

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Ивонцин Леонид Андреевич

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

Специальность 1.5.8.
«Математическая биология, биоинформатика»

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва — 2025

Работа выполнена в Секторе математического моделирования и статистической обработки результатов Научно-исследовательского института цитохимии и молекулярной фармакологии.

Научный руководитель: **Нарциссов Ярослав Рюрикович**,
кандидат физико-математических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Коваленко Илья Борисович**,
доктор физико-математических наук,
биологический факультет Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», ведущий научный сотрудник

Фенюк Борис Александрович,
доктор биологических наук,
Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, заместитель директора

Толстой Петр Михайлович,
доктор химических наук,
Институт химии Санкт-Петербургского государственного университета, профессор, заведующий кафедрой физической органической химии

Защита диссертации состоится «13» марта 2025 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24, кафедра биофизики, «Новая аудитория».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3291>.

Автореферат разослан «__» февраля 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.015.5,
кандидат физико-математических наук

Фурсова П.В.

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Важнейшую роль в биохимических реакциях играет аденозинтрифосфат (АТФ), макроэргическое соединение, которое обеспечивает различные анаболические и транспортные процессы в живых организмах. 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 ($\Delta\mu H^+$).

Преобразование энергии с помощью F_0F_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.

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 $\Delta\mu H^+$, 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 молекулярно-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 α -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 (α Asn214, α Gln252) α -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 α -субъединице, ограниченную трансмембранными α -спиралями TMC1-4, и последовательность консервативных аминокислотных остатков (α Glu219, α Asp119, α His245, α Asn214, α Gln252) со структурными кластерами молекул воды около c Asp61. При этом выходной полуканал представляет собой ограниченное пространство, экспонированное в цитоплазму, расположенное между TMC5-6 α -субъединицы и TMC2 c -субъединицы.
2. При молекулярно-динамическом моделировании белка в составе гомогенной мембраны, состоящей из фосфотидилхолина (PC), во входном полуканале определены области локализации трех структурных кластеров молекул воды (W1-W3), необходимых для замыкания цепи переноса протона. Кластер W1 наблюдается около c Asp61, W2 расположен между α Asp119 и α His245, а кластер W3 обнаруживается вблизи α Glu219.

3. Наличие кардиолипина в мембране увеличивает гидратацию полуканалов и оказывает влияние на функциональные элементы белковой структуры АТФсинтазы *E. coli*. Наблюдается уменьшение расстояний между *aGlu219* и *aAsp119/aHis245*, а также *aGln252* и *cAsp61* менее 3 Å.
4. Во всех рассмотренных составах модельных мембран наблюдаются устойчивые пространственные положения боковых групп существенных аминокислотных остатков (*aAsn214*, *aGln252*) *a*-субъединицы, обозначенные как SP1, SP2, SP3. Изменение локализации положения боковой группы *aAsn214* 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 *aArg210* на Ala, Lys наблюдается формирование непрерывного пространства трансмембранного канала, заполненного мобильными молекулами воды. Остатки *aHis245* и *aAsn214* 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 (Андовер, США, 2017); 42nd Federation of European Biochemical Societies Congress (Иерусалим, Израиль, 2017); Second International meeting of Italian Group of Biomembranes and Bioenergetics (Вieste, 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.

Содержание работы

Во **введении** дано обоснование актуальности исследования, проводимого в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель, ставятся задачи работы, излагается научная новизна, теоретическая и практическая значимость представленного исследования, а также приводятся положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору научной литературы по изучаемой проблеме, который включает описание структуры и функции F_0F_1 -АТФсинтазы, каталитического цикла работы фермента, строения протонных полуканалов в *E. coli*. Рассмотрены современные представления о роли молекул воды и фосфолипидов мембраны в функционировании АТФсинтазы. Особое внимание уделяется анализу различных экспериментальных и теоретических подходов для изучения механизма работы трансмембранного фактора F_0 .

Во **второй главе** описывается изучение структурных и функциональных характеристик полуканалов в мембранно-белковом комплексе бактериальной F_0F_1 -АТФсинтазы, а также исследование потенциальной траектории движения протонов через мембрану. Изложены основы метода молекулярной динамики (МД) и способы анализа молекулярных траекторий. Представлена оценка гидратации полуканалов, выполненная различными способами: стохастическим заполнением пустот в молекулярной структуре модельными молекулами воды с учетом только Ван-дер-Ваальсовских радиусов атомов (модель твердых сфер), с учетом электростатических взаимодействий (Dowser++), в рамках подхода молекулярной динамики. Кроме того, методы кластерного анализа были применены для выявления общих закономерностей расположения молекул воды в полуканалах. В качестве входных данных использовались координаты атомов кислорода молекул воды, а параметры кластеризации варьировались таким образом, чтобы минимальное количество соседних объектов, необходимых для образования кластера, составляло более 70% от общей совокупности.

Крио-ЭМ структура мембранной части F_0F_1 -АТФсинтазы *E. coli* [PDB ID: 6VWK] была взята за основу для построения атомистической модели протонных полуканалов, которая содержала *a*-субъединицу, кольцо из десяти *c*-субъединиц, а также две укороченные *b*-субъединицы. Кроме того, белок был встроен в гомогенный липидный бислой, состоящий из фосфатидилхолина (POPC), и водное окружение (Рисунок 1).

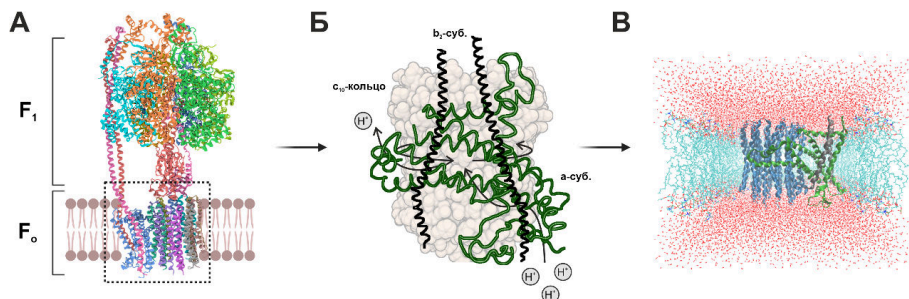


Рисунок 1. (А) Общая структура F_0F_1 -АТФсинтазы из *E. coli* [PDB ID: 6VWK]. (Б) Модельная система мембранной части АТФсинтазы, включающая *a*-субъединицу (зеленые спирали), кольцо из десяти *c*-субъединиц (серая поверхность) и две укороченные *b*-субъединицы (черные спирали). Стрелки указывают направление движения протонов во время синтеза АТФ. (В) Вид сбоку (из мембраны). Липидный РОРС бислоем и молекулы растворителя представлены голубыми и красными линиями соответственно.

Для анализа возможных областей движения протона, исследования структурной динамики боковых групп аминокислот и гидратации белка было проведено молекулярно-динамическое моделирование с помощью программы NAMD при периодических граничных условиях с использованием силового поля CHARMM36. МД моделирование состояло из четырех этапов. На первых трех этапах производилась минимизация энергии и уравнивание модельной системы в течение 15 нс для коррекции возможных неестественных атомных позиций, возникших в результате ручного встраивания фермента в липидный бислой. На последнем этапе 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).

Для определения потенциальной траектории движения протона были подробно изучены области полуканалов. 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 рассматриваются 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. Указанные атомы названы *центрами связывания протона*. При этом возможный путь движения протона может быть определен, как последовательность аминокислот и молекул воды, расположенных на расстоянии около 3 Å, что соответствует длине водородной связи (Рисунок 2).

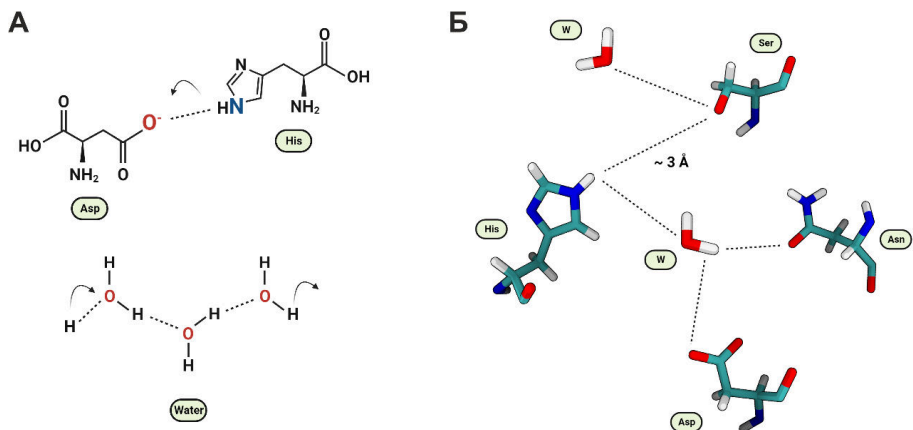


Рисунок 2. Механизм протонного транспорта в полуканалах F_0F_1 -АТФсинтазы. (А) Схема переноса H^+ с участием аминокислотных остатков и молекул воды. (Б) Схема сети переноса протона, состоящей из аминокислотных остатков и молекул воды.

На рисунке 3А представлена структура полуканалов бактериальной F_0F_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, и в некоторых областях существуют целые полости, заполненные водой.

Для анализа структуры входного полуканала (со стороны межмембранного пространства) были подробно изучены участки между трансмембранными α -спиралями (ТМС) *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 3В). Входная часть полуканала формируется трансмембранными участками *aТМС1*, *aТМС4*, петель между *aТМС3* и *aТМС4*, а также N-концом *a*-субъединицы (Рисунок 3Б). 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 (лауну), внутренняя поверхность которой содержит значительное количество полярных аминокислот. Присутствие данных остатков способствует поддержанию гидрофильной среды внутри полости, что способствует проникновению в нее значительного количества молекул воды. Предполагается, что данная водная полость может являться источником свободного H^+ , т.е. протон попадает во входной полуканал через нее. Кроме того, был обнаружен еще один возможный способ проникновения протона в полуканал. Рядом с основной водной лакуной была обнаружена еще одна область (между *a*- и *b*-субъединицами), заполненная молекулами растворителя. Далее за водной полостью наблюдается сужение

входного полуканала, где перенос протона от *a*Glu219 проходит между *a*TMC3-6 вплоть до *a*Arg210 и *c*Asp61. В данном «узком месте» были выявлены все существенные полярные аминокислоты (*a*Asn116, *a*Asp119, *a*Ser144, *a*Asn214, *a*Glu219, *a*His245, *a*Gln252), которые образуют цепь переноса протона. Было установлено, что *a*Glu219, вместе с *a*Asp119 и *a*His245, расположены на разных *a*TMC (на *a*TMC4, *a*TMC3 и *a*TMC5 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 *c*Asp61. *a*Asn214 и *a*Gln252 были расположены в самом конце входного полуканала 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.

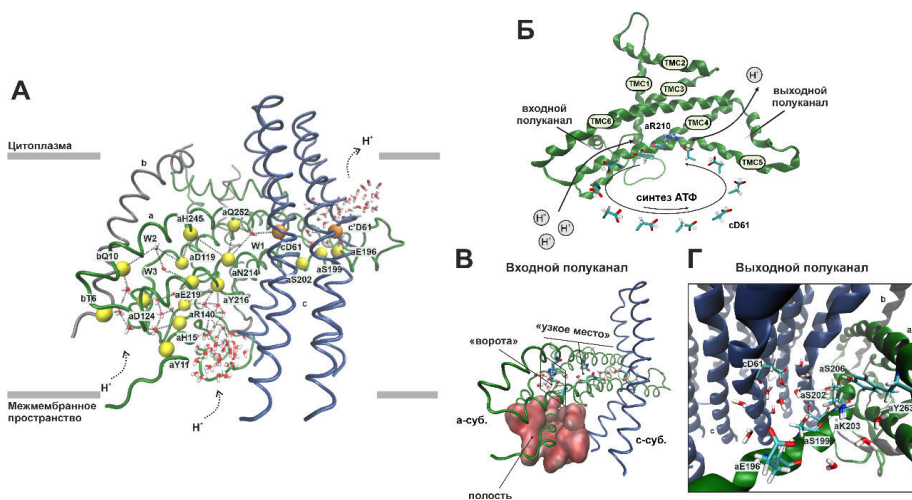


Рисунок 3. (А) Структура протонных полуканалов бактериальной F_0F_1 -АТФсинтазы. Пунктирные линии показывают возможную траекторию движения протона через входной полуканал. Полярные аминокислотные остатки, предположительно участвующие в транспорте протонов, показаны желтыми сферами, *c*Asp61 входного/выходного полуканалов – оранжевыми сферами. (Б) Расположение протонных полуканалов. Указаны трансмембранные спирали (ТМС) *a*-субъединицы и положения ключевых аминокислотных остатков (*a*Arg210, *c*Asp61). (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) Область вблизи *c*Asp61 в выходном полуканале (вид со стороны цитоплазмы). На спиралях 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).

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, 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. По данным МД траекторий были получены карты вероятности распределения молекул воды внутри полуканала и с их помощью определены области локализации трех структурных кластеров молекул воды (W1-W3), необходимых для замыкания цепи переноса протона. Кластер W1 наблюдался около *c*Asp61, W2 располагался между *a*Asp119 и *a*His245, а кластер W3 вблизи *a*Glu219 (Рисунок 4). Корректность определения областей локализации воды W1-W3 подтверждается тем, что молекулы проводят в этих кластерах максимально наблюдаемую долю времени на рассчитанных МД траекториях.

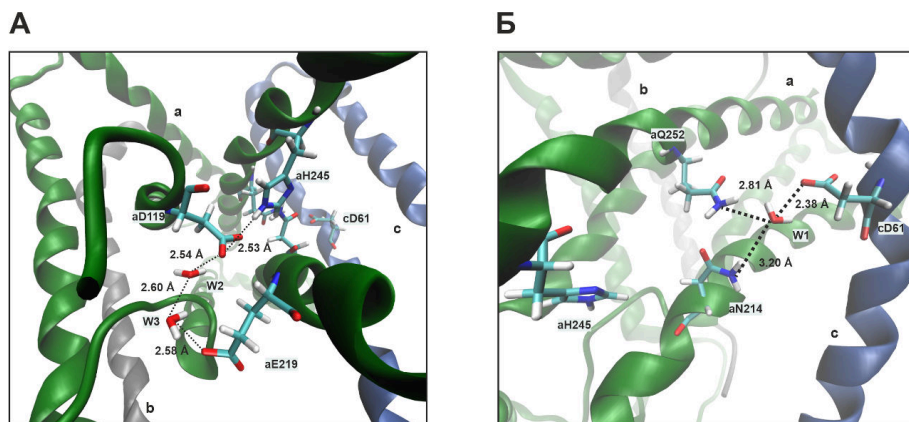


Рисунок 4. (А) Детальный вид на *a*Asp119, *a*Glu219 и *a*His245, боковые группы которых перекрывают входной полуканал, образуя что-то похожее на «ворота». Показаны две молекулы воды (W2 и W3), координирующие перенос протона между *a*Asp119 и *a*Glu219. (Б) Область вблизи *c*Asp61 во входном полуканале (вид со стороны *b*-субъединицы). Показана молекула воды W1, которая образовывала водородные связи с *a*Asn214, *a*Gln252 и *c*Asp61. Указаны минимально наблюдаемые в процессе МД моделирования значения расстояний.

Несмотря на плотную упаковку белка, подвижность боковых групп некоторых остатков оказалась очень высокой. При этом были обнаружены *устойчивые пространственные положения* боковых групп существенных аминокислот, средняя амплитуда колебаний в которых по порядку величины соответствовала тепловым колебаниям атомов (~ 1 Å). Так для остатков *a*Asn214 и *a*Gln252 *a*-субъединицы с помощью оценки угловых характеристик, а также методов классификации объектов (кластерный анализ, дискриминантный анализ, метод

главных компонент) были определены три устойчивых положения, обозначенные как SP1, SP2, SP3. Установлено, что *a*Asn214 в положении SP3 и *a*Gln252 в SP1, SP2 были ориентированы в сторону *c*Asp61 и могли протонировать его через W1. При этом в положении SP1 *a*Asn214 был ориентирован в сторону *a*His245, поэтому цепь переноса протона всегда была незамкнута, и изменение локализации положения *a*Asn214 является необходимым условием для обеспечения протонного транспорта. Также, мы обнаружили еще одно редкое положение SP3, в котором *a*Gln252 был ориентирован на *a*Asn116 и *a*Ser144, которые находились в стороне от «основной траектории» H^+ и могли являться протонной ловушкой (Рисунок 5).

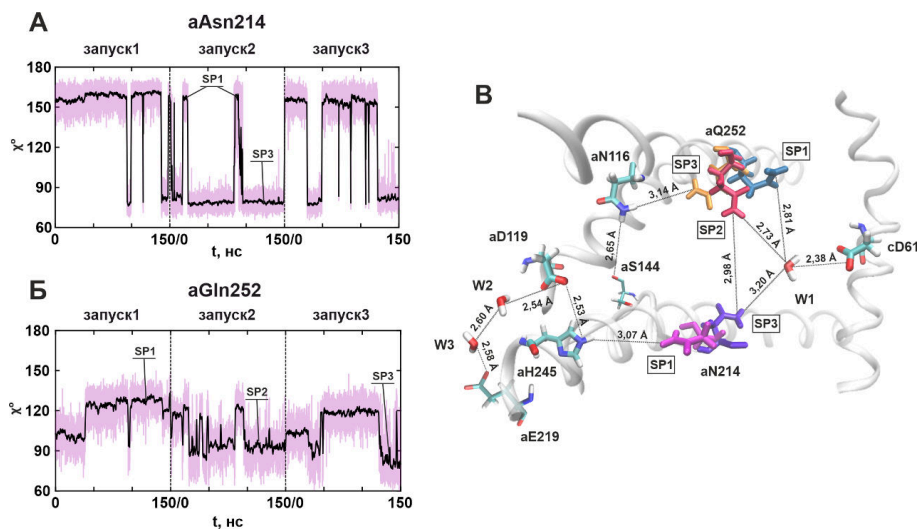


Рисунок 5. Устойчивые пространственные положения (SP) боковых групп *a*Asn214 и *a*Gln252. (А-Б) Графики значений угла χ между боковой группой и осью α -спирали для трех независимых запусков. (В) Схема пространственных положений боковых цепей *a*Asn214 и *a*Gln252. SP1 и SP3 *a*Asn214 показаны пурпурным и фиолетовым, SP1, SP2 и SP3 *a*Gln252 — синим, розовым и оранжевым соответственно.

Важность для процесса протонного транспорта некоторых из описанных аминокислот давно была известна из экспериментов по мутагенезу, однако их точная роль в переносе 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, удерживающее молекулы 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 лагунах способствует поддержанию концентрации свободных H^+ , в то время как

структурные молекулы воды, проникающие внутрь фермента, непосредственно участвуют в цепи переноса протона.

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 3Б). Воронкообразная форма выходного полуканала, в сочетании с высоким содержанием полярных аминокислотных остатков, способствовала его заполнению молекулами воды. Вблизи *c*Asp61 было идентифицировано шесть аминокислотных остатков (*a*Glu196, *a*Ser199, *a*Ser202, *a*Lys203, *a*Ser206 и *a*Tyr263), однако ни один из них не находился на расстоянии менее 3 Å от аспартата, что исключало их непосредственное участие в процессе его депротонирования (Рисунок 3Г). Поэтому, *c*Asp61 мог быть депротонирован через молекулы воды, которые вместе с функциональными группами полярных аминокислот могли образовывать сети водородных связей («протонные провода»), через которые протон мог легко перемещаться в цитоплазму.

Таким образом, входной полуканал имел комбинированную структуру, включающую в себя две водные полости, которые являются резервуарами накопления свободного H^+ (т.е. протон попадает во входной полуканал через них), а также цепочку полярных аминокислот и структурных молекул воды: *a*Glu219 — W3 — W2 — *a*Asp119 — *a*His245 — *a*Asn214 — *a*Gln252 — W1 — *c*Asp61. При этом выходной полуканал представлял собой просто водную полость, через которую протон мог легко перемещаться *in bulk*, т.е. не существовало определенного пути выхода, и можно ли назвать эту область движения протонов полуканалом является, скорее всего, вопросом терминологии.

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. 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.

Третья глава посвящена исследованию влияния липидного состава мембраны на структуру и гидратацию протонных полуканалов F_0F_1 -АТФсинтазы.

Важную роль в процессах передачи энергии, в 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).

Описанная в главе 2 структура мембранного фактора F_0 АТФсинтазы была встроена в липидный бислой, соответствующий физиологическим условиям, который состоял из PE и CL в соотношении 3:1 (25% CL). Данный тип липидного бислоя далее будет называться *in vivo* мембрана. Кроме того, для *E. coli* увеличение содержания CL является важным механизмом адаптации к неблагоприятным условиям окружающей среды. Поэтому мы также рассмотрели мембрану с обратным соотношением PE:CL — 1:3 (75% CL), что соответствует условиям бактериального стресса. Кроме того, был проведен сравнительный анализ результатов с данными, полученными при моделировании фермента, встроенного в POPC мембрану (Рисунок 6.)

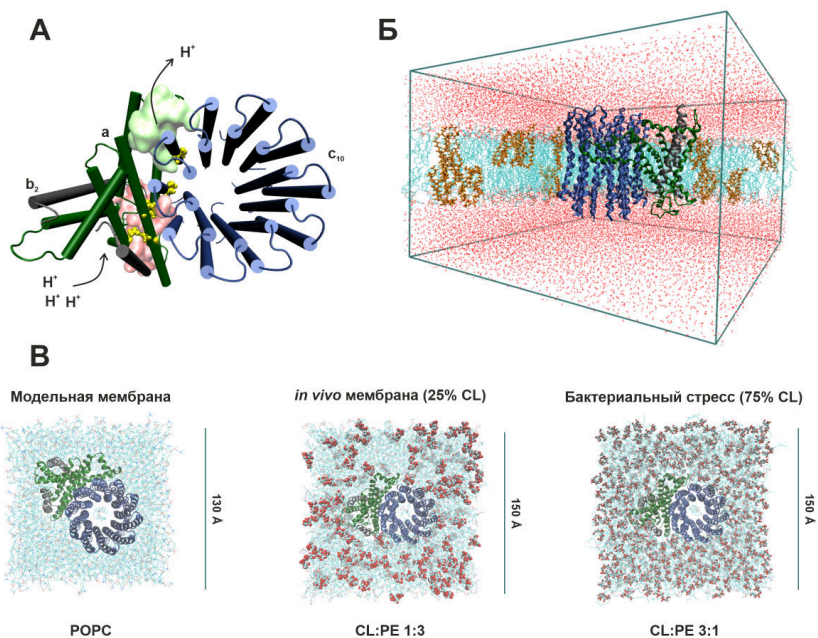


Рисунок 6. Модельная система мембранной части бактериальной АТФсинтазы. (А) Вид сверху (из цитоплазмы). Области входного и выходного полуканалов отображены в виде красной и зеленой поверхности соответственно. Полярные аминокислотные остатки, предположительно участвующие в транспорте протонов, показаны 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.

Для изучения влияния CL на структуру и гидратацию протонных полуканалов было проведено полноатомное МД моделирование согласно протоколу, описанному в главе 2. Для каждого типа мембраны было проведено по три независимых моделирования без ограничений 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). Более того, одно из моделирований фермента (запуск5), встроенного в *in vivo* мембрану, было продлено до одной микросекунды.

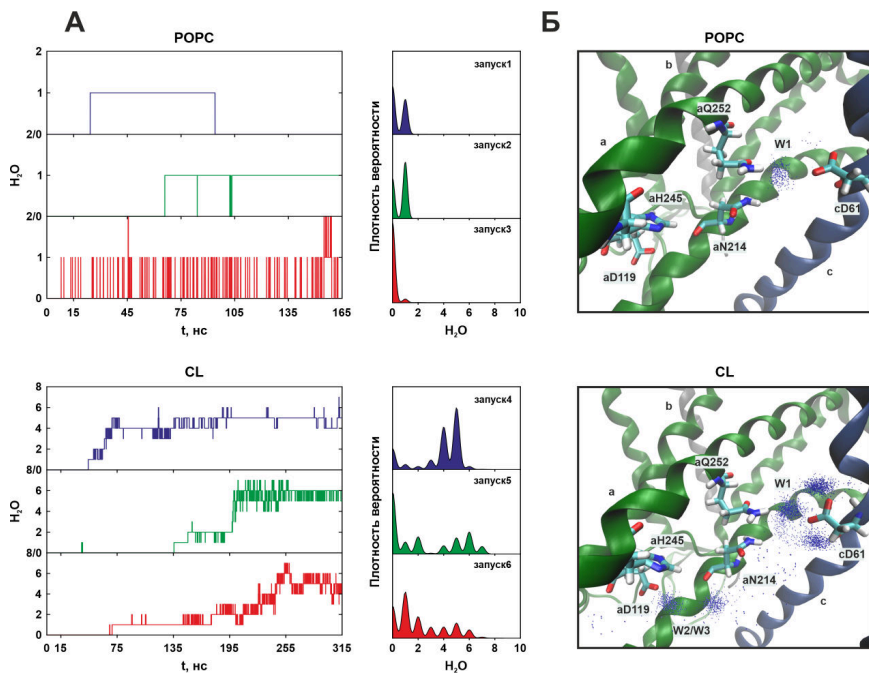


Рисунок 7. (А) Динамика гидратации входного полуканала при МД моделировании в POPC мембране и липидном бислое, содержащем CL. Слева — количество молекул воды, расположенных в «узком месте» входного полуканала в трех независимых запусках (синяя, зеленая, красная линии). Справа — плотность распределения числа молекул воды. Границы исследуемого компартамента определялись набором плоскостей, зависящих от координат атомов C_α 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.

Увеличение заряда мембраны за счет добавления различного процентного содержания CL приводило к повышению гидратации полуканалов. Наличие участков связывания CL около высокоподвижных петель *a*-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 (Рисунок 7А), а боковые группы существенных остатков *a*-субъединицы имеют устойчивую сольватацию.

Наблюдалось более глубокое проникновение молекул воды в область локализации W2/W3 (Рисунок 8), а также преобразование W1 в кластер, состоящий из нескольких молекул (Рисунок 7Б). Значимым проявлением эффекта гидратации также стало формирование непрерывной цепочки упорядоченных молекул воды, что способствовало повышению стабильности возможного протонного транспорта и приводило к увеличению вероятности протонирования ключевого *c*Asp61 в условиях, близких к *in vivo*.

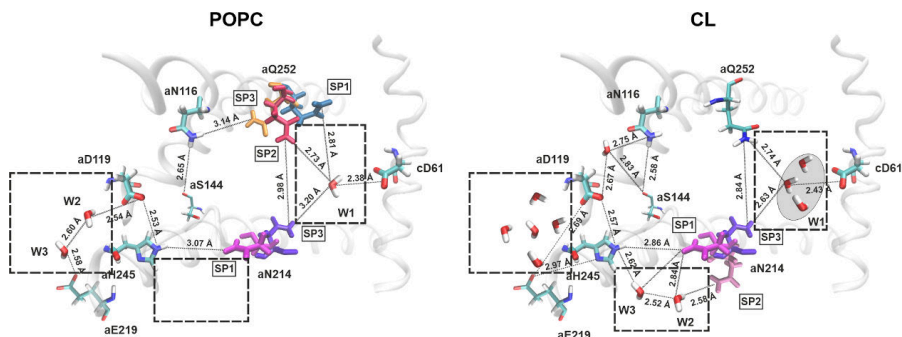


Рисунок 8. Схема пути переноса протона во входном полуканале бактериальной F_0F_1 -АТФсинтазы при МД моделировании в POPC мембране (слева) и мембранах, содержащих CL (справа). Указаны полярные аминокислотные остатки и молекулы воды, участвующие в предполагаемом пути переноса протонов. Устойчивые пространственные положения (SP1, SP2, SP3) боковой группы *a*Asn214 и *a*Gln252 обозначены различными цветами. Показаны минимально наблюдаемые в процессе МД моделирования значения расстояний.

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

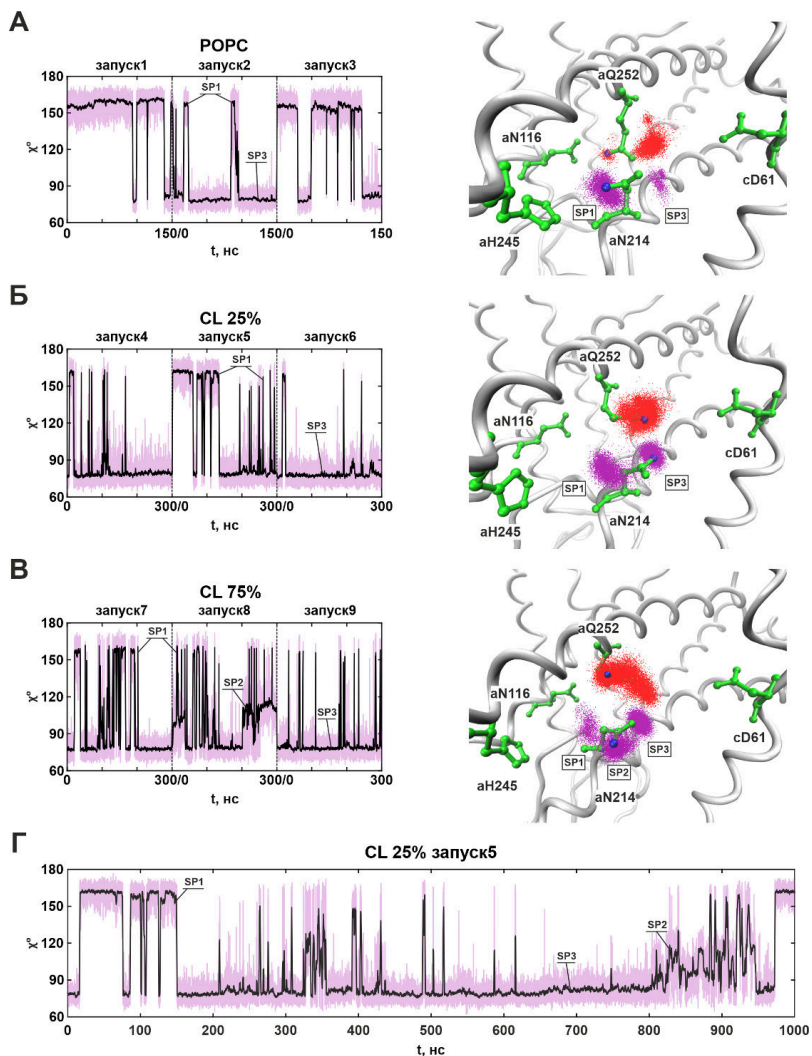


Рисунок 9. Устойчивые пространственные положения (SP) боковой группы *a*Asn214, полученные в результате МД моделирования в РОРС мембране (А), *in vivo* мембране, содержащей 25% CL (Б) и мембране, содержащей 75% CL (условия бактериального стресса) (В). Слева — графики значений угла χ между боковой группой и осью α -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 χ между боковой группой и осью α -спирали для МД моделирования в течение 1 мкс в мембране, содержащей 25% CL (запуск5).

него не удалось (Рисунок 9). Выходной полуканал, представляющий собой водную полость, является стабильной структурой, слабо зависящей от состава мембраны.

Повышенное содержание CL (75%) не оказывало существенного влияния на общую стабильность мембранной части белкового комплекса и не приводило к нежелательным конформационным изменениям. Структура протонных полуканалов сохранялась, за исключением незначительных изменений в подвижности боковой группы *a*Asn214 (Рисунок 9B). 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 было показано влияние кардиолипинов на гидратацию протонных полуканалов F₀F₁-АТФсинтазы, а также подтверждена структурная устойчивость мембранного фактора F_o к изменению липидного состава мембраны, который критически влияет на функциональные характеристики фермента при МД моделировании. Подвижность и наличие устойчивых пространственных положений боковой группы *a*Asn214 определяют характеристики протонного транспорта. Между тем, молекулы воды являются обязательными участниками цепи переноса протона через мембрану, как в составе больших водных полостей, так и за счет глубокого проникновения внутрь белка (W1-W3), где их присутствие необходимо для обеспечения непрерывности транспорта. Повышение гидратации области W1, при наличии CL, увеличивает вероятность протонирования ключевого *s*Asp61 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.

В **четвертой главе** описывается исследование роли функциональных элементов белковой структуры в процессе протонного транспорта с помощью мутационного анализа, а также оценка влияния мутаций на стабильность структуры *a*-субъединицы.

Несмотря на высокую скорость протонного транспорта, данный процесс оказывается чрезвычайно чувствительным к различным мутациям в области протонных полуканалов, приводящим к блокировке работы всего фермента. Результаты экспериментальных исследований мутаций аминокислот *a*-субъединицы (*a*Asn214, *a*Arg210, *a*Glu219, *a*His245, *a*Gln252) 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. Молекулярно-динамическое моделирование позволит дополнить результаты экспериментов, предоставляя ценную информацию для понимания процесса переноса протона на атомном уровне.

Для того, чтобы установить вклад существенных аминокислотных остатков в процесс переноса протона, был проведен мутационный анализ с использованием МД моделирования в течение 150 нс для каждой мутации. За основу была взята модельная система, описанная в предыдущей главе, которая представляла собой

мембранный фактор F_o АТФсинтазы дикого типа (wild type (WT)), встроенный в нативный липидный бислой (25% содержание CL) и водное окружение. 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*. На основе построенной молекулярной модели мембранной части фермента дикого типа были сконструированы мутантные системы путем следующих замен во входном полуканале: *aArg210Ala*, *aArg210Lys*, *aAsn214Leu*, *aAsn214His*, *aGlu219Gly*, *aGlu219Gln*, *aHis245Gly*, *aHis245Ser*, *aHis245Tyr*, *aGln252Leu* и ревертант *aGlu219His/aHis245Glu*. В выходном полуканале шесть полярных аминокислотных остатков, которые находились в непосредственной близости от *cAsp61*, были одновременно заменены на аланин (*aGlu196Ala/aSer199Ala/aSer202Ala/aLys203Ala/aSer206Ala/aTyr263Ala*).

При анализе МД траекторий особое внимание было уделено структурной динамике боковых групп мутированного остатка и близлежащих к нему аминокислот, а также гидратации белка. Для оценки влияния мутаций на структурные кластеры молекул воды были рассчитаны следующие параметры: *занятость кластера*, рассчитанная как процент времени моделирования, в течение которого молекулы воды наблюдались в области его локализации; *емкость кластера* — максимально наблюдаемое количество молекул воды в нем. Важность остатка для процесса протонного транспорта оценивалась по сохранению возможного пути переноса.

Прежде всего была проведена оценка стабильности структуры *a*-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 *a*-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 *aHis245Tyr* и *aGln252Leu* наблюдались конформационные изменения во взаимном расположении *aTMC4-6* (что также отражено в более высоких значениях RMSD), которые оказывали влияние на цепь переноса протона (Рисунок 10). Тем не менее, мутации могут нарушать активность белка, не меняя его стабильности (или с незначительными изменениями), например, путем разрыва цепи переноса протонов или изменения гидратацию кластеров W1-W3.

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 и/или обеспечивать стабильность самой структуры полуканала. Следует отметить, что, как правило, повышенная гидратация позволяет увеличить скорость движения протонов при функционировании фермента и облегчить транспорт в условиях критических мутаций. Однако, для эффективного использования

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.

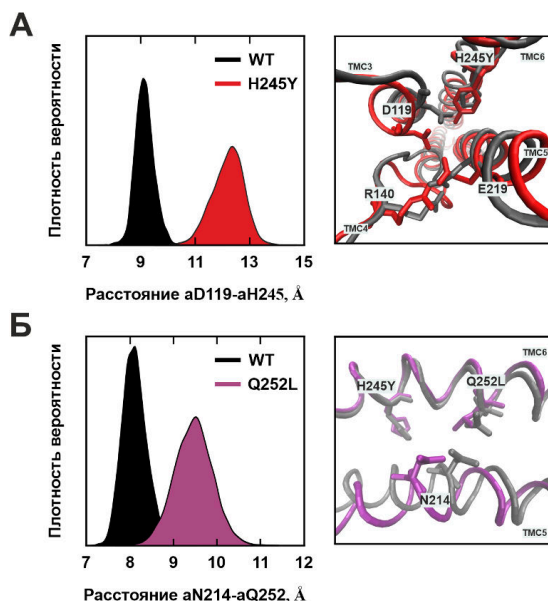


Рисунок 10. (А) Слева: плотность распределения расстояния между атомами C_{α} *a*Asp119 и *a*His245 для WT (черный) и *a*His245Тут (красный) указывает на увеличение расстояния между *a*TMC3 и *a*TMC6 в области «ворот». Справа: наложение молекулярных моделей *a*-субъединицы, полученных в результате 150 нс МД моделирования, для WT (черный) и *a*His245Тут (красный). Показано изменение относительного положения боковых групп остатков *a*Asp119, *a*Arg140, *a*Glu219 и *a*His245. (Б) Слева: плотность распределения расстояния между атомами C_{α} *a*Asn214 и *a*Gln252 для WT (черный) и *a*Gln252Leu (фиолетовый) указывает на увеличение расстояния между *a*TMC5 и *a*TMC6 в области протонирования остатка *c*Asp61. Справа: наложение молекулярных моделей *a*-субъединицы, полученных в результате 150 нс МД моделирования, для WT (черный) и *a*Gln252Leu (фиолетовый). Показано смещение *a*TMC5, приводящее к изменению относительного положения боковых групп остатков *a*Asn214 и *a*Gln252.

В случае замены остатка *a*Glu219 на неполярный глицин или полярный глутамин возможный путь движения протона практически не изменялся по сравнению с диким типом. Остаток *a*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, модификация локального заряда в самом начале «узкого места» вызывала некоторое затруднение проникновения молекул воды вглубь входного полуканала, что, в свою очередь, приводило к изменению занятости и емкости кластеров воды W1-W3. Следует отметить, что занятость, в отличие от емкости кластера, зависит от времени моделирования, 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. 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 (Рисунок 11).

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, несмотря на отсутствие устойчивых пространственных положений (SP) (Рисунок 11). Интересно, что экспериментальные исследования мутантных штаммов *aAsn214His E. coli* демонстрировали снижение активности фермента на 95%. Возможно, 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. Замена *aAsn214His* приводила к возникновению сильного положительного заряда в области протонирования *cAsp61*, что, в свою очередь, могло вызывать нарушение вращения *c*-кольца. Развитие геной инженерии, совершенствование методов регистрации и анализа протонной проводимости через мембраны помогут объяснить результаты МД моделирования, а также

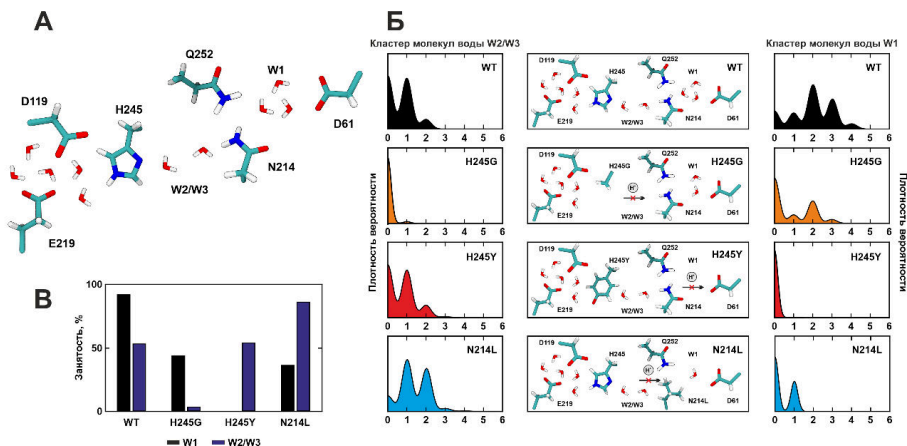


Рисунок 11. Результаты МД моделирования для WT, *aHis245Gly*, *aHis245Tyr* и *aAsn214Leu*. (A) Схема цепи переноса протона во входном полуканале, состоящая из консервативных аминокислотных остатков (*aGlu219*, *aAsp119*, *aHis245*, *aAsn214*, *aGln252*, *cAsp61*) и структурных кластеров молекул воды (W1-W3). Кластеры W2/W3 координируют перенос протона между *aHis245* и *aAsn214*, в то время как кластер W1 был необходим для протонирования *cAsp61*. (Б) Слева и справа показаны плотности распределения числа молекул воды в кластерах W2/W3 и W1, отражающие емкость кластеров. В середине приведены схемы возможного пути переноса протона в «узком месте» входного полуканала. (В) Занятость кластера водой показана черным цветом для W1, синим — для W2/W3.

позволят более точно оценить, на какой именно процесс (транспорт H^+ или вращение) оказывают влияние мутации в *a*-субъединице.

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. Интересно, что замена *aArg210* на положительно заряженный Lys со схожей боковой группой также приводила к слиянию полуканалов, что было обусловлено более высокой подвижностью боковой группы остатка лизина (Рисунок 12). Следовательно, данный остаток является критическим, а его наличие необходимо для существования полуканалов и корректного функционирования фермента.

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. Одновременные мутации шести полярных аминокислот выходного полуканала не вызывали нарушения в структуре *a*-субъединицы, однако, приводили к существенному

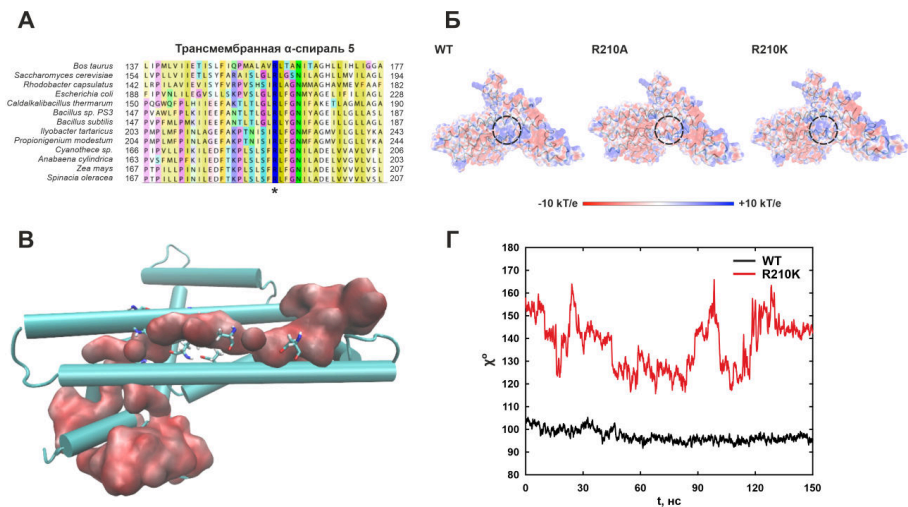


Рисунок 12. (А) Множественное выравнивание последовательностей a TMC5 α -субъединицы из разных организмов. Интенсивность цвета отражает степень консервативности остатка. Звездочкой отмечен консервативный остаток a Arg210. (Б) Электростатические поверхности α -субъединицы (вид сбоку) для WT, a Arg210Ala и a Arg210Lys. Цветовая шкала варьируется от -10 кТ/е до $+10$ кТ/е. Пунктирный круг указывает положение остатка a Arg210. (В) Слияние протонных полуканалов (красная поверхность) в случае мутаций a Arg210Ala и a Arg210Lys. (Г) График значений угла χ между боковой группой и осью α -спирали для WT (черный) и a Arg210Lys (красный).

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_0F_1 -АТФсинтазы к различным мутациям аминокислот α -субъединицы. Расположенный между полуканалами фактора F_0 остаток a Arg210 предотвращал утечку протонов через мембрану, что особенно важно во время синтеза АТФ. Остатки a His245 и a Asn214 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, a Glu219, a Gln252 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 АТФсинтазы будет реагировать на такие изменения, как мутации. Рассмотренные аминокислотные замены подтвердили описанный в предыдущих разделах возможный путь 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.

В **заключении** приведены основные выводы работы:

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 *a*-субъединице, ограниченную трансмембранными α -спиралями ТМС1-4, и последовательность консервативных аминокислотных остатков (*a*Glu219, *a*Asp119, *a*His245, *a*Asn214, *a*Gln252) со структурными кластерами молекул воды около *c*Asp61. При этом выходной полуканал представляет собой ограниченное пространство, экспонированное в цитоплазму, расположенное между ТМС5-6 *a*-субъединицы и ТМС2 *c*-субъединицы.
2. При молекулярно-динамическом моделировании белка в составе гомогенной мембраны, состоящей из фосфотидилхолина (PC), во входном полуканале определены области локализации трех структурных кластеров молекул воды (W1-W3), необходимых для замыкания цепи переноса протона. Кластер W1 наблюдается около *c*Asp61, W2 расположен между *a*Asp119 и *a*His245, а кластер W3 обнаруживается вблизи *a*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 *a*Glu219 и *a*Asp119/*a*His245 ниже 3 Å. Кроме того, возникала возможность протонирования *c*Asp61 напрямую с *a*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 (*a*Asn214, *a*Gln252) *a*-субъединицы, обозначенные как SP1, SP2, SP3. Показано, что изменение локализации положения боковой группы *a*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 или 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.

Основные публикации Ивонцина Леонида Андреевича по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.8. «Математическая биология, биоинформатика» (физико-математические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1. **Ivontsin L.A.**, Mashkovtseva E.V., Nartsissov Y.R. Simulation of proton movement in F_oF₁-ATP synthase by quantum-mechanical approach // *Journal of Physics: Conference Series*. — 2017. — Vol. 784. — P. 012021. — DOI: 10.1088/1742-6596/784/1/012021. **(IF SJR: 0,18; 0,58/0,41 п. л.)**.
2. **Ivontsin L.A.**, Mashkovtseva E.V., Nartsissov Y.R. Quantum-mechanical analysis of amino acid residues function in the proton transport during F_oF₁-ATP synthase catalytic cycle // *Journal of Physics: Conference Series*. — 2017. — Vol. 917. — P. 042004. — DOI: 10.1088/1742-6596/917/4/042004. **(IF SJR: 0,18; 0,55/0,39 п. л.)**.
3. **Ивонцин Л.А.**, Машковцева Е.В., Нарциссов Я.Р. Оценка чувствительности процесса протонного транспорта через полуканал АТФ-синтазы к изменениям трансмембранного потенциала // *Молекулярная медицина*. — 2019. — Т. 17, № 3. — С. 20–26. — DOI: 10.29296/24999490-2019-03-04. **(ИФ РИНЦ: 0,44; 0,89/0,63 п. л.)**.
4. **Ivontsin L.A.**, Mashkovtseva E.V., Nartsissov Y.R. Insights on the proton translocation pathways in F_oF₁-ATP synthase using molecular dynamics simulations // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. — 2022. — Vol. 717. — P. 109135. — DOI: 10.1016/j.abb.2022.109135. **(IF WoS: 3,8; 1,20/0,84 п. л.)**.
5. **Ivontsin L.A.**, Mashkovtseva E.V., Nartsissov Y.R. Membrane lipid composition influences the hydration of proton half-channels in F_oF₁-ATP Synthase // *Life*. — 2023. — Vol. 13, № 9. — P. 1816. — DOI: 10.3390/life13091816. **(IF WoS: 3,2; 1,38/0,97 п. л.)**.
6. **Ivontsin L.A.**, Mashkovtseva E.V., Nartsissov Y.R. Molecular dynamics simulations of the mutated proton-transferring *a*-subunit of *E. coli* F_oF₁-ATP synthase // *International Journal of Molecular Sciences*. — 2024. — Vol. 25, № 10. — P. 5143. — DOI: 10.3390/ijms25105143. **(IF WoS: 4,9; 1,60/1,12 п. л.)**.

Ивонцин Леонид Андреевич

Молекулярно-динамическое
моделирование протонных полуканалов бактериальной F₀F₁-АТФсинтазы

Автореф. дис. на соискание ученой степени к.ф.-м.н.

Подписано в печать ____ . ____ . ____ . Заказ № _____

Формат 60×90/16. Усл. печ. л. 1. Тираж 100 экз.

Типография _____

