом запуске были рассчитаны среднеквадратичные отклонения (RMSD) и среднеквадратичные флуктуации (RMSF) положений атомов  $C_\alpha$  аминокислот, а также радиус инерции (RG). RMSD представляет собой отклонение набора координат атомов белка от эталонного набора, который в молекулярной динамике представлен начальной точкой моделирования. Таким образом, данный параметр позволяет наблюдать, как координаты атомов фермента эволюционируют с течением времени относительно кристаллической структуры белка (Рисунок 2.10А). В то же время, параметр RMSF не указывает на позиционные различия во времени, а позволяет оценить индивидуальную подвижность аминокислотных остатков, т.е. насколько сильно перемещается конкретный остаток за все время моделирования (Рисунок 2.10Б). RG отражает общую компактность и размер белковой системы во время МД моделирования (Рисунок 2.10В).

Полученные МД траектории были использованы для изучения возможных центров связывания протона, которые могут быть включены в цепь его переноса. Однако следует отметить, что в проведенном эксперименте с применением классической МД непосредственно процесс протонирования или депротонирования не рассматривался, и сам перенос протона не моделировался. Как уже отмечалось выше, для определения возможного пути движения протона мы рассматривали сеть полярных аминокислотных остатков, расположенных на расстоянии около 3 Å, что соответствует примерной длине водородной связи. В областях, где расстояния превышали этот порог, вероятность присутствия молекул воды была высока.

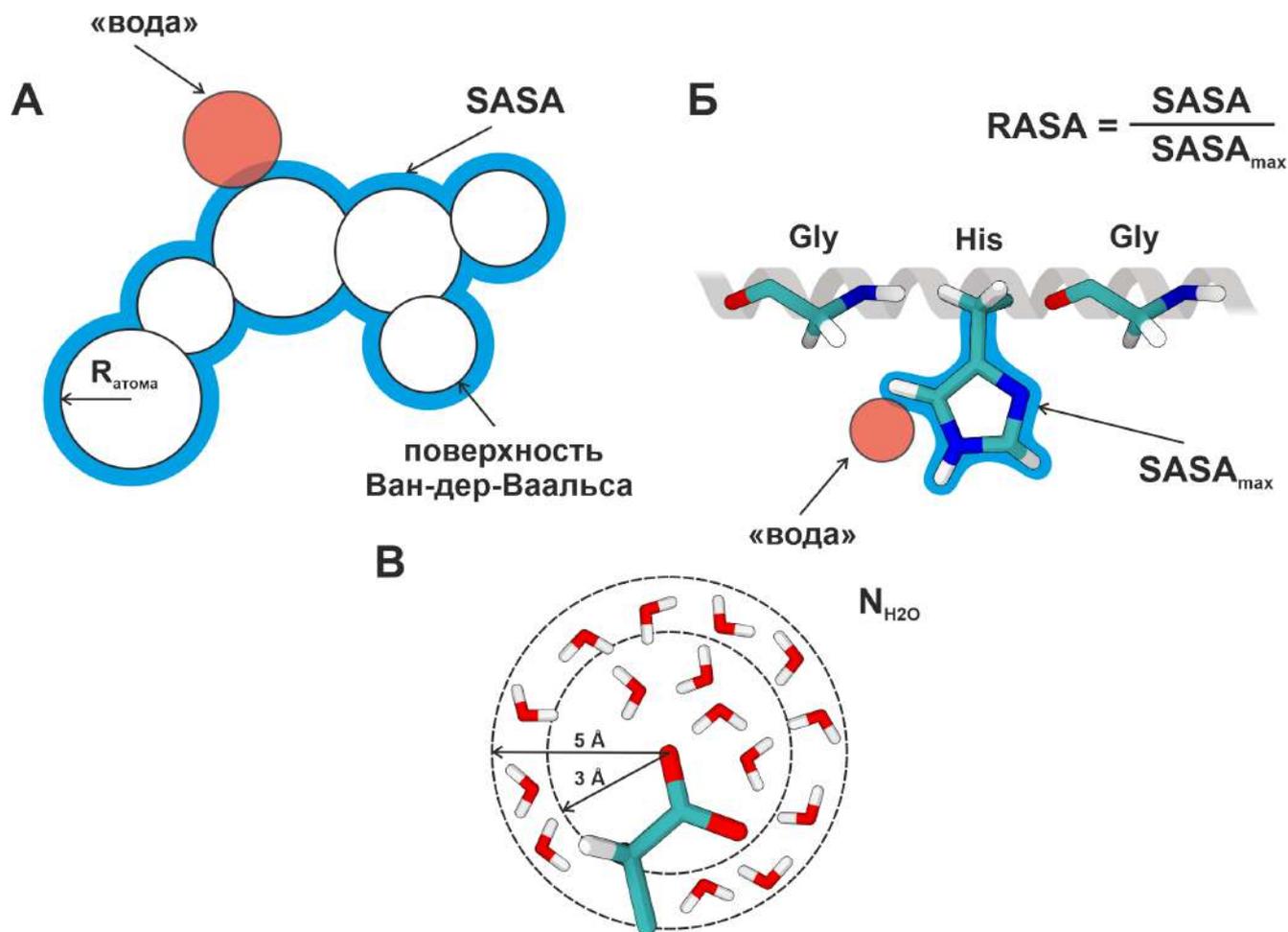
Для оценки возможности проникновения молекул воды внутрь полуканалов была рассчитана абсолютная площадь поверхности, доступная для растворителя (SASA). Для расчета этого параметра использовался алгоритм «rolling ball», в котором используется сфера радиуса, соответствующего молекуле воды, для зондирования поверхности боковых групп внутренних аминокислот (Рисунок 2.11А). Также была рассчитана относительная площадь поверхности, доступная для растворителя (RASA), которая равна отношению SASA и мак-



**Рисунок 2.10.** Параметры структурного анализа: (А) среднеквадратичные отклонения (RMSD) и (Б) среднеквадратичные флуктуации (RMSF) положений атомов  $C_{\alpha}$  аминокислот, (В) радиус инерции (RG), (Г) угол  $\chi$  между боковой группой и осью  $\alpha$ -спирали ( $C_{\alpha}$ -N-X, где X – атом, выступающий в качестве донора/акцептора  $H^{+}$ ).

симально возможной площади поверхности для данного остатка  $SASA_{max}$ . В работе использовалась шкала значений  $SASA_{max}$  из [208], которые были получены на основе трипептидов Gly-X-Gly, где X – интересующий остаток (Рисунок 2.11Б). Кроме того, для оценки гидратации фермента было рассчитано количество молекул воды, находящихся на расстоянии до 3-5 Å от атомов боковых групп существенных аминокислот (Рисунок 2.11В), а также исследованы области их преимущественной локализации с использованием методов кластерного анализа.

Для исследования динамики существенных аминокислот были рассчитаны среднеквадратичные флуктуации (RMSF) атомов боковых групп, которые могут выступать в качестве донора/акцептора протона (OD2 для Asp, OE2 для Glu, ND1/NE2 для His, NE/NH1/NH2 для Arg, NZ для Lys, OG для Ser, OH для Tyr, OD1/ND2 Asn, OE1/NE2 для Gln). Еще одним параметром, позволяющим

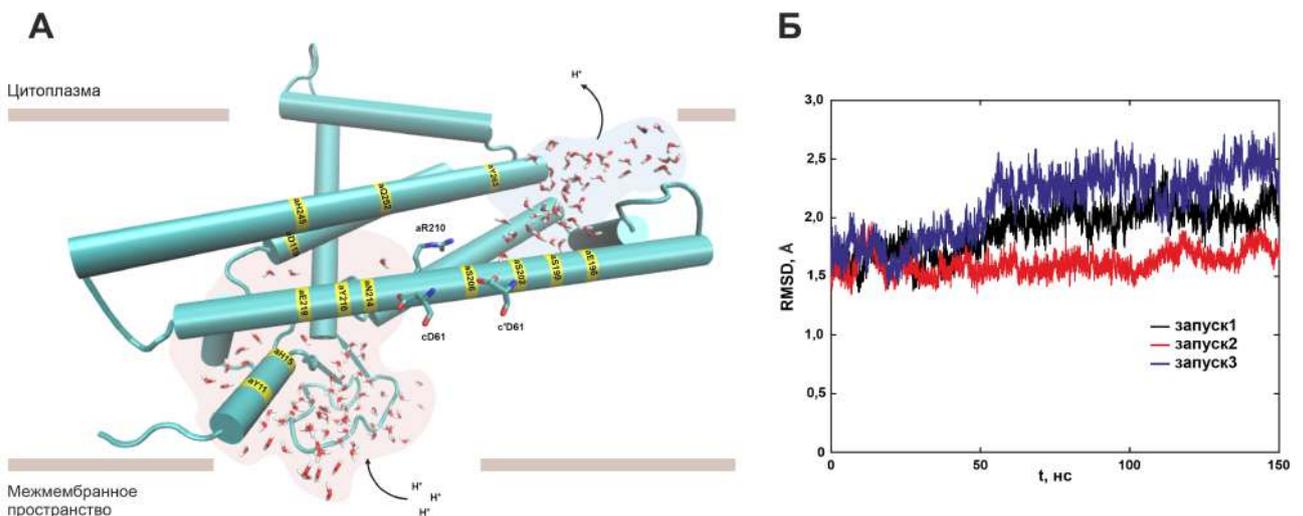


**Рисунок 2.11.** Параметры структурного анализа: (А) абсолютная площадь поверхности, доступная для растворителя (SASA), (Б) относительная площадь поверхности, доступная для растворителя (RASA), (В) число молекул воды, находящихся на расстоянии до 3-5 Å от атомов боковых групп существенных аминокислот, выступающих в качестве донора/акцептора  $\text{H}^+$ .

оценить мобильность боковой группы аминокислотного остатка, может выступать угол  $\chi$  между боковой группой и осью  $\alpha$ -спирали ( $\text{C}_\alpha\text{-N-X}$ , где X — атом, выступающий в качестве донора/акцептора  $\text{H}^+$ ) (Рисунок 2.10Г). Также были определены расстояния между всеми предполагаемыми центрами связывания протона (атомы аминокислот и воды), по каждой МД траектории длительностью 150 нс. Для вычислений и визуализации использовались встроенные модули программы VMD [195], а также собственные tcl-скрипты.

#### 2.4.4. Исследование потенциальной траектории движения протона через мембрану

На рисунке 2.12А представлена структура полуканалов бактериальной  $F_oF_1$ -АТФсинтазы, полученная в результате молекулярно-динамического моделирования. Здесь выделены все существенные полярные аминокислотные остатки, а также видно, что в белок проникает достаточно большое количество молекул воды, а в некоторых областях существуют целые полости, заполненные водой. Полученные для всех запусков средние значения RMSD ( $1,88 \text{ \AA}$ ) указывали на то, что система достигла равновесия и осталась стабильной, а силовое поле CHARMM36 дает правильные параметры мембраны. Средняя площадь на липид составила  $63,39 \text{ \AA}^2$ , а средняя толщина мембраны —  $39,06 \text{ \AA}$ , что соответствует экспериментальным данным для POPC мембран [209].



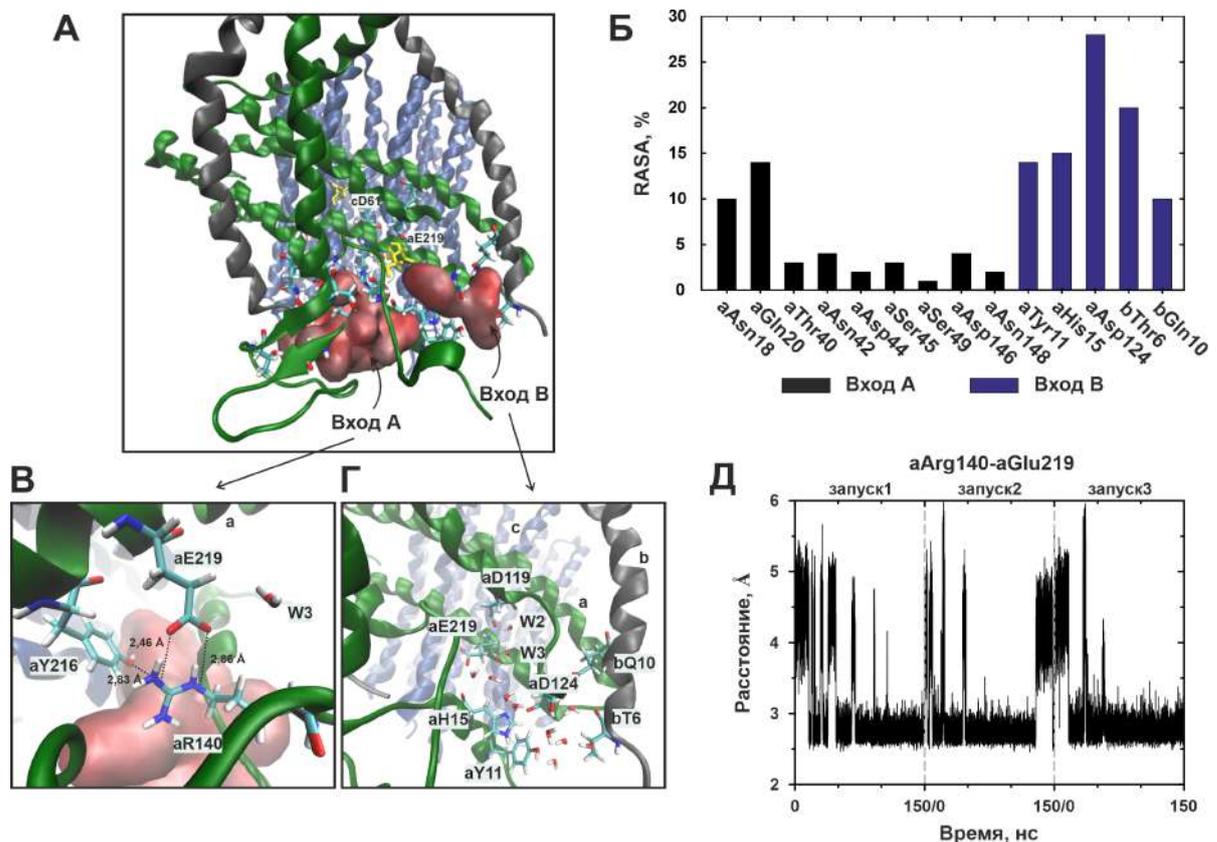
**Рисунок 2.12.** (А) Структура полуканалов бактериальной  $F_oF_1$ -АТФсинтазы, полученная в результате МД моделирования. (Б) График RMSD положений атомов  $C_\alpha$  аминокислот в течение 150 нс МД моделирования для трех независимых запусков.

Для определения возможного пути движения протона были подробно изучены области полуканалов. В *a*-субъединице на границе с мембраной со стороны периплазмы была обнаружена водная полость или лакуна (Рисунок 2.13А). Боковые группы полярных аминокислот, формирующие стенки полости, обладали хорошей водной доступностью (Рисунок 2.13Б). Средние значения RASA составили около 5%. Гидрофильная среда способствовала проникновению в полость значительного количества молекул воды, в среднем в каждый момент

моделирования в лакуне находилось 64 молекулы. Примечательно, что плотность вероятности распределения воды во входной лакуне, полученная при МД моделировании, соответствовала результатам моделирования молекул воды с использованием программы Dowser++. При этом среднее количество молекул воды на 10% превышало число молекул, зафиксированное в наиболее оптимальном распределении, установленном с помощью модели твердых сфер (Рисунок 2.14). Также следует отметить, что молекулы воды в лакуне непрерывно обновлялись из окружающей среды. Мы предполагаем, что данная водная полость может являться источником свободного  $H^+$ , т.е. протон попадает во входной полуканал через нее, например, по механизму Гротгуса.

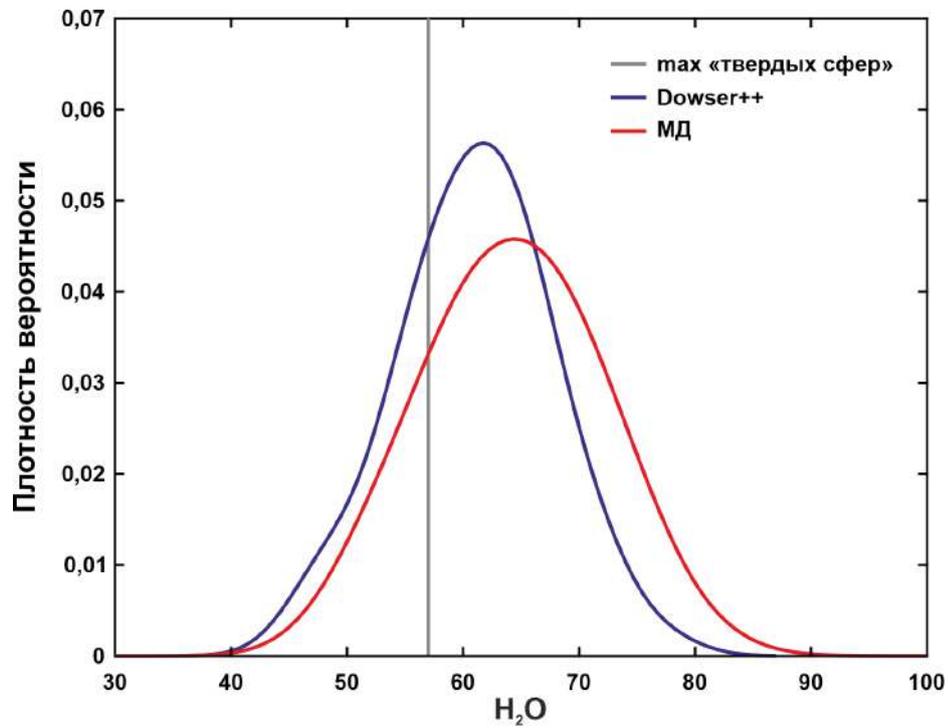
Аминокислоты *a*Tyr216 и *a*Arg140 были расположены над водной полостью, а их боковые группы ориентированы внутрь нее. Эти остатки могли захватывать протон и передавать его на существенный *a*Glu219, который находился в самом начале «узкого места». На рисунке 2.13В показаны минимальные расстояния, наблюдаемые в процессе МД моделирования. Перенос протона на *a*Glu219 был возможен только с *a*Arg140, однако, график расстояний между этими остатками показал несколько стационарных состояний, в которых среднее расстояние составляло от 2,75 Å до 4,5 Å в трех независимых запусках (Рисунок 2.13Д). Таким образом, перенос протона в данной области был возможен не всегда, а переключение между этими стационарными состояниями может существенно повлиять на параметры движения.

Кроме того, был обнаружен еще один возможный способ проникновения протона в полуканал (Рисунок 2.13Г). Рядом с основной водной лакуной была обнаружена еще одна водная полость, стенки которой образованы полярными аминокислотами *a*-субъединицы (*a*Tyr11, *a*His15, *a*Asp124) и *b*-субъединицы (*b*Thr6, *b*Gln10). Эти остатки также обладали высокой водной доступностью. Средние значения RASA составили около 17%, хотя наблюдались отдельные отклонения до 60%. Указанные аминокислоты вместе с молекулами воды образовывали цепь, по которой протоны могли перемещаться из периплазмы к *a*Glu219. Таким образом, были выявлены два возможных способа проникновения протона во входной полуканал. Вероятно, один из них может быть использован в качестве резерва в случае возникновения критических конформационных изменений или мутаций. Кроме того, предполагается, что они могут играть ключевую роль во время переноса протона в периплазму в процессе гидролиза.



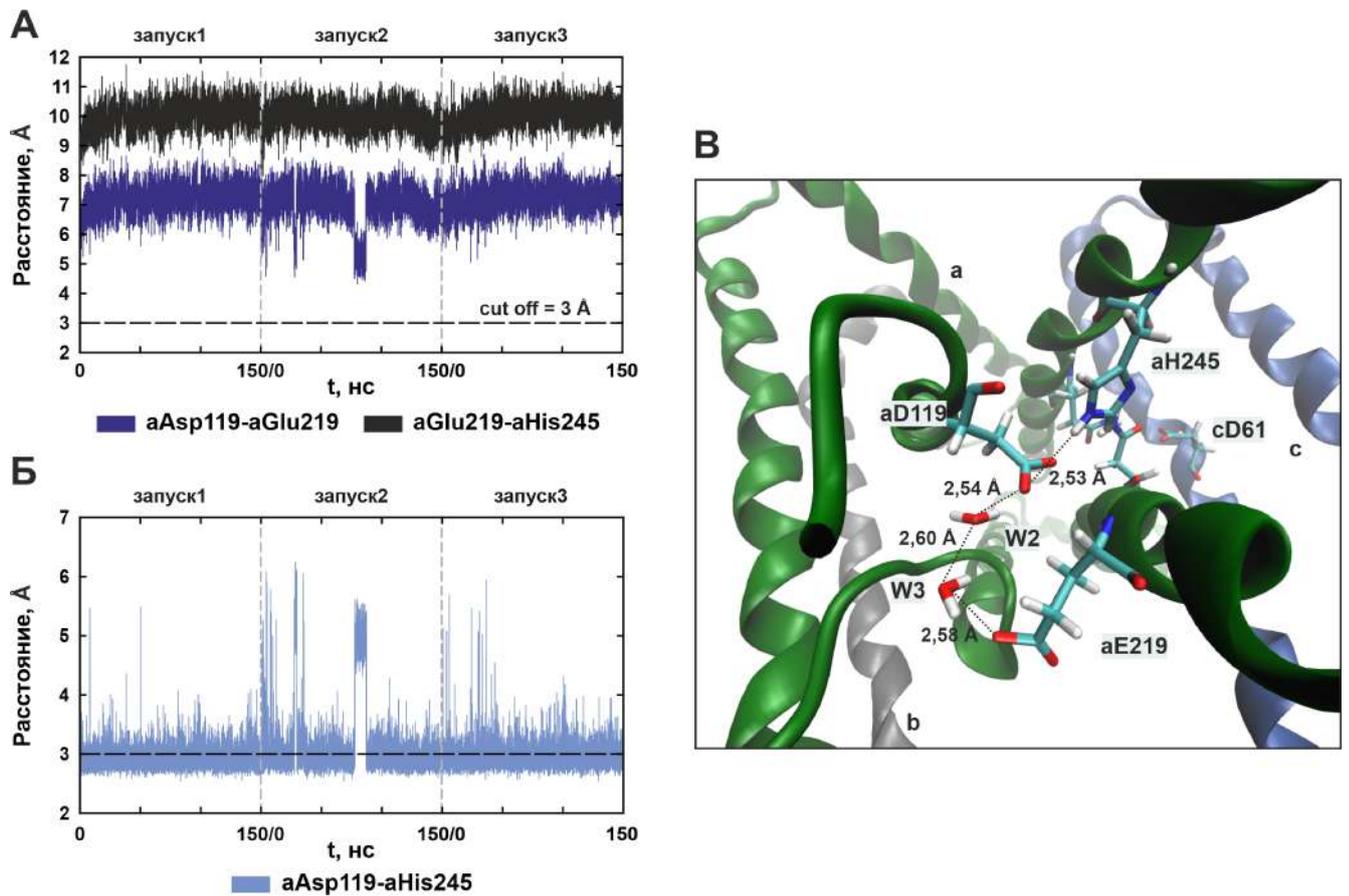
**Рисунок 2.13.** (А) Водные полости входного полуканала, полученные в результате МД моделирования. Основная водная лагуна (Вход А) и дополнительная водная полость (Вход В) отображены в виде красной поверхности. На спиральях выделены гидрофильные аминокислотные остатки, формирующие стенки полостей. (Б) Гистограмма значений RASA аминокислот из водных полостей входного полуканала. (В) Детальный вид на *aTyr216* и *aArg140*, расположенные над основной водной полостью. Эти остатки могут быть донорами протона и передавать его на *aGlu219*. Показаны минимально наблюдаемые в процессе МД моделирования значения расстояний между *aArg140* — *aTyr216* и *aArg140* — *aGlu219*. (Г) Второй возможный способ проникновения протона во входной полуканал. Указаны полярные аминокислотные остатки и молекулы воды, участвующие в переносе протона. (Д) График расстояний между *aArg140* и *aGlu219* в течение 150 нс МД моделирования для трех независимых запусков.

Перенос протона от *aGlu219* до *cAsp61* происходит по консервативной цепи, расположенной в «узком месте» входного полуканала. Ближайшими к *aGlu219* остатками, которые могли выступить в качестве акцептора протона, были *aAsp119* и *aHis245*. Однако, расстояния между *aGlu219* — *aAsp119* и *aGlu219* — *aHis245* были слишком велики для прямого переноса протона (Рисунок 2.15А). Мы предположили наличие молекул воды в этой области. Среднее



**Рисунок 2.14.** Плотность распределения числа молекул воды во входной лакуне, полученная при МД моделировании (красная линия) и с использованием программы Dowser++ (синяя линия). Серая линия — распределение с максимальным числом молекул воды (наиболее оптимальное), установленное с помощью модели твердых сфер.

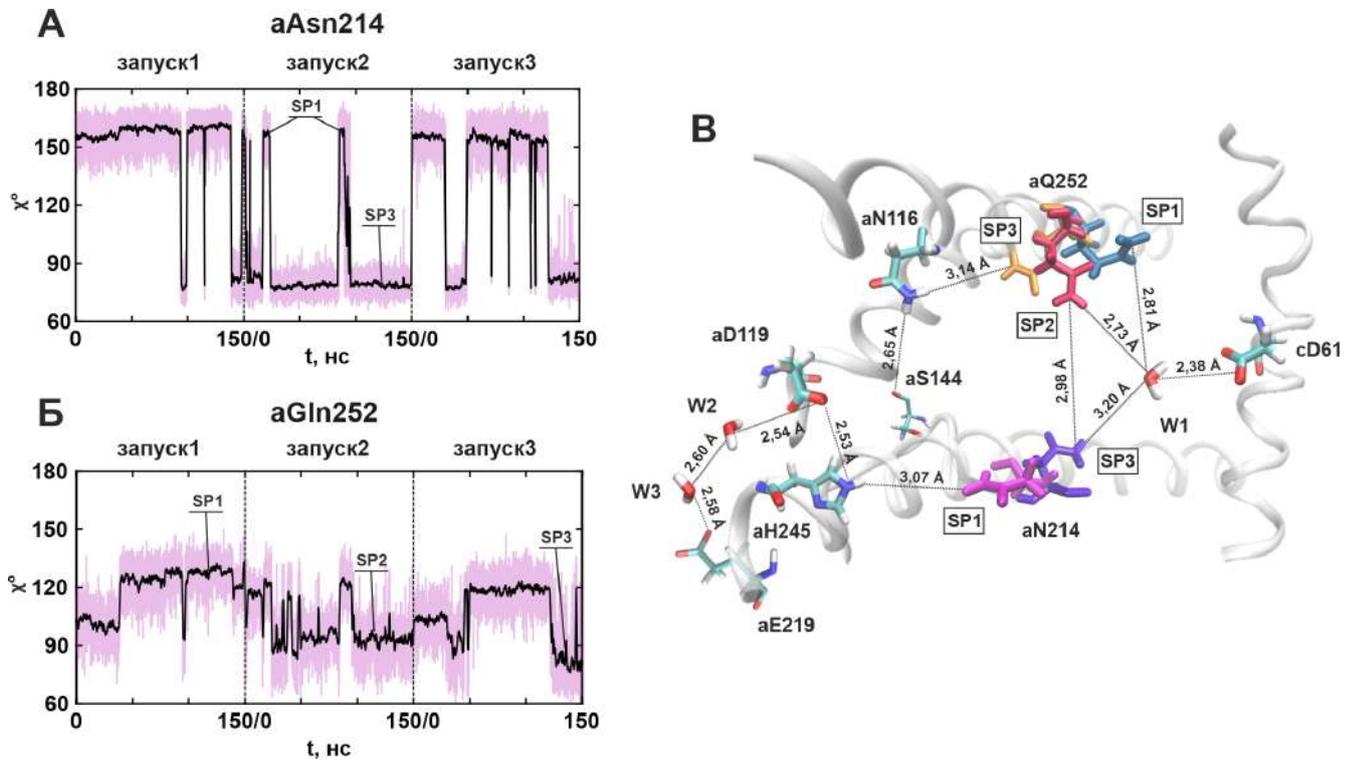
значение SASA для этих аминокислот было низким, около  $1 \text{ \AA}^2$ , хотя вдоль МД траектории наблюдалось несколько моментов времени, в которых водная доступность была выше  $7\text{--}11 \text{ \AA}^2$ . Тем не менее, были определены области локализации двух молекулы воды W2 и W3, которые замыкали цепь переноса протона между *aGlu219* и *aAsp119*, *aHis245* (Рисунок 2.15В). Они проникали в белок и обладали некоторой подвижностью, что обеспечивало расстояния между центрами связывания протона менее  $3 \text{ \AA}$ . Эти молекулы воды скорее всего являются *структурными* (в отличие от молекул в водной полости), поскольку они оставались в данной области белка на протяжении всего моделирования и не уходили в окружающую среду. Следует отметить, что с помощью программы Dowser++ в этой области входного полуканала также были предсказаны кластеры молекул воды. При этом наиболее вероятной была цепь *aGlu219* — W3 — W2 — *aAsp119* — *aHis245*. Перенос протона от *aAsp119* к *aHis245* можно было осуществить напрямую, так как расстояние между ними почти всегда не превышало  $3 \text{ \AA}$  (Рисунок 2.15Б).



**Рисунок 2.15.** Графики расстояний между *aAsp119* — *aGlu219*, *aGlu219* — *aHis245* (A) и между *aAsp119* — *aHis245* (B) в течение 150 нс МД моделирования для трех независимых запусков. (B) Детальный вид на *aAsp119*, *aGlu219* и *aHis245*, боковые группы которых перекрывают входной полуканал, образуя что-то похожее на «ворота». Показаны две молекулы воды (W2 и W3), координирующие перенос протона между *aAsp119* и *aGlu219*. Указаны минимально наблюдаемые в процессе МД моделирования значения расстояний между *aGlu219* — W3 — W2 — *aAsp119* — *aHis245*.

Дальнейший переход протона от *aHis245* к *aAsn214* был возможен не всегда, поскольку боковая группа *aAsn214* обладала высокой подвижностью и имела *устойчивые пространственные положения*, которые мы обозначили как SP1-SP3 (spatial positions — это положения боковой группы аминокислоты, в которых средняя амплитуда колебаний по порядку величины соответствует тепловым колебаниям атомов) (Рисунок 2.16A). Установлено, что переход от *aHis245* к *aAsn214* был возможен лишь в случае, когда *aAsn214* находился в положении SP1. Расстояние между *aHis245* и *aAsn214* в среднем составляло около 5,05 Å, хотя в минимуме достигало 3,07 Å. При этом в положении SP3, *aAsn214* был ориентирован в сторону *cAsp61* и мог передавать протон на

*aGln252*. Минимальное расстояние между *aGln252* и *aAsn214* составило 2,98 Å, однако могло увеличиваться до 7,50 Å. Таким образом, цепь переноса протона всегда была незамкнута, и изменение локализации положения *aAsn214* в SP1 или SP3 являлось необходимым условием для обеспечения протонного транспорта (Рисунок 2.16В).

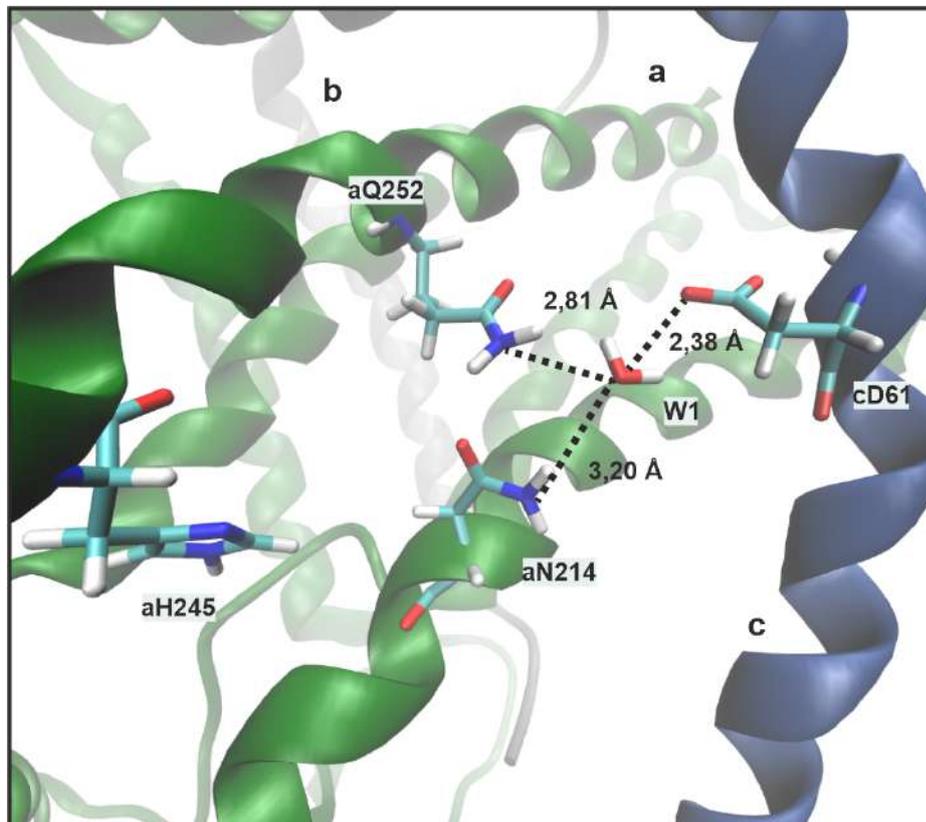


**Рисунок 2.16.** Устойчивые пространственные положения (SP) боковых групп *aAsn214* и *aGln252*. (А-Б) Графики значений угла  $\chi$  между боковой группой и осью  $\alpha$ -спирали для трех независимых запусков. (В) Схема пространственных положений боковых цепей *aAsn214* и *aGln252*. SP1 и SP3 *aAsn214* показаны пурпурным и фиолетовым, SP1, SP2 и SP3 *aGln252* — синим, розовым и оранжевым соответственно.

Боковая группа *aGln252* также была очень подвижна и имела три устойчивых пространственных положения (Рисунок 2.16Б). В положениях SP1 и SP2 *aGln252* был ориентирован на *cAsp61* и только в положении SP2 мог являться акцептором протона от *aAsn214*. Кроме того, было обнаружено еще одно редкое положение SP3, в котором *aGln252* был ориентирован на *aAsn116* и *aSer144*. Для этих остатков относительная площадь поверхности, доступная для растворителя (SASA), равнялась нулю, и молекулы воды в области около них не наблюдались. Минимально наблюдаемое расстояние между *aGln252* и *aAsn116* составило 3,14 Å, а между *aAsn116* и *aSer144* — 2,65 Å, поэтому прямой перенос

протона был весьма вероятен. Однако, *aAsn116* и *aSer144* находились в стороне от «основной траектории» движения  $H^+$  и могли функционировать как протонная ловушка, которая приводит к увеличению общего времени протонного транспорта (Рисунок 2.16В).

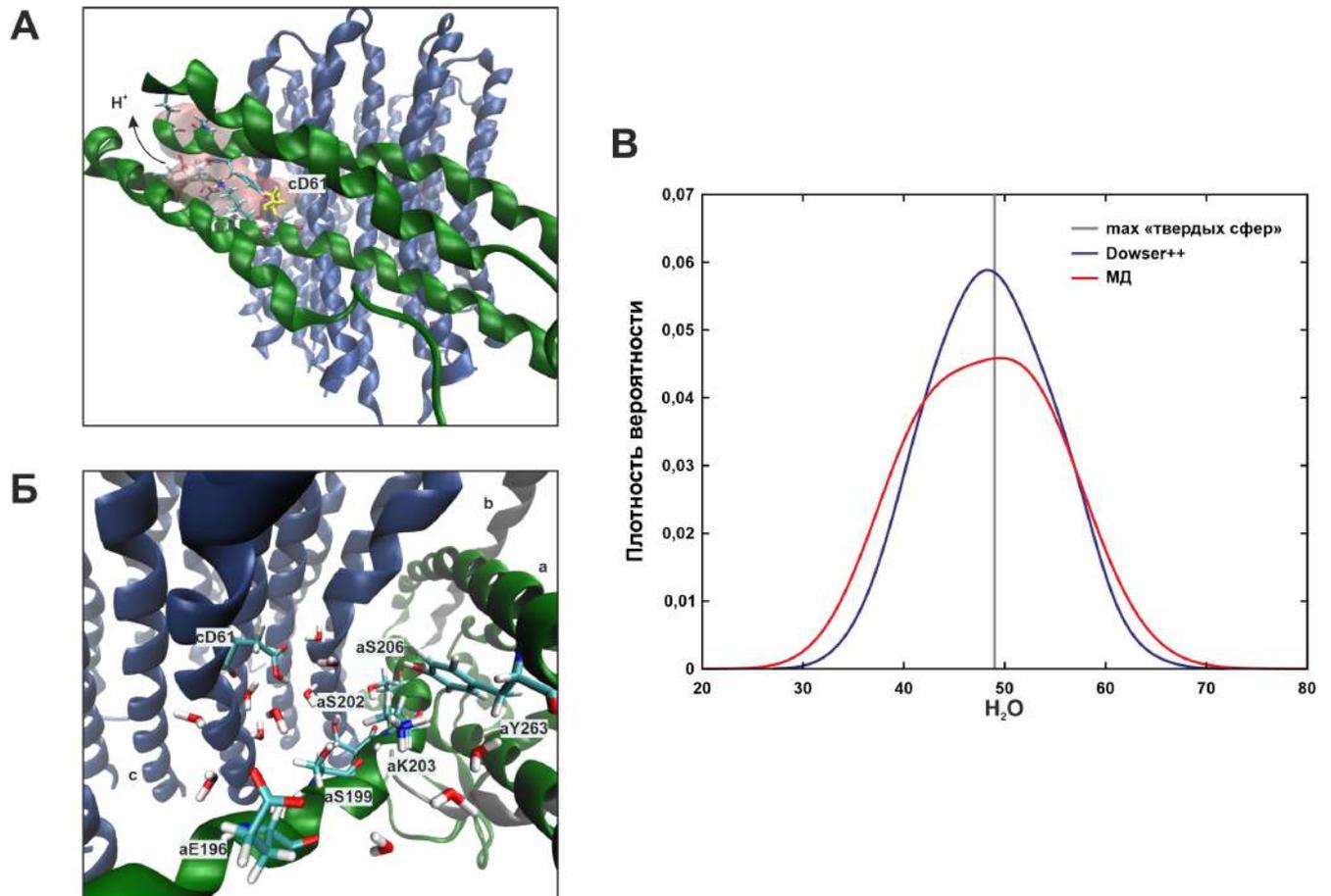
Последний шаг во входном полуканале — это протонирование *cAsp61* *c*-субъединицы, которое не могло осуществляться с *aGln252* или *aAsn214* из-за их значительной удаленности от него (Рисунок 2.16В). Однако в данной области мы также обнаружили структурную молекулу воды W1, которая образовывала водородные связи с *aAsn214*, *aGln252* и *cAsp61* (Рисунок 2.17). В среднем мы наблюдали одну молекулу вблизи *cAsp61* на расстоянии 2,38 Å, через которую он мог быть протонирован. С применением программы Dowser++ в данной области были также предсказаны кластеры молекул воды.



**Рисунок 2.17.** Область вблизи *cAsp61* во входном полуканале (вид со стороны *b*-субъединицы). Показана молекула воды W1, которая образовывала водородные связи с *aAsn214*, *aGln252* и *cAsp61*. Указаны минимально наблюдаемые в процессе МД моделирования значения расстояний.

Воронкообразная форма выходного полуканала, в сочетании с высоким содержанием полярных аминокислотных остатков, способствовала его

заполнению молекулами воды (Рисунок 2.18А, 2.18Б). В результате МД моделирования было установлено, что в среднем в каждый момент времени в полости выходного полуканала находилось 48 молекул воды. Полученная при МД моделировании плотность вероятности распределения воды в выходном полуканале соответствовала результатам моделирования при помощи Dowser++, а среднее число молекул воды совпадало со значением в наиболее оптимальном распределении, полученном при помощи модели твердых сфер (Рисунок 2.18В).



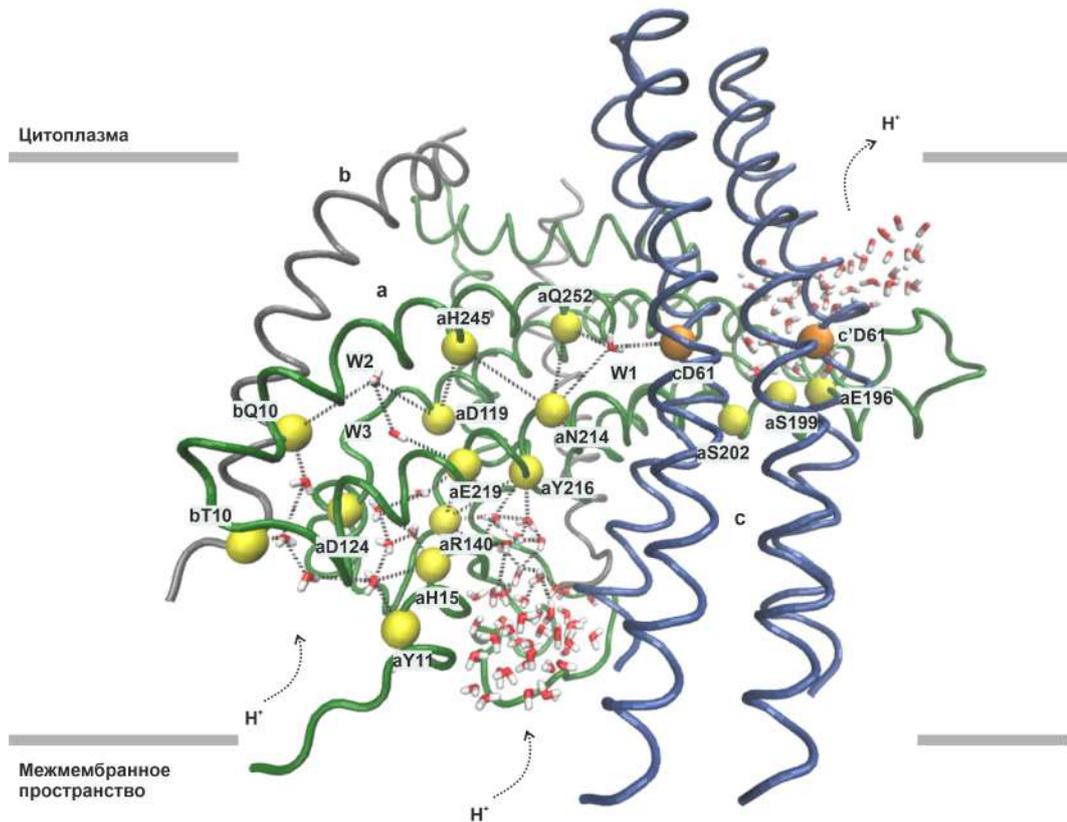
**Рисунок 2.18.** Область вблизи *cAsp61* в выходном полуканале. (А) Водная полость отображена в виде красной полупрозрачной поверхности, на спиральях выделены гидрофильные аминокислотные остатки, формирующие стенки полости. (Б) Вид со стороны цитоплазмы. Указаны существенные полярные аминокислоты и молекулы воды, окружающие *cAsp61*. (В) Плотность распределения числа молекул воды в выходном полуканале, полученная при МД моделировании (красная линия) и с использованием программы Dowser++ (синяя линия). Серая линия – распределение с максимальным числом молекул воды (наиболее оптимальное), установленное с помощью модели твердых сфер.

Следует отметить, что как в водной лакуне входного полуканала, так и в выходном полуканале, молекулы воды непрерывно обновлялись за счет поступления из окружающей среды. Рядом с *cAsp61* были расположены шесть полярных аминокислотных остатков (*aGlu196*, *aSer199*, *aSer202*, *aLys203*, *aSer206* и *aTyr263*), однако ни один из них не находился на расстоянии менее 3 Å от аспартата, что исключало их непосредственное участие в процессе его депротонирования (Рисунок 2.18Б). Тем не менее, данная область характеризовалась высокой водной доступностью, среднее значение SASA превышало 6 Å<sup>2</sup>, и наблюдались отдельные отклонения до 30 Å<sup>2</sup>. Поэтому, *cAsp61* мог быть депротонирован через молекулы воды, которые вместе с функциональными группами полярных аминокислот могли образовывать сети водородных связей, выступающих в качестве «протонных проводов». При этом, перемещение протона в цитоплазму могло осуществляться по механизму Гротгуса или просто путем диффузии *in bulk*.

## 2.5. Выводы по главе

Таким образом, мы изучили расположение и структуру полуканалов в бактериальной F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФсинтазе, а также описали возможную траекторию движения протона через мембрану. Входной полуканал имел комбинированную структуру, включающую в себя водные полости в белковой *a*-субъединице и последовательность консервативных аминокислотных остатков (*aGlu219*, *aAsp119*, *aHis245*, *aAsn214*, *aGln252*) со структурными кластерами молекул воды. При этом выходной полуканал представлял собой просто водную полость, через которую протон мог легко перемещаться *in bulk* из-за высокощелочного рН в цитоплазме, т.е. не существовало определенного пути выхода, и можно ли назвать эту область движения протонов полуканалом является, скорее всего, вопросом терминологии.

Результаты по гидратации фермента, полученные при МД моделировании, соответствовали результатам моделирования молекул воды при помощи Dowser++, как в водных полостях, так и в «узком месте» входного полуканала. Поэтому алгоритм предсказания внутренних молекул воды в белковых структурах, учитывающий электростатические взаимодействия между атома-



**Рисунок 2.19.** Структура протонных полуканалов бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазы. Пунктирные линии показывают возможную траекторию движения протона через входной полуканал. Полярные аминокислотные остатки, предположительно участвующие в транспорте протонов, показаны желтыми сферами, *cAsp61* входного/выходного полуканалов – оранжевыми сферами.

ми системы, позволяет за более короткое время (день), чем МД расчеты (неделя-месяц), получить распределения молекул воды в полуканалах фермента, максимально приближенные к реальным. Кроме того, программный пакет Dowser++ находит полости в белке с более высокой эффективностью, чем алгоритм, учитывающий только геометрию, а также дает гораздо меньшую вариабельность в расположении молекул. Тем не менее, использование модели твердых сфер предоставляет возможность за более короткое время (час) сгенерировать статистическую совокупность распределений молекул воды внутри белка и отобрать оптимальные распределения, которые характеризуются максимальной плотностью упаковки. Однако, в рамках подхода молекулярной динамики возможно дополнительно оценить влияние на гидратацию фермента

таких факторов как: окружающая среда, липидный состав мембраны, подвижности аминокислотных остатков самого белка.

Учет только аминокислот при прыжковом движении протона будет приводить к довольно низким значениям вероятности перехода с одного центра связывания на другой из-за их значительной удаленности друг от друга. Тем не менее, при молекулярно-динамическом моделировании белка в составе гомогенной мембраны, состоящей из фосфотидилхолина, было обнаружено, что молекулы воды имеют тенденцию локализоваться в областях, критически важных для передачи протона, при этом вода остается в полуканале на протяжении всего МД моделирования и не уходит *in bulk*. Были определены области локализации трех структурных кластеров молекул воды (W1-W3), необходимых для замыкания цепи переноса протона. Кластер W1 наблюдался около *cAsp61*, W2 располагался между *aAsp119* и *aHis245*, а кластер W3 вблизи *aGlu219*. При моделировании учитывалось проникновение молекул воды в белок, предварительно встроенный в мембрану, а не на этапе фолдинга. В связи с этим количество обнаруженных молекул воды не достигало максимально возможного уровня. Кроме того, липидный состав мембраны или случайные мутации могут оказать существенное влияние на расположение молекул воды в полуканалах, что приведет к изменениям параметров протонного транспорта.

Несмотря на плотную упаковку белка, подвижность некоторых остатков оказалась очень высокой. Были обнаружены устойчивые пространственные положения боковых групп существенных аминокислот (*aAsn214*, *aGln252*) *a*-субъединицы, обозначенные как SP1, SP2, SP3. Установлено, что *aAsn214* в положении SP3 и *aGln252* в SP1, SP2 были ориентированы в сторону *cAsp61* и могли протонировать его через W1. При этом в положении SP1 *aAsn214* был ориентирован в сторону *aHis245*, поэтому цепь переноса протона всегда была незамкнута, и изменение локализации положения *aAsn214* является необходимым условием для обеспечения протонного транспорта. Также, мы обнаружили еще одно редкое положение SP3, в котором *aGln252* был ориентирован на *aAsn116* и *aSer144*, которые находились в стороне от «основной траектории»  $H^+$  и могли являться протонной ловушкой. Тем не менее, биологическая система должна избегать таких условий, которые потенциально могут нарушить ее работу.

Важность некоторых из описанных аминокислот давно была известна из экспериментов по мутагенезу, однако их точная роль в процессе переноса

протонов оставалась не ясна. Нами было установлено, что полярные аминокислотные остатки могут выполнять несколько важных функций: принимать непосредственное участие в процессе переноса протонов, создавать локальное электростатическое поле внутри фермента для удержания молекул воды, выступать в качестве протонной ловушки и возможно приводить к увеличению времени переноса  $H^+$ . Обнаружено, что молекулы воды также играют важную роль. Непрерывное обновление воды из окружающей среды в лакунах способствует поддержанию концентрации свободных  $H^+$ , в то время как структурные молекулы воды, проникающие внутрь фермента, непосредственно участвуют в цепи переноса протона.

Таким образом, во входном полуканале путь протона к *cAsp61* из периплазмы проходил через две водные полости, которые являются резервуарами накопления свободного  $H^+$ , а также цепочку полярных аминокислот и структурных молекул воды: *aGlu219* — W3 — W2 — *aAsp119* — *aHis245* — *aAsn214* — *aGln252* — W1 — *cAsp61*. Полученная в работе сеть полярных аминокислотных остатков и молекул воды позволит провести моделирование траекторий движения протона через мембранную часть белка с учетом всех внешних полей, количественно оценить параметры протонного транспорта, а также послужит основой для интерпретации исследований по сайт-специфическому мутагенезу. Новые данные могут быть использованы для описания процесса переноса энергии в полуканалах, что является еще одним шагом в понимании сложности функционирования  $F_oF_1$ -АТФсинтазы.

### Глава 3. Оценка влияния липидного состава мембраны на структуру и гидратацию протонных полуканалов $F_oF_1$ -АТФсинтазы

В предыдущей главе было описано исследование структуры протонных полуканалов в модельной мембране. Молекулярно-динамическое моделирование  $F_o$ -АТФсинтазы из *E. coli*, встроенной в гомогенный липидный РОРС бислоем и водное окружение, способствовало пониманию потенциальных механизмов транспортировки протонов через мембрану. Использование РС позволило минимизировать влияние заряда мембраны на динамику белка. Полученные результаты исследования были особенно актуальны, поскольку информации от статических крио-ЭМ структур недостаточно для объяснения динамики и локализации перемещения протонов в факторе  $F_o$ .

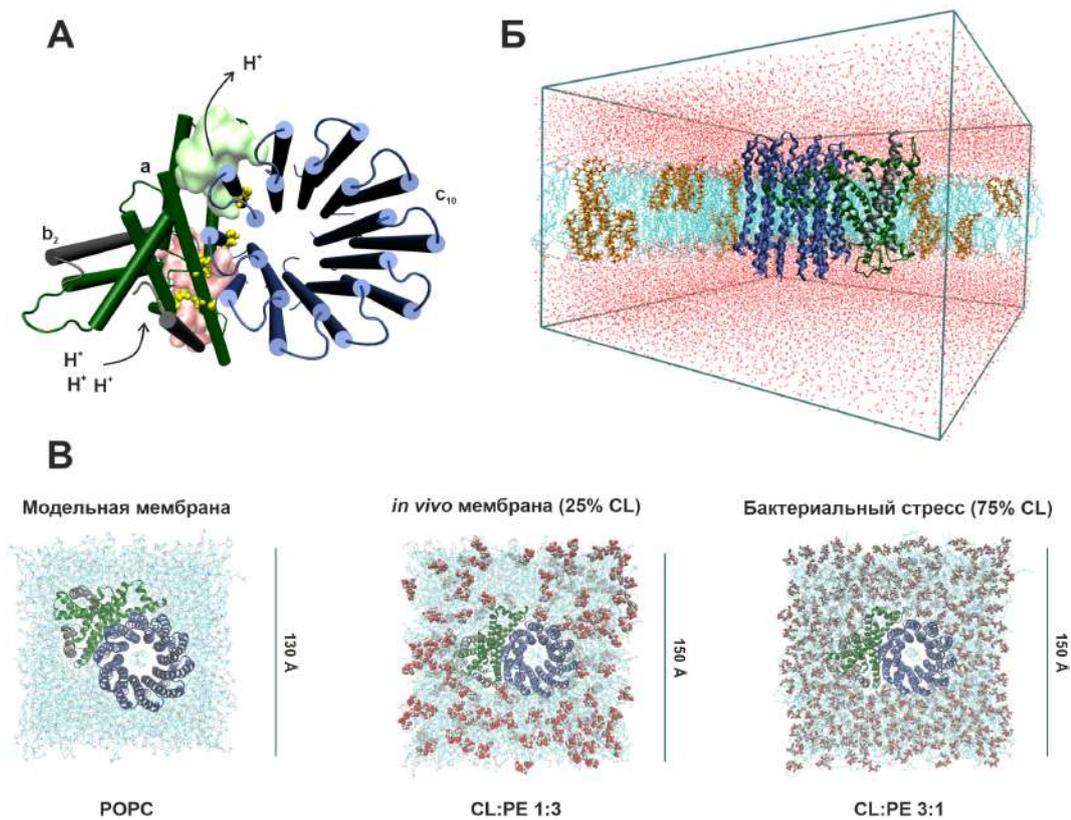
Была выявлена совокупность пространственных положений боковых групп полярных аминокислотных остатков и молекул воды, которые оказывают существенное влияние на транспорт протонов, а также определены области локализации трех структурных кластеров молекул воды. Однако, наличие критических расстояний между существенными аминокислотами в сочетании с низкой гидратацией фермента указывает на высокий риск нестабильности протонного транспорта. Для того, чтобы цепь переноса протона оставалась непрерывной, требовалось одновременное возникновение нескольких редких событий: прямой перенос  $H^+$  между аминокислотами, переключение между устойчивыми пространственными положениями (SP), присутствие молекул воды в определенных участках полуканала. Так предполагается, что вариабельность липидного состава мембраны, включая наличие заряженных фосфолипидов, может оказывать воздействие на протонные полуканалы путем стабилизации предпочтительных положений боковых групп существенных аминокислот и усиления гидратации фермента.

#### 3.1. Подготовка модельных систем с различными типами мембран

Важную роль в процессах передачи энергии, поддержании структуры и функциональной активности белковых комплексов дыхательной цепи и

АТФсинтазы играет липидный состав мембраны, в частности, специфический анионный фосфолипид кардиолипин (CL). Доля отрицательно заряженных кардиолипинов во внутренней мембране *E. coli* составляет порядка 25%, при этом основным классом липидов является фосфатидилэтаноламин (PE) [134]. Для описания динамики липидных бислоев широко применяется метод крупнозернистого (coarse-grained) молекулярно-динамического моделирования, при котором снижение уровня детализации позволяет изучать биомолекулярные системы на более длительных временных интервалах. Однако в данном контексте такой подход приведет к потере деталей конкретных липид-белковых взаимодействий. Поэтому, для изучения влияния CL на структуру и гидратацию протонных полуканалов было проведено классическое МД моделирование в микросекундных временных масштабах. Для конструирования мембраны, по липидному составу соответствующей физиологическим условиям, был рассмотрен бислои, содержащий 25% CL. Данный тип липидного бислоя далее будет называться *in vivo* мембрана. Интересный факт, что для *E. coli* увеличение содержания CL является важным механизмом адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды. Поэтому мы также рассмотрели мембрану, содержащую 75% CL, что соответствует условиям бактериального стресса. Кроме того, был проведен сравнительный анализ результатов с данными, полученными при моделировании фермента, встроенного в РОРС мембрану (Рисунок 3.1).

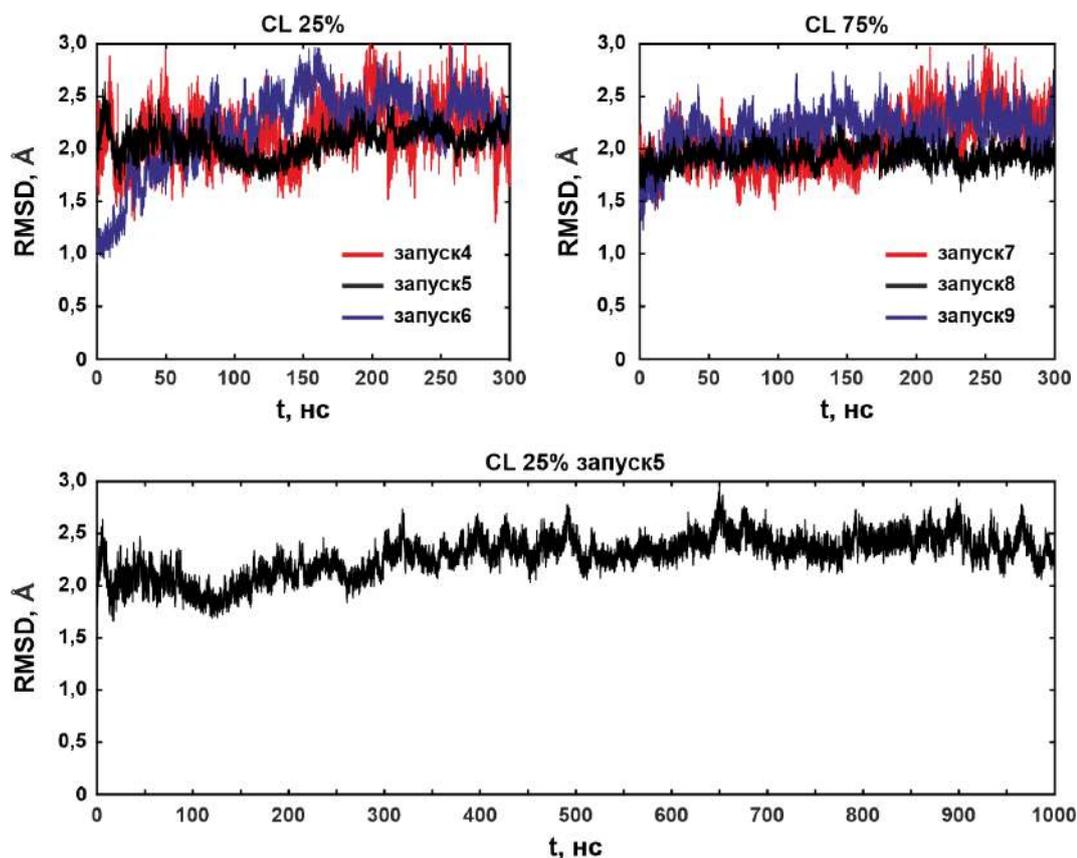
Описанная в главе 2 структура мембранной части АТФсинтазы была встроена в липидные бислои с различным содержанием CL с помощью модуля Membrane Builder веб-сервиса CHARMM-GUI [210]. *In vivo* мембрана состояла из PE и CL в соотношении 3:1 (25% CL), в то время как в мембране, имитирующей бактериальный стресс, было обратное соотношение PE:CL — 1:3 (75% CL). Кроме того, при сборке модельных мембран были учтены липиды с различными типами ацильных цепей, характерных для бактериальной мембраны: 1,2-дипальмитоил-1'-пальмитоил-2'-цис-9,10-метилгексадеканол кардиолипин (PMCL2), 1,2-1',2'-тетрагексадеканол-кардиолипин (TYCL2), 1,2-дипальмитоил-олеин-фосфатидилэтаноламин (DYPE), 1,2-дипальмитоил-фосфатидилэтаноламин (DPPE) и 1-пальмитоил-2-цис-9,10-метилгексадеканол фосфатидилэтаноламин (PMPE) [210]. Чтобы исключить эффекты, связанные с начальным положением CL, для каждого типа мембран были сконструированы три различных бислоя, которые отличались исходными положениями липидов. Во всех полученных моделях один PE липид был встроен внутрь



**Рисунок 3.1.** Модельная система мембранной части бактериальной АТФ-синтазы, включающая *a*-субъединицу, кольцо из десяти *c*-субъединиц и две укороченные *b*-субъединицы. (А) Вид сверху (из цитоплазмы). Области входного и выходного полуканалов отображены в виде красной и зеленой поверхности соответственно. Полярные аминокислотные остатки, предположительно участвующие в транспорте протонов, показаны желтыми сферами. Стрелки указывают предполагаемое направление движения протонов. (Б) Вид сбоку (из мембраны). Незаряженные липиды мембраны показаны голубым, кардиолипиды — оранжевыми, молекулы растворителя — красными. (В) Рассмотренные три типа мембран: модельная POPC мембрана, состоящая только из фосфатидилхолина, *in vivo* мембрана, содержащая 25% CL, липидный бислой с 75% CL, что соответствует условиям бактериального стресса. Полярные головные группы кардиолипидов показаны как VDW.

*c*-кольца в обоих листках мембраны. Системы сольватировались молекулами воды TIP3P [204], а также нейтрализовались ионами натрия и хлора (150 мМ KCl). Общий размер систем составил  $150 \text{ \AA} \times 150 \text{ \AA} \times 90 \text{ \AA}$  и включал около 210 000 атомов.

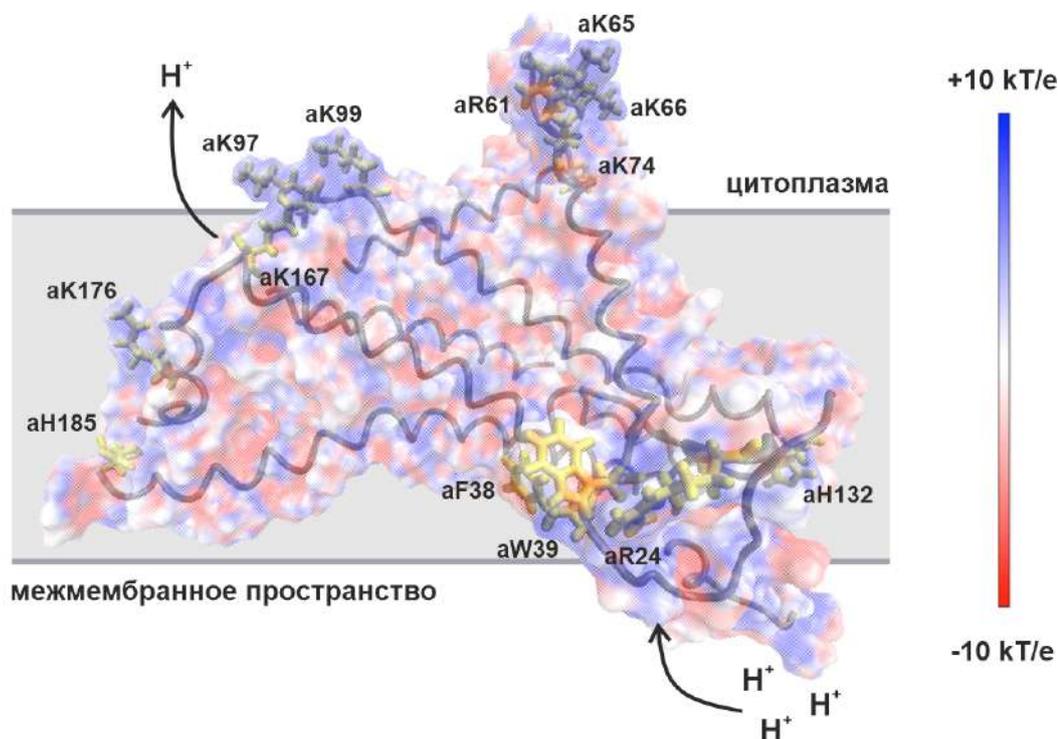
После подготовки модельной системы для оценки влияния липидного состава мембраны на структуру и гидратацию белка, было проведено полноатом-



**Рисунок 3.2.** Графики RMSD положений атомов  $C_{\alpha}$  аминокислот. Сверху показаны данные для МД моделирования в течение 300 нс в мембранах, содержащих 25% и 75% CL, для шести независимых запусков. Снизу – данные для МД моделирования в течение 1 мкс в мембране, содержащей 25% CL (запуск5).

ное МД моделирование с помощью программы NAMD [205] при периодических граничных условиях с использованием силового поля CHARMM36 [206, 207] согласно протоколу, описанному в разделе 2.4.2. Систему сначала подвергали минимизации энергии, после чего производили уравнивание с ограничениями в течение 15 нс для постепенной релаксации мембраны и белка. Затем для каждого типа мембраны было проведено по три независимых моделирования без ограничений (производственный цикл) продолжительностью 300 нс. При этом еще раз отметим, что для сравнительного анализа было проведено девять запусков: три расчета фермента в POPC мембране, которые отличались только случайными начальными скоростями движения атомов системы (запуск1-3 по 150 нс), шесть расчетов фермента в мембранах с CL, которые отличались начальным положением липидов (запуск4-6 для 25% CL и запуск7-9 для 75% CL по 300 нс). Кроме того, производственный цикл одного из моделирований фермента, встроенного в *in vivo* мембрану, был продлен до одной микросекунды. В

структурах, полученных в результате МД, липиды были хорошо упакованы вокруг белка. Среднеквадратичное отклонение всех атомов  $C_{\alpha}$  (RMSD) составили менее  $3 \text{ \AA}$  (Рисунок 3.2), что указывает на то, что модельные системы достигали равновесия, а добавление заряженных СЛ в систему не оказало существенного влияния на общую стабильность фермента.



**Рисунок 3.3.** Электростатическая поверхность  $a$ -субъединицы АТФсинтазы (вид сбоку). Цветовая шкала варьируется от  $-10 \text{ кТ/е}$  до  $+10 \text{ кТ/е}$ . Указаны аминокислоты, взаимодействующие с кардиолипинами.

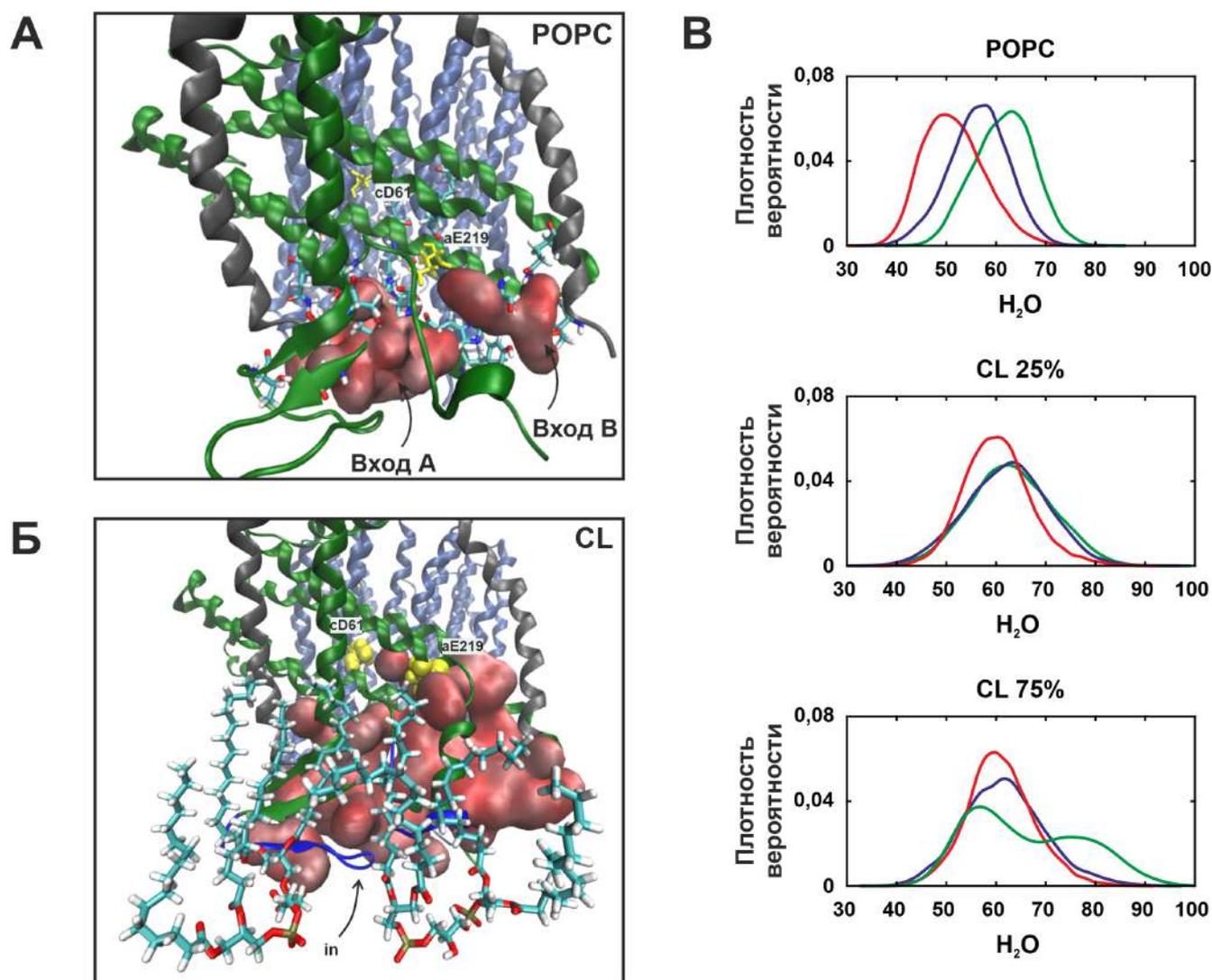
Места контактов СЛ с поверхностью  $a$ -субъединицы были определены как области белка, расположенные на расстоянии до  $3 \text{ \AA}$  от фосфатидильных групп в кардиолипинах. Несмотря на различное начальное положение СЛ, МД моделирование показало около 10 мест его контакта в  $a$ -субъединице, которые оставались неизменными во всех проведенных запусках независимо от процентного содержания СЛ (Рисунок 3.3). Хотя среднее время удержания СЛ в месте связывания было немного увеличено для мембран, имитирующих бактериальный стресс, СЛ-белковые взаимодействия носили кратковременный характер ( $\sim 0,07 \text{ нс}$ ), в отличие от III или IV комплексов дыхательной цепи, где молекулы СЛ образовывали гораздо более сильные взаимодействия с ферментом и модулировали его активность [144, 145]. Местом контакта СЛ в основном являлись

положительно заряженные (Lys, Arg, His) или ароматические (Phe, Trp) аминокислоты, расположенные на поверхности белка. При этом некоторые из них были локализованы непосредственно на трансмембранных спиральных, формирующих протонные полуканалы, в частности, около входа в периплазматический полуканал.

### 3.2. Моделирование в мембранах, содержащих кардиолипины

Во всех полученных МД траекториях на границе  $\alpha$ -субъединицы с мембраной (со стороны периплазмы) были установлены места связывания двух или трех CL с полярными аминокислотными остатками, участвующими в формировании стенки водных полостей, через которые протон мог проникать во входной полуканал. Кратковременные контакты CL с  $\alpha$ Arg24 и  $\alpha$ His132 приводили к высокой подвижности петель  $\alpha$ -субъединицы (остатки 27-37 и 133-140), что способствовало проникновению в полость большего числа молекул воды. В результате мы наблюдали слияние водных полостей, т.е. был один общий вход, через который протон мог попасть на существенный остаток  $\alpha$ Glu219, а не два отдельных, как при моделировании в POPC мембране (Рисунок 3.4).

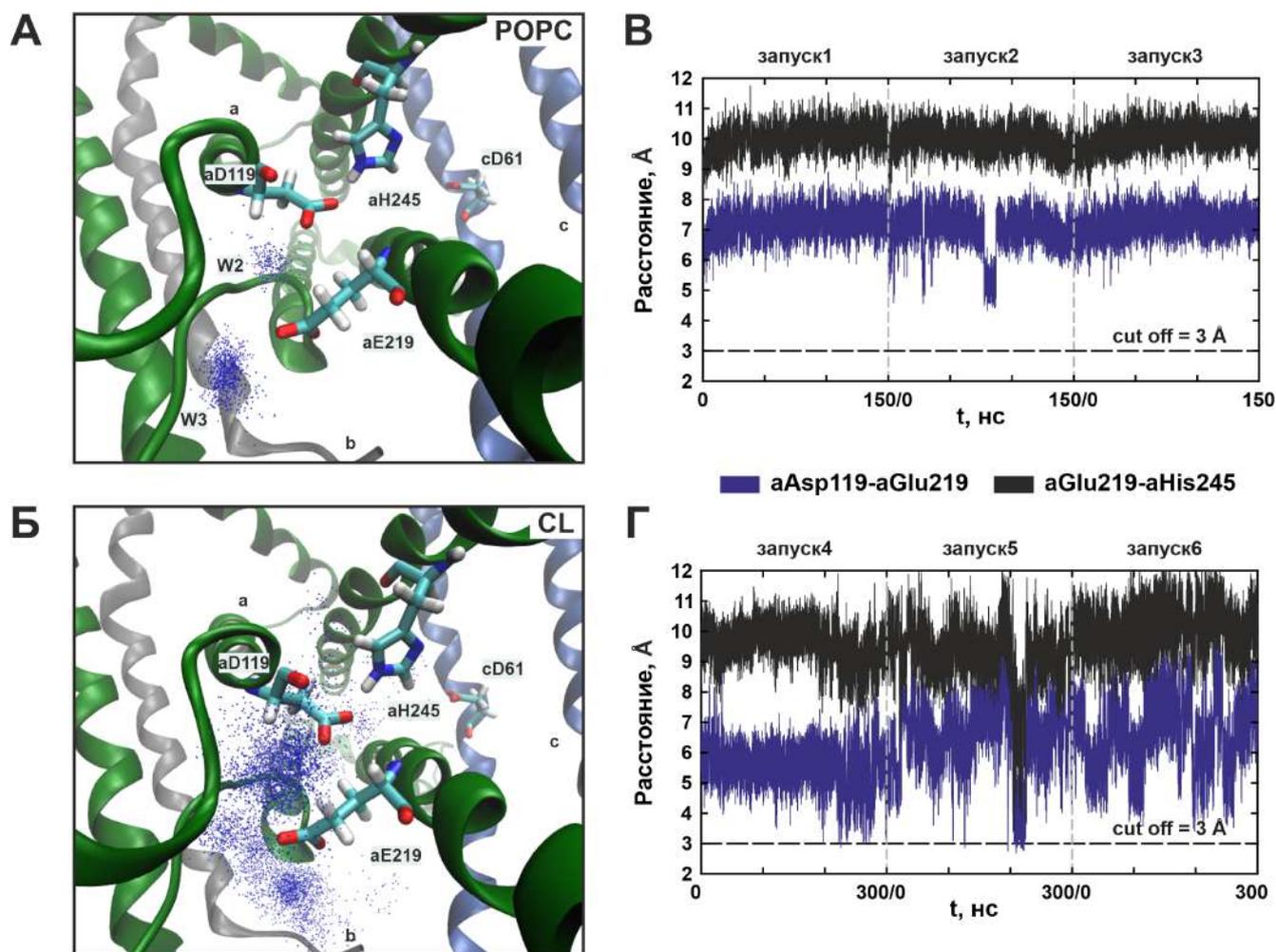
Накладывая друг на друга отдельные кадры МД траектории, можно получить карту вероятности распределения молекул воды внутри полуканала (Рисунок 3.5 синие точки). В *in vivo* мембране была обнаружена повышенная гидратация области фермента около  $\alpha$ Glu219,  $\alpha$ Asp119 и  $\alpha$ His245. Молекулы воды проникали во входной полуканал вплоть до этих аминокислотных остатков, образуя сети водородных связей, по которым протон мог легко их достигнуть из периплазмы (Рисунок 3.5Б). Кроме того, был возможен прямой перенос протона с  $\alpha$ Glu219 на  $\alpha$ Asp119/ $\alpha$ His245. Однако вероятность такого перехода была крайне низкой, поскольку контакт (расстояние меньше 3 Å) между боковыми группами этих остатков был кратковременным и наблюдался редко вдоль МД траекторий (Рисунок 3.5Г). Следует отметить, что для белка в POPC мембране расстояние между  $\alpha$ Glu219 и  $\alpha$ Asp119/ $\alpha$ His245 было большим для совершения прямого переноса протона, и в области около этих аминокислот были обнаружены всего две структурные молекулы воды (W2 и W3), которые замыкали цепь переноса протона (Рисунок 3.5А, 3.5В). При этом, переход между  $\alpha$ Asp119 и  $\alpha$ His245



**Рисунок 3.4.** Водные полости входного полуканала, полученные в результате МД моделирования в POPC мембране (А) и *in vivo* мембране, содержащей 25% CL (Б). Отдельные (А) и агрегированные (Б) водные полости отображены в виде красной поверхности, показаны близлежащие молекулы кардиолипинов. Синим цветом выделены петли  $\alpha$ -субъединицы (остатки 27-37 и 133-140), обладающие высокой подвижностью. (В) Плотность распределения числа молекул воды во входной лакуне, полученная при МД моделировании в трех типах мембран. Для каждого типа мембраны было проведено три независимых запуска (красная, синяя, зеленая линии).

был возможен практически всегда, поскольку данные остатки более 90% времени моделирования находились в непосредственном контакте (расстояние между ними было меньше 3 Å) как в мембранах, содержащих CL, так и без него.

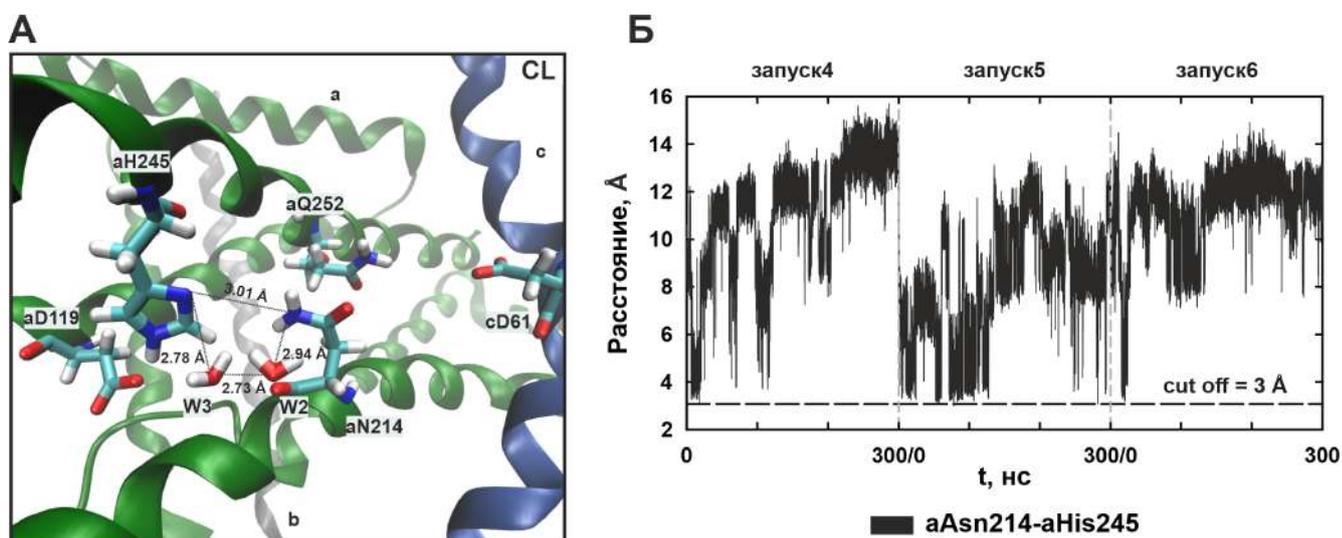
Дальнейший перенос протона с  $\alpha$ His245 осуществлялся на  $\alpha$ Asn214 (Рисунок 3.6). Однако, из-за высокой подвижности боковой группы  $\alpha$ Asn214



**Рисунок 3.5.** Карты вероятности распределения молекул воды (синие точки) в области *aGlu219*, *aAsp119* и *aHis245*, полученные при МД моделировании в POPC мембране (А) и *in vivo* мембране, содержащей 25% CL (Б). В POPC мембране две молекулы воды (W2 и W3) координировали переход между *aGlu219* и *aAsp119* (А). При наличии CL наблюдается повышение гидратации данной области (Б). (В, Г) Графики расстояний между *aAsp119* — *aGlu219*, *aGlu219* — *aHis245* в POPC мембране (В) и *in vivo* мембране (Г).

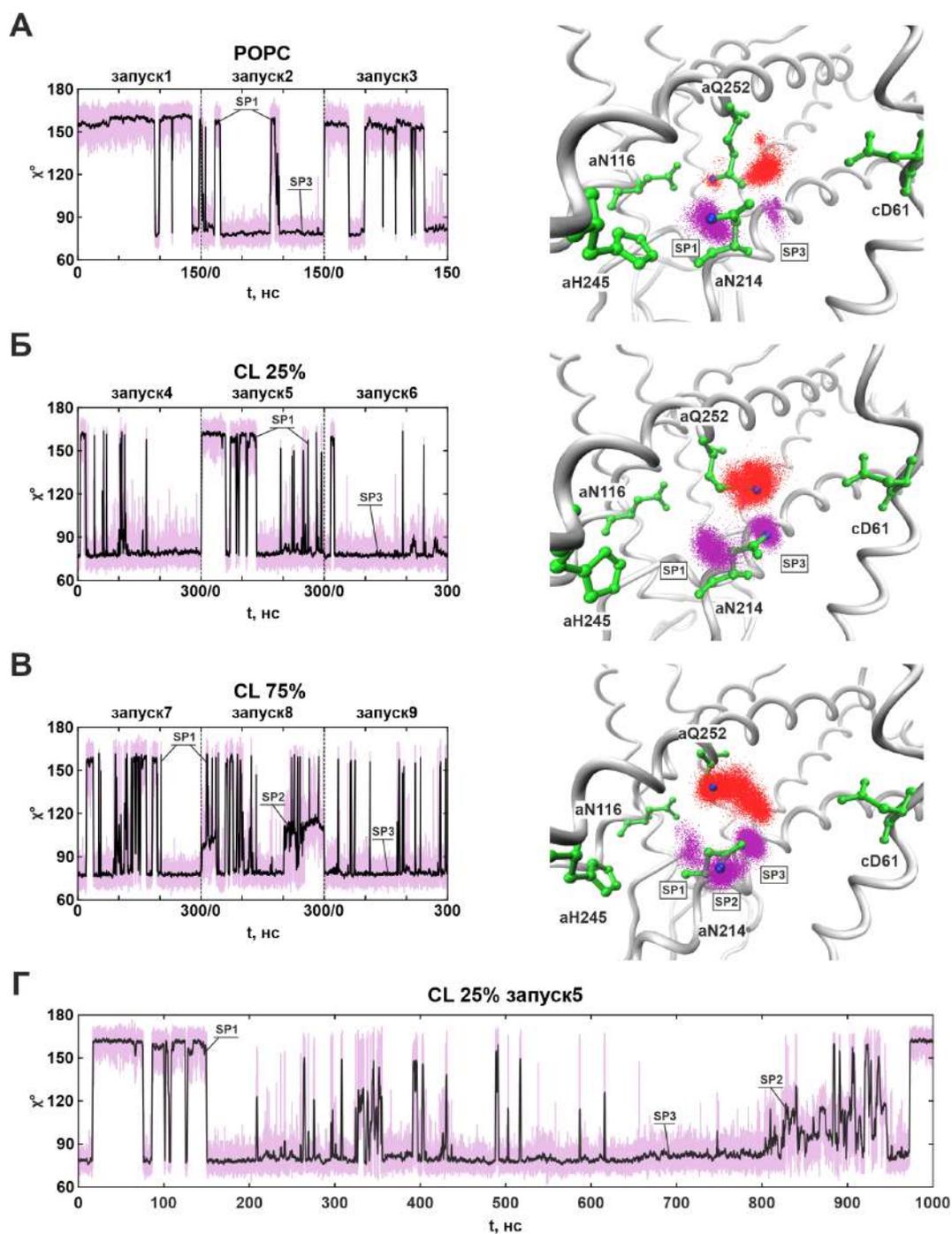
расстояние между ними варьировалось от 3 Å до 15 Å как при моделировании в мембранах, не содержащих CL, так и с ним. В устойчивом положении SP1, когда *aAsn214* был ориентирован на *aHis245*, среднее расстояние между ними составляло 4,41 Å и крайне редко достигало значений менее 3 Å, что затрудняло перемещение протона в этой области. Тем не менее, в мембранах с CL было обнаружено более глубокое проникновение молекул воды W2 и W3, которые могли координировать перенос протона с *aHis245* на *aAsn214*.

На последнем шаге протонирование *cAsp61* могло осуществляться с *aAsn214* и *aGln252*, боковые группы которых, как уже отмечалось выше, об-



**Рисунок 3.6.** (А) Детальный вид на *aAsn214* и *aHis245* (вид со стороны *b*-субъединицы) при моделировании в мембране с CL. Указаны полярные аминокислотные остатки и молекулы воды, участвующие в переносе протонов. Отмечено более глубокое проникновение молекул воды W2 и W3, которые теперь координируют переход протонов между *aHis245* и *aAsn214*. Показаны минимально наблюдаемые в процессе МД моделирования значения расстояний. (Б) График расстояний между *aAsn214* и *aHis245* в течение 300 нс МД моделирования в мембране с CL для трех независимых запусков.

ладали повышенной подвижностью. Для описания динамики аминокислот и определения их устойчивых пространственных положений (SP) были оценены среднеквадратичные флуктуации (RMSF) боковых групп аминокислот и угол  $\chi$  между боковой группой и осью  $\alpha$ -спирали (см. раздел 2.4.3). Обнаруженные при моделировании фермента в POPC мембране устойчивые пространственные положения (SP1 и SP3) боковой группы *aAsn214* также наблюдались и в ферменте, встроенном в *in vivo* мембрану (Рисунок 3.7). В положении SP1 его боковая группа была направлена к *aHis245*, однако, чаще она была ориентирована на *cAsp61* в положении SP3, что связано с повышением гидратации фермента в мембранах, содержащих CL. Также, при МД моделировании в течение одной микросекунды наблюдалось еще одно устойчивое пространственное положение боковой группы *aAsn214*, обозначенное как SP2 (Рисунок 3.7Г). Данное положение SP2 также наблюдалось и при моделировании в мембранах, содержащих 75% CL (Рисунок 3.7В). В SP2 *aAsn214* находился в промежуточном положении между *aHis245* и *cAsp61* и был ориентирован на структурную молекулу воды W2, которая также проникала глубже в полуканал. Появление этого простран-



**Рисунок 3.7.** Устойчивые пространственные положения (SP) боковой группы *a*Asn214, полученные в результате МД моделирования в POPC мембране (А), *in vivo* мембране, содержащей 25% CL (Б), 75% CL (условия бактериального стресса) (В). Слева — графики значений угла  $\chi$  между боковой группой и осью  $\alpha$ -спирали для трех независимых запусков. Справа — схемы пространственных положений существенных аминокислотных остатков (зеленые), участвующих в переносе протонов, с картами вероятности распределения местоположения атома ND2 *a*Asn214 (пурпурные точки) и атома NE2 *a*Gln252 (красные точки). (Г) График значений угла  $\chi$  между боковой группой и осью  $\alpha$  спирали для МД моделирования в течение 1 мкс в мембране, содержащей 25% CL (запуск5).

ственного положения было связано со значительным увеличением гидратации (W2) области между *aHis245* и *aAsn214*, и приводило к повышению вероятности переноса протона между указанными остатками.

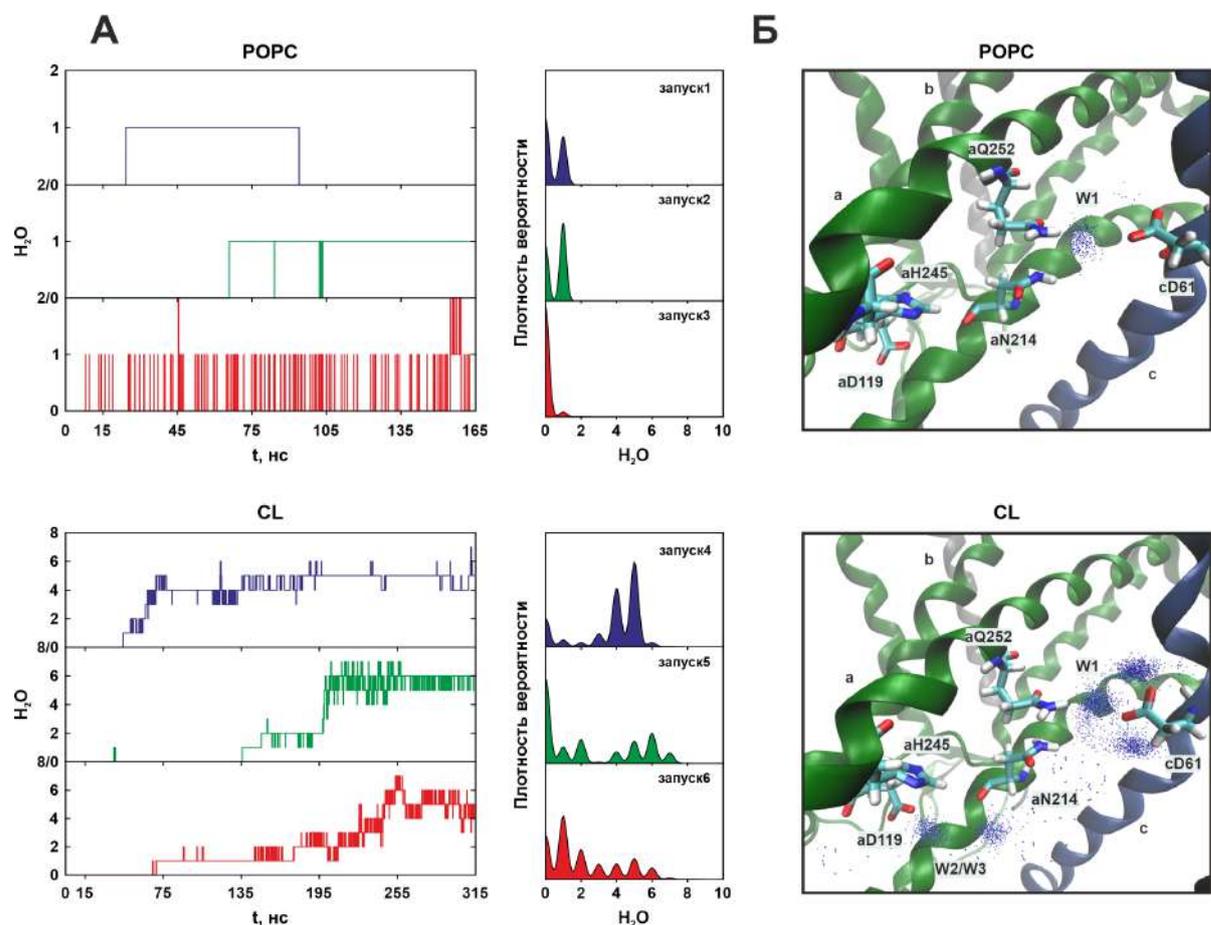
При моделировании в РОРС мембране боковая группа *aGln252* имела три устойчивых пространственных положения. При наличии CL данный остаток также был очень подвижен, однако выявить четкие устойчивые пространственные положения (SP) для него не удалось (Рисунок 3.7Б, 3.7В). *aGln252* был ориентирован в сторону *cAsp61*, где большую часть времени моделирования находился в контакте с *aAsn214*, а прямой перенос между ним и *aAsn116*, наблюдаемый в РОРС мембране, был невозможен. Кроме того, крайне редко наблюдалась возможность прямого переноса протона с *aGln252* на *cAsp61* (минимально наблюдаемое расстояние составило 2,55 Å).

Таким образом, структурная подвижность боковых групп аминокислот в области протонирования/депротонирования ключевого *cAsp61* напрямую не зависела от наличия CL в мембране, а была обусловлена исключительно локальными взаимодействиями между аминокислотами и водой.

Перенос протона на *cAsp61* мог осуществляться только через взаимодействие с остатками *aAsn214* и *aGln252* посредством структурной молекулы воды W1, которая была обнаружена в расчетах для мембран каждого типа (во всех запусках 1-9). Наличие CL способствовало проникновению большего количества молекул воды в область около *cAsp61* (Рисунок 3.8). Были определены наиболее вероятные области локализации молекул воды, которые находились на расстоянии менее 3 Å от *cAsp61*. Поэтому, в области W1 теперь наблюдался кластер, состоящий из 2-3 структурных молекул воды, обеспечивающих эффективное протонирование *cAsp61*.

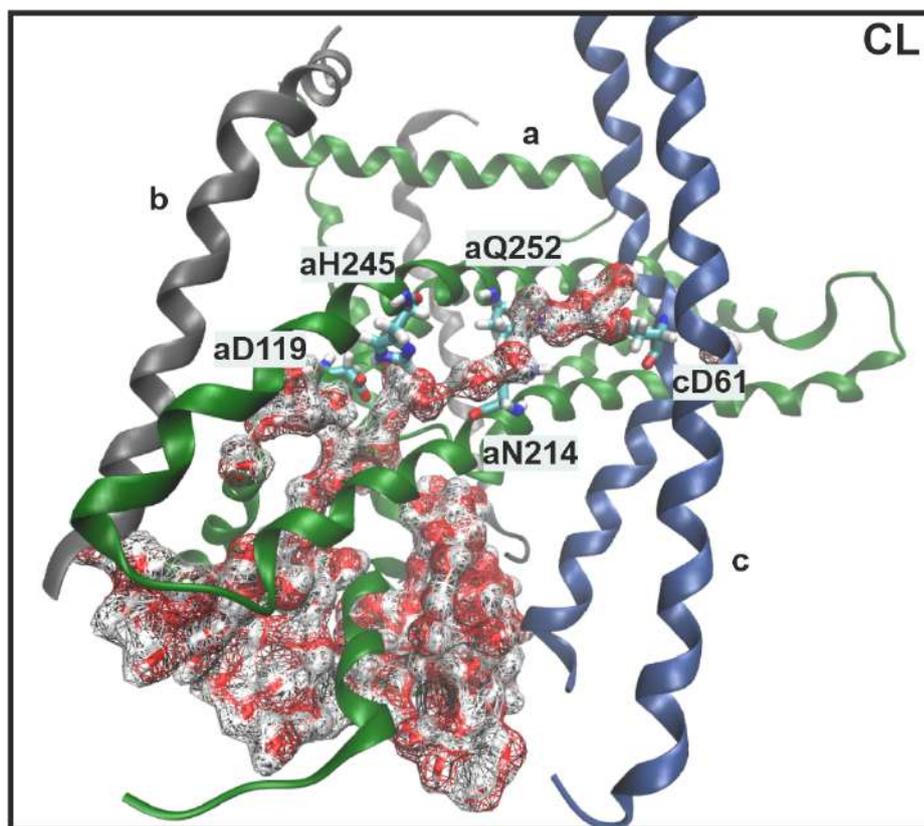
Кроме того, наблюдалось формирование непрерывной цепочки упорядоченных молекул воды, по которой протон мог достигать ключевого *cAsp61* напрямую из водной полости. Однако, непрерывность данной цепочки постоянно нарушалась, наблюдались разрывы в области существенных аминокислотных остатков (*aAsp119*, *aHis245*, *aAsn214* и *aGln252*). В результате этого данная цепь молекул воды могла замыкаться сама на себя или на аминокислотные остатки (Рисунок 3.9).

Полярные остатки *aAsn116* и *aSer144* располагались в стороне от «основной траектории H<sup>+</sup>». При моделировании фермента в РОРС мембране молекул воды около них обнаружено не было, и протон мог достичь их только в редких



**Рисунок 3.8.** (А) Динамика гидратации входного полуканала при МД моделировании в POPC мембране и липидном бислое, содержащем CL. Слева — количество молекул воды, расположенных в «узком месте» входного полуканала в трех независимых запусках (синяя, зеленая, красная линии). Справа — плотность распределения числа молекул воды. Границы исследуемого компартамента определялись набором плоскостей, зависящих от координат атомов  $C_{\alpha}$  остатков *a*-субъединицы. (Б) Карты вероятности распределения молекул воды (синие точки) в области *a*Asn214, *a*Gln252 и *c*Asp61, полученные при МД моделировании в POPC мембране и липидном бислое, содержащем CL. Наличие CL способствует проникновению большего количества молекул воды в область W1, где наблюдался кластер, состоящий из 2-3 структурных молекул.

случаях через *a*Gln252 в положении SP3. В *in vivo* мембране с CL наблюдались редкие случаи проникновения одной или двух молекул воды, через которые протон мог попасть от *a*Asp119 к *a*Asn116 — *a*Ser144. Поэтому данные аминокислоты по-прежнему являлись тупиком и могли представлять собой протонную ловушку или не участвовать в процессе протонного транспорта.



**Рисунок 3.9.** Непрерывная цепочка молекул воды (бело-красная поверхность), через которую протон может достичь *cAsp61* напрямую из водной полости.

Известно, что у грамотрицательных бактерий, например *E. coli*, важным механизмом адаптации к условиям сильного стресса, вызванного различными неблагоприятными условиями (ограничение питательных веществ, осмотическое давление, экстремальные температуры, кислоты), и нарушенного энергетического обмена является увеличение содержания кардиолипина в цитоплазматической мембране [151]. Изменение соотношения основных фосфолипидов оказывает сильное влияние на процессы клеточного окислительного фосфорилирования [161]. Для оценки изменений в структуре протонных полуканалов в условиях бактериального стресса было выполнено молекулярно динамическое моделирование мембранной части  $F_0F_1$ -АТФсинтазы, встроенной в липидный бислой, содержащий 75% CL.

При анализе результатов моделирования не было выявлено значительных изменений в структуре и гидратации протонных полуканалов. Протон, также как и при моделировании в мембране, содержащей 25% CL, мог проникать во входной полуканал через одну большую водную полость и достигать существенных аминокислотных остатков *aGlu219*, *aAsp119* и *aHis245*, а затем перемещаться по высококонсервативной цепи из аминокислот и структурных

молекул воды в «узком месте» до ключевого *cAsp61*. Траектория движения протона не изменялась, также наблюдались структурные кластеры молекул воды (W1-W3) и устойчивые пространственные положения остатка *aAsn214* (Рисунок 3.7В).

Независимо от типа модельной мембраны выходной (цитоплазматической) полуканал представлял собой полость, заполненную водой. Экспонированный в данную полость *cAsp61* соседней *c*-субъединицы более 95% времени моделирования находился в контакте с молекулами воды и мог быть депротонирован только через них, поскольку близлежащие полярные аминокислотные остатки находились на расстоянии, превышающем 3 Å. В то же время в мембранах, содержащих 25% CL и 75% CL, наблюдалось повышение гидратации на 17% по сравнению с POPC бислоем. В среднем в каждый момент времени моделирования в водной полости выходного полуканала находилось 49 молекул воды (42 молекулы в POPC мембране), через которые протон мог легко перемещаться в цитоплазму.

### 3.3. Выводы по главе

Таким образом, с помощью МД моделирования мы изучили области движения протона, а также описали возможную траекторию его движения через фактор  $F_o$  АТФсинтазы из *E. coli*, встроенный в три типа мембран с различным липидным составом, в частности, разным уровнем содержания кардиолипинов (CL). Описанная структура протонных полуканалов была устойчива во всех типах мембран, а путь переноса протона включал большое количество молекул воды и полярных аминокислотных остатков, расположенных внутри полуканалов и полностью недоступных для липидов.

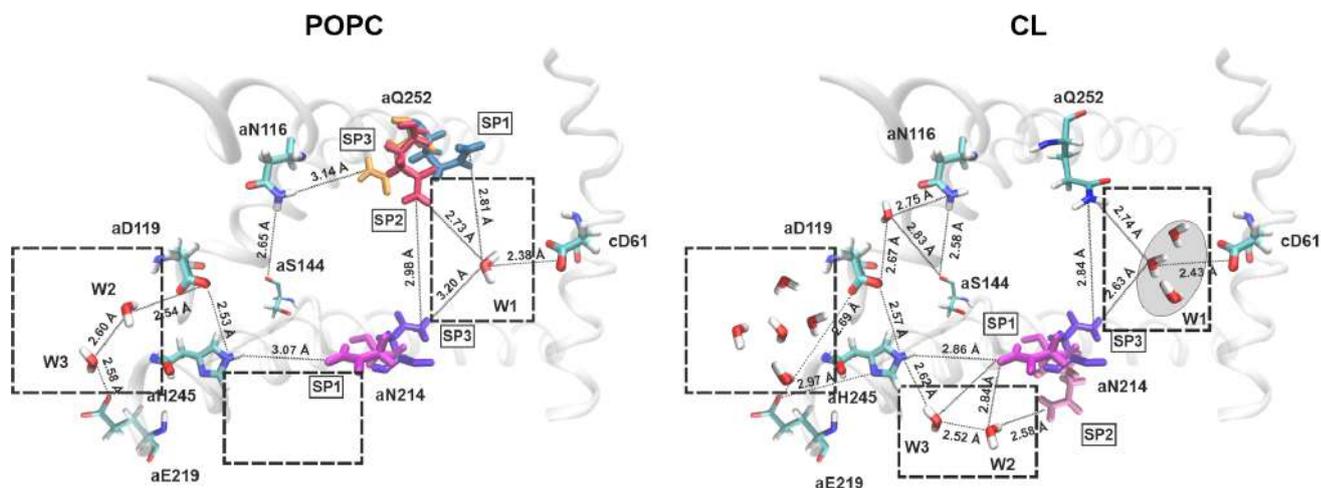
Полученные результаты подтверждают общепринятую теорию о взаимодействии полярных головных групп CL с положительно заряженными или ароматическими аминокислотными остатками на поверхности белка. Наличие стабильных участков контакта на внешней поверхности *a*-субъединицы указывает на сильное влияние электростатических взаимодействий на динамическую структуру мембрана-белок в ходе МД моделирования. Однако, CL-белковые взаимодействия носили кратковременный стохастический характер, поэтому ак-

тивность АТФсинтазы, скорее всего, будет больше зависеть от общей вязкости липидной среды. С другой стороны, присутствие СL около входа/выхода полуканалов необходимо для усиления гидратации внутренних водных полостей, что в конечном итоге приводит к повышению стабильности протонного транспорта.

Увеличение заряда мембраны за счет добавления различного процентного содержания СL приводило к повышению гидратации полуканалов. Наличие участков связывания СL около высокоподвижных петель  $\alpha$ -субъединицы со стороны периплазмы также способствовало проникновению большего количества молекул воды во входные лакуны, что приводило к слиянию двух водных полостей в одну. Динамика гидратации показывает, что молекулы воды способны проникать глубоко во входной полуканал, а боковые группы существенных остатков  $\alpha$ -субъединицы имеют устойчивую сольватацию. Наблюдалось более глубокое проникновение молекул воды в область локализации W2/W3, а также преобразование W1 в кластер, состоящий из нескольких молекул (Рисунок 3.10). Значимым проявлением эффекта гидратации также стало формирование непрерывной цепочки упорядоченных молекул воды, что способствовало повышению стабильности протонного транспорта и приводило к увеличению вероятности протонирования ключевого  $c$ Asp61 в условиях, близких к *in vivo*. Кроме того, предполагается, что расположение СL вблизи входа в полуканал может способствовать примембранной локализации протонов, что, в свою очередь, приведет к минимизации изменения рН в периплазме.

Незначительные конформационные изменения в полуканалах, которые произошли при добавлении СL, привели к возникновению крайне редких прямых переходов между  $\alpha$ Glu219- $\alpha$ Asp119,  $\alpha$ Glu219- $\alpha$ His245 и  $\alpha$ Gln252- $c$ Asp61. Обнаруженные устойчивые пространственные положения (SP) существенного аминокислотного остатка  $\alpha$ Asn214 наблюдались при всех условиях моделирования, что говорит о преимущественном влиянии на динамику боковых групп локальных взаимодействий между аминокислотами и водой. Остаток  $\alpha$ Gln252 также был очень подвижен, однако выявить четкие устойчивые пространственные положения для него не удалось (Рисунок 3.10).

Полярные аминокислотные остатки  $\alpha$ Asn116/ $\alpha$ Ser144 входного полуканала, не входящие в «классический» путь переноса протона, могут являться тупиком или ловушкой. Вероятность их протонирования напрямую или через молекулы воды (при наличии СL) может быть фактором, регулирующим скорость протонного транспорта. Выходной полуканал, представляющий собой



**Рисунок 3.10.** Схема пути переноса протона во входном полуканале бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазы при МД моделировании в РОРС мембране (слева), *in vivo* мембране, содержащей 25% CL, и 75% CL (условия бактериального стресса) (справа). Указаны полярные аминокислотные остатки и молекулы воды, участвующие в переносе протонов. Устойчивые пространственные положения (SP1, SP2, SP3) боковой группы *aAsn214* отмечены пурпурным, лиловым и фиолетовым цветами, а *aGln252* — синим, розовым и оранжевым соответственно. Показаны минимально наблюдаемые в процессе МД моделирования значения расстояний.

водную полость, является стабильной структурой, слабо зависящей от состава мембраны. Неизвестно, влияет ли увеличение числа молекул воды внутри него на транспорт протонов, учитывая тот факт, что они находятся в избытке.

Повышенное содержание CL не оказывало существенного влияния на общую стабильность мембранной части белкового комплекса и не приводило к нежелательным конформационным изменениям. Структура протонных полуканалов оставалась неизменной, за исключением незначительных изменений в подвижности боковой группы *aAsn214*. Однако, это не приводило к разрыву траектории движения протона, и как следствие, к нарушению процесса протонного транспорта через мембрану в условиях бактериального стресса.

Таким образом, в исследовании впервые была подтверждена структурная устойчивость полуканалов  $F_0F_1$ -АТФсинтазы к изменению липидного состава мембраны, который критически влияет на функциональные характеристики фермента при МД моделировании. Подвижность и наличие устойчивых пространственных положений боковой группы *aAsn214* являются необходимыми компонентами, определяющими характеристики протонного транспорта. Меж-

ду тем, молекулы воды являются обязательными участниками цепи переноса протона через мембрану, как в составе больших водных полостей (по механизму Гротгуса), так и за счет глубокого проникновения внутрь белка (W1-W3), где их присутствие является необходимым условием обеспечения непрерывности транспорта. Повышение гидратации области W1, при наличии CL, увеличивает вероятность протонирования ключевого *sAsp61* в условиях, близких к *in vivo*. При этом образование непрерывной цепочки молекул воды в мембранах с CL может обеспечивать функционирование фермента за счет увеличения скорости движения протона по молекулам воды, а также сохранять транспорт в условиях критических мутаций.

#### Глава 4. Мутационный анализ существенных аминокислотных остатков, оказывающих влияние на протонный транспорт

Перенос протонов через мембранный фактор  $F_o$  АТФсинтазы является одним из важнейших этапов в процессе сопряжения энергии градиента ионов водорода и энергии образования макроэргической связи АТФ. Однако, в отличие от самой реакции синтеза, точные траектории движения протонов до сих пор остаются недостаточно исследованными. Несмотря на высокую скорость данного процесса, транспорт протонов оказывается чрезвычайно чувствительным к различным мутациям в области протонных полуканалов, приводящим к блокировке работы всего фермента [105].

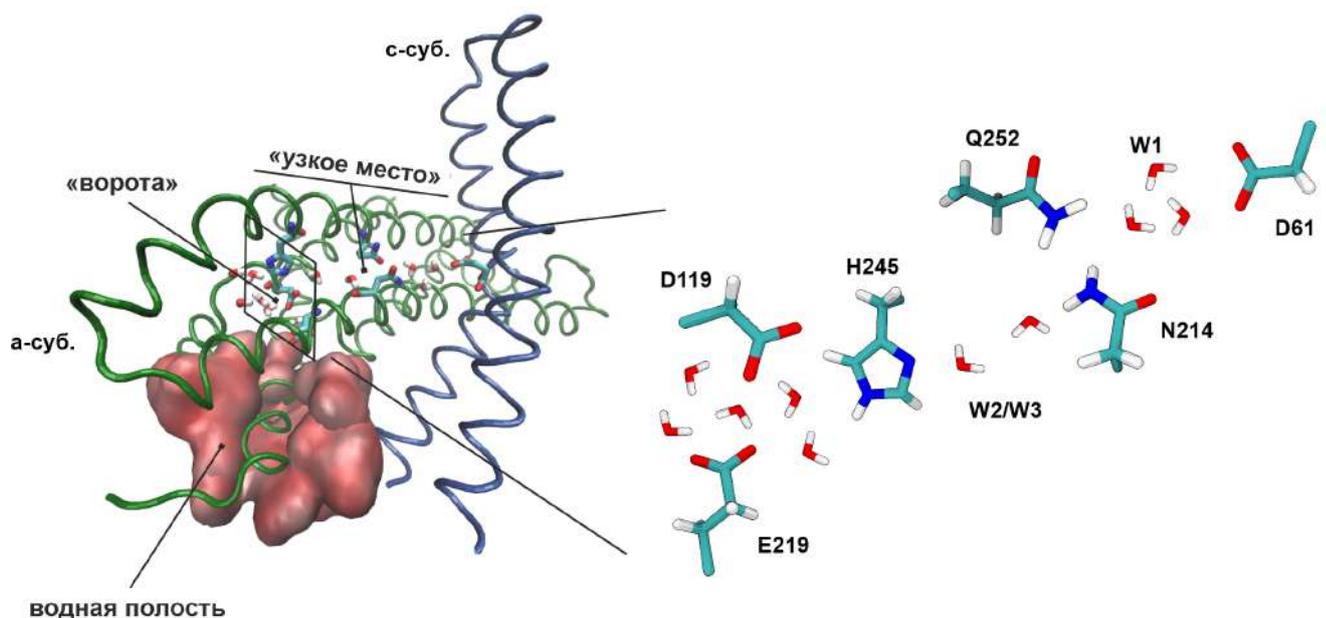
Результаты экспериментальных исследований мутаций аминокислот  $a$ -субъединицы ( $aAsn214$ ,  $aArg210$ ,  $aGlu219$ ,  $aHis245$ ,  $aGln252$ ) из *E. coli* показали, что замены указанных остатков на другие полярные и неполярные группы приводят к снижению синтеза АТФ, уменьшению активности пассивной транслокации  $H^+$ , а также к изменению активности гидролиза АТФ в различной степени [60, 61, 70, 102–104, 107]. Исходя из этого было предположено, что данные аминокислоты формируют стенки полуканала и оказывают существенное влияние на транспорт протонов. Следует отметить, что анализ крио-ЭМ структур  $a$ -субъединицы подтвердил расположение указанных остатков в области входного полуканала [23–26]. Тем не менее, несмотря на то что данные о структурах высокого разрешения вместе с экспериментальными исследования мутантных штаммов бактериальной АТФсинтазы позволили прояснить ряд вопросов, касающихся механизма протонного транспорта, молекулярно-динамическое моделирование дополнит результаты экспериментов, предоставляя ценную информацию для понимания процесса переноса протона на атомном уровне.

#### 4.1. Подготовка модельных систем с различными мутациями аминокислотных остатков $\alpha$ -субъединицы

Для того, чтобы выявить функционально важные для процесса протонного транспорта аминокислотные остатки, был проведен мутационный анализ с использованием молекулярно-динамического моделирования. За основу была взята модельная система, описанная в предыдущей главе, которая представляла собой мембранный фактор  $F_0$ -АТФсинтазы дикого типа (wild type (WT)), встроенный в нативный липидный бислой (25% содержание CL) и водное окружение. Белок включал протонпроводящую  $\alpha$ -субъединицу, кольцо из 10  $c$ -субъединиц, а также две укороченные  $b$ -субъединицы. Мембрана была ориентирована перпендикулярно оси  $z$  и состояла из 206 молекул DYPE, 96 DPPE, 96 PMPE, 108 PMCL<sup>2-</sup> и 36 молекул TYCL<sup>2-</sup> (соотношение PE:CL — 3:1), что отражает состав внутренней бактериальной мембраны [134]. Кроме того, в каждой листке мембраны вручную добавляли одну молекулу DYPE внутрь  $c$ -кольца, чтобы закрыть его центральный канал. Систему сольватировали 36785 молекулами воды TIP3P, а также регулировали количество ионов  $K^+$  и  $Cl^-$  для поддержания концентрации раствора 150 мМ и нейтрализации общего заряда. Размер системы составил  $150 \text{ \AA} \times 150 \text{ \AA} \times 90 \text{ \AA}$ . Детали молекулярной модели фермента дикого типа описаны в разделах 2.4.1 и 3.1.

В предыдущей главе были описаны результаты молекулярно-динамического моделирования фермента дикого типа, встроенного в нативный липидный бислой. Во входном полуканале была определена цепь переноса протона, состоящая из консервативных аминокислотных остатков ( $\alpha$ Glu219,  $\alpha$ Asp119,  $\alpha$ His245,  $\alpha$ Asn214,  $\alpha$ Gln252) и структурных кластеров молекул воды (W1-W3) (Рисунок 4.1). Данная цепь является основой для интерпретации исследований по сайт-специфическому мутагенезу.

Мутации включали изменения полярности остатка, его положения в полипептидной цепи или длины боковой группы. Кроме того, при выборе мутаций мы ориентировались на экспериментальные данные, поскольку большинство функционально значимых аминокислот были выявлены и изучены с использованием именно мутантных штаммов *E. coli* [60, 61, 70, 102–104, 107]. На основе построенной молекулярной модели мембранной части фермента дикого типа были сконструированы мутантные системы путем следующих замен



**Рисунок 4.1.** (А) Детальный вид на входной полуканал (вид со стороны *b*-субъединицы). Водная полость показана красной поверхностью. Отмечены аминокислоты, расположенные в «узком месте», а также боковые группы остатков, образующих «ворота». (Б) Схема цепи переноса протона, состоящая из консервативных аминокислотных остатков (*a*Glu219, *a*Asp119, *a*His245, *a*Asn214, *a*Gln252, *c*Asp61) и структурных кластеров молекул воды (W1-W3). Кластеры W2 и W3 координируют перенос протона между *a*His245 и *a*Asn214, в то время как кластер W1 был необходим для протонирования *c*Asp61.

во входном полуканале: *a*Arg210Ala, *a*Arg210Lys, *a*Asn214Leu, *a*Asn214His, *a*Glu219Gly, *a*Glu219Gln, *a*His245Gly, *a*His245Ser, *a*His245Tyr, *a*Gln252Leu и ревертант *a*Glu219His/*a*His245Glu с использованием плагина Mutator в программе VMD [195]. Изучение области около ключевого остатка *c*Asp61 входного полуканала («узкое место») позволит провести более точную оценку роли функциональных элементов белковой структуры в процессе  $H^+$  транспорта, поскольку перенос именно в этой области скорее всего является лимитирующей стадией движения протонов по полуканалам. В выходном полуканале шесть полярных аминокислотных остатков, которые находились в непосредственной близости от *c*Asp61, были одновременно заменены на аланин (*a*Glu196Ala/*a*Ser199Ala/*a*Ser202Ala/*a*Lys203Ala/*a*Ser206Ala/*a*Tyr263Ala). В случае замен, приводящих к ненулевому суммарному заряду, количество ионов в растворителе корректировалось с целью нейтрализации системы.

Для всех мутантных систем было проведено полноатомное МД моделирование в течение 150 нс с помощью программы NAMD [205], с использованием

силового поля CHARMM36 [206, 207]. Моделирование проводилось в изотермо-изобарическом (NPT) ансамбле с периодическими граничными условиями согласно протоколу, описанному в разделе 2.4.2. При этом, наше внимание было сфокусировано на влиянии указанных мутаций на локализацию структурных кластеров молекул воды W1-W3, поскольку цепь переноса протона была особенно нестабильной именно в этих областях.

## 4.2. Оценка влияния мутаций на стабильность структуры $\alpha$ -субъединицы

Для оценки влияния мутаций на стабильность структуры  $\alpha$ -субъединицы АТФсинтазы было рассчитано изменение свободной энергии Гиббса сворачивания белка ( $\Delta\Delta G$ ) с помощью программы FoldX [211], а также веб-сервиса Eris с использованием протокола «гибкого остова полипептидной цепи» (flexible backbone) [212]. Работа этих инструментов основана на изменении непосредственно трехмерной структуры белка и применении эмпирических силовых полей, полученных из экспериментов по инженерии белков, с использованием быстрого алгоритма выбора конформаций. Это позволяет оценить свободную энергию сворачивания белка дикого типа ( $\Delta G_{WT}$ ) и мутанта ( $\Delta G_{Mut}$ ), в то время как изменение свободной энергии Гиббса определяется как:

$$\Delta\Delta G = \Delta G_{Mut} - \Delta G_{WT} \quad (4.1)$$

Полученные значения  $\Delta\Delta G$  представлены в таблице 3. В случае некоторых замен остатков  $\alpha\text{Glu219}$  и  $\alpha\text{His245}$  значения  $\Delta\Delta G$  принимали положительные значения больше 1 ккал/моль, что указывает на дестабилизирующий эффект. При этом замена положительно заряженного гистидина на нейтральный глицин с короткой боковой цепью  $\alpha\text{His245Gly}$  приводила к самому сильному дестабилизирующему эффекту ( $\Delta\Delta G = 3,71$  ккал/моль). Для остальных мутаций рассчитанные значения  $\Delta\Delta G$  были сопоставимы между двумя инструментами и принимали отрицательные или близкие к нулю значения, что указывало на нейтральный или стабилизирующий эффект. Исходя из этого можно предположить, что большинство рассмотренных мутаций не должны

оказывать разрушительного воздействия на структуру  $\alpha$ -субъединицы. Экспериментальные исследования также показали, что замены этих остатков не нарушали сборку мембранной части фермента [103, 107]. Однако, отсутствие существенного влияния на общую стабильность сворачивания белка не дает гарантии, что мутации не будут оказывать влияния на процесс протонного транспорта. Кроме того, существующие алгоритмы для оценки  $\Delta\Delta G$  имеют среднеквадратичную ошибку, близкую к 1 ккал/моль. Это означает, что любое объяснение, основанное на предсказании  $\Delta\Delta G$  мутаций, будет иметь относительно высокую степень неопределенности [213].

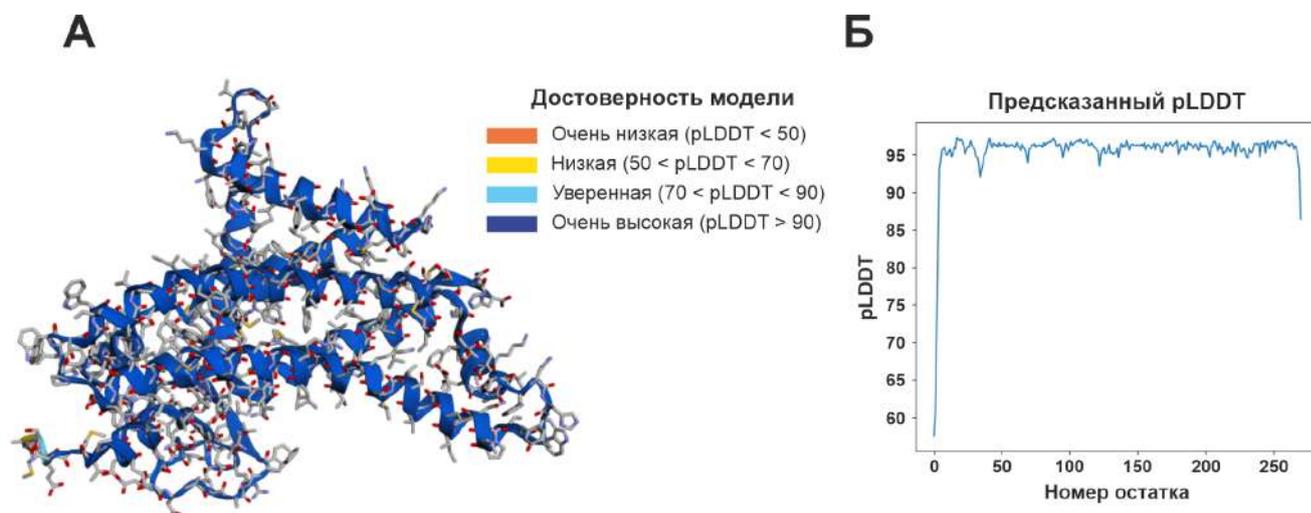
Таблица 3. Разница свободной энергии Гиббса сворачивания белка ( $\Delta\Delta G$ ) между  $\alpha$ -субъединицей дикого типа и мутантов.

| Мутации   | $\Delta\Delta G$ , ккал/моль |       |
|---|------------------------------|-------|
|   | Eris                         | FoldX |
| $\alpha R210A$  | 0,45                         | -0,06 |
| $\alpha R210K$  | 0,18                         | -0,30 |
| $\alpha N214L$  | -3,84                        | -2,24 |
| $\alpha N214H$  | -0,04                        | -0,01 |
| $\alpha E219G$  | 0,88                         | 1,29  |
| $\alpha E219Q$  | -1,59                        | -1,47 |
| $\alpha H245G$  | 3,71                         | 0,74  |
| $\alpha H245S$  | 0,93                         | 0,63  |
| $\alpha H245Y$  | -1,59                        | -1,26 |
| $\alpha Q252L$  | -1,85                        | -2,92 |
| $\alpha E219H/\alpha H245E$   | 1,24                         | 2,08  |
| $\alpha E196A/\alpha S199A$<br>$\alpha S202A/\alpha K203A$<br>$\alpha S206A/\alpha Y263A$ | -0,50                        | 0,49  |

Структуры мутантных  $\alpha$ -субъединиц также были предсказаны с помощью программы AlphaFold для оценки влияния аминокислотных замен на фолдинг белка, хотя разработчики не гарантируют, что программа создаст развернутую структуру белка при наличии последовательности, содержащей дестабилизирующую точечную мутацию [214].

Тем не менее, для всех рассмотренных мутаций были получены трехмерные свернутые структуры  $\alpha$ -субъединицы. Для оценки степени совпадения

предсказанного белка с эталонной структурой использовался показатель достоверности теста локальной разницы расстояний pLDDT (predicted local distance difference test), значение которого находится в диапазоне от 0 до 100. Оценки pLDDT, усредненные по всем аминокислотным остаткам, обозначают общую достоверность для всей белковой цепи ( $\langle \text{pLDDT} \rangle$ ). Для всех предсказанных  $\alpha$ -субъединиц показатель  $\langle \text{pLDDT} \rangle$  был выше 95, что указывает на высокую точность моделей, полученных с помощью AlphaFold. Кроме того, для измерения степени совпадения между структурой  $\alpha$ -субъединицы дикого типа [PDB ID: 6VWK] и мутантами, полученными с помощью AlphaFold, также были рассчитаны среднеквадратичные отклонения RMSD между ними (Таблица 4). При этом, более низкие значения RMSD свидетельствуют о более высокой степени сходства между исследуемыми структурами. Среднее значение RMSD для всех мутантов, построенных AlphaFold, составило 1,59 Å.



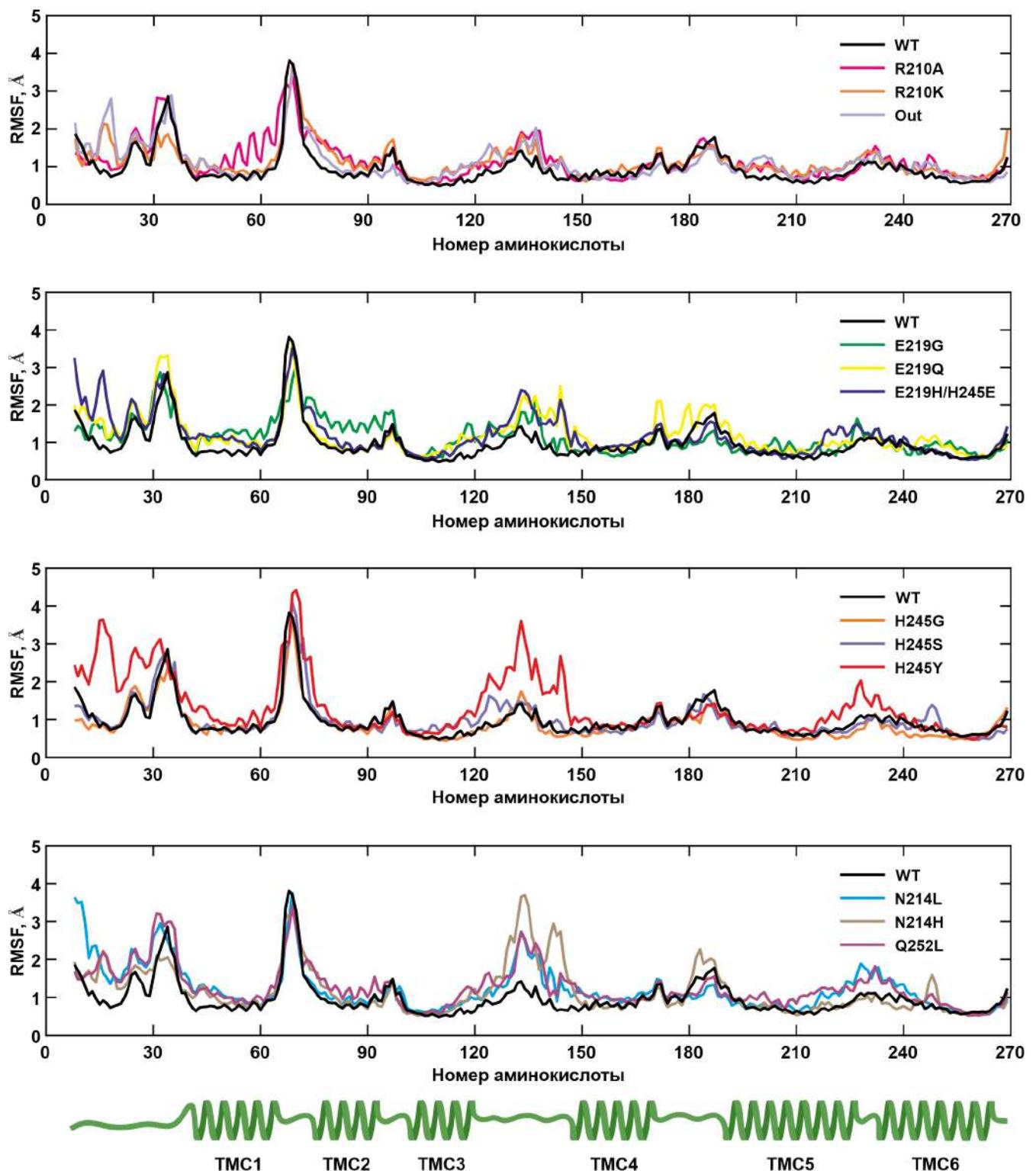
**Рисунок 4.2.** (А) Структура  $\alpha$ -субъединицы дикого типа, предсказанная с помощью AlphaFold. (Б) График значений pLDDT остатков  $\alpha$ -субъединицы дикого типа. Для всей белковой цепи показатель pLDDT был выше 90, за исключением N-конца.

Конформационная стабильность  $\alpha$ -субъединицы оценивалась путем расчета следующих параметров: среднеквадратичные отклонения (RMSD), среднеквадратичные флуктуации (RMSF), радиус инерции (RG), количество водородных связей (Hbond) и площадь поверхности, доступная для растворителя (SASA), полученных в результате 150 нс МД моделирования. Средние значения всех рассчитанных параметров представлены в таблице 4.

Таблица 4. Расчетные параметры структурной стабильности  $\alpha$ -субъединицы для всех мутантных систем, полученные с помощью МД моделирования или AlphaFold.

| Мутации  | RMSD, Å | RMSF, Å | RG, Å | SASA, $10^4$ Å <sup>2</sup> | Hbond | RMSD, Å (AlphaFold) |
|--|---------|---------|-------|-----------------------------|-------|---------------------|
| WT   | 2,41    | 1,04    | 22,24 | 1,25                        | 59    | 1,51                |
| <i>a</i> R210A   | 2,34    | 1,19    | 22,49 | 1,30                        | 60    | 1,36                |
| <i>a</i> R210K   | 2,34    | 1,17    | 22,25 | 1,31                        | 58    | 1,35                |
| <i>a</i> N214L   | 2,64    | 1,31    | 22,34 | 1,30                        | 61    | 1,48                |
| <i>a</i> N214H   | 2,59    | 1,20    | 22,47 | 1,32                        | 60    | 1,43                |
| <i>a</i> E219G   | 2,67    | 1,18    | 22,15 | 1,26                        | 61    | 1,51                |
| <i>a</i> E219Q   | 2,60    | 1,24    | 22,46 | 1,30                        | 61    | 1,49                |
| <i>a</i> H245G   | 2,36    | 0,91    | 22,31 | 1,26                        | 59    | 1,73                |
| <i>a</i> H245S   | 2,45    | 1,06    | 22,40 | 1,28                        | 59    | 1,61                |
| <i>a</i> H245Y   | 2,91    | 1,40    | 22,44 | 1,37                        | 61    | 1,89                |
| <i>a</i> Q252L   | 2,94    | 1,30    | 22,37 | 1,32                        | 58    | 1,48                |
| <i>a</i> E219H/ <i>a</i> H245E   | 2,51    | 1,24    | 22,20 | 1,29                        | 57    | 1,67                |
| <i>a</i> E196A/ <i>a</i> S199A<br><i>a</i> S202A/ <i>a</i> K203A<br><i>a</i> S206A/ <i>a</i> Y263A | 2,25    | 1,14    | 22,39 | 1,34                        | 60    | 1,49                |

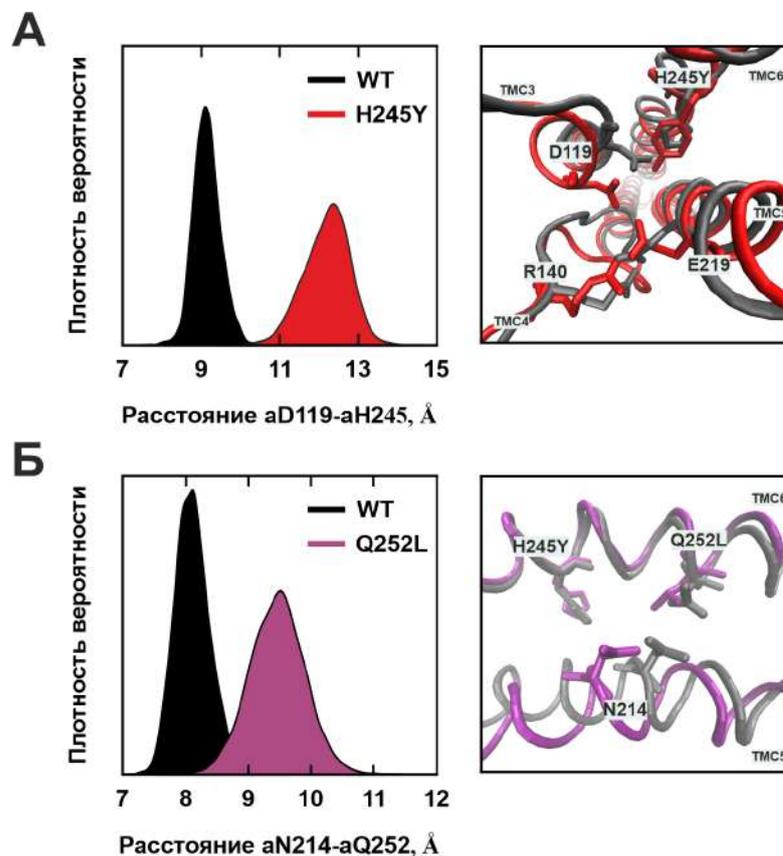
Средние значения RMSD для фермента дикого типа и мутантов не превышали 3 Å, что указывает на то, что модельные системы с мутациями сохраняли свою структурную целостность на протяжении всего МД моделирования. Тем не менее, в случае мутаций *a*His245Tyr и *a*Gln252Leu были обнаружены заметные структурные изменения, а средние значения RMSD для данных замен составили 2,91 Å и 2,94 Å соответственно (Таблица 4). Рассчитанные значения RMSF атомов остова для всех 271 аминокислот  $\alpha$ -субъединицы дикого типа и с мутациями показали, что N-концевая часть, остатки в положениях 65-70 (петля между *a*TMC1 и *a*TMC2) и в положениях 121-143 (петля между *a*TMC3 и *a*TMC4) демонстрировали самые высокие колебания во всех системах, в то время как остатки, образующие протонные полуканалы (*a*TMC3-6), были менее подвижны (Рисунок 4.3). Среднее значение RMSF составило 1,17 Å, однако, наибольшая подвижность остатков также наблюдалась у мутантов *a*His245Tyr и *a*Gln252Leu со средними значениями RMSF 1,40 Å и 1,30 Å, соответственно. В случае замены



**Рисунок 4.3.** График RMSF атомов остова аминокислот  $\alpha$ -субъединицы для WT и 12 мутаций. Внизу схематически представлена топология  $\alpha$ -субъединицы, которая состоит из шести трансмембранных спиралей (ТМС). Здесь и далее каждый цвет линии соответствует определенной мутации.

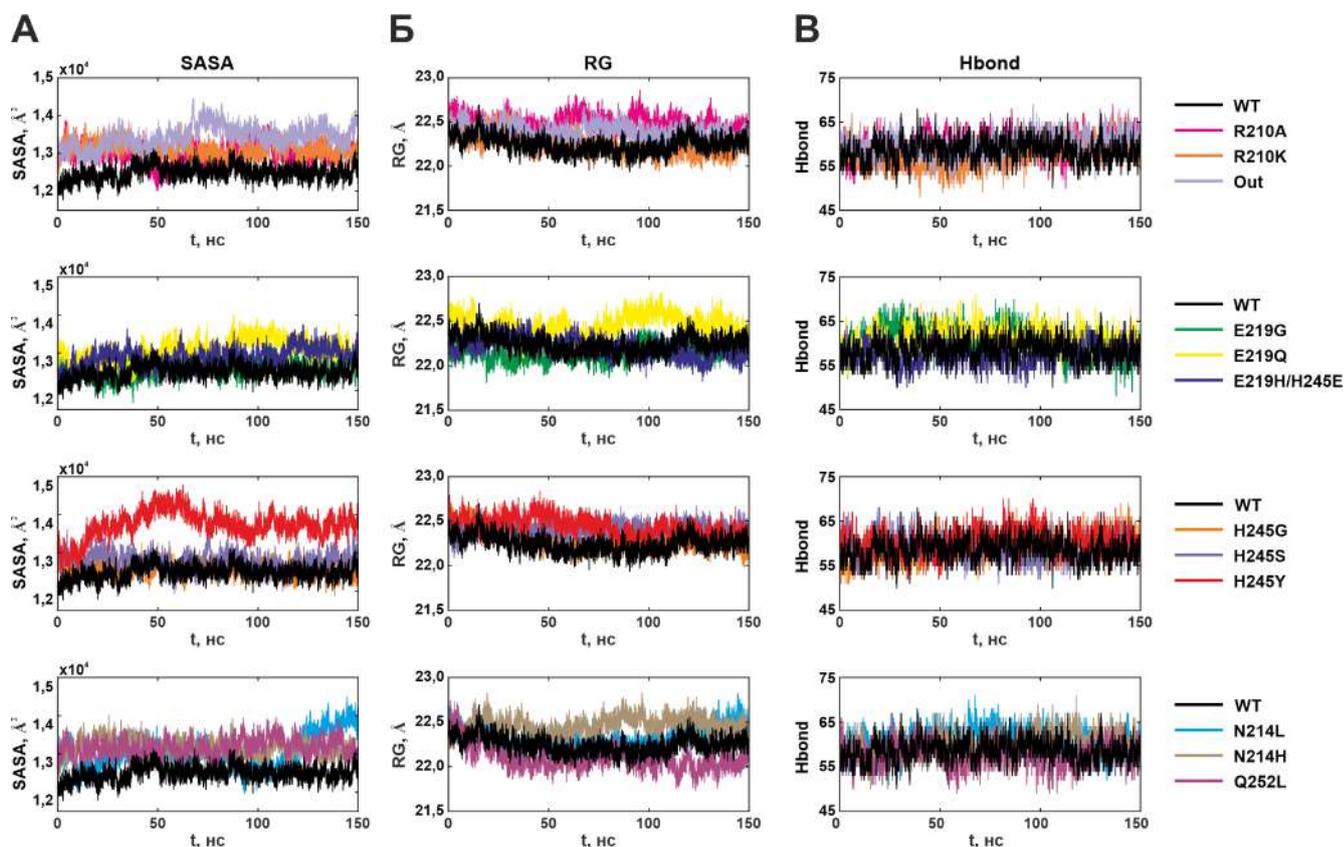
$\alpha$ His245Tyr в области  $\alpha$ Asp119,  $\alpha$ Glu219 и  $\alpha$ His245Tyr наблюдалось увеличение расстояния между  $\alpha$ TMC3 и  $\alpha$ TMC5 из-за смещения  $\alpha$ TMC3 (Рисунок 4.4А).

Удаление полярной боковой цепи глутамина при замене на лейцин тоже приводило к увеличению расстояния между  $\alpha$ TMC5 и  $\alpha$ TMC6 в области  $\alpha$ Asn214 и  $\alpha$ Gln252Leu, а также к смещению остатков  $\alpha$ TMC5 (Рисунок 4.4Б). Влияние этих конформационных изменений на процесс протонного транспорта будет рассмотрено в следующем разделе.



**Рисунок 4.4.** (А) Слева: плотность распределения расстояния между атомами  $C_{\alpha}$   $\alpha$ Asp119 и  $\alpha$ His245 для WT (черный) и  $\alpha$ His245Tyr (красный) указывает на увеличение расстояния между  $\alpha$ TMC3 и  $\alpha$ TMC6 в области «ворот». Справа: наложение молекулярных моделей  $\alpha$ -субъединицы, полученных в результате 150 нс МД моделирования, для WT (черный) и  $\alpha$ His245Tyr (красный). Показано изменение относительного положения боковых групп остатков  $\alpha$ Asp119,  $\alpha$ Arg140,  $\alpha$ Glu219 и  $\alpha$ His245. (Б) Слева: плотность распределения расстояния между атомами  $C_{\alpha}$   $\alpha$ Asn214 и  $\alpha$ Gln252 для WT (черный) и  $\alpha$ Gln252Leu (фиолетовый) указывает на увеличение расстояния между  $\alpha$ TMC5 и  $\alpha$ TMC6 в области протонирования остатка  $\alpha$ Asp61. Справа: наложение молекулярных моделей  $\alpha$ -субъединицы, полученных в результате 150 нс МД моделирования, для WT (черный) и  $\alpha$ Gln252Leu (фиолетовый). Показано смещение  $\alpha$ TMC5, приводящее к изменению относительного положения боковых групп остатков  $\alpha$ Asn214 и  $\alpha$ Gln252.

Площадь поверхности, доступная для растворителя (SASA), является индикатором размера белка (Рисунок 4.5А). Все рассмотренные аминокислотные замены не показали каких-либо существенных изменений в значениях SASA по сравнению с диким типом. Однако, для мутаций *a*His245Tyr наблюдалось одно из самых высоких значений SASA ( $1,37 \cdot 10^4 \text{ \AA}^2$ ), которое связано с конформационными изменениями в *a*-субъединице. Радиус инерции (RG) отражает общую компактность и размер белковой системы во время МД моделирования (Рисунок 4.5Б). Средние значения RG находились в диапазоне от 22,15 Å до 22,47 Å, что означает, что все системы оставались компактными. Еще одним параметром, отражающим стабильность белка, является количество внутримолекулярных водородных связей (Hbond), образующихся между остатками белка (Рисунок 4.5В). Все рассмотренные мутации не оказывали влияния на число Hbond, а среднее значение составило 60. Таким образом, рассмотренные мутации в целом не оказывали сильного дестабилизирующего эффекта и не приводили к денатурации *a*-субъединицы. Тем не менее, конформационные изменения, обнаруженные в случае некоторых мутаций, требуют дополнительного глубокого анализа для оценки их влияния на процесс протонного транспорта.



**Рисунок 4.5.** Графики SASA (А), RG (Б), Hbond (В) для *a*-субъединицы WT и 12 мутаций.

### 4.3. Исследование роли существенных аминокислотных остатков в процессе протонного транспорта

Для определения функциональной роли конкретных аминокислотных остатков в цепи переноса протона было выполнено полноатомное МД моделирование мутантных штаммов мембранной части бактериальной АТФсинтазы в течение 150 нс. Кроме того, был проведен сравнительный анализ с результатами нашего предыдущего моделирования фермента дикого типа, встроенного в нативный липидный бислой, а также с экспериментальными данными по сайт-специфическому мутагенезу. При анализе МД траекторий особое внимание было уделено структурной динамике боковых групп аминокислот мутированного остатка и близлежащих к нему, а также гидратации белка. Для оценки влияния мутаций на структурные кластеры молекул воды были рассчитаны следующие параметры: *занятость кластера* — процент времени моделирования, в течение которого молекулы воды наблюдались в области локализации кластера; *емкость кластера* — максимально наблюдаемое количество молекул воды в кластере. Важность остатка для процесса протонного транспорта оценивалась по сохранению возможного пути переноса.

#### 4.3.1. Мутации *aArg210*

Высококонсервативным остатком в структуре фермента, который присутствует у всех организмов, является положительно заряженный Arg. Данный аминокислотный остаток расположен между полуканалами фактора  $F_o$  и обеспечивает связанное с протонным транспортом вращение *c*-кольца, особенно во время синтеза АТФ, а также предотвращает утечку протонов через мембрану (Рисунок 4.6А).

Для анализа изменений были построены электростатические поверхности *a*-субъединицы дикого типа, а также для мутаций *aArg210Ala* и *aArg210Lys* (Рисунок 4.6Б). Замена аминокислотного остатка *aArg210* на неполярный Ala приводила к слиянию полуканалов, в результате чего образовывалось непрерывное пространство единого трансмембранного канала, заполненного

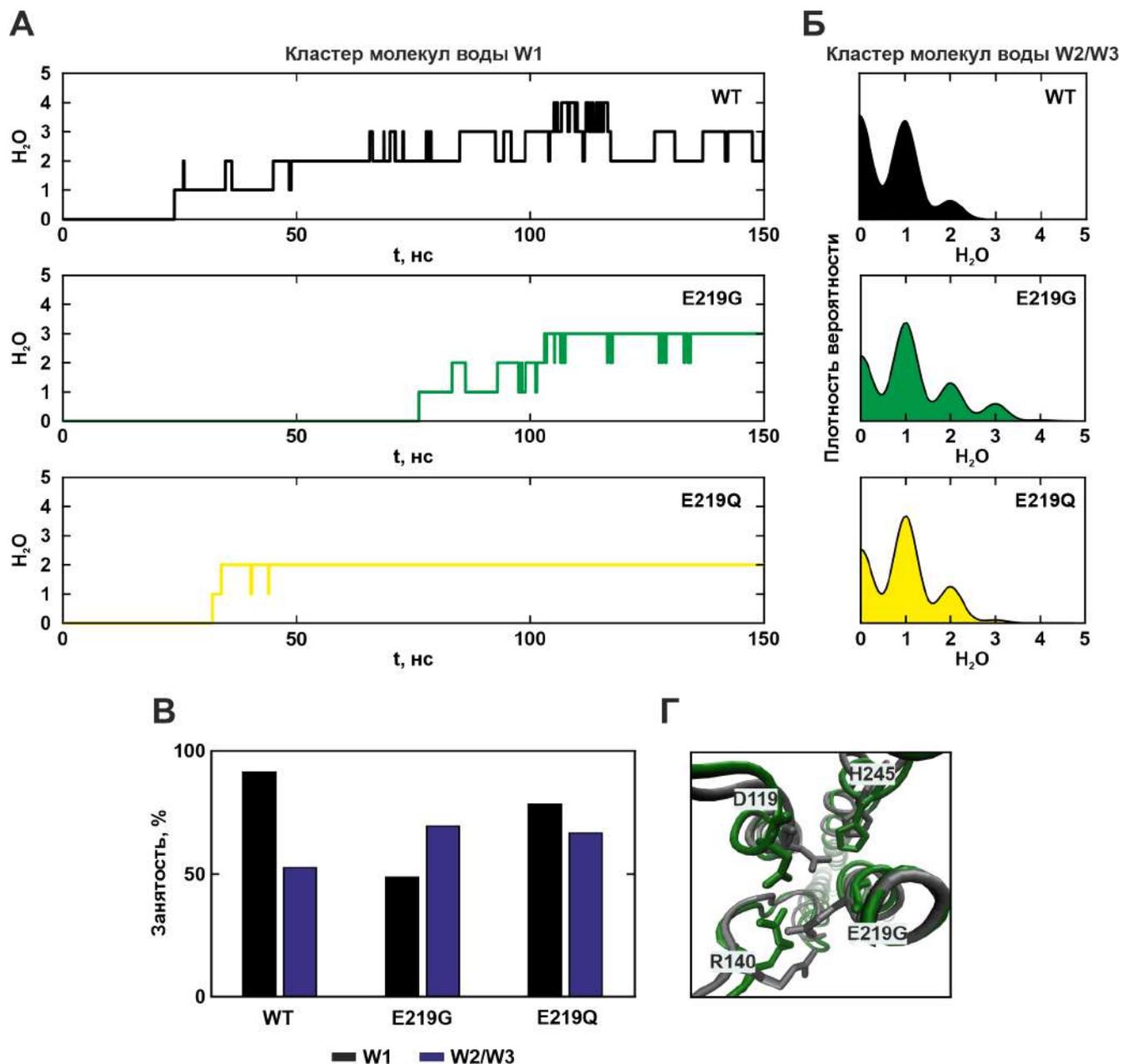


его наличие необходимо для существования полуканалов и корректного функционирования фермента.

### 4.3.2. Мутации *aGlu219*

Остаток *aGlu219* вместе с *aAsp119* и *aHis245* расположены в самом начале цепи переноса протона в «узком месте» входного полуканала. В ферменте дикого типа данные остатки были сильно гидратированы. Молекулы воды проникали во входной полуканал через водную полость вплоть до этих аминокислот, образуя сильно разветвленные сети водородных связей, по которым протон мог легко их достигнуть из периплазмы. Боковые группы *aGlu219*, *aAsp119* и *aHis245*, расположенные на разных ТМС *a*-субъединицы (на *aТМС5*, *aТМС3* и *aТМС6* соответственно), перекрывали полуканал, образуя что-то похожее на «ворота», которые регулировали прохождение молекул воды глубже в полуканал к *cAsp61* (Рисунок 4.1).

В случае мутаций *aGlu219Gly* или *aGlu219Gln* наблюдалось замедление проникновения молекул воды в область кластера W1, который был расположен в глубине входного полуканала около *aAsn214*, *aGln252* и *cAsp61*, хотя в структуре дикого типа эта область заполнялась в течение первых 30 нс моделирования (Рисунок 4.7А). В мутантных системах наблюдалось снижение занятости (процент от времени моделирования, в течение которого вода наблюдается в области) кластера W1 по сравнению с диким типом (WT — 92%, *aGlu219Gly* — 49%, *aGlu219Gln* — 79%), в то время как для кластера W2/W3 отмечалось увеличение данного показателя (WT — 53%, *aGlu219Gly* — 70%, *aGlu219Gln* — 67%) (Рисунок 4.7В). Молекулы воды реже наблюдались в кластере W1, что затрудняло протонирование *cAsp61*, хотя одновременно указанные замены приводили к небольшому увеличению емкости (максимальное число молекул воды) кластеров W2/W3 (наблюдалось до 4 молекул воды) (Рисунок 4.7Б). Эти эффекты могли быть связаны с изменением положения боковой группы *aArg140*, расположенной ближе всего к *aGlu219*. У обоих мутантов в месте локализации боковой группы *aGlu219* у WT наблюдался радикал положительно заряженного *aArg140*, который большую часть времени моделирования находился в контакте (расстояние составляло менее 3 Å) с *aAsp119* (Рисунок 4.7Г).



**Рисунок 4.7.** Результаты МД моделирования для WT,  $\alpha$ Glu219Gly и  $\alpha$ Glu219Gln. (А) Число молекул воды в кластере W1 в течение 150 нс МД моделирования. (Б) Плотность распределения числа молекул воды в кластере W2/W3, отражающая емкость кластеров. (В) Занятость кластера водой (т.е. процент от времени моделирования, в течение которого вода наблюдается в области) показана черным цветом для W1, синим — для W2/W3. (Г) Наложение молекулярных моделей  $\alpha$ -субъединицы, полученных в результате 150 нс МД моделирования, для WT (черный) и  $\alpha$ Glu219Gly (зеленый). Показано изменение относительного положения боковых групп остатков  $\alpha$ Asp119,  $\alpha$ Arg140,  $\alpha$ Glu219 и  $\alpha$ His245, которые образуют «ворота».

Таким образом, в случае замен *aGlu219* на глицин или глутамин возможный путь движения протона практически не изменялся по сравнению с диким типом (не наблюдалось разрыва цепи переноса  $H^+$ ), однако, изменение локального заряда в самом начале «узкого места» приводило к некоторому затруднению проникновения молекул воды вглубь входного полуканала.

Экспериментальные исследования показали, что мутантные штаммы *aGlu219Gly* росли за счет окислительного фосфорилирования на сукцинатной среде (т.е. сохраняли синтез АТФ), а АТФ-зависимая протонная проводимость наблюдалась с эффективностью от 60% до 80% от дикого типа [61]. Единичная замена *aGlu219Gln* приводила к образованию штамма, который плохо рос на сукцинате. Мембранные препараты данного мутанта были плохо проницаемы для протонов, а активность  $F_1$ -АТФазы ингибировалась примерно на 50% при связывании с таким мембранным фактором  $F_o$  [104]. Таким образом, на основе экспериментальных данных вместе с МД моделированием можно сделать вывод, что остаток *aGlu219*, расположенный в начале цепи переноса протона, оказывает влияние на гидратацию входного полуканала, способствуя проникновению молекул воды вглубь, но непосредственно не играет решающей роли в процессе переноса протонов.

### 4.3.3. Мутации *aHis245*

*aHis245* является остатком, который передает  $H^+$  от «ворот» дальше по цепи переноса протона на *aAsn214*. В ферменте дикого типа среднее расстояние между этими остатками составило 4,41 Å из-за высокой подвижности боковой группы *aAsn214* (наличие SP) и редко достигало значений ниже 3 Å, что затрудняло движение протонов в этой области. Тем не менее, между *aHis245* и *aAsn214* были обнаружены области локализации структурных кластеров молекул воды W2 и W3, которые могли способствовать переносу протона между этими остатками (Рисунок 3.6).

В то время как *aGlu219* и *aAsp119* были сильно гидратированы в ферменте дикого типа, замена положительно заряженного *aHis245* на неполярный глицин с малой боковой группой приводила к снижению гидратации аминокислот *aAsn214*, *aGln252* и *cAsp61* в «узком месте» (Рисунок 4.8). До трех

молекул воды проникало к *cAsp61*, т.е. емкость кластера W1 сохранялась, хотя занятость была снижена (92% для WT и 44% для *aHis245Gly*). Однако, удаление заряда привело к исчезновению кластеров молекул воды W2 и W3, обеспечивающих перенос на *aAsn214*. Таким образом, цепь переноса протона была прервана, поскольку сам остаток глицина, расположенный в 245 положении, не мог участвовать в передаче H<sup>+</sup>. Следует отметить, что несмотря на предсказанный сильный дестабилизирующий эффект ( $\Delta\Delta G = 3,71$  ккал/моль), результаты МД моделирования мутантного штамма *aHis245Gly* не показали каких-либо конформационных изменений в структуре  $\alpha$ -субъединицы. Поэтому высокое значение  $\Delta\Delta G$ , вероятно, обусловлено исключительно изменением полярности аминокислотного остатка в 245 положении.

Напротив, замена *aHis245* на полярный серин привела к повышению гидратации почти всех консервативных аминокислот по сравнению с диким типом (Рисунок 4.8). Остаток Ser, имеющий гидроксильную группу, мог непосредственно принимать участие в переносе протона на *aAsn214*, однако, минимально наблюдаемое расстояние между ними составило 5,65 Å, что велико для совершения прямого переноса. Между этими остатками была обнаружена цепь, состоящая из двух или трех молекул воды, т.е. емкость кластеров W2 и W3 была увеличена. Вода вместе с остатками *aGlu219*, *aAsp119* и *aHis245Ser* образовывала сеть водородных связей, по которой протон мог достигать *aAsn214*. При этом замена *aHis245Ser* не оказывала влияния на кластер W1, и цепь переноса протона сохранялась. Таким образом, замены большого имидазольного кольца гистидина на остатки с малой боковой группой не обязательно приведут к увеличению гидратации, что можно было бы предположить, основываясь исключительно на геометрических соображениях. Важным фактором для обеспечения проникновения молекул воды вглубь входного полуканала и поддержания протонного транспорта является полярность замещенного остатка.

Замена *aHis245* на тирозин с гидроксильной группой в пара-положении бензольного кольца приводила к конформационным изменениям в структуре  $\alpha$ -субъединицы. Средние значения RMSD для данного мутанта составили 2,91 Å. В области *aAsp119* и *aHis245Tyr* наблюдалось увеличение расстояния между *aTMC3* и *aTMC6* из-за смещения *aTMC3*, что приводило к изменению взаимного расположения остатков, образующих «ворота» (Рисунок 4.4А). Это влияло на проникновение молекул воды вглубь входного полуканала к *cAsp61*. Между *aHis245Tyr* и *aAsn214* сохранились кластеры молекул воды W2 и W3,



однако вода не проникала за пределы аспарагина в область кластера W1 (Рисунок 4.8). Таким образом, цепь переноса протона была прервана, поскольку сAsp61 не мог быть протонирован при отсутствии кластера молекул воды W1.

Экспериментальные замены *aHis245* аминокислотами с малой боковой группой (Gly, Ser, Cys) приводили к полной потере функции АТФсинтазы, о чем свидетельствовала неспособность мутировавших бактерий расти на минимальной сукцинатной среде. Однако, для штамма *aHis245Ser* наблюдался некоторый рост при добавлении 10-100 мМ ацетата натрия [60]. Замена *aHis245Tyr* приводила к полной потере АТФ-зависимого протонного градиента [107]. Следовательно, *aHis245* является функционально важной аминокислотой для процесса протонного транспорта. Этот остаток оказывает влияние на гидратацию входного полуканала и принимает непосредственное участие в переносе протона, а молекулы воды или боковые группы соседних полярных аминокислот не могут заменить его.

Примечательно, что пространственное расположение остатков *aGlu219* и *aHis245* из *E. coli* подверглось обратной перестановке в митохондриальных АТФсинтазах некоторых организмов, таких как млекопитающие (*aHis168* и *aGlu203*) [23] или дрожжи (*aHis185* и *aGlu223*) [27]. В связи с этим особый интерес представлял ревертант этих двух аминокислот. Имидазольное кольцо His в 219 положении занимало такое же пространственное расположение, как и в структуре дикого типа, где практически все время моделирования находилось в контакте с *aAsp119* и *aHis245Glu*. При этом, консервативные аминокислотные остатки цепи переноса протона были гидратированы сильнее. Наблюдалось увеличение емкости и занятости области локализации кластеров W1-W3 по сравнению с диким типом (Рисунок 4.8). Таким образом, несмотря на вариабельность локализации остова гистидина, наличие его имидазольного кольца играет критическую роль в области «ворот». Траектория движения протонов сохранялась, как и предположительно в экспериментальных исследованиях с мутантными штаммами *E. coli*, где фермент с взаимной заменой *aGlu219His/aHis245Glu* оказывался частично функциональным. Наблюдался АТФ-зависимый протонный транспорт, хотя и меньший, чем у фермента дикого типа [103].

#### 4.3.4. Мутации *aAsn214*

Еще одним значимым для протонного транспорта аминокислотным остатком является *aAsn214*, боковая группа которого имела устойчивые пространственные положения (SP1-SP3) в ферменте дикого типа. Было установлено, что в устойчивом положении SP1 *aAsn214* ориентирован на *aHis245*, в то время как в положении SP3 на ключевой *cAsp61* и мог протонировать его через кластер воды W1. Таким образом, изменение положения боковой группы *aAsn214* являлось необходимым условием для обеспечения протонного транспорта (Рисунок 3.7).

При замене *aAsn214* на неполярный лейцин входная область около *aGlu219*, *aAsp119* и *aHis245* была сильно гидратирована и похожа на дикий тип. Далее молекулы воды (W2/W3) проникали во входной полуканал вплоть до *aAsn214Leu*, однако отсутствие полярной боковой группы приводило к затруднению гидратации *cAsp61*, и занятость кластера W1 была снижена (WT — 92% и *aAsn214Leu* — 36%) (Рисунок 4.9). Только в конце МД траектории мы наблюдали проникновение всего одной молекулы воды в область кластера W1. Таким образом, цепь переноса протона была прервана, и протонирование *cAsp61* было невозможно, поскольку неполярная боковая группа остатка Leu в 214 положении не могла участвовать в переносе  $H^+$  на воду W1, а протонирование через *aGln252* было невозможно по причине его низкой гидратации. При этом экспериментальные замены *aAsn214* на Val, Leu, Gln или Glu показали значительное снижение АТФ-зависимой протонной проводимости, хотя способность клеток расти на сукцинатной среде сохранялась [70].

#### 4.3.5. Мутации *aGln252*

Аминокислота *aGln252* была расположена в самом конце входного полуканала и находилась в контакте с *aAsn214*, вместе с которым могла протонировать *cAsp61* через кластер W1. Однако, остаток *aGln252* располагался в стороне от основной траектории движения  $H^+$  и не играл решающей роли в переносе протона, в отличие от *aAsn214* (Рисунок 4.1).



высоким из всех рассматриваемых мутаций. Увеличилась емкость и занятость области локализации W2/W3, наблюдалось до пяти молекул воды, которые координировали перенос протона между *a*His245 и *a*Asn214, тогда как в диком типе только две. При этом, кластер W1 не изменился (Рисунок 4.9). Таким образом, замена *a*Gln252Leu не приводила к нарушению цепи переноса протона, однако вызывала конформационные изменения в структуре *a*-субъединицы.

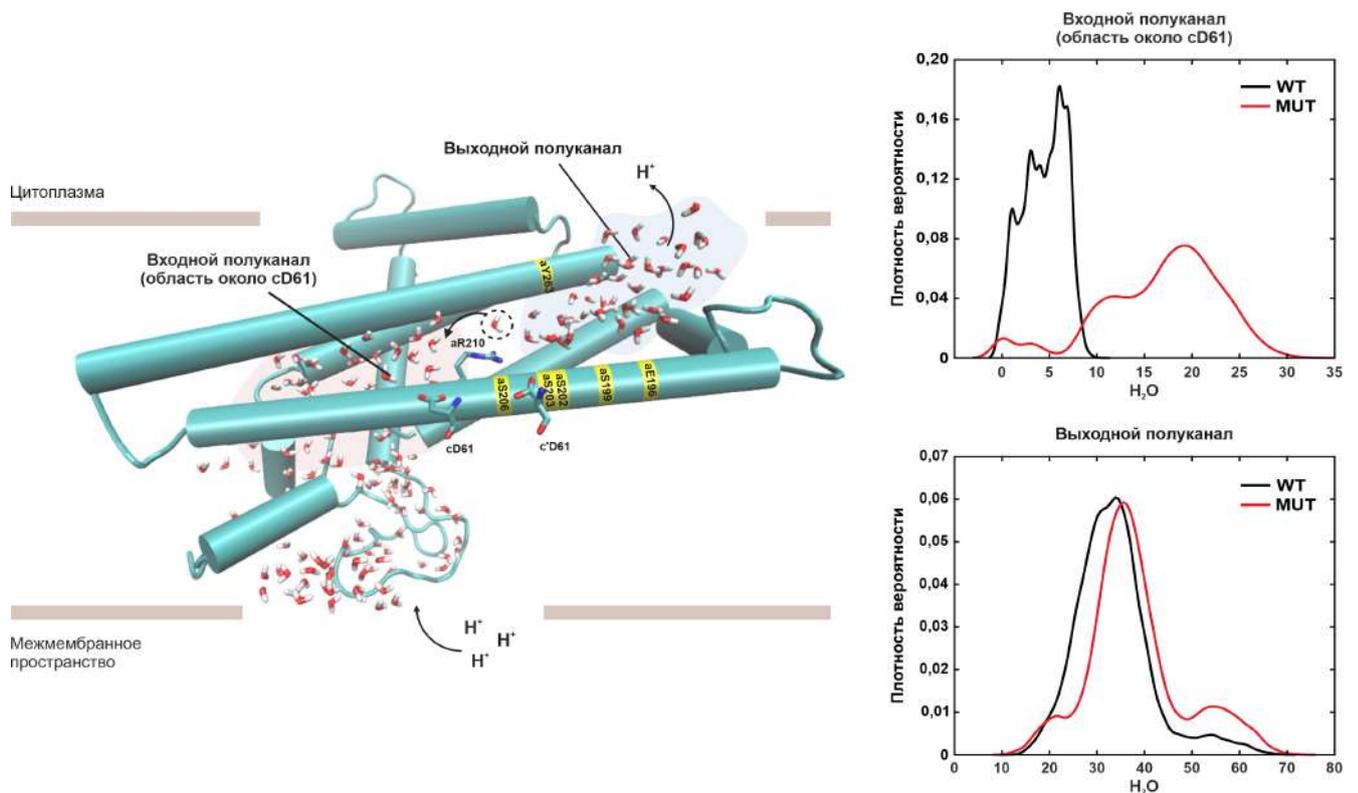
Экспериментальные исследования показали, что замены *a*Gln252 на незаряженные остатки Leu или Val снижали активность фермента, в то время как при замене на заряженную аминокислоту Glu существенного эффекта не наблюдалось [102]. Результаты экспериментов и МД моделирования позволяют предположить, что *a*Gln252, вероятно, не принимает участия непосредственно в процессе протонного транспорта, однако его положение играет важную роль в обеспечении стабильности *a*-субъединицы.

#### 4.3.6. Мутации аминокислот выходного полуканала

Экспериментальные одиночные замены полярных аминокислотных остатков выходного полуканала не вызывали заметных фенотипических изменений по сравнению с ферментом дикого типа [106, 107]. Только замена *a*Glu196 на другие полярные/неполярные аминокислоты приводила к снижению АТФ-зависимого переноса протонов в различной степени, но не предотвращала рост на минимальной сукцинатной среде [108].

Для оценки влияния полярных аминокислот выходного полуканала на его гидратацию, были одновременно подвергнуты замене шесть остатков (*a*Glu196, *a*Ser199, *a*Ser202, *a*Lys203, *a*Ser206, *a*Tyr263), расположенных в непосредственной близости от *c*Asp61, на аланин. В результате количество молекул воды в выходном полуканале практически не изменилось, в то время как область около соседнего *c*Asp61 входного полуканала была гидратирована сильнее по сравнению с диким типом (Рисунок 4.10). Удаление заряженных групп, находящихся вблизи *a*Arg210, приводило к периодическому слиянию полуканалов (не постоянному, как при мутациях *a*Arg210Ala и *a*Arg210Lys), в результате чего молекулы воды проникали во входной полуканал через выходной. При этом,

*a*Arg210 предотвращает слияние полуканалов, однако, видимо, только его присутствия недостаточно для эффективного выполнения этой функции.



**Рисунок 4.10.** Замена полярных остатков *a*Glu196, *a*Ser199, *a*Ser202, *a*Lys203, *a*Ser206, *a*Tyr263 выходного полуканала на Ala. Справа показаны плотности распределения числа молекул воды в области около *c*Asp61 входного полуканала и в выходном полуканале для WT (черный) и мутанта (красный).

#### 4.4. Выводы по главе

В настоящем исследовании для того, чтобы выявить функционально важные аминокислотные остатки в описанной нами цепи переноса протона, был проведен мутационный анализ с использованием МД моделирования в течение 150 нс для каждой мутации. На основе структуры дикого типа были сконструированы различные замены аминокислотных остатков входного и выходного полуканалов в *a*-субъединице. Важность остатка для процесса протонного транспорта оценивалась по сохранению возможного пути переноса. Результаты мутационного анализа показывают, что замены многих консервативных поляр-

ных аминокислот приводят к изменению гидратации входного полуканала, что в свою очередь оказывает влияние на протонную проводимость.

Прежде всего была проведена оценка стабильности структуры  $\alpha$ -субъединицы всех рассмотренных мутантов. Рассчитанный энергетический ландшафт  $\Delta\Delta G$  показал, что структура белка устойчива к мутациям, поскольку замены существенных остатков не приводили к сильным дестабилизирующим эффектам. При исследовании структур мутантной  $\alpha$ -субъединицы, предсказанных с помощью AlphaFold, а также анализе результатов МД моделирования не было выявлено разрушительного воздействия аминокислотных замен на конформационную стабильность. Однако, в случае замен  $\alpha\text{His245Tyr}$  и  $\alpha\text{Gln252Leu}$  наблюдались конформационные изменения во взаимном расположении  $\alpha\text{TMC4-6}$  (что также отражено в более высоких значениях RMSD), которые оказывали влияние на цепь переноса протона. Тем не менее, мутации могут нарушать активность белка, не меняя его стабильности (или с незначительными изменениями), например, путем разрыва цепи переноса протонов или изменяя гидратацию кластеров W1-W3. Безопасный уровень стабильности, при котором  $\alpha$ -субъединица АТФсинтазы может нормально функционировать, еще предстоит установить экспериментально.

Мутационный анализ аминокислот, входящих в цепь переноса протона во входном полуканале, показал, что остатки могут функционально по-разному влиять на транспорт: участвовать в прямом переносе протонов, способствовать гидратации или обеспечивать стабильность самой структуры полуканала. Следует отметить, что, как правило, повышенная гидратация позволяет увеличить скорость движения протонов во время функционирования фермента и облегчить транспорт в условиях критических мутаций. Однако, для эффективного функционирования таких путей необходимо наличие строго ориентированных цепочек молекул воды. В противном случае увеличение гидратации может привести к случайному блужданию протона в полуканале или отклонению от основной траектории его движения в сторону остатков, которые могут действовать как ловушки для протонов.

В случае замены остатка  $\alpha\text{Glu219}$  на неполярный глицин или полярный глутамин возможный путь движения протона практически не изменялся по сравнению с диким типом. Остаток  $\alpha\text{Glu219}$  не играл решающей роли в переносе протонов, поскольку он находился на границе водной полости, а его боковая группа была сильно гидратирована на протяжении всего моделирования, т.е.

существовал альтернативный путь с участием цепочки молекул воды. Однако, изменение заряда в самом начале «узкого места» оказывало значительное влияние на гидратацию, что приводило к нарушению занятости и емкости кластеров воды W1-W3. Следует отметить, что занятость, в отличие от емкости кластера, является оценочным параметром, поскольку молекулы воды могут попадать во входной полуканал еще на этапе сборки фермента и оставаться внутри. Тем не менее, изменение данного параметра явно указывает на перераспределение локальных электростатических взаимодействий внутри полуканала в случае критических мутаций.

Консервативный остаток *aHis245* играл критическую роль в функционировании полуканала, принимая непосредственное участие в переносе протона, а также оказывая влияние на гидратацию. В случае *aHis245Gly* цепь переноса протона была прервана, поскольку сам остаток глицина не мог участвовать в передаче  $H^+$ , а компенсаторного пути обнаружено не было. Молекулы воды или боковые группы соседних полярных аминокислот не могли заменить остаток *aHis245*. Наоборот, замена на полярный серин привела к повышению гидратации области входного полуканала, что способствовало образованию альтернативного пути по цепочке молекул воды. В случае мутации *aHis245Tyr* гидрофобное бензольное кольцо с гидроксильной группой вызывало конформационные изменения в структуре *a*-субъединицы, приводящие к нарушению гидратации и, как следствие, исчезновению кластера молекул воды W1 и невозможности переноса протона.

В случае ревертанта *aGlu219His/aHis245Glu*, соответствующего митохондриальным АТФсинтазам, траектория движения протона сохранялась. Такая взаимозаменяемость соседних аминокислот позволяет различным организмам использовать уникальные наборы полярных остатков для формирования своих протонных полуканалов, а их изменчивость предполагает невероятно гибкий механизм переноса протонов в высокоэффективной макромолекулярной машине.

Замена *aAsn214Leu*, расположенная в середине «узкого места», приводила к невозможности транспорта через входной полуканал, связанной с неспособностью остатка Leu участвовать в переносе протона. При этом замена *aAsn214His* не влияла на занятость области W1, хотя наблюдалось снижение емкости этого кластера по сравнению с WT, и цепь переноса протона сохранялась. Интересно, что экспериментальные исследования мутантных штаммов *aAsn214His E. coli* демонстрировали снижение активности фермента на 95%. Возмож-

но, наблюдаемое нарушение работы фермента было вызвано не блокировкой протонного транспорта. Остаток *aAsn214* расположен рядом с высококонсервативным остатком *aArg210*, который обеспечивает связанное с протонным транспортом вращение ротора [96]. Замена *aAsn214His* приводила к возникновению сильного положительного заряда в области протонирования *cAsp61*, что, в свою очередь, могло вызывать нарушение вращения *c*-кольца. Развитие генной инженерии, а также совершенствование методов регистрации и анализа протонной проводимости через мембраны помогут объяснить расхождения результатов МД моделирования и экспериментов с мутантными штаммами *E. coli*. Дополнительные исследования вращения *c*-кольца также позволят более точно оценить, на какой именно процесс (транспорт  $H^+$  или вращение) оказывают влияние мутации в *a*-субъединице.

Остаток *aGln252* не является критическим для транспорта протонов, поскольку при его замене существовал альтернативный путь через молекулы воды и другие аминокислоты, цепь переноса протона не нарушалась. Тем не менее, обнаруженные конформационные изменения свидетельствуют о важности этого остатка в поддержании стабильности *a*-субъединицы. Замены консервативного *aArg210* приводили к формированию длинного водного канала, по которому протоны могли пересекать мембрану, не вызывая вращения *c*-кольца, что в конечном итоге привело бы к дисфункции синтеза АТФ. Следовательно, данный остаток является критическим, а его наличие необходимо для существования полуканалов и корректного функционирования фермента. Одновременные мутации шести полярных аминокислот выходного полуканала не вызывали нарушения в структуре *a*-субъединицы, однако, приводили к существенному возрастанию гидратации входного полуканала. Интересно, что уровень гидратации в выходном полуканале при этом остался неизменным, что может быть обусловлено его воронкообразной формой.

Таким образом, в работе была показана структурная устойчивость полуканалов  $F_oF_1$ -АТФсинтазы к различным мутациям аминокислот *a*-субъединицы. Расположенный между полуканалами фактора  $F_o$  остаток *aArg210* предотвращал утечку протонов через мембрану, что особенно важно во время синтеза АТФ. Остатки *aHis245* и *aAsn214* также являлись критическими для процесса протонного транспорта. Они принимали непосредственное участие в переносе  $H^+$ , их замены приводили к разрыву предполагаемого пути переноса, а молекулы воды или боковые группы соседних полярных остатков не могли заменить

их. В то же время, *aGlu219*, *aGln252* и остатки выходного полуканала непосредственно не играли решающей роли в переносе протонов, поскольку существовал путь с участием цепочки молекул воды. Все рассматриваемые замены оказывали существенное влияние на гидратацию, что приводило к значительным изменениям в занятости и емкости кластеров молекул воды W1-W3, вплоть до их полного исчезновения, и как следствие, разрыву цепи переноса протона.

МД моделирование позволило получить данные для прогнозирования того, как цепь переноса протона во входном полуканале бактериальной АТФ-синтазы будет реагировать на такие изменения, как мутации. Рассмотренные аминокислотные замены подтвердили описанную в предыдущих разделах цепь переноса протона и подчеркнули значимость аминокислотных остатков, а также показали высокую степень сохранности данной траектории. Дальнейшие исследования, направленные на расшифровку молекулярного механизма переноса протонов с учетом различных влияющих факторов, позволят выявить особенности энергетического обеспечения клетки как в норме, так и при патологии.

## Заключение

В рамках представленного исследования разработана структурно-динамическая модель мембранно-белкового комплекса бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазы для установления потенциальной траектории движения протонов через мембрану. В ходе работы была определена структура полуканалов, включающая в себя области движения протонов, а также положения заряженных центров (таких как полярные аминокислоты и молекулы воды), способных оказывать влияние на его движение. Во входном полуканале путь протона к *cAsp61* из периплазмы проходил через две водные полости, которые являются резервуарами накопления свободного  $H^+$ , а также цепочку полярных аминокислот и структурных молекул воды: *aGlu219* — W3 — W2 — *aAsp119* — *aHis245* — *aAsn214* — *aGln252* — W1 — *cAsp61*. При этом выходной полуканал представлял собой просто водную полость, через которую протон мог легко перемещаться in bulk.

При молекулярно-динамическом моделировании белка в составе гомогенной мембраны, состоящей из фосфотидилхолина, было обнаружено, что молекулы воды имеют тенденцию локализоваться в областях, критически важных для передачи протона, при этом вода остается в полуканале на протяжении всего моделирования и не уходит in bulk. Были определены области локализации трех структурных кластеров молекул воды (W1-W3), необходимых для замыкания цепи переноса протона. Кластер W1 наблюдался около *cAsp61*, W2 располагался между *aAsp119* и *aHis245*, а кластер W3 вблизи *aGlu219*.

Увеличение заряда мембраны за счет добавления различного процентного содержания кардиолипинов приводило к повышению гидратации полуканалов. Динамика гидратации показывает, что молекулы воды способны быстро проникать глубоко во входной полуканал даже на этапе уравнивания модельной системы, а боковые группы существенных остатков *a*-субъединицы имеют устойчивую сольватацию. Наблюдалось более глубокое проникновение молекул воды в область локализации W2/W3, а также преобразование W1 в кластер, состоящий из нескольких молекул. Значимым проявлением эффекта гидратации также стало формирование непрерывной цепочки упорядоченных молекул воды, что способствовало повышению стабильности протонного транспорта и

приводило к увеличению вероятности протонирования ключевого *cAsp61* в условиях, близких к *in vivo*.

Несмотря на плотную упаковку белка, подвижность некоторых остатков оказалась очень высокой. Были обнаружены устойчивые пространственные положения боковых групп существенных аминокислот (*aAsn214*, *aGln252*) *a*-субъединицы, обозначенные как SP1, SP2, SP3. Установлено, что *aAsn214* в положении SP3 и *aGln252* в SP1, SP2 были ориентированы в сторону *cAsp61* и могли протонировать его через W1. При этом в положении SP1 *aAsn214* был ориентирован в сторону *aHis245*, поэтому цепь переноса протона всегда была незамкнута, и изменение локализации положения боковой группы *aAsn214* является необходимым условием для обеспечения протонного транспорта. Обнаруженные устойчивые пространственные положения наблюдались при моделировании во всех типах мембран, что говорит о преимущественном влиянии на динамику боковых групп локальных взаимодействий между аминокислотами и водой.

Мутационный анализ аминокислот, входящих в цепь переноса протона во входном полуканале, показал, что остатки могут функционально по-разному влиять на транспорт: участвовать в прямом переносе протонов, способствовать гидратации или обеспечивать стабильность самой структуры полуканала. В работе была показана структурная устойчивость полуканалов  $F_0F_1$ -АТФсинтазы к различным заменам аминокислот *a*-субъединицы. Расположенный между полуканалами фактора  $F_0$  остаток *aArg210* предотвращал утечку протонов через мембрану, что особенно важно во время синтеза АТФ. Остатки *aHis245* и *aAsn214* также являлись критическими для процесса протонного транспорта, их замены приводили к разрыву предполагаемого пути переноса, а молекулы воды или боковые группы соседних полярных остатков не могли заменить их. В то же время, *aGlu219*, *aGln252* и остатки выходного полуканала непосредственно не играли решающей роли в переносе протонов, поскольку существовал путь с участием цепочки молекул воды. Все рассматриваемые замены оказывали существенное влияние на гидратацию, что приводило к значительным изменениям в занятости и емкости кластеров молекул воды W1-W3, вплоть до их полного исчезновения, и как следствие, разрыву цепи переноса протона.

Таким образом, результаты работы значительно расширяют представления о механизме протонного транспорта в  $F_0F_1$ -АТФсинтазе. Необходимо подчеркнуть, что с учетом консервативности структуры фермента как у эу-

кариот, так и у прокариот, основные выводы, полученные при моделировании локальных процессов на наноуровне, могут быть с достаточной степенью достоверности транспонированы от одного вида к другому. Тем не менее, предложенный в данной работе алгоритм изучения структурно-динамических характеристик протонных полуканалов бактериальной АТФсинтазы применим и для других организмов. Полученная в работе сеть полярных аминокислотных остатков и молекул воды в дальнейшем может быть использована для оценки электрофизиологических характеристик переноса протона в реальных биологических условиях, а также для анализа границы адаптивности функционирования фермента при нарушении целостности и характеристик биологических мембран. Новые данные могут быть использованы для описания процесса переноса энергии в полуканалах, что будет являться еще одним этапом в понимании сложности функционирования  $F_0F_1$ -АТФсинтазы, а также позволят выявить особенности энергетического обеспечения клетки как в норме, так и при патологии.

## Выводы

1. В работе установлена последовательность полярных аминокислотных остатков и молекул воды, формирующих путь переноса протона в полуканалах бактериальной  $F_0F_1$ -АТФсинтазы. Входной полуканал имеет комбинированную структуру, включающую в себя полость в белковой  $\alpha$ -субъединице, ограниченную трансмембранными  $\alpha$ -спиралями ТМС1-4, и последовательность консервативных аминокислотных остатков ( $\alpha$ Glu219,  $\alpha$ Asp119,  $\alpha$ His245,  $\alpha$ Asn214,  $\alpha$ Gln252) со структурными кластерами молекул воды около  $\epsilon$ Asp61. При этом выходной полуканал представляет собой ограниченное пространство, экспонированное в цитоплазму, расположенное между ТМС5-6  $\alpha$ -субъединицы и ТМС2  $\epsilon$ -субъединицы.
2. При молекулярно-динамическом моделировании белка в составе гомогенной мембраны, состоящей из фосфотидилхолина (РС), во входном полуканале определены области локализации трех структурных кластеров молекул воды (W1-W3), необходимых для замыкания цепи переноса протона. Кластер W1 наблюдается около  $\epsilon$ Asp61, W2 расположен между  $\alpha$ Asp119 и  $\alpha$ His245, а кластер W3 обнаруживается вблизи  $\alpha$ Glu219. Критерием локализации является удаленность от существенного аминокислотного остатка на расстояние не более 3 Å.
3. Показано, что наличие кардиолипина (CL) в мембране увеличивало гидратацию полуканалов и приводило к уменьшению расстояний между  $\alpha$ Glu219 и  $\alpha$ Asp119/ $\alpha$ His245 ниже 3 Å. Кроме того, возникала возможность протонирования  $\epsilon$ Asp61 напрямую с  $\alpha$ Gln252. Полученные результаты указывают на влияние отрицательного заряда поверхности мембраны на функциональные элементы белковой структуры АТФсинтазы *E. coli*.
4. Для всех рассмотренных составов модельных мембран обнаружены устойчивые пространственные положения боковых групп существенных аминокислот ( $\alpha$ Asn214,  $\alpha$ Gln252)  $\alpha$ -субъединицы, обозначенные как SP1, SP2, SP3. Показано, что изменение локализации положения боковой группы  $\alpha$ Asn214 в SP1 или SP3 является необходимым условием для обеспечения протонного транспорта.

5. Результаты мутационного анализа показывают, что структура белка устойчива и замены существенных остатков не приводят к сильным дестабилизирующим эффектам. Тем не менее, при замене консервативного *a*Arg210 на Ala, Lys наблюдается формирование непрерывного пространства трансмембранного канала, заполненного мобильными молекулами воды. Остатки *a*His245 и *a*Asn214 являются критическими для процесса протонного транспорта, их замены на неполярные аминокислоты приводят к разрыву предполагаемого пути переноса, а молекулы воды или боковые группы соседних полярных остатков не могут заменить их.

## Список сокращений

|                  |  |
|------------------|--|
| $\Delta\Delta G$ | изменение свободной энергии Гиббса сворачивания белка  |
| $\Delta\mu H^+$  | трансмембранная разность электрохимических потенциалов $H^+$   |
| $\Delta\mu Na^+$ | трансмембранная разность электрохимических потенциалов $Na^+$  |
| $\Delta\psi$     | трансмембранная разность электрических потенциалов   |
| CL               | кардиолипид  |
| DBSCAN           | density-based spatial clustering of applications with noise, плотностной алгоритм пространственной кластеризации с присутствием шума |
| DGDG             | дигалактозилдиацилглицерин   |
| DPPE             | 1,2-дипальмитоил-фосфатидилэтаноламин  |
| DYPE             | 1,2-дипальмитоолеин-фосфатидилэтаноламин   |
| Hbond            | количество водородных связей   |
| MGDG             | моноголактозилдиацилглицерин   |
| $P_i$            | неорганический фосфат  |
| PA               | фосфатидная кислота  |
| PC               | фосфатидилхолин  |
| PDB              | protein data bank, банк данных трехмерных структур белков  |
| PDB ID           | идентификационный номер структуры в банке данных PDB   |
| PE               | фосфатидилэтаноламин   |
| PG               | фосфатидилглицерин   |
| pLDDT            | predicted local distance difference test, тест локальной разницы расстояний предсказанной структуры                                  |
| PMCL2            | 1,2-дипальмитоил-1'-пальмитоил-2'-цис-9,10-метиленгексадеканол-кардиолипид   |
| PMPE             | 1-пальмитоил-2-цис-9,10-метиленгексадеканол-фосфатидилэтаноламин   |
| POPC             | 1-пальмитоил-2-олеоилфосфохолин  |
| POPE             | 1-пальмитоил-2-олеоилфосфатидилэтаноламин  |
| PS               | фосфатидилсерин  |
| RASA             | relative accessible surface area, относительная площадь поверхности, доступная для растворителя                                      |

|         |   |
|---------|---|
| RG      | radius of gyration, радиус инерции  |
| RMSD    | root mean squared deviation, среднеквадратичное отклонение                              |
| RMSF    | root mean squared fluctuation, среднеквадратичные флуктуации                            |
| SASA    | solvent accessible surface area, абсолютная площадь поверхности, доступная растворителю |
| SP      | spatial positions, устойчивые пространственные положения боковых групп аминокислот      |
| SQDG    | сульфохиновозилдиацилглицерин   |
| TYCL2   | 1,2-1',2'-тетрагексадеканол-кардиолипид   |
| WT      | wild type, дикий тип  |
| АДФ     | аденозиндифосфат  |
| АТФ     | аденозинтрифосфат   |
| ДЦКД    | дициклогексилкарбодиимид  |
| КМ/ММ   | комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики                          |
| Крио-ЭМ | криоэлектронная микроскопия   |
| МД      | молекулярная динамика   |
| МК      | метод моделирования Монте-Карло   |
| НАДН    | никотинамидадениндинуклеотид восстановленный  |
| ТМС     | трансмембранная спираль   |

В данной работе также использованы стандартные сокращения названий аминокислот (в однобуквенном и трехбуквенном кодах).

|           |     |   |             |     |   |
|-----------|-----|---|-------------|-----|---|
| Аланин    | Ala | A | Лейцин      | Leu | L |
| Аргинин   | Arg | R | Лизин       | Lys | K |
| Аспарагин | Asn | N | Метионин    | Met | M |
| Аспартат  | Asp | D | Пролин      | Pro | P |
| Валин     | Val | V | Серин       | Ser | S |
| Гистидин  | His | H | Тирозин     | Tyr | Y |
| Глицин    | Gly | G | Треонин     | Thr | T |
| Глутамат  | Glu | E | Триптофан   | Trp | W |
| Глутамин  | Gln | Q | Фенилаланин | Phe | F |
| Изолейцин | Ile | I | Цистеин     | Cys | C |

## Словарь терминов

**Емкость кластера** молекул воды — максимально наблюдаемое количество молекул воды в кластере.

**Занятость кластера** молекул воды — процент времени моделирования, в течение которого вода наблюдается в области локализации кластера.

**Структурные молекулы воды** — молекулы, которые проникают внутрь фермента, имеют тенденцию локализоваться в областях, критически важных для передачи протона; при этом молекулы остаются в полуканале на протяжении всего МД моделирования и не уходят in bulk.

**Устойчивые пространственные положения** (spatial positions, SP) — положения боковой группы аминокислотных остатков, в которых средняя амплитуда колебаний по порядку величины соответствует тепловым колебаниям атомов.

**Центры связывания протона** — атомы кислорода молекул воды, атомы кислорода карбоксильных и гидроксильных групп, атомы азота амидных групп аминокислотных остатков, которые способны влиять на движение протона и образовывать с ним короткоживущие связанные состояния.

## Список литературы

1. Boyer P. D. What makes ATP synthase spin? / P. D. Boyer // *Nature*. — 1999. — Vol. 402, no. 6759. — P. 247—249.
2. Oster G. ATP synthase: two motors, two fuels / G. Oster, H. Wang // *Structure*. — 1999. — Vol. 7, no. 4. — P. 67—72.
3. Zhang X. C. How does transmembrane electrochemical potential drive the rotation of F<sub>o</sub> motor in an ATP synthase? / X. C. Zhang, M. Liu, Y. Zhao // *Protein and Cell*. — 2015. — Vol. 6, no. 11. — P. 784—791.
4. Kagawa Y. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. X. correlation of morphology and function in submitochondrial particles / Y. Kagawa, E. Racker // *The Journal of biological chemistry*. — 1966. — Vol. 241, no. 10. — P. 2475—82.
5. Junesch U. The rate of ATP-synthesis as a function of  $\Delta\text{pH}$  and  $\Delta\psi$  catalyzed by the active, reduced H<sup>+</sup>-ATPase from chloroplasts / U. Junesch, P. Gräber // *FEBS Letters*. — 1991. — Vol. 294, no. 3. — P. 275—278.
6. Junge W. ATP synthase / W. Junge, N. Nelson // *Annual Review of Biochemistry*. — 2015. — Vol. 84. — P. 631—657.
7. Feniouk B. A. The proton-driven rotor of ATP Synthase: ohmic conductance (10 fS), and absence of voltage gating / B. A. Feniouk [et al.] // *Biophysical Journal*. — 2004. — Vol. 86, no. 6. — P. 4094—4109.
8. Bonora M. ATP synthesis and storage / M. Bonora [et al.] // *Purinergic Signalling*. — 2012. — Vol. 8, no. 3. — P. 343—357.
9. Скулачев В. П. Мембранная биоэнергетика / В. П. Скулачев, А. В. Богачев, Ф. О. Каспаринский. — Москва : Издательство Московского университета, 2010.
10. Dimroth P. Bacterial Na<sup>+</sup>- or H<sup>+</sup>-coupled ATP synthases operating at low electrochemical potential / P. Dimroth, G. M. Cook // *Advances in Microbial Physiology*. — 2004. — Vol. 49. — P. 175—218.

11. Walker J. E. The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown / J. E. Walker // *Biochemical Society Transactions*. — 2013. — Vol. 41, no. 1. — P. 1—16.
12. Junge W. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics / W. Junge, H. Lill, S. Engelbrecht // *Trends in Biochemical Sciences*. — 1997. — Vol. 22, no. 11. — P. 420—423.
13. P. M. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation / M. P., M. J. // *Nature*. — 1967. — Vol. 213. — P. 137—139.
14. Forgacs M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology / M. Forgacs // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2007. — Vol. 8, no. 11. — P. 917—929.
15. Müller V. Cellular and molecular life sciences review ATP synthases: structure, function and evolution of unique / V. Müller, G. Grüber // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. — 2003. — Vol. 60. — P. 474—494.
16. Wienisch M. Vesicular proteins exocytosed and subsequently retrieved by compensatory endocytosis are nonidentical / M. Wienisch, J. Klingauf // *Nature Neuroscience*. — 2006. — Vol. 9, no. 8. — P. 1019—1027.
17. Grüber G. ATP synthases from archaea: the beauty of a molecular motor / G. Grüber [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*. — 2014. — Vol. 1837, no. 6. — P. 940—952.
18. Abrahams J. P. Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria / J. P. Abrahams [et al.] // *Nature*. — 1994. — Vol. 370, no. 6491. — P. 621—628.
19. Ferguson S. A. Regulation of the thermoalkaliphilic F<sub>1</sub>-ATPase from *Caldalkalibacillus thermarum* / S. A. Ferguson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2016. — Vol. 113, no. 39. — P. 10860—10865.
20. Allegretti M. Horizontal membrane-intrinsic  $\alpha$ -helices in the stator a-subunit of an F-type ATP synthase / M. Allegretti [et al.] // *Nature*. — 2015. — Vol. 521, no. 7551. — P. 237—240.
21. Zhou A. Structure and conformational states of the bovine mitochondrial ATP synthase by cryo-EM / A. Zhou [et al.] // *eLife*. — 2015. — Vol. 4.

22. Guo H. Structure of a bacterial ATP synthase / H. Guo, T. Suzuki, J. L. Rubinstein // *eLife*. — 2019. — Vol. 8.
23. Pinke G. Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase / G. Pinke, L. Zhou, L. A. Sazanov // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2020. — Vol. 27, no. 11. — P. 1077—1085.
24. Sobti M. Cryo-EM structures provide insight into how *E. coli* F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase accommodates symmetry mismatch / M. Sobti [et al.] // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11, no. 1. — P. 2615.
25. Sobti M. Cryo-EM structures of the autoinhibited *E. coli* ATP synthase in three rotational states / M. Sobti [et al.] // *eLife*. — 2016. — Vol. 5.
26. Guo H. Cryo-EM of ATP synthases / H. Guo, J. L. Rubinstein // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2018. — Vol. 52. — P. 71—79.
27. Srivastava A. P. High-resolution cryo-EM analysis of the yeast ATP synthase in a lipid membrane / A. P. Srivastava [et al.] // *Science*. — 2018. — Vol. 360, no. 6389.
28. Hahn A. Structure, mechanism, and regulation of the chloroplast ATP synthase / A. Hahn [et al.] // *Science*. — 2018. — Vol. 360, no. 6389.
29. Guo H. Atomic model for the dimeric F<sub>o</sub> region of mitochondrial ATP synthase / H. Guo, S. A. Bueler, J. L. Rubinstein // *Science*. — 2017. — Vol. 358, no. 6365. — P. 936—940.
30. Romanovsky Y. Molecular energy transducers of the living cell. Proton ATP synthase: a rotating molecular motor / Y. Romanovsky, A. N. Tikhonov // *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*. — 2010. — Vol. 180, no. 9. — P. 931.
31. Nakanishi-Matsui M. ATP synthase from *Escherichia coli*: mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the  $\epsilon$  subunit and phytopolyphenols / M. Nakanishi-Matsui, M. Sekiya, M. Futai // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 2016. — Vol. 1857, no. 2. — P. 129—140.
32. Dimroth P. Primary sodium ion translocating enzymes / P. Dimroth // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 1997. — Vol. 1318, no. 1/2. — P. 11—51.

33. Krah A. Structural and energetic basis for H<sup>+</sup> versus Na<sup>+</sup> binding selectivity in ATP synthase F<sub>o</sub> rotors / A. Krah [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 2010. — Vol. 1797, no. 6/7. — P. 763—772.
34. Wilkens S. ATP synthase's second stalk comes into focus / S. Wilkens, R. A. Capaldi // *Nature*. — 1998. — Vol. 393, no. 6680. — P. 29—29.
35. Engelbrecht S. ATP synthase: a tentative structural model / S. Engelbrecht, W. Junge // *FEBS Letters*. — 1997. — Vol. 414, no. 3. — P. 485—491.
36. Elston T. Energy transduction in ATP synthase / T. Elston, H. Wang, G. Oster // *Nature*. — 1998. — Vol. 391, no. 6666. — P. 510—513.
37. Leyva J. A. Understanding ATP synthesis: structure and mechanism of the F<sub>1</sub>-ATPase (Review) / J. A. Leyva, M. A. Bianchet, L. M. Amzel // *Molecular Membrane Biology*. — 2003. — Vol. 20, no. 1. — P. 27—33.
38. Weber J. Mg<sup>2+</sup> coordination in catalytic sites of F<sub>1</sub>-ATPase / J. Weber [et al.] // *Biochemistry*. — 1998. — Vol. 37, no. 2. — P. 608—614.
39. Senior A. E. Further examination of seventeen mutations in *Escherichiacoli* F<sub>1</sub>-ATPase beta-subunit / A. E. Senior, M. K. al-Shawi // *The Journal of biological chemistry*. — 1992. — Vol. 267, no. 30. — P. 21471—8.
40. Park M.-Y. Conserved Glu-181 and Arg-182 residues of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase (ATP Synthase) β subunit are essential for catalysis: properties of 33 mutants between βGlu-161 and βLys-201 Residues1 / M.-Y. Park [et al.] // *The Journal of Biochemistry*. — 1994. — Vol. 116, no. 5. — P. 1139—1145.
41. Noumi T. Replacement of arginine 246 by histidine in the beta subunit of *Escherichia coli* H<sup>+</sup>-ATPase resulted in loss of multi-site ATPase activity / T. Noumi [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 1986. — Vol. 261, no. 20. — P. 9196—9201.
42. Nadanaciva S. Importance of F<sub>1</sub>-ATPase residue α-Arg-376 for catalytic transition state stabilization / S. Nadanaciva [et al.] // *Biochemistry*. — 1999. — Vol. 38, no. 47. — P. 15493—15499.

43. Le N. P. *Escherichia coli* ATP Synthase  $\alpha$  subunit Arg-376: the catalytic site arginine does not participate in the hydrolysis/synthesis reaction but is required for promotion to the steady state / N. P. Le [et al.] // *Biochemistry*. — 2000. — Vol. 39, no. 10. — P. 2778—2783.
44. Weber J. Catalytic mechanism of  $F_1$ -ATPase / J. Weber, A. E. Senior // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 1997. — Vol. 1319, no. 1. — P. 19—58.
45. Capaldi R. A. Cross-Linking and electron microscopy studies of the structure and functioning of the *Escherichia Coli* ATP Synthase / R. A. Capaldi [et al.] // *Journal of Experimental Biology*. — 2000. — Vol. 203, no. 1. — P. 29—33.
46. Sternweis P. C. The epsilon subunit of *Escherichia coli* coupling factor 1 is required for its binding to the cytoplasmic membrane / P. C. Sternweis // *The Journal of biological chemistry*. — 1978. — Vol. 253, no. 9. — P. 3123—8.
47. Cingolani G. Structure of the ATP synthase catalytic complex ( $F_1$ ) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation / G. Cingolani, T. M. Duncan // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2011. — Vol. 18, no. 6. — P. 701—707.
48. Tanigawara M. Role of the DELSEED loop in torque transmission of  $F_1$ -ATPase / M. Tanigawara [et al.] // *Biophysical Journal*. — 2012. — Vol. 103, no. 5. — P. 970—978.
49. Noji H. Direct observation of the rotation of  $F_1$ -ATPase / H. Noji [et al.] // *Nature*. — 1997. — Vol. 386, no. 6622. — P. 299—302.
50. Pänke O. Viscoelastic dynamics of actin filaments coupled to Rotary F-ATPase: angular torque profile of the enzyme / O. Pänke [et al.] // *Biophysical Journal*. — 2001. — Vol. 81, no. 3. — P. 1220—1233.
51. Sobti M. Cryo-EM reveals distinct conformations of *E. coli* ATP synthase on exposure to ATP / M. Sobti [et al.] // *eLife*. — 2019. — Vol. 8.
52. Wilkens S. Solution structure of the N-terminal domain of the  $\delta$  subunit of the *E. coli* ATPsynthase / S. Wilkens [et al.] // *Nature Structural Biology*. — 1997. — Vol. 4, no. 3. — P. 198—201.

53. Hilbers F. Subunit  $\delta$  is the key player for assembly of the  $H^+$ -translocating unit of *Escherichia coli*  $F_0F_1$  ATP Synthase / F. Hilbers [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 2013. — Vol. 288, no. 36. — P. 25880—25894.
54. Li C.-B. ATP hydrolysis assists phosphate release and promotes reaction ordering in  $F_1$ -ATPase / C.-B. Li [et al.] // *Nature Communications*. — 2015. — Vol. 6, no. 1. — P. 10223.
55. Birkenhäger R. The  $F_0$  complex of the *Escherichia coli* ATP synthase. Investigation by electron spectroscopic imaging and immunoelectron microscopy / R. Birkenhäger [et al.] // *European journal of biochemistry*. — 1995. — Vol. 230, no. 1. — P. 58—67.
56. Nesci S. The c-ring of the  $F_1F_0$ -ATP synthase: facts and perspectives / S. Nesci [et al.] // *The Journal of Membrane Biology*. — 2016. — Vol. 249, no. 1/2. — P. 11—21.
57. Altendorf K. Structure and function of the  $F_0$  complex of the ATP synthase from *Escherichia coli* / K. Altendorf [et al.] // *Journal of Experimental Biology*. — 2000. — Vol. 203, no. 1. — P. 19—28.
58. Long J. C. Membrane topology of subunit a of the  $F_1F_0$  ATP synthase as determined by labeling of unique cysteine residues / J. C. Long, S. Wang, S. B. Vik // *Journal of Biological Chemistry*. — 1998. — Vol. 273, no. 26. — P. 16235—16240.
59. Valiyaveetil F. I. Transmembrane topography of subunit a in the *Escherichia coli*  $F_1F_0$  ATP synthase / F. I. Valiyaveetil, R. H. Fillingame // *Journal of Biological Chemistry*. — 1998. — Vol. 273, no. 26. — P. 16241—16247.
60. Vik S. B. Insertion scanning mutagenesis of subunit a of the  $F_1F_0$  ATP synthase near His245 and implications on gating of the proton channel / S. B. Vik, A. R. Patterson, B. J. Antonio // *Journal of Biological Chemistry*. — 1998. — Vol. 273, no. 26. — P. 16229—16234.
61. Valiyaveetil F. I. On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the *Escherichia coli*  $F_0F_1$ -ATP Synthase / F. I. Valiyaveetil, R. H. Fillingame // *Journal of Biological Chemistry*. — 1997. — Vol. 272, no. 51. — P. 32635—32641.

62. Schwem B. E. Cross-linking between helices within subunit a of *Escherichia coli* ATP synthase defines the transmembrane packing of a four-helix bundle / B. E. Schwem, R. H. Fillingame // *Journal of Biological Chemistry*. — 2006. — Vol. 281, no. 49. — P. 37861—37867.
63. Wada T. A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase / T. Wada [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 1999. — Vol. 274, no. 24. — P. 17353—17357.
64. Moore K. J. Structural interactions between transmembrane helices 4 and 5 of subunit a and the subunit c ring of *Escherichia coli* ATP Synthase / K. J. Moore, R. H. Fillingame // *Journal of Biological Chemistry*. — 2008. — Vol. 283, no. 46. — P. 31726—31735.
65. Jiang W. Interacting helical faces of subunits a and c in the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking / W. Jiang, R. H. Fillingame // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1998. — Vol. 95, no. 12. — P. 6607—6612.
66. Faruqi A. Electronic detectors for electron microscopy / A. Faruqi, R. Henderson // *Current Opinion in Structural Biology*. — 2007. — Vol. 17, no. 5. — P. 549—555.
67. Scheres S. H. RELION: Implementation of a bayesian approach to cryo-EM structure determination / S. H. Scheres // *Journal of Structural Biology*. — 2012. — Vol. 180, no. 3. — P. 519—530.
68. Kühlbrandt W. The resolution revolution / W. Kühlbrandt // *Science*. — 2014. — Vol. 343, no. 6178. — P. 1443—1444.
69. Fillingame R. H. Half channels mediating H<sup>+</sup> transport and the mechanism of gating in the F<sub>0</sub> sector of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase / R. H. Fillingame, P. R. Steed // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 2014. — Vol. 1837, no. 7. — P. 1063—1068.
70. Cain B. D. Proton translocation by the F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase of *Escherichia coli*. Mutagenic analysis of the a subunit / B. D. Cain, R. D. Simoni // *The Journal of biological chemistry*. — 1989. — Vol. 264, no. 6. — P. 3292—300.
71. Vik S. B. Structure and function of subunit a of the ATP synthase of *Escherichia coli* / S. B. Vik, R. R. Ishmukhametov // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. — 2005. — Vol. 37, no. 6. — P. 445—449.

72. Pitard B. ATP synthesis by the  $F_0F_1$  ATP synthase from thermophilic *Bacillus* PS3 reconstituted into liposomes with bacteriorhodopsin / B. Pitard [et al.] // *European Journal of Biochemistry*. — 1996. — Vol. 235, no. 3. — P. 769—778.
73. Hermolin J. Defining the domain of binding of  $F_1$  subunit  $\epsilon$  with the polar loop of  $F_0$  subunit  $c$  in the *Escherichia coli* ATP synthase / J. Hermolin [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 1999. — Vol. 274, no. 24. — P. 17011—17016.
74. Drapier D. Intertwined translational regulations set uneven stoichiometry of chloroplast ATP synthase subunits / D. Drapier [et al.] // *The EMBO Journal*. — 2007. — Vol. 26, no. 15. — P. 3581—3591.
75. Cheuk A. Rotor subunits adaptations in ATP synthases from photosynthetic organisms / A. Cheuk, T. Meier // *Biochemical Society Transactions*. — 2021. — Vol. 49, no. 2. — P. 541—550.
76. Tomashek J. J. Stoichiometry of energy coupling by proton-translocating ATPases: a history of variability / J. J. Tomashek, W. S. A. Brusilow // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. — 2000. — Vol. 32, no. 5. — P. 493—500.
77. Petersen J. Comparison of the  $H^+$ /ATP ratios of the  $H^+$ -ATP synthases from yeast and from chloroplast / J. Petersen [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2012. — Vol. 109, no. 28. — P. 11150—11155.
78. Turina P.  $H^+$ /ATP ratio of proton transport-coupled ATP synthesis and hydrolysis catalysed by  $CF_0F_1$ -liposomes / P. Turina // *The EMBO Journal*. — 2003. — Vol. 22, no. 3. — P. 418—426.
79. Tran Q. H. Changes in the proton potential and the cellular energetics of *Escherichia coli* during growth by aerobic and anaerobic respiration or by fermentation / Q. H. Tran, G. Unden // *European Journal of Biochemistry*. — 1998. — Vol. 251, no. 1/2. — P. 538—543.
80. Hüttemann M. Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease / M. Hüttemann [et al.] // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. — 2008. — Vol. 40, no. 5. — P. 445—456.

81. Pogoryelov D. Engineering rotor ring stoichiometries in the ATP synthase / D. Pogoryelov [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2012. — Vol. 109, no. 25.
82. Preiss L. The c-ring stoichiometry of ATP synthase is adapted to cell physiological requirements of alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 / L. Preiss [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2013. — Vol. 110, no. 19. — P. 7874—7879.
83. Vonck J. Molecular architecture of the undecameric rotor of a bacterial Na<sup>+</sup>-ATP synthase / J. Vonck [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. — 2002. — Vol. 321, no. 2. — P. 307—316.
84. Schulz S. Molecular architecture of the N-type ATPase rotor ring from *Burkholderia pseudomallei* / S. Schulz [et al.] // *EMBO reports*. — 2017. — Vol. 18, no. 4. — P. 526—535.
85. Fillingame R. H. Structural model of the transmembrane F<sub>o</sub> rotary sector of H<sup>+</sup>-transporting ATP synthase derived by solution NMR and intersubunit cross-linking in situ / R. H. Fillingame, O. Y. Dmitriev // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. — 2002. — Vol. 1565, no. 2. — P. 232—245.
86. Cortés-Hernández P. ATP6 homoplasmic mutations inhibit and destabilize the Human F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase without preventing enzyme assembly and oligomerization / P. Cortés-Hernández, M. E. Vázquez-Memije, J. J. García // *Journal of Biological Chemistry*. — 2007. — Vol. 282, no. 2. — P. 1051—1058.
87. Greie J.-C. Secondary structure composition of reconstituted subunit *b* of the *Escherichia coli* ATP synthase / J.-C. Greie, G. Deckers-Hebestreit, K. Altendorf // *European Journal of Biochemistry*. — 2000. — Vol. 267, no. 10. — P. 3040—3048.
88. Claggett S. B. Functional incorporation of chimeric *b* subunits into F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP Synthase / S. B. Claggett [et al.] // *Journal of Bacteriology*. — 2007. — Vol. 189, no. 15. — P. 5463—5471.
89. Rastogi V. K. Structural changes linked to proton translocation by subunit *c* of the ATP synthase / V. K. Rastogi, M. E. Girvin // *Nature*. — 1999. — Vol. 402, no. 6759. — P. 263—268.

90. Zarco-Zavala M. The  $3 \times 120^\circ$  rotary mechanism of *Paracoccus denitrificans*  $F_1$ -ATPase is different from that of the bacterial and mitochondrial  $F_1$ -ATPases / M. Zarco-Zavala [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2020. — Vol. 117, no. 47. — P. 29647—29657.
91. Kayalar C. An alternating site sequence for oxidative phosphorylation suggested by measurement of substrate binding patterns and exchange reaction inhibitions / C. Kayalar, J. Rosing, P. D. Boyer // *Journal of Biological Chemistry*. — 1977. — Vol. 252, no. 8. — P. 2486—2491.
92. Boyer P. D. The ATP synthase — a splendid molecular machine / P. D. Boyer // *Annual Review of Biochemistry*. — 1997. — Vol. 66, no. 1. — P. 717—749.
93. Boyer P. D. A research journey with ATP synthase / P. D. Boyer // *Journal of Biological Chemistry*. — 2002. — Vol. 277, no. 42. — P. 39045—39061.
94. Boyer P. D. The binding change mechanism for ATP synthase — some probabilities and possibilities / P. D. Boyer // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 1993. — Vol. 1140, no. 3. — P. 215—250.
95. Deckers-Hebestreit G. THE  $F_0F_1$ -type ATP synthases of bacteria: structure and function of the  $F_0$  complex / G. Deckers-Hebestreit, K. Altendorf // *Annual Review of Microbiology*. — 1996. — T. 50, № 1. — C. 791—824.
96. Kühlbrandt W. Structure and mechanisms of F-Type ATP synthases / W. Kühlbrandt // *Annual Review of Biochemistry*. — 2019. — Vol. 88, no. 1. — P. 515—549.
97. Miller M. J. The essential carboxyl group in subunit c of the  $F_1F_0$  ATP synthase can be moved and H(+)-translocating function retained / M. J. Miller, M. Oldenburg, R. H. Fillingame // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1990. — Vol. 87, no. 13. — P. 4900—4904.
98. Jones P. C. Mutations in single hairpin units of genetically fused subunit c provide support for a rotary catalytic mechanism in  $F_0F_1$  ATP synthase. / P. C. Jones, J. Hermolin, R. H. Fillingame // *The Journal of biological chemistry*. — 2000. — Vol. 275, no. 15. — P. 11355—60.

99. Fraga D. Transmembrane helix-helix interactions in  $F_o$  suggested by suppressor mutations to Ala24→Asp/Asp61→Gly mutant of ATP synthase subunit / D. Fraga, J. Hermolin, R. H. Fillingame // *The Journal of biological chemistry*. — 1994. — Vol. 269, no. 4. — P. 2562—7.
100. Lightowlers R. The proton pore in the *Escherichia coli*  $F_oF_1$ -ATPase: a requirement for arginine at position 210 of the a-subunit / R. Lightowlers [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 1987. — Vol. 894, no. 3. — P. 399—406.
101. Ishmukhametov R. R. ATP synthesis without R210 of subunit a in the *Escherichia coli* ATP synthase / R. R. Ishmukhametov [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 2008. — Vol. 1777, no. 1. — P. 32—38.
102. Hartzog P. E. Mutagenic analysis of the a subunit of the  $F_1F_o$  ATP synthase in *Escherichia coli*: Gln-252 through Tyr-263 / P. E. Hartzog, B. D. Cain // *Journal of Bacteriology*. — 1993. — Vol. 175, no. 5. — P. 1337—1343.
103. Cain B. D. Interaction between Glu-219 and His-245 within the a subunit of  $F_1F_o$ -ATPase in *Escherichia coli* / B. D. Cain, R. D. Simoni // *The Journal of biological chemistry*. — 1988. — Vol. 263, no. 14. — P. 6606—12.
104. Lightowlers R. N. The proton pore in the *Escherichia coli*  $F_oF_1$ -ATPase: substitution of glutamate by glutamine at position 219 of the a-subunit prevents  $F_o$ -mediated proton permeability / R. N. Lightowlers [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 1988. — Vol. 933, no. 2. — P. 241—248.
105. Paule C. R. Mutations in three of the putative transmembrane helices of subunit a of the *Escherichia coli*  $F_1F_o$ -ATPase disrupt ATP-driven proton translocation / C. R. Paule, R. H. Fillingame // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 1989. — Vol. 274, no. 1. — P. 270—284.
106. Howitt S. The proton pore of the  $F_oF_1$ -ATPase of *Escherichia coli*: Ser-206 is not required for proton translocation / S. Howitt, F. Gibson, G. Cox // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 1988. — Vol. 936, no. 1. — P. 74—80.

107. B D Cain. Impaired proton conductivity resulting from mutations in the a subunit of  $F_1F_0$  ATPase in *Escherichia coli* / B D Cain, R D Simoni // *J Biol Chem.* — 1986. — Vol. 261. — P. 10043—10050.
108. Vik S. B. Mutagenesis of the alpha subunit of the  $F_1F_0$ -ATPase from *Escherichia coli*. Mutations at Glu-196, Pro-190, and Ser-199. / S. B. Vik [et al.] // *The Journal of biological chemistry.* — 1988. — Vol. 263, no. 14. — P. 6599—605.
109. Porter A. C. Role of the b subunit of the *Escherichia coli* proton-translocating ATPase. A mutagenic analysis / A. C. Porter [et al.] // *The Journal of biological chemistry.* — 1985. — Vol. 260, no. 13. — P. 8182—7.
110. Hardy A. W. Mutagenesis studies of the  $F_1F_0$  ATP synthase b subunit membrane domain / A. W. Hardy [et al.] // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* — 2003. — Vol. 35, no. 5. — P. 389—397.
111. Carugo O. How many water molecules can be detected by protein crystallography? / O. Carugo, D. Bordo // *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography.* — 1999. — Vol. 55, no. 2. — P. 479—483.
112. García-Sosa A. T. Free energy calculations of mutations involving a tightly bound water molecule and ligand substitutions in a ligand-protein complex / A. T. García-Sosa, R. L. Mancera // *Molecular Informatics.* — 2010. — Vol. 29, no. 8/9. — P. 589—600.
113. Morozenko A. Dipole moment and binding energy of water in proteins from crystallographic analysis / A. Morozenko, I. V. Leontyev, A. A. Stuchebukhrov // *Journal of Chemical Theory and Computation.* — 2014. — Vol. 10, no. 10. — P. 4618—4623.
114. Britt R. Recent pulsed EPR studies of the Photosystem II oxygen-evolving complex: implications as to water oxidation mechanisms / R. Britt [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics.* — 2004. — Vol. 1655. — P. 158—171.
115. García-Sosa A. T. Including tightly-bound water molecules in de novo drug design. Exemplification through the in silico generation of poly(ADP-ribose)polymerase ligands / A. T. García-Sosa, S. Firth-Clark, R. L. Mancera // *Journal of Chemical Information and Modeling.* — 2005. — Vol. 45, no. 3. — P. 624—633.

116. Michel J. Energetics of displacing water molecules from protein binding sites: consequences for ligand optimization / J. Michel, J. Tirado-Rives, W. L. Jorgensen // *Journal of the American Chemical Society*. — 2009. — Vol. 131, no. 42. — P. 15403—15411.
117. Mikol V. The role of water molecules in the structure-based design of (5-Hydroxynorvaline)-2-cyclosporin: synthesis, biological activity, and crystallographic analysis with cyclophilin A / V. Mikol, C. Papageorgiou, X. Borer // *Journal of Medicinal Chemistry*. — 1995. — Vol. 38, no. 17. — P. 3361—3367.
118. Harms M. J. The pKa values of acidic and basic residues buried at the same internal location in a protein are governed by different factors / M. J. Harms [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. — 2009. — Vol. 389, no. 1. — P. 34—47.
119. Peng Y. Hydrated excess protons can create their own water wires / Y. Peng [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2015. — Vol. 119, no. 29. — P. 9212—9218.
120. Gahura O. An ancestral interaction module promotes oligomerization in divergent mitochondrial ATP synthases / O. Gahura [et al.] // *Nature Communications*. — 2022. — Vol. 13, no. 1. — P. 5989.
121. Murphy B. J. Rotary substates of mitochondrial ATP synthase reveal the basis of flexible  $F_1$ - $F_0$  coupling / B. J. Murphy [et al.] // *Science*. — 2019. — Vol. 364, no. 6446.
122. Spikes T. E. Structure of the dimeric ATP synthase from bovine mitochondria / T. E. Spikes, M. G. Montgomery, J. E. Walker // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2020. — T. 117, № 38. — C. 23519—23526.
123. Krah A. Characterizing the hydration properties of proton binding sites in the ATP synthase c-rings of *Bacillus* species / A. Krah, J. K. Marzinek, P. J. Bond // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2020. — T. 124, № 33. — C. 7176—7183.
124. Morozenko A. Dowser++, a new method of hydrating protein structures / A. Morozenko, A. A. Stuchebrukhov // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 2016. — Vol. 84, no. 10. — P. 1347—1357.

125. Mehdipour A. R. Cardiolipin puts the seal on ATP synthase / A. R. Mehdipour, G. Hummer // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2016. — Vol. 113, no. 31. — P. 8568—8570.
126. Contreras F.-X. Specificity of intramembrane protein-lipid interactions / F.-X. Contreras [et al.] // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. — 2011. — Vol. 3, no. 6. — a004705—a004705.
127. Fagone P. Phosphatidylcholine and the CDP-choline cycle / P. Fagone, S. Jackowski // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. — 2013. — Vol. 1831, no. 3. — P. 523—532.
128. Vance J. E. Formation and function of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells / J. E. Vance, G. Tasseva // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. — 2013. — Vol. 1831, no. 3. — P. 543—554.
129. Farine L. Phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine biosynthesis by the Kennedy pathway occurs at different sites in *Trypanosoma brucei* / L. Farine [et al.] // *Scientific Reports*. — 2015. — Vol. 5, no. 1. — P. 16787.
130. Exton J. H. Signaling through phosphatidylcholine breakdown / J. H. Exton // *The Journal of biological chemistry*. — 1990. — Vol. 265, no. 1. — P. 1—4.
131. Billah M. M. The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis / M. M. Billah, J. C. Anthes // *Biochemical Journal*. — 1990. — Vol. 269, no. 2. — P. 281—291.
132. Farine L. The ins and outs of phosphatidylethanolamine synthesis in *Trypanosoma brucei* / L. Farine, P. Bütikofer // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*. — 2013. — Vol. 1831, no. 3. — P. 533—542.
133. Vance J. E. Thematic review series: glycerolipids. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids / J. E. Vance // *Journal of Lipid Research*. — 2008. — Vol. 49, no. 7. — P. 1377—1387.
134. Glukhov E. Basis for selectivity of cationic antimicrobial peptides for bacterial versus mammalian membranes / E. Glukhov [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 2005. — Vol. 280, no. 40. — P. 33960—33967.

135. Schenkel L. C. Formation and regulation of mitochondrial membranes / L. C. Schenkel, M. Bakovic // *International Journal of Cell Biology*. — 2014. — Vol. 2014. — P. 1—13.
136. Kobayashi K. Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development / K. Kobayashi // *Journal of Plant Research*. — 2016. — Vol. 129, no. 4. — P. 565—580.
137. Paradies G. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics / G. Paradies [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 2014. — Vol. 1837, no. 4. — P. 408—417.
138. Dörmann P. Galactolipids rule in seed plants / P. Dörmann, C. Benning // *Trends in Plant Science*. — 2002. — Vol. 7, no. 3. — P. 112—118.
139. Hafez I. M. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery / I. M. Hafez, P. R. Cullis // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2001. — Vol. 47, no. 2/3. — P. 139—148.
140. Brink-van der Laan E. van den. Nonbilayer lipids affect peripheral and integral membrane proteins via changes in the lateral pressure profile / E. van den Brink-van der Laan, J. Antoinette Killian, B. de Kruijff // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. — 2004. — Vol. 1666, no. 1/2. — P. 275—288.
141. Sharpley M. S. Interactions between phospholipids and NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from bovine mitochondria / M. S. Sharpley [et al.] // *Biochemistry*. — 2006. — Vol. 45, no. 1. — P. 241—248.
142. Arnarez C. Evidence for Cardiolipin Binding Sites on the Membrane-Exposed Surface of the Cytochrome *bc*<sub>1</sub> / C. Arnarez [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. — 2013. — Vol. 135, no. 8. — P. 3112—3120.
143. Arnarez C. Identification of cardiolipin binding sites on cytochrome c oxidase at the entrance of proton channels / C. Arnarez, S. J. Marrink, X. Periole // *Scientific Reports*. — 2013. — Vol. 3, no. 1. — P. 1263.
144. Zhang M. Cardiolipin is essential for organization of Complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria / M. Zhang, E. Mileykovskaya, W. Dowhan // *Journal of Biological Chemistry*. — 2005. — Vol. 280, no. 33. — P. 29403—29408.

145. Jussupow A. How cardiolipin modulates the dynamics of respiratory complex I / A. Jussupow, A. Di Luca, V. R. I. Kaila // *Science Advances*. — 2019. — Vol. 5, no. 3.
146. Eble K. S. Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy / K. S. Eble [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 1990. — Vol. 265, no. 32. — P. 19434—19440.
147. Duncan A. L. Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases / A. L. Duncan, A. J. Robinson, J. E. Walker // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2016. — Vol. 113, no. 31. — P. 8687—8692.
148. Lange C. Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome bc<sub>1</sub> complex structure / C. Lange // *The EMBO Journal*. — 2001. — Vol. 20, no. 23. — P. 6591—6600.
149. Acehan D. Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP Synthase in mitochondria / D. Acehan [et al.] // *Biophysical Journal*. — 2011. — Vol. 100, no. 9. — P. 2184—2192.
150. Yi Q. The effects of cardiolipin on the structural dynamics of the mitochondrial ADP/ATP carrier in its cytosol-open state / Q. Yi [et al.] // *Journal of Lipid Research*. — 2022. — Vol. 63, no. 6. — P. 100227.
151. Romantsov T. Cardiolipin and the osmotic stress responses of bacteria / T. Romantsov, Z. Guan, J. M. Wood // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. — 2009. — Vol. 1788, no. 10. — P. 2092—2100.
152. Bajaj R. Interaction of the intermembrane space domain of Tim23 protein with mitochondrial membranes / R. Bajaj [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. — 2014. — Vol. 289, no. 50. — P. 34620—34626.
153. Zardeneta G. Physical characterization of a reactivatable liposome-bound rhodanese folding intermediate / G. Zardeneta, P. M. Horowitz // *Biochemistry*. — 1993. — Vol. 32, no. 50. — P. 13941—13948.
154. Beyer K. Specific cardiolipin binding interferes with labeling of sulfhydryl residues in the adenosine diphosphate/adenosine triphosphate carrier protein from beef heart mitochondria / K. Beyer, B. Nuscher // *Biochemistry*. — 1996. — Vol. 35, no. 49. — P. 15784—15790.

155. Dawan J. Bacterial stress responses as potential targets in overcoming antibiotic resistance / J. Dawan, J. Ahn // *Microorganisms*. — 2022. — Vol. 10, no. 7. — P. 1385.
156. Rowley G. Pushing the envelope: extracytoplasmic stress responses in bacterial pathogens / G. Rowley [et al.] // *Nature Reviews Microbiology*. — 2006. — Vol. 4, no. 5. — P. 383—394.
157. Raivio T. L. MicroReview: Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis / T. L. Raivio // *Molecular Microbiology*. — 2005. — Vol. 56, no. 5. — P. 1119—1128.
158. Schembri M. A. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms / M. A. Schembri, K. Kjaergaard, P. Klemm // *Molecular Microbiology*. — 2003. — Vol. 48, no. 1. — P. 253—267.
159. Needham B. D. Fortifying the barrier: the impact of lipid A remodelling on bacterial pathogenesis / B. D. Needham, M. S. Trent // *Nature Reviews Microbiology*. — 2013. — Vol. 11, no. 7. — P. 467—481.
160. Brown G. R. The modification of the membrane of *Oceanomonas baumannii* when subjected to both osmotic and organic solvent stress / G. R. Brown [et al.] // *FEMS Microbiology Letters*. — 2000. — Vol. 189, no. 2. — P. 149—154.
161. Rowlett V. W. Impact of membrane phospholipid alterations in *Escherichia coli* on cellular function and bacterial stress adaptation / V. W. Rowlett [et al.] // *Journal of Bacteriology*. — 2017. — Vol. 199, no. 13.
162. Sun Y. Respiration and the  $F_1F_0$ -ATPase enhance survival under acidic conditions in *Escherichia coli* / Y. Sun [et al.] // *PLoS ONE*. — 2012. — Vol. 7, no. 12. — e52577.
163. Vik S. B. A mechanism of proton translocation by  $F_1F_0$  ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit / S. B. Vik, B. J. Antonio // *Journal of Biological Chemistry*. — 1994. — Vol. 269, no. 48. — P. 30364—30369.
164. Duncan T. M. Rotation of subunits during catalysis by *Escherichia coli*  $F_1$ -ATPase / T. M. Duncan [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1995. — Vol. 92, no. 24. — P. 10964—10968.

165. Dimroth P. Energy transduction in the sodium F-ATPase of *Propionigenium modestum* / P. Dimroth [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 1999. — Vol. 96, no. 9. — P. 4924—4929.
166. Dimroth P. Operation of the F<sub>o</sub> motor of the ATP synthase / P. Dimroth // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 2000. — Vol. 1458, no. 2/3. — P. 374—386.
167. Girvin M. E. Solution structure of the transmembrane H<sup>+</sup>-transporting subunit c of the F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP synthase / M. E. Girvin [et al.] // *Biochemistry*. — 1998. — Vol. 37, no. 25. — P. 8817—8824.
168. Aksimentiev A. Insights into the molecular mechanism of rotation in the F<sub>o</sub> sector of ATP synthase / A. Aksimentiev [et al.] // *Biophysical Journal*. — 2004. — Vol. 86, no. 3. — P. 1332—1344.
169. Kawasaki-Nishi S. Proton translocation driven by ATP hydrolysis in V-ATPases / S. Kawasaki-Nishi, T. Nishi, M. Forgac // *FEBS Letters*. — 2003. — Vol. 545, no. 1. — P. 76—85.
170. Fillingame R. Structural interpretations of F<sub>o</sub> rotary function in the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase / R. Fillingame [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 2000. — Vol. 1458, no. 2/3. — P. 387—403.
171. Fillingame R. H. Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase / R. H. Fillingame, C. M. Angevine, O. Y. Dmitriev // *FEBS Letters*. — 2003. — Vol. 555, no. 1. — P. 29—34.
172. Steed P. R. Subunit a facilitates aqueous access to a membrane-embedded region of subunit c in *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP synthase / P. R. Steed, R. H. Fillingame // *Journal of Biological Chemistry*. — 2008. — Vol. 283, no. 18. — P. 12365—12372.
173. Steed P. R. Aqueous accessibility to the transmembrane regions of subunit c of the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>o</sub> ATP Synthase / P. R. Steed, R. H. Fillingame // *Journal of Biological Chemistry*. — 2009. — Vol. 284, no. 35. — P. 23243—23250.
174. Mulkidjanian A. Y. Proton in the well and through the desolvation barrier / A. Y. Mulkidjanian // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. — 2006. — Vol. 1757, no. 5/6. — P. 415—427.

175. Bartl F. The  $F_o$  complex of the ATP synthase of *Escherichia coli* contains a proton pathway with large proton polarizability caused by collective proton fluctuation / F. Bartl [et al.] // *Biophysical Journal*. — 1995. — Vol. 68, no. 1. — P. 104—110.
176. Smirnov A. Y. Proton transport and torque generation in rotary biomotors / A. Y. Smirnov [et al.] // *Physical Review E*. — 2008. — Vol. 78, no. 3. — P. 031921.
177. Mashkovtseva E. Combined mathematical methods in the description of the  $F_oF_1$ -ATP synthase catalytic cycle / E. Mashkovtseva, S. Boronovsky, Y. Nartsissov // *Mathematical Biosciences*. — 2013. — Vol. 243, no. 1. — P. 117—125.
178. Agmon N. The Grotthuss mechanism / N. Agmon // *Chemical Physics Letters*. — 1995. — Vol. 244, no. 5/6. — P. 456—462.
179. Markovitch O. Special pair dance and partner selection: elementary steps in proton transport in liquid water / O. Markovitch [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2008. — Vol. 112, no. 31. — P. 9456—9466.
180. Agmon N. Protons and hydroxide ions in aqueous systems / N. Agmon [et al.] // *Chemical Reviews*. — 2016. — Vol. 116, no. 13. — P. 7642—7672.
181. Iftimie R. *Ab initio* molecular dynamics: concepts, recent developments, and future trends / R. Iftimie, P. Minary, M. E. Tuckerman // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2005. — Vol. 102, no. 19. — P. 6654—6659.
182. Siva K. Ion permeation through the gramicidin channel: atomically detailed modeling by the stochastic difference equation / K. Siva, R. Elber // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 2003. — Vol. 50, no. 1. — P. 63—80.
183. Chen D. Quantum dynamics in continuum for proton transport-generalized correlation / D. Chen, G.-W. Wei // *The Journal of Chemical Physics*. — 2012. — Vol. 136, no. 13.
184. Nakamoto R. K. The rotary mechanism of the ATP synthase / R. K. Nakamoto, J. A. Baylis Scanlon, M. K. Al-Shawi // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 2008. — Vol. 476, no. 1. — P. 43—50.
185. Klusch N. Structural basis of proton translocation and force generation in mitochondrial ATP synthase / N. Klusch [et al.] // *eLife*. — 2017. — Vol. 6.

186. Goddard T. D. UCSF ChimeraX: meeting modern challenges in visualization and analysis / T. D. Goddard [et al.] // *Protein Science*. — 2018. — Vol. 27, no. 1. — P. 14—25.
187. Gohlke H. Resolving the negative potential side (n-side) water-accessible proton pathway of F-type ATP synthase by molecular dynamics simulations / H. Gohlke, D. Schlieper, G. Groth // *Journal of Biological Chemistry*. — 2012. — Vol. 287, no. 43. — P. 36536—36543.
188. Marciniak A. Determinants of directionality and efficiency of the ATP Synthase  $F_o$  motor at atomic resolution / A. Marciniak [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry Letters*. — 2022. — Vol. 13, no. 1. — P. 387—392.
189. Roh S.-H. Cryo-EM and MD infer water-mediated proton transport and autoinhibition mechanisms of  $V_o$  complex / S.-H. Roh [et al.] // *Science Advances*. — 2020. — Vol. 6, no. 41.
190. Emsley P. Features and development of *Coot* / P. Emsley [et al.] // *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*. — 2010. — Vol. 66, no. 4. — P. 486—501.
191. Bai C. Revisiting the protomotive vectorial motion of  $F_o$ -ATPase / C. Bai, A. Warshel // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2019. — Vol. 116, no. 39. — P. 19484—19489.
192. Kubo S. Molecular dynamics simulation of proton-transfer coupled rotations in ATP synthase  $F_o$  motor / S. Kubo, T. Niina, S. Takada // *Scientific Reports*. — 2020. — Vol. 10, no. 1. — P. 8225.
193. Leone V. Structure and mechanism of the ATP synthase membrane motor inferred from quantitative integrative modeling / V. Leone, J. D. Faraldo-Gómez // *Journal of General Physiology*. — 2016. — Vol. 148, no. 6. — P. 441—457.
194. Kubo S. Rotational mechanism of  $F_o$  motor in the F-Type ATP synthase driven by the proton motive force / S. Kubo, S. Takada // *Frontiers in Microbiology*. — 2022. — Vol. 13.
195. Humphrey W. VMD: visual molecular dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // *Journal of Molecular Graphics*. — 1996. — Vol. 14, no. 1. — P. 33—38.

196. Sugo Y. Mechanism of asparagine-mediated proton transfer in photosynthetic reaction centers / Y. Sugo, H. Ishikita // *Biochemistry*. — 2023. — Vol. 62, no. 10. — P. 1544—1552.
197. Stillinger F. Theory and molecular models for water / F. Stillinger // *Advances in Chemical Physics*. — 1975. — P. 31.
198. Bondi A. Van der Waals Volumes and Radii / A. Bondi // *The Journal of Physical Chemistry*. — 1964. — Vol. 68. — P. 441—451.
199. Ross G. A. Rapid and accurate prediction and scoring of water molecules in protein binding sites / G. A. Ross, G. M. Morris, P. C. Biggin // *PLoS ONE*. — 2012. — Vol. 7, no. 3. — e32036.
200. M. Ester. Density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise / M. Ester [et al.] // *KDD'96: Proceedings of the Second International Conference on Knowledge Discovery and Data Mining*. — 1996. — P. 226—231.
201. Gruebele M. Protein dynamics: from molecules, to interactions, to biology / M. Gruebele // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2009. — Vol. 10, no. 3. — P. 1360—1368.
202. Hills R. D. Insights from coarse-grained Gō models for protein folding and dynamics / R. D. Hills, C. L. Brooks // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2009. — Vol. 10, no. 3. — P. 889—905.
203. Anandakrishnan R. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations / R. Anandakrishnan, B. Aguilar, A. V. Onufriev // *Nucleic Acids Research*. — 2012. — Vol. 40, W1. — W537—W541.
204. Jorgensen W. L. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water / W. L. Jorgensen [et al.] // *The Journal of Chemical Physics*. — 1983. — Vol. 79, no. 2. — P. 926—935.
205. Phillips J. C. Scalable molecular dynamics with NAMD / J. C. Phillips [et al.] // *Journal of Computational Chemistry*. — 2005. — Vol. 26, no. 16. — P. 1781—1802.

206. Best R. B. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone  $\varphi$ ,  $\psi$  and side-chain  $\chi_1$  and  $\chi_2$  dihedral angles / R. B. Best [et al.] // *Journal of Chemical Theory and Computation*. — 2012. — Vol. 8, no. 9. — P. 3257—3273.
207. Klauda J. B. Update of the CHARMM all-atom additive force field for lipids: validation on six lipid types / J. B. Klauda [et al.] // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2010. — Vol. 114, no. 23. — P. 7830—7843.
208. Tien M. Z. Maximum allowed solvent accessibilities of residues in proteins / M. Z. Tien [et al.] // *PLoS ONE*. — 2013. — Vol. 8, no. 11. — e80635.
209. Janosi L. Simulating POPC and POPC/POPG bilayers: conserved packing and altered surface reactivity / L. Janosi, A. A. Gorfe // *Journal of Chemical Theory and Computation*. — 2010. — Vol. 6, no. 10. — P. 3267—3273.
210. Wu E. L. CHARMM-GUI *Membrane Builder* toward realistic biological membrane simulations / E. L. Wu [et al.] // *Journal of Computational Chemistry*. — 2014. — Vol. 35, no. 27. — P. 1997—2004.
211. Guerois R. Predicting changes in the stability of proteins and protein complexes: a study of more than 1000 mutations / R. Guerois, J. E. Nielsen, L. Serrano // *Journal of Molecular Biology*. — 2002. — Vol. 320, no. 2. — P. 369—387.
212. Yin S. Eris: an automated estimator of protein stability / S. Yin, F. Ding, N. V. Dokholyan // *Nature Methods*. — 2007. — Vol. 4, no. 6. — P. 466—467.
213. Studer R. A. Stability-activity tradeoffs constrain the adaptive evolution of RubisCO / R. A. Studer [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. — 2014. — Vol. 111, no. 6. — P. 2223—2228.
214. Jumper J. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 596, no. 7873. — P. 583—589.