ПРИМЕНЕНИЕ МАТЛАБА ДЛЯ РАССЧЕТА ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ЦИТОХРОМ С ОКСИДАЗЫ

Горбикова Е.А.
Университет Хельсинки, Институт Биотехнологии, г.Хельсинки

Горбикова Е.А.
Университет Хельсинки,
Институт Биотехнологии

Цитохром с оксидаза (CcO) – терминальный белок дыхательной цепи митохондрий и некоторых аэробных бактерий. За один оборот каталитического цикла CcO пампирует 4H+, создавая электрохимический трансмембранный градиент, который используется АТФ синтетазой для синтеза АТФ.

CcO включает четыре редокс центра (CuA, гем а, гем а3 и CuB). CuA является первичным акцептором электронов от цитохрома с, передавая их через гем а на биядерный реакционный центр, который состоит из гема а3 и CuB. Реакция утилизации электронов за счет восстановления кислорода до воды осуществляется в биядерном центре. Определение термодинамических параметров редокс центров существенно для построения молекулярной модели функционирования фермента (модели транспорта электронов и протонов).

С этой целью было проведено редокс титрование цитохром с оксидазы. В качестве детектора редокс изменений использовали Фурье-ИК-спектрометр. Электрохимический диапазон титрования – 0:+480 мВ (относительно стандартного водородного электрода) с шагом 40 мВ. Регистрируемый инфракрасный диапазон 4000-1000 см-1. В результате титрования были получены поверхности «оптическая плотность-потенциал-количество волн» [1]. Поверхности были получены при разных pH. Каждая поверхность включала ~40 максимумов и такое же количество минимумов.

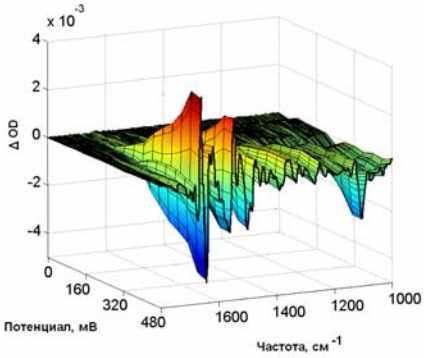

Рис.1. Типичная Фурье-ИК поверхность редокс титрования CcO для ИК диапазона 1800-1000 см-1

Для расчета термодинамических параметров требовалось извлечь кривые титрования (зависимости оптической плотности OD от электрохимического потенциала) во всех максимумах и минимумах. Генерирование трехмерных матриц, извлечение из них кривых редокс титрования, фитирование кривых титрования и расчет термодинамических параметров было проведено в среде Matlab. Для извлечения кривых редокс титрования следующий алгоритм был применен. Интенсивность пика определялась как разница между интенсивностью максимума (минимума) и полусуммой интенсивностей соответствующих минимумов (максимумов). Поиск максимумов и минимумов осуществлялся автоматически в Matlab. После этой процедуры система кривых титрования была рассортирована на четыре группы в зависимости от редокс- и pH- поведения. Каждая группа была приписана одному из четырех редокс центров. Однако предложенный алгоритм извлечения кривых титрования из поверхности с системой пиков не идеален. Каждый максимум (минимум) рассчитывался относительно ближайших минимумов (максимумов). В случае если максимум и ближайший минимум относился к разным редокс центрам, то интерпретация кривой титрования оказывалась неоднозначной. Поэтому на следующем этапе была проведена верификация интерпретации каждого пика. Дла этого интенсивность пика расчитывалась как разность между интенсивностью максимума (минимума) и полусуммой интенсивностей на расстоянии ±3 см-1 от максимума (минимума).

Экспериментальные точки кривых титрования каждой группы были усреднены и фитированы. Кривые титрования CuA и CuB были фитированы уравнением Нернста для одного одноэлектронного перехода:

E = Em + 2.303(RT/F) log ([Ox]/[Red])

где Em – среднеточечный потенциал (потенциал, при котором концентрации окисленной и восстановленной форм белка равны), E – действительный редокс потенциал, R – газовая постаянная (8,314 Дж/[К-моль]), T - температура, F – постоянная Фарадея (96500 Кл/моль), [Ox] – концентрация окисленной формы белка, and [Red] – концентрация восстановленной формы.

Для фитирования экспериментальных точек кривых титрования гема *a* и *a*3 была применена «неоклассическая модель» [2]. Данная модель описывает титрование системы из двух редокс центров с редокс взаимодействием между ними. Фитирование данной моделью позволяет рассчитать высокоасимптотные потенциалы, степень редокс взаимодействия и Em для высоко- и низкопотенциальных переходов обоих гемов. Результаты расчета термодинамических констант представлены в таблице.

Рассчитанные значения термодинамических параметров для CcO *Paracoccus denitrificans* из Фурье-ИК поверхностей редокс титрования

pH / редокс компонент, мВ	6.5	8.0	9.0
высокопотенциальный переход гемов	405	372	342
низкопотенциальный переход гемов	238	222	221
гем *a*, высокоасимптотный редокс потенциал	391	359	330
гем a_3, высокоасимптотный редокс потенциал	383	350	320
гем a/a_3 антикооперативное взаимодействие	-132	-115	-86
Cu_B	412	366	314
Cu_A	250	250	250
равновесная константа электронного транспорта между гемами	1.5	1.5	1.5

Таким образом, анализ редокс титрования цитохром с оксидазы был проведен полностью в среде Matlab, что показывает широкое применение данного программного продукта для решения биологических задач.

Литература

1. *Gorbikova E.A. et al. Redox titration of all electron carriers of cytochrome c oxidase by FTIR spectroscopy*. Biochemistry, 2006, in press
2. *Wikström,M. et al.* Cytochrome Oxidase - A Synthesis. 1981. Academic Press, New York