

## СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

УДК 577.325

### НЕРЕГУЛЯРНЫЕ КОЛЕБАНИЯ АКТИВНОСТИ ВРАЩАТЕЛЬНОГО МОЛЕКУЛЯРНОГО МОТОРА. ПРОСТАЯ КИНЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ $F_1$ -АТРаза

© 2012 г. **Б. Н. Гольдштейн**, А. М. Аксиров\*, Д. Т. Закржевская

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук,  
Пушино, Московская обл., 142290*

Поступила в редакцию 06.12.2011 г.

Принята к печати 23.12.2011 г.

$F_1$ -АТРаза – каталитическая часть вращательного молекулярного мотора  $F_1F_0$ -АТР-синтазы. Кооперативный гидролиз АТР на трех каталитических центрах  $F_1$ -АТРаза сопряжен с вращением центральной субъединицы  $\gamma$  внутри цилиндра, образованного тремя субъединицами  $\alpha$  и тремя субъединицами  $\beta$ . Экспериментальные работы разных авторов показали, что вращение субъединицы  $\gamma$  происходит с нерегулярными остановками. Простая кинетическая модель данной статьи дает объяснение остановкам вращения  $F_1$ -АТРаза. Согласно ей остановки вращения происходят в режиме детерминированного хаоса, который возникает при величинах констант скорости, близких к известным экспериментальным оценкам. Длительность полученных остановок вращения практически совпадает с ранее наблюдаемыми экспериментально. Модель объясняет известное нерегулярное заполнение каталитических центров  $F_1$ -АТРаза нуклеотидами.

**Ключевые слова:** вращательный мотор  $F_1$ -АТРаза, кинетическая модель, детерминированный хаос.

IRREGULAR ACTIVITY OSCILLATIONS OF ROTARY MOLECULAR MOTOR. A SIMPLE KINETIC MODEL OF  $F_1$ -ATPase, by *B. N. Goldstein, A. M. Aksirov\*, D. T. Zakrjevskaya* (Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia; \*e-mail: konfl@rambler.ru).  $F_1$ -ATPase is a catalytic portion of the rotary molecular motor,  $F_1F_0$ -ATP synthase. Cooperative ATP hydrolysis at the three catalytic sites of the  $F_1$ -ATPase is connected with rotation of the central  $\gamma$ -subunit inside a cylinder made of three  $\alpha$  subunits and three  $\beta$  subunits. Various experimental works have shown that the  $\gamma$ -subunit rotates with irregular dwells. A simple kinetic model of this paper explains dwells during rotation as a result of the deterministic chaos. It is shown that the deterministic chaos occurs under the rate constants close to the known experimental estimations. Time duration of dwells in the model are close to those observed experimentally. Our model explains the known irregular occupancy of catalytic sites of  $F_1$ -ATPase by nucleotides.

**Keywords:** rotary motor  $F_1$ -ATPase, kinetic model, deterministic chaos.

Молекулярный вращательный мотор  $F_1$ -АТРаза – водорастворимая часть  $F_1F_0$ -АТР-синтазы, которая связывает транспорт протонов через биологические мембраны с синтезом или гидролизом АТР [1–3]. Отделенная от мембраны  $F_1$ -АТРаза гидролизует АТР, используя энергию гидролиза для вращательного изменения конформации своих субъединиц [3].  $F_1$ -АТРаза, выделенную из разных источников, интенсивно изучают в ведущих лабораториях разных стран структурными и биохимическими методами. Обзор этих работ опубликован в 2010 г. [3].

\* Эл. почта: konfl@rambler.ru

Кристаллические структуры  $F_1$ -АТРаза определены с высокой точностью разрешения в присутствии различных лигандов и без них [4, 5]. Три субъединицы  $\alpha$  и три субъединицы  $\beta$  организованы в  $F_1$  альтернативным образом вокруг центральной субъединицы  $\gamma$ . Каталитические центры  $F_1$  локализованы на субъединицах  $\beta$ , и в любой момент времени разные центры находятся в различных состояниях в ходе катализа [5].

Гидролиз АТР индуцирует вращение центральной субъединицы  $\gamma$  и приводит к циклическому изменению конформационного состояния субъединиц  $\beta$ . При вращении субъединицы  $\gamma$  все субъединицы  $\beta$  изменяют конформацию в следующей

последовательности:  $\beta_{TP}$  (с высоким сродством к АТФ)  $\rightarrow$   $\beta_{DP}$  (с высоким сродством к АДФ)  $\rightarrow$   $\beta_E$  (пустая конформация) [4, 5].

Кинетический механохимический механизм вращательного катализа для  $F_1$  впервые предложен Бойером еще до установления кристаллической структуры фермента на основании только термодинамических и кинетических данных [1]. Тем не менее, этот механизм в основном остается признанным до сих пор [3].

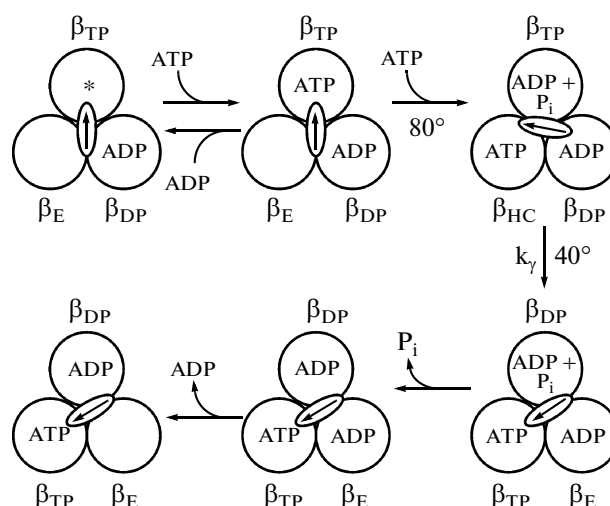
В 1997 г. механизм Бойера нашел прямое подтверждение в экспериментах на одной молекуле [6], когда вращение центральной субъединицы  $\gamma$  наблюдали в оптический микроскоп. Позднее, в 2001 г., показано, что каждое вращение субъединицы  $\gamma$  на  $120^\circ$  (полный каталитический цикл) происходит с “паузами” при вращении на  $80^\circ$  и  $40^\circ$  [7].

Нетривиальное вращательное поведение  $F_1$  привело к попытке его интерпретации с помощью различных моделей [8, 9]. Наибольшее распространение получили модели Остера и соавторов [10], основанные на допущении дискретных механических движений субъединицы  $\gamma$ . Однако Карплус с соавт. [11] заметили, что Остер не использует важных идей, заложенных в механизме Бойера [1]. Кроме того, в недавних работах [12] показано, что  $F_1$ -АТРаза продолжает вращаться в правильном направлении после почти полного удаления субъединицы  $\gamma$ . Следовательно, необходимо привлечение новых подходов, учитывающих кооперативное взаимодействие субъединиц  $\beta$  в ходе катализа.

Кинетические модели, учитывающие кооперативное взаимодействие субъединиц  $\beta$ , ранее применяли только для интерпретации равновесных и не зависящих от времени стационарных данных [11, 13].

Модель, предложенная в данной статье, впервые объясняет появление во времени нерегулярных ступенек на кинетических кривых для  $F_1$  на основе простой кинетической схемы, согласующейся с классической, предложенной Бойером. Она развивает идеи работы [9], в которой объяснено появление регулярных ступенек на кривой накопления продукта во времени для вращательного фермента.

Нерегулярность появления ступенек, обнаруженная экспериментально для  $F_1$ -АТРаза [14–18], мы объясняем способностью рассматриваемой кинетической схемы генерировать так называемый “детерминированный хаос”, который можно наблюдать как кажущийся случайным набор амплитуд и частот колебаний активности фермента [19]. В этом случае накопление продукта во времени, пропорциональное числу вращений субъединицы  $\gamma$ , происходит ступенчатым образом, сходным с наблюдаемым экспериментально для  $F_1$ -АТРаза.



**Рис. 1.** Схематическое представление двух путей катализа на  $F_1$ -АТРаза. Начальный одноцентровый путь соответствует связыванию АТФ в конформации  $\beta_{TP}$  и гидролизу в обратной реакции (возможно, без выделения  $P_i$ ). Второго многоцентровый путь связан с поворотом центральной субъединицы  $\gamma$  (показана стрелкой в центре) последовательно на  $80^\circ$  и  $40^\circ$  с выделением продуктов  $P_i$  и АДФ. После завершения цикла с поворотом на  $120^\circ$  происходит повторение многоцентрового пути.  $\beta_{TP}$ ,  $\beta_{DP}$ ,  $\beta_E$ ,  $\beta_{HC}$  – конформации трех субъединиц  $\beta$ .

Предлагаемая модель объясняет зависящее от времени различное заполнение каталитических центров  $F_1$ -АТРаза нуклеотидами, что помогает разрешить многолетний спор сторонников “двухцентровой” [20] и “трехцентровой” [21] моделей функционирования  $F_1$ -АТРаза.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Кинетическая модель $F_1$ -АТРаза

Мы рассматриваем простую кинетическую модель вращательного катализа ферментом  $F_1$ -АТРазой, которая получена модификацией уже известных [11, 22]. Кинетические модели  $F_1$ -АТРаза последних лет, основанные на классическом механизме Бойера, имеют некоторые различия. На рис. 1 схематически изображены основные стадии, установленные разными авторами. Минимальная схема представляет установленное к настоящему времени соотношение между углом поворота субъединицы  $\gamma$  и химическими стадиями. Изображены три субъединицы  $\beta$  в разных конформациях и переходы между состояниями, индуцированные связыванием АТФ. Представлены следующие стадии:

1. Начало реакции – связывание АДФ на субъединице  $\beta_{DP}$ . Эта стадия на рис. 1 не показана. Другие две субъединицы  $\beta$  при этом находятся в конформациях  $\beta_{TP}$  и  $\beta_E$  соответственно [22]. Стрелка в

центре тримера показывает ориентацию центральной субъединицы  $\gamma$ .

2. Связывание первой молекулы АТР происходит с высоким сродством на субъединице  $\beta_{\text{ТР}}$ .

3. Первая связанная молекула АТР может быть гидролизована без вращения субъединицы  $\gamma$  в так называемом “одноцентровом гидролизе” [23]. В освобожденной субъединице  $\beta_{\text{ТР}}$  может остаться связанным неорганический фосфат  $P_i$  [23]. Оставшийся продукт  $P_i$  показан звездочкой.

4. Связывание второй молекулы АТР в конформации  $\beta_E$  происходит с меньшим сродством (отрицательная кооперативность [11]), поскольку это связывание сопряжено с поворотом субъединицы  $\gamma$  на  $80^\circ$  (на рис. 1 поворот показан против часовой стрелки). При связывании второй молекулы АТР конформация  $\beta_E$  изменяется на  $\beta_{\text{НС}}$  (так называемая полужакрытая конформация [22]). При повороте на  $80^\circ$  также происходит гидролиз АТР на субъединице  $\beta_{\text{ТР}}$ .

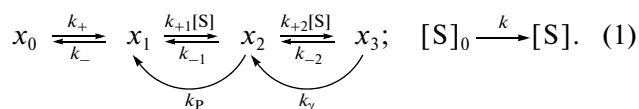
5. После связывания второй молекулы АТР происходит относительно медленный поворот субъединицы  $\gamma$  на  $40^\circ$  (на рис. 1 поворот показан вертикальной стрелкой  $k_\gamma$ ). Данный поворот сопровождается изменением конформации всех трех субъединиц  $\beta$ .

6. После суммарного поворота на  $120^\circ$  последовательно образуются продукты  $P_i$  и АДФ, и фермент готов к новому каталитическому циклу в так называемом “многосубъединичном катализе” [23].

Отметим, что “одноцентровый катализ” в нашей схеме, представленной на рис. 1, не является независимым от занятости других каталитических центров фермента нуклеотидами, как это предполагали в ряде работ [23]. Все ферментные формы связаны условием сохранения общей концентрации фермента. Поэтому скорость одноцентрового катализа может оказаться малой из-за малой концентрации гидролизующей формы фермента, а не из-за малой константы скорости гидролиза.

Некоторые модели  $F_1$ -АТРАЗы не учитывают кооперативность при связывании АТР [22]. В нашей модели, так же как и в некоторых других [11], кооперативное связывание АТР имеет решающее значение для интерпретации нетривиального кинетического поведения  $F_1$ -АТРАЗы.

Для количественного анализа мы представляем схему в формализованном виде:



На схеме (1) вначале показана иницирующая стадия (константы  $k_+$ ,  $k_-$ ). Две последовательные

стадии связывания субстрата АТР обратимы. Полукруглые стрелки изображают две лимитирующие стадии катализа ( $k_P$  – одноцентровый катализ,  $k_\gamma$  – многоцентровый катализ). Показан также приток субстрата  $k$  из регенерирующей системы. Здесь  $x_i = [E_i] / [E]$ ,  $i = 0, 1, 2, 3$  обозначают нормированные концентрации различных форм фермента, связанные соотношением баланса,  $[E] = \sum_i [E_i]$  – суммарная концентрация фермента:

$$x_0 + x_1 + x_2 + x_3 = 1. \quad (2)$$

Если мы интерпретируем эксперименты по одной молекуле фермента [6], то переменные  $x_i$  представляют не концентрации, а вероятности различных состояний фермента. Кинетические уравнения в обоих случаях имеют одинаковый вид.

На схеме (1) в явном виде показана иницирующая стадия обратимого связывания АДФ (константы скорости  $k_+$  и  $k_-$ ). Две последовательные стадии связывания субстрата АТР также обратимы (константы скорости  $k_{+1}$ ,  $k_{-1}$  для первой стадии и  $k_{+2}$ ,  $k_{-2}$  для второй). Стадия  $k_P$  отражает “одноцентровый гидролиз”, стадия  $k_\gamma$  соответствует лимитирующему вращению с последующим быстрым выделением продуктов  $P_i$  и АДФ, как показано в работах [22, 23].

На схеме (1) также отдельно показана стадия притока субстрата из регенерирующей системы (стадия  $k$ ). Приток субстрата, применяемый в большинстве экспериментов, имеет важное значение. Отсутствие его в кинетических моделях обедняет опубликованный ранее [22] кинетический анализ. Только с учетом внешнего притока субстрата схема (1) допускает возникновение незатухающих колебаний активности фермента [9].

В данной работе впервые показано, что наша модель допускает не только регулярные, но и нерегулярные колебания активности фермента, что приводит к нерегулярной ступенчатости, обнаруженной экспериментально в кинетике  $F_1$ -АТРАЗы [3].

### Численное решение кинетических уравнений

Следующие кинетические уравнения, составленные в соответствии с законом действующих масс, количественно характеризуют кинетическое поведение схемы (1):

$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= k_+(1 - x_1 - x_2 - x_3) - k_-x_1 - \\ &\quad - k_{+1}[S]x_1 + (k_{-1} + k_p)x_2, \\ \frac{dx_2}{dt} &= k_{+1}[S]x_1 - (k_{-1} + k_p)x_2 - k_{+2}[S]x_2 + (k_{-2} + k_\gamma)x_3, \\ \frac{dx_3}{dt} &= k_{+2}[S]x_2 - (k_{-2} + k_\gamma)x_3, \\ \frac{1}{[E]} \frac{d[S]}{dt} &= k - k_1[S]x_1 + k_{-1}x_2 - k_{+2}[S]x_2 + k_{-2}x_3, \end{aligned} \quad (3)$$

$$x_0 = 1 - x_1 - x_2 - x_3.$$

Мы решали уравнения (3) с использованием вычислительной программы DBSolve [24]. Образование продукта, лимитируемое вращением субъединицы  $\gamma$  с константой скорости  $k_\gamma$ , при интегрировании пропорционально числу оборотов вращения  $\gamma$  субъединицы. Накопление продукта вычисляли с использованием уравнения (4):

$$\begin{aligned} \frac{1}{[E]} \frac{d[P]}{dt} &= k_\gamma x_3, \\ \frac{[P]}{[E]} &= \int_0^t k_\gamma x_3 dt \left( \frac{\text{моль } P_1}{\text{моль } F_1} \right). \end{aligned} \quad (4)$$

Начальные условия:

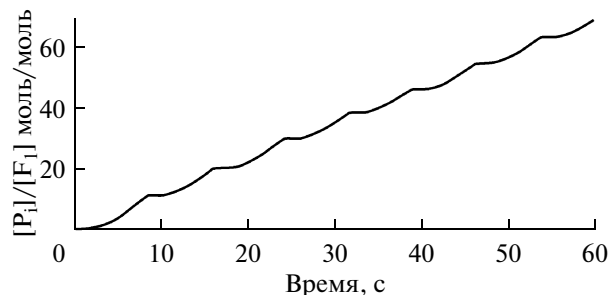
$$\begin{aligned} x_1 = 0.5, \quad x_2 = x_3 = 0, \quad [S] = 2 \times 10^{-4} \text{ М}, \\ [E] = 10^{-4} \text{ М}. \end{aligned} \quad (5)$$

Величины кинетических параметров выбирали так, чтобы получить нерегулярные ступеньки на кривой накопления продукта, близкие к экспериментальным [16–18]. Константы  $k_+$ ,  $k_-$ , характеризующие обратимое связывание ADP, и константа  $k/[E] = 10 \text{ с}^{-1}$ , обозначенная в уравнении 4 как  $k$ , описывающая приток субстрата ATP в систему, оценены в нашей предшествующей работе [9]. Поскольку в системе происходит регенерация ATP, значение концентрации ADP в системе мы предполагали близким к постоянному значению. Поэтому константа  $k_+$  включает в себя приближенно постоянную концентрацию ADP. В соответствии с нашими оценками [9]

$$k_+ = 5 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}, \quad k_- > 3 \text{ с}^{-1}, \quad k = 10 \text{ с}^{-1}.$$

Константа  $k_{+1}$  характеризует связывание ATP в каталитическом центре с высоким сродством. В ряде работ [7] величина  $k_{+1}$  указана равной:  $k_{+1} = 3 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ .

Константа  $k_{+2}$  включает относительно медленное вращение субъединицы  $\gamma$  на  $80^\circ$  и медленный гидролиз. Поэтому мы выбираем  $k_{+2} = 5 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ . На схеме (1) показаны обратные стадии процесса связывания субстрата ( $k_{-1}$ ,  $k_{-2}$ ). Эти константы в литературе обычно указываются малыми по вели-



**Рис. 2.** Ступенчатое накопление продукта, рассчитанное по уравнениям (3, 4). Константы скорости:  $k = 10 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_+ = 5 \times 10^{-2} \text{ с}^{-1}$ ,  $k_- = 6 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{+1} = 3 \times 10^7 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{+2} = 5 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{-1} = 0.007 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{-2} = 2 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_p = 100 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_\gamma = 10 \text{ с}^{-1}$ .

чине ( $\approx 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ ). В некоторых работах [23] указаны другие величины (больше  $1 \text{ с}^{-1}$ ). Мы выбрали величины  $k_{-1} = 0.007 \text{ с}^{-1}$ ,  $k_{-2} = 2 \text{ с}^{-1}$ .

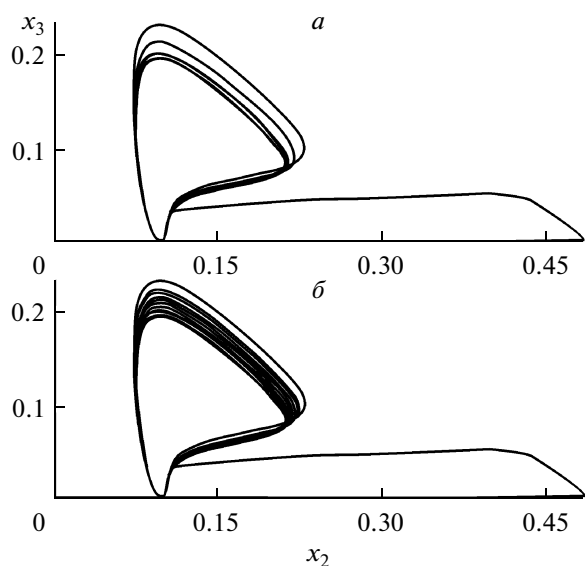
Константа  $k_p$  на схеме (1) характеризует “одноцентровый гидролиз”. В соответствии с работой [23]  $k_p = 100 \text{ с}^{-1}$  или  $k_p > 100 \text{ с}^{-1}$ . Малая “одноцентровая” каталитическая активность может быть связана с малой величиной  $x_2$ . Известно [25], что активность  $F_1$  становится заметной только при быстром заполнении субстратом третьего каталитического центра (т.е. при условии  $x_3 > x_2$ ).

Константа  $k_\gamma$  введена в работах [22, 23] и характеризует медленную скорость вращения субъединицы  $\gamma$ . В соответствии с литературными данными мы выбрали величину  $k_\gamma = 10 \text{ с}^{-1}$ .

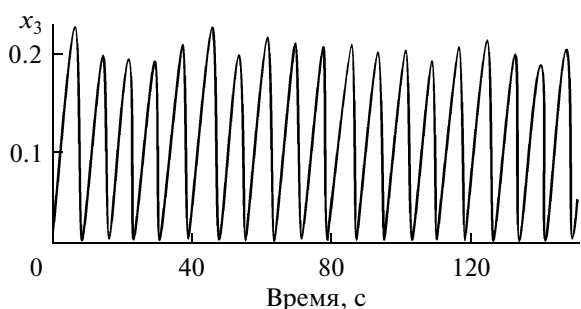
Решение уравнений (3, 4) при указанных величинах параметров дает накопление продукта во времени, изображенное на рис. 2. Кинетическая кривая на нем показывает различные по длительности ступеньки (паузы), подобные наблюдавшимся экспериментально [18]. Нерегулярности на рис. 2 становятся более заметными при изображении результатов расчета в других координатах.

На рис. 3 показано поведение траекторий данной системы в фазовом пространстве переменных ( $x_2$ ,  $x_3$ ). Видно, что после предстационарного изменения переменных  $x_2$ ,  $x_3$  (предстационарного “выброса” [22, 23]) система выходит на близкие предельные циклы. Рис. 3а показывает изменение предельного цикла в течение 60 с, а рис. 3б показывает изменение предельного цикла в течение 150 с.

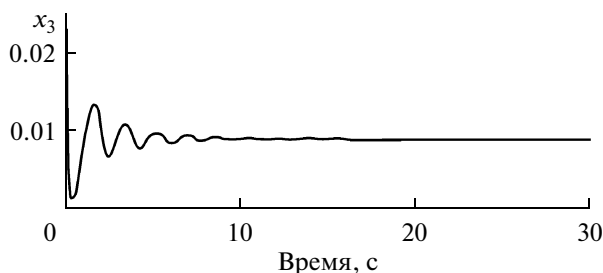
Изменения предельных циклов означают изменения частоты и амплитуды колебаний в определенных пределах, свойственных так называемому “детерминированному хаосу” [19]. В отличие от обычного шума детерминированный хаос характеризуется некоторыми закономерностями [19].



**Рис. 3.** Рассчитанный выход в плоскости переменных  $(x_2, x_3)$  на семейство предельных циклов, соответствующих ступенькам на рис. 1.  $a - t = 60$  с,  $b - t = 150$  с.



**Рис. 4.** Нерегулярное заполнение третьего центра  $x_3$ , рассчитанное по уравнениям (3). Условия как на рис. 2.



**Рис. 5.** Кратковременное заполнение третьего центра  $x_3$  с измененной константой  $k_p = 200$  с<sup>-1</sup>. Остальные константы как на рис. 4.

При выбранных величинах параметров небольшие различия в длительности ступенек на рис. 2 подобны экспериментальным [15, 18]. Эксперимент [15, 18] показывает, что длительность “пауз” составляет 1–2 с.

Таким образом, схема (1) и соответствующие ей кинетические уравнения способны объяснить

возникновение нерегулярных по длительности ступенек на кинетической кривой (рис. 2). Наше объяснение не требует привлечения гипотез о стохастическом дискретном механическом движении деталей молекулы  $F_1$ -АТРаза. Все химические стадии этой схемы достоверно установлены.

### *Нерегулярное колебательное заполнение каталитических центров*

Нерегулярным ступенькам на рис. 2 соответствует нерегулярное заполнение каталитических центров  $F_1$ -АТРаза лигандами. На рис. 4 показано рассчитанное заполнение третьего центра ( $x_3$ ) для тех же величин параметров, что и на рис. 2.

Видно, что амплитуда колебаний на рис. 4 меняется случайным образом, но не выходит за пределы области  $0.18 < x_3 < 0.24$ . Период колебаний также не выходит из определенной области значений.

Экспериментальное наблюдение зависящего от времени заполнения каталитических центров  $F_1$ -АТРаза в ходе катализа осуществлено впервые в 2010 г. [26]. Заполнение третьего центра было кратковременным и быстро уменьшалось [26]. Зависимость  $x_3(t)$ , подобную экспериментальной [26], мы получили при увеличении константы скорости  $k_p$  ( $k_p = 200$  с<sup>-1</sup> вместо  $k_p = 100$  с<sup>-1</sup> на рис. 4). Полученная в результате решения уравнений (3) кривая представлена на рис. 5.

На рис. 5 заполнение третьего каталитического центра ( $x_3$ ) происходит кратковременно и имеет характер затухающих колебаний подобно тому, как это наблюдали методом тушения флуоресценции триптофана у  $F_1$ -АТРаза. Тушение флуоресценции наблюдали в присутствии АТФ или АДФ, оно достигало постоянного уровня в течение 100 с [26]. Авторы [26] показали, что наблюдаемое тушение пропорционально заполнению каталитических центров  $F_1$ -АТРаза. Использованный авторами мутированный фермент, возможно, обладал большей одноцентровой активностью, чем нативный. Мы увеличили константу  $k_p$ , находясь в рамках известных значений константы скорости одноцентрового гидролиза [23].

Нерегулярность заполнения третьего каталитического центра  $F_1$ -АТРаза свидетельствует о справедливости как “двухцентровой” [20], так и “трехцентровой” [21] моделей  $F_1$ -АТРаза.

### **ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Модель  $F_1$ -АТРаза, схематически представленная на рис. 1, содержит два различных пути катализа. Один путь протекает через один каталитический центр в конформации  $\beta_{TP}$  без вращения субъединицы  $\gamma$ . Этот путь в литературе называют

“одноцентровым гидролизом” [23]. Известно, что малую скорость одноцентрового гидролиза можно объяснить тем, что доля фермента, участвующего в нем, незначительна. Участие фермента в “многоцентровом гидролизе” уменьшает долю “одноцентрового гидролиза”. Многоцентровой гидролиз образует второй путь катализа с участием всех трех каталитических центров.

Присутствие двух путей катализа – необходимое условие колебательного поведения фермента [9, 27–29]. На кривой накопления продукта во времени колебательная кинетика приводит к возникновению ступенек (рис. 2), регистрируемых в различных экспериментальных работах [3].

Кроме того, для возникновения колебаний кинетическая схема должна включать стадию задержки [9]. В нашем случае задержка обусловлена медленным обратимым связыванием продукта ADP.

Ранее мы показали, что необходимая для колебаний задержка может происходить и другими способами. В частности, предварительное связывание АТР, рассмотренное Карплусом и соавт. [11], также может индуцировать колебательное поведение [27]. Футаи и соавт. [18] определяют стадию задержки в виде обратимого ингибирования промежуточного состояния фермента.

Кинетическая модель, рассмотренная в данной статье, позволяет получить достаточно длительные паузы (~2 с) на кинетической кривой (рис. 2). Недавно именно такие паузы обнаружены экспериментально. Их длительность авторы работы [18] объясняют присутствием в кинетической схеме стадии задержки. Мы даем такое же объяснение, но с привлечением другой стадии задержки.

Наиболее интригующее на наш взгляд в рассмотренной модели – возникновение нерегулярности пауз во вращательной кинетике. Стохастиче- ку пауз во вращении  $F_1$ -АТРазы наблюдали во многих экспериментах [15]. Нерегулярность колебательного поведения может возникнуть без вовлечения внешних случайных процессов. В этом случае она называется детерминированным хаосом [19], который может быть легко идентифицирован по фазовым портретам, как это показано на рис. 3а и 3б.

При изменении кинетических параметров вместо детерминированного хаоса могут быть получены устойчивые колебания (один предельный цикл), как показано в нашей работе [9].

Физиологическое значение хаоса еще недостаточно изучено. Ясно, что хаос дает детерминированной системе возможность иметь определенный разброс колебательного поведения. Разброс колебательного поведения в определенных пределах может иметь адаптивное значение [19], характер поведения системы сохраняется при малых возмущениях.

В нашей модели детерминированный хаос является следствием дополнительных обратных связей, возникающих из-за обратимости связывания субстрата. Таким образом, обратимость связывания субстрата может иметь физиологическое значение. Известно, что  $F_1$ -АТРазы в комплексе с  $F_0$  участвуют в процессе трансдукции энергии [3]. Обороту  $\gamma$ -субъединицы на  $360^\circ$  соответствует транспорт через мембрану митохондрии 10 протонов у *E. coli* и *Bacillus PS3*, 11 – у *Ilyobacter tartaricus* и *Propionigenium modestum*, 15 – у синезеленых водорослей *Spirulina platensis*, т.е. в среднем 3.3–5 протонов приходится на синтез/гидролиз 1 молекулы АТР [3]. По-видимому, различие соотношений – результат адаптации к неодинаковым физиологическим режимам [3], и оно отражает характерные механизмы регуляции. Полученная в нашей работе нерегулярность появления ступенек – проявление “детерминированного хаоса” – находится в соответствии с экспериментальными данными, не требует для своего объяснения привлечения гипотезы о флуктуации энзима [3], и ее можно рассматривать как дополнительный механизм регуляции транспорта протонов.

Мы предполагаем, что регенерированный субстрат возвращается в систему в виде притока  $k$ . В связи с этим можно допустить существование расхождения в поведении моделируемой системы и экспериментальной. Однако если предположить, что в экспериментальной системе подача восстановленного субстрата из регенерирующей системы в течение некоторого времени будет происходить в форме постоянного притока, то в этом случае в соответствии с моделью должны наблюдаться колебания концентрации субстрата.

Схема с постоянным притоком субстрата позволяет воспроизвести как длительность остановок вращения, так и наблюдаемую в эксперименте нерегулярность их появления без привлечения гипотезы [3] о стохастическом дискретном механическом движении деталей молекулы  $F_1$ -АТРазы.

В отличие от известных моделей [22, 23] наша учитывает реалистическое условие притока субстрата и поэтому может быть использована для уточнения кинетического механизма  $F_1$ -АТРазы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boyer P.D. 1997. The ATP synthase – a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749.
2. Stock D., Gibbons C., Arechaga I., Leslie A.G., Walker I.E. 2000. The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 672–679.
3. Nakanishi-Matsui M., Sekiya M., Nakamoto R., Futai M. 2010. The mechanism of rotating proton pumping ATPases. *Biochim. Biophys. Acta.* **1797**, 1343–1352.
4. Abrahams J.P., Leslie A.G.W., Lutter R., Walker J.E. 1994. Structure at 2.8 Å resolution of  $F_1$ -ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature.* **370**, 621–628.

5. Menz R., Walker J., Leslie A. 2001. Structure of bovine mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites. *Cell*. **106**, 331–341.
6. Noji H., Yasuda R., Yoshida M., Kinosita K. 1997. Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature*. **386**, 299–302.
7. Yasuda R., Noji H., Yoshida M., Kinosita K., Itoh H. 2001. Resolution of distinct rotational substeps by sub-millisecond kinetic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature*. **410**, 898–904.
8. Cherepanov D.A., Mulikidjanian A.Y., Junge W. 1999. Transient accumulation of elastic energy in proton translocating ATP synthase. *FEBS Lett*. **449**, 1–6.
9. Goldstein B.N., Aksirov A.M., Zakrjevskaya D.T. 2011. A model of stepping kinetics for rotary enzymes. Application to the F<sub>1</sub>-ATPase. *Biosystems*. **104**, 9–13.
10. Wang H., Oster G. 1998. Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase. *Nature*. **396**, 279–282.
11. Gao Y.Q., Yang W., Marcus R.A., Karplus M. 2003. A model for the cooperative free energy transduction and kinetics of ATP hydrolysis by F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 11339–11344.
12. Furuike S., Hossain M.D., Maki Y., Adachi K., Suzuki T., Kohori A., Itoh H., Yoshida M., Kinosita K. 2008. Axle-less F<sub>1</sub>-ATPase rotates in the correct direction. *Science*. **319**, 955–958.
13. Weber J., Wilke-Mounts S., Lee R.S.F., Grell E., Senior A.E. 1993. Specific placement of tryptophan in the catalytic sites of *Escherichia coli* F<sub>1</sub>-ATPase provides a direct probe of nucleotide binding: maximal ATP hydrolysis occurs with three sites occupied. *J. Biol. Chem.* **268**, 20126–20133.
14. Ariga T., Muneyuki E., Yoshida M. 2007. F<sub>1</sub>-ATPase rotates by an asymmetric, sequential mechanism using all three catalytic subunits. *Nature Struct. Mol. Biol.* **14**, 841–846.
15. Nakanishi-Matsui M., Kashiwagi S., Ubukata T., Iwamoto-Kihara A., Wada Y., Futai M. 2007. Rotational catalysis of *Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> sector stochastic fluctuation and a key domain of the  $\beta$  subunit. *J. Biol. Chem.* **282**, 20698–20704.
16. Shimabukuro K., Yasuda R., Muneyuki E., Hara K., Kinosita K., Yoshida M. 2003. Catalysis and rotation of F<sub>1</sub> motor: cleavage of ATP at the catalytic site occurs in 1 ms before 40° substep rotation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 14731–14736.
17. Shimabukuro K., Muneyuki E., Yoshida M. 2006. An alternative reaction pathway of F<sub>1</sub>-ATPase reaction pathway of F<sub>1</sub>-ATPase suggested by rotation without 80 degrees/40 degrees substeps of a sluggish mutant at low ATP. *Biophys. J.* **90**, 1028–1032.
18. Sekiya M., Hosokawa H., Nakanishi-Matsui M., Al-Shavi M.K., Nakamoto R.K., Futai M. 2010. Single molecule behavior of inhibited and active states of *Escherichia coli* ATP synthase F<sub>1</sub> rotation. *J. Biol. Chem.* **285**, 42058–42067.
19. Canavier C.C., Clark J.W., Byrne J.H. 1990. Routes to chaos in a model of a bursting neuron. *Biophys. J.* **57**, 1245–1251.
20. Milgrom Y.M., Cross L. 2005. Rapid hydrolysis of ATP by mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase correlates with the filling of the second of three catalytic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102**, 13831–13836.
21. Weber J., Senior A.E. 1997. Catalytic mechanism of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*. **1319**, 19–58.
22. Scanlon J., Al-Shavi M., Le N., Nakamoto R. 2007. Determination of the partial reactions of rotational catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochemistry*. **46**, 8785–8797.
23. Scanlon J., Al-Shavi M., Nakamoto R. 2008. A rotor-stator cross-link in the F<sub>1</sub>-ATPase blocks the rate limiting step of rotational catalysis. *J. Biol. Chem.* **283**, 26228–26240.
24. Goryanin I.I., Hogman T.C., Sel'kov E.E. 1999. Mathematical simulation and analysis of cellular metabolism and regulation. *Bioinformatics*. **15**, 749–758.
25. Ren H., Bandyopadhyay S., Allison W. 2006. The sub-complex of TF<sub>1</sub>-ATPase does not hydrolyze ATP at a significant rate until the substrate binds to the catalytic site of the lowest affinity. *Biochemistry*. **45**, 6222–6230.
26. Shimo-Kon R., Muneyuki E., Sakai H., Adachi K., Yoshida M., Kinosita K. 2010. Chemo-mechanical coupling in F<sub>1</sub>-ATPase revealed by catalytic site occupancy during catalysis. *Biophys. J.* **98**, 1227–1236.
27. Goldstein B., Aksirov A., Zakrjevskaya D. 2009. A new kinetic model for biochemical oscillations: graph-theoretical analysis. *Biophys. Chem.* **145**, 111–115.
28. Goldstein B., Aksirov A., Zakrjevskaya D. 2008. Kinetic model for dynein oscillatory activity. *Biophys. Chem.* **134**, 20–24.
29. Goldstein B. 2007. Switching mechanism for branched biometrical fluxes: graph-theoretical analysis. *Biophys. Chem.* **125**, 314–319.