

Министерство образования и науки Российской Федерации

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Казанский (Приволжский) федеральный университет»

Институт Физики

Специальность: 010701.62 – Физика

Медицинская физика

Бакалаврская работа

Механизм изменения свойств пуринорецептора P2X7
при простой мутации.

Исполнитель:

студент гр. 06-105

« 15 » июня 2015 г.



Миргазова А.А.

Руководители:

Д.ф-м.н., доцент

« 15 » июня 2015 г.



Скоринкин А.И.

Заведующий кафедрой

д.х.н, профессор

« 15 » июня 2015 г.



Аганов А.В.

Казань – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| Введение | 3 |
| ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 5 |
| 1.1 Нервная система | 5 |
| 1.2 Синаптическая передача | 8 |
| 1.3 Мембранный потенциал и потенциал действия | 10 |
| 1.4 Пуриновые рецепторы нервных клеток | 14 |
| 1.5 Пуриновый рецептор P2X7..... | 17 |
| 1.6 Электрофизиологический эксперимент | 18 |
| ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ | 21 |
| 2.1 Компьютерное моделирование | 21 |
| 2.2 Выполнение эксперимента | 25 |
| ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ | 28 |
| Заключение | 36 |
| Выводы | 37 |
| Список литературы | 38 |

ВВЕДЕНИЕ

Организм человека – сложная система, в которой многочисленные процессы взаимосвязаны. Нервная система объединяет весь организм и способствует его нормальной работе. Сложность и многообразие функций нервной системы определяются взаимодействием между нейронами, которое, в свою очередь, представляют собой набор различных сигналов, передаваемых в рамках взаимодействия нейронов с другими нейронами или мышцами и железами. Сигналы испускаются и распространяются с помощью ионов, генерирующих электрический заряд, который движется вдоль нейрона. Любое нарушение в цепочке нервных импульсов ведет к ухудшению самочувствия, болезни.

Механизмом передачи информации между нейронами являются ионотропные рецепторы, представляющие собой мембранные лиганд-зависимые каналы, в которых проницаемость для определенных ионов меняется при действии на мембрану химических соединений – агонистов. В нервной системе в роли агониста может служить аденозинтрифосфорная кислота (АТФ). В данной работе были исследованы рецепторы на которых действует АТФ – пуринорецептор P2X7. Одним из способов изучения механизмов изменения свойств пуринорецепторов – мутация (замена одной аминокислоты на другую).

P2X7 является наиболее крупной молекулой из семейства пуринорецепторов. Активация рецептора АТФ способствует открытию пор на долгое время, пока агонист находится в связи с рецептором без развития десенситизации. P2X7 рецепторы в основном выражены в иммунных и глиальных клетках и в данное время широко обсуждается физиологическая роль рецепторов в иммунологических реакциях организма, поэтому важно структурно-функционально изучить эти рецепторы.

Для изучения процессов ионного трансмембранного переноса на мембране и законов образования поры, через которую ионы проникают внутрь клетки, была создана модельная система. Использование метода компьютерного моделирования позволяет изучить экспериментально все процессы, использовать хорошо разработанное наукой физическое описание.

Данная работа основана на применении математической модели рецептора для определения изменений свойств пуринорецептора P2X7 при замене фенилаланина на серин.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1 Нервная система. Нейроны.

Нервная система человека – это сложная сеть структур, пронизывающая весь организм и обеспечивающая саморегуляцию его жизнедеятельности благодаря способности реагировать на внешние и внутренние воздействия (стимулы). Основными функциями нервной системы являются получение, хранение и переработка информации из внешней и внутренней среды, регуляция и координация деятельности всех органов. Нервная система состоит из клеток двух типов: нервных (или нейронов) и глиальных. В центральной нервной системе количество глиальных клеток в среднем в 10÷50 раз больше, чем нейронов.

Существуют четыре разновидности глиальных клеток: астроциты, олигодендроциты и микроглия и шванновские клетки. Глиальные клетки играют роль вспомогательных клеток нервной ткани. Они составляют специфическое микроокружение для нейронов, обеспечивая условия генерации и передачи нервных импульсов. Каждое нервное волокно покрыто тонким изолирующим жировым (миелинизированным) слоем. Этот слой образуется шванновскими клетками. Олигодендроциты и шванновские клетки тесно связаны с нервными путями, образованными пучками аксонов. Другие глиальные клетки – астроциты расположены между кровеносными сосудами и телами нейронов, их отростки контактируют со стенкой капилляров и служат компонентом барьера между кровеносной системой и центральной нервной системой, а микроглия являются фагоцитами мозга. Глиальные клетки регулируют транспорт питательных веществ от капилляров к нейронам. Между глиальными клетками и связанными с ними нейронами осуществляется обмен белками, нуклеиновыми кислотами и другими веществами [10].

Структурной и функциональной единицей нервной системы является нервная клетка – нейрон. Эти специализированные клетки способны принимать, обрабатывать, кодировать, передавать и хранить информацию, организовывать реакции на раздражения, устанавливать контакты с другими нейронами, клетками органов. Уникальными особенностями нейрона являются способность генерировать электрические разряды и передавать информацию с помощью специализированных окончаний — синапсов.

Все нейроны можно разделить на 3 класса:

1. чувствительные (сенсорные)
2. вставочные
3. эффекторные

Чувствительные нейроны представляют собой афферентные пути, по которым импульсы передаются от рецепторов в ЦНС, а эфферентные нейроны проводят импульсы от ЦНС к эффекторам (мышцам и железам). К эффекторным нейронам относятся двигательные (моторные) нейроны, иннервирующие скелетные мышцы, и нейроны вегетативной нервной системы, осуществляющие центральную регуляцию гладких мышц и желез. Отростки вставочных нейронов не выходят за пределы ЦНС. Почти все нейроны ЦНС, за исключением сенсорных и эффекторных, являются вставочными. В ЦНС вставочные нейроны образуют цепи, осуществляющие анализ входной сенсорной информации, хранение опыта в виде памяти и формирование соответствующих команд [16].

Нейрон имеет три основные части: аксон, тело клетки (сома) и дендриты (рис. 1). Сомма содержит органеллы, необходимые для осуществления клеточных функций: ядро, рибосомы, гранулярный эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи и митохондрии. Сомма нейрона заключена в мембрану, которая состоит из двух слоев липидных

молекул. Своими гидрофобными концами липиды обращены друг к другу – внутрь мембраны, а гидрофильными концами – наружу. Также на мембране находятся белки: белки-«насосы», обеспечивающие перемещение ионов и молекул против градиента концентрации в клетке; белки, встроенные в каналы, обеспечивают избирательную проницаемость мембраны; рецепторные белки распознают нужные молекулы и фиксируют их на мембране; и ферменты, облегчающие протекание химических реакций на поверхности нейрона. В ряде случаев один и тот же белок может быть и рецептором, и ферментом, и «насосом». От тела клетки берет начало аксон – трубчатый отросток, приспособленный для проведения возбуждения и информации. Он окружен миелиновой оболочкой. Аксон имеет разветвленные окончания – пресинаптические, на которых находятся митохондрии и секреторные образования. Эти окончания контактируют с воспринимающей поверхностью других клеток. Рецептивной поверхностью нейрона являются дендриты – короткие и сильно разветвленные отростки нейрона. Необходимость такого ветвления обусловлена тем, что нейрон как информационная структура должен иметь большое количество входов [11].

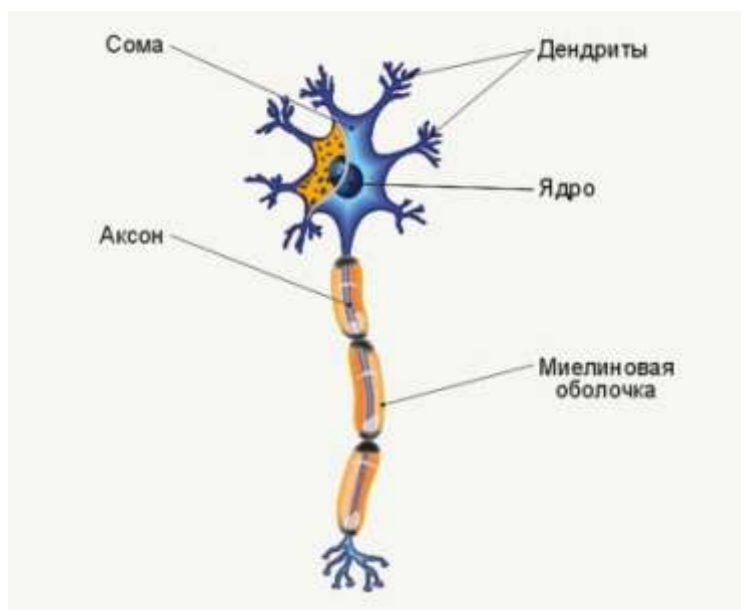


Рисунок 1 – Строение нейрона.

1.2 Синаптическая передача.

Нейроны связаны между собой синапсами – это место контакта двух нейронов, в котором осуществляется передача нервного импульса с одного нейрона на другой. Синапс представляет собой сложную структуру и состоит из пресинаптической части (окончание аксона, передающее сигнал), синаптической щели и постсинаптической части (структура воспринимающей клетки). Импульсы в синапсах передаются с помощью нейромедиаторов – биологически активных веществ – норадреналина, ацетилхолина и др. Молекулы медиаторов в результате взаимодействия с клеточной мембраной меняют ее проницаемость для ионов Na^+ , K^+ и Cl^- . Это приводит к возбуждению нейрона.

По механизму передачи нервного импульса бывают электрические и химические синапсы. Синаптические возбуждения могут быть одновременно и электрическими, и химическими; это означает что процессы обоих типов могут сосуществовать в одном и том же синапсе. Электрические контакты обычно пропускают сигнал в обе стороны, а химические синапсы односторонние: передача осуществляется только от пресинаптического окончания к постсинаптической клетке [10,13].

Химический синапс.

Структурно химический синапс состоит из пресинаптической части, постсинаптической части и синаптической щели (рис. 2). Пресинаптическая часть образуется расширением аксона по его ходу или окончаниям. Там имеются агранулярные и гранулярные пузырьки, содержащие медиатор, митохондрии, обеспечивающие синтез медиатора. Синаптическая щель – это пространство между пресинаптическим пузырьком и постсинаптической

мембраной от 20 до 30 нанометров шириной, которое содержит связующие пре- и постсинаптической структуры, построенные из протеогликана. Постсинаптическая мембрана принадлежит клетке, которая принимает нервные импульсы. На ней находятся рецепторы – белковые макромолекулы, встроенные в постсинаптическую мембрану.

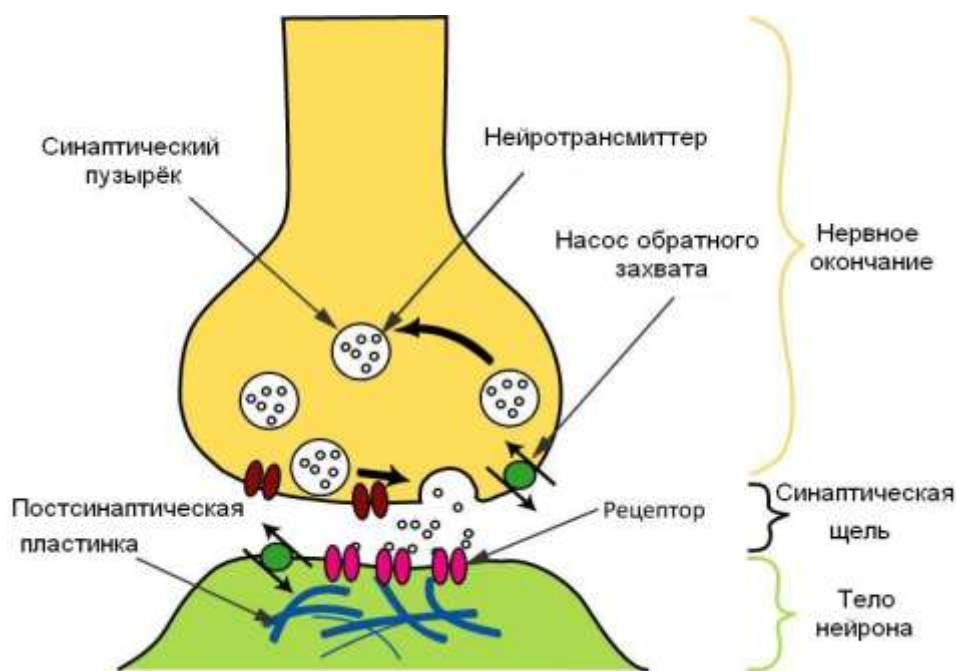


Рисунок 2 – Схема процесса передачи нервного сигнала в химическом синапсе.

Поступление электрического импульса к пресинаптической мембране включает процесс синаптической передачи, первым этапом которой является вхождение ионов Ca^{2+} в пресинапс сквозь мембрану через специализированные кальциевые каналы, локализованные у синаптической щели. Ионы Ca^{2+} активируют везикулы, скученные у своих мест присоединения, и те высвобождают медиатор в синаптическую щель. Вошедшие в нейрон ионы Ca^{2+} , после активации ими везикул с медиатором, деактивируются за время порядка нескольких микросекунд, благодаря депонированию в митохондриях и везикулах пресинапса. Молекулы

медиатора, высвобождаемые из пресинапса, связываются с рецепторами на постсинаптической мембране, в результате чего в рецепторных макромолекулах открываются ионные каналы. Ионы, которые начинают поступать внутрь постсинаптической клетки через открытые каналы, изменяют заряд её мембраны, что является частичной поляризацией (в случае тормозного синапса) или деполяризацией (в случае возбуждающего синапса) этой мембраны и, как следствие, приводит к торможению или провоцированию генерации постсинаптической клеткой потенциала действия [17].

Электрический синапс.

Пре- и постсинаптические мембраны в таких соединениях близко расположены и связаны каналами, которые соединяют внутриклеточное содержимое двух клеток. Каналы переброшены в виде мостиков через щель, соединяя цитоплазму обеих клеток. Они достаточно широки и позволяют проходить между пресинаптической и постсинаптической частью клеток не только ионам (калию, натрию и другим неорганическим ионам), но и большим органическим молекулам.

1.3 Мембранный потенциал и потенциал действия.

Специфическая реакция нейрона на действие раздражителя (электрического импульса) – это образование потенциала действия, то есть кратковременного изменения мембранного потенциала клетки при действии на него электрического импульса. Основная роль в возбуждении принадлежит потенциал-зависимым ионным каналам. Эти каналы представляют собой гликопротеины, входящие в состав клеточных мембран и способные при действии нервного (электрического) импульса избирательно

менять проницаемость мембраны для определенных ионов. Кроме потенциал-зависимых каналов, в мембране нейрона могут находиться также лиганд-зависимые каналы. Это такие каналы, в которых проницаемость для определенных ионов меняется при действии на мембрану специфических для них веществ (лигандов). Если канал изменяет свою проницаемость только при действии определенных веществ, он является селективным, в то время как в неселективных каналах проницаемость может меняться при действии целого ряда веществ.

Каждая нервная клетка в состоянии покоя поляризована. Между обеими сторонами её мембраны поддерживается разность электрических потенциалов – мембранный потенциал покоя, связанный с тем, что внутренность клетки заряжена отрицательно по отношению к наружной среде. Мембранный потенциал покоя обычно близок к -60 мВ. Уменьшение величины мембранного потенциала покоя называется деполяризацией, увеличение – гиперполяризацией, восстановление исходного значения – реполяризацией мембраны (рис. 3).

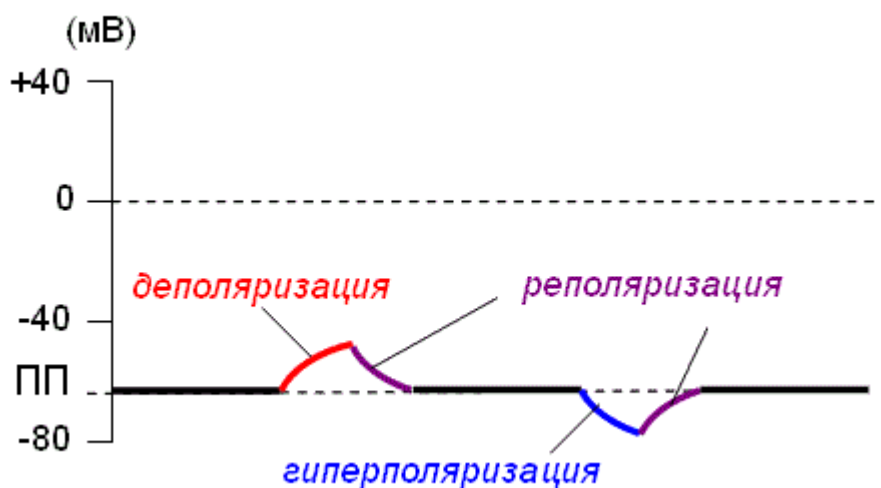


Рисунок 3 – Фазы мембранного потенциала.

Потенциал действия.

Раздражение нервной клетки под действием химического или электрического сигнала приводит к возникновению потенциала действия (рис. 4). Это означает, что потенциал покоя -60 мВ скачком изменяется на $+30$ мВ и спустя 1 мс принимает исходное значение.

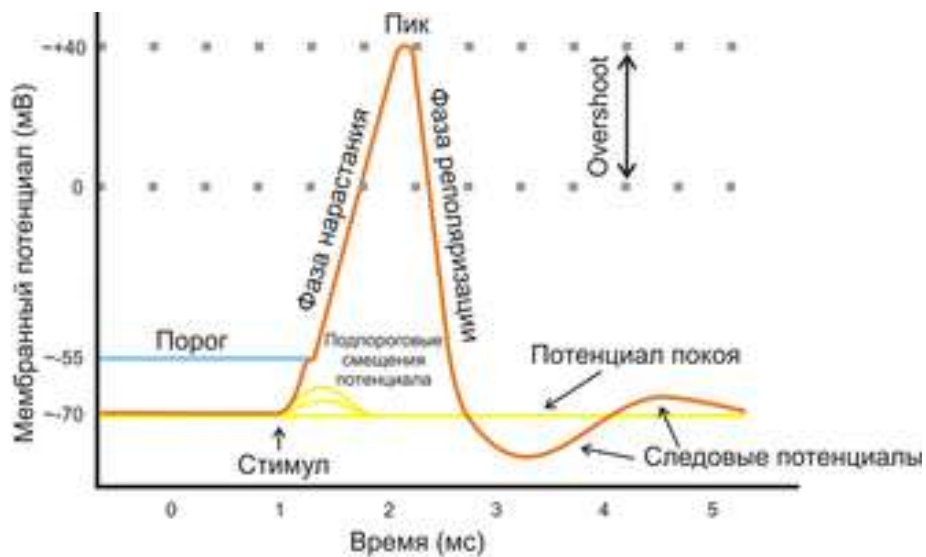


Рисунок 4 – Фазы потенциала действия.

В фазе деполяризации развитие потенциала действия возможно только при действии раздражителей, которые вызывают деполяризацию клеточной мембраны. При деполяризации клеточной мембраны до критического уровня деполяризации происходит лавинообразное открытие потенциалчувствительных Na^+ -каналов. Положительно заряженные ионы Na^+ входят в клетку по градиенту концентрации (натриевый ток), в результате чего мембранный потенциал очень быстро уменьшается до 0, а затем приобретает положительное значение.

В фазе быстрой и медленной реполяризации в результате деполяризации мембраны происходит открытие потенциалчувствительных K^+ -каналов. Положительно заряженные ионы K^+ выходят из клетки по

градиенту концентрации (калиевый ток), что приводит к восстановлению потенциала мембраны. В начале фазы интенсивность калиевого тока высока и реполяризация происходит быстро, к концу фазы интенсивность калиевого тока снижается и реполяризация замедляется.

Фаза гиперполяризации развивается за счет остаточного калиевого тока и за счет прямого электрогенного эффекта активировавшейся Na^+/K^+ насоса.

Овершут – период времени, в течение которого мембранный потенциал имеет положительное значение.

Пороговый потенциал – разность между мембранным потенциалом покоя и критическим уровнем деполяризации. Величина порогового потенциала определяет возбудимость клетки – чем больше пороговый потенциал, тем меньше возбудимость клетки.

Процесс потенциала действия начинается с открыванием Na^+ -канала. Ионы Na^+ устремляются в клетку (по градиенту концентрации), что вызывает локальное обращение знака мембранного потенциала. При этом Na^+ -каналы тотчас закрываются, т.е. поток ионов Na^+ в клетку длится очень короткое время. В связи с изменением мембранного потенциала открываются (на несколько мс) потенциал-управляемые K^+ - каналы и ионы K^+ устремляются в обратном направлении, из клетки. В результате мембранный потенциал принимает первоначальное значение, и даже превышает на короткое время потенциал покоя. После этого нервная клетка вновь становится возбудимой [18].

1.4 Пуринорецепторы, их классификация.

Контакт нейронов между собой и передача импульса с нервной на исполнительную клетку в большинстве случаев происходит при помощи химических веществ-передатчиков – нейромедиаторов. Они выделяются под

действием импульса из нервной клетки, достигают другой клетки и связываются на ее поверхности с особыми белковыми структурами – рецепторами. Благодаря этому и происходит передача информации.

В нервной системе роль нейромедиаторов играют в основном три вещества – ацетилхолин и норадреналин и аденозинтрифосфорная кислота (АТФ).

Нервы выделяющие АТФ называют пуринергическими, а рецепторы, на которые действует АТФ – пуринорецепторами.

Рецепторы АТФ представляют собой большие белковые молекулы и обозначаются как P2-рецепторы. Их можно разделить на два семейства: ионотропные (P2X) и метаботропные (P2Y), которые включают многочисленные подсемейства [3].

Ионотропные рецепторы представляют собой мембранные лиганд-зависимые каналы (рис. 5). При связывании рецептора с нейромедиатором происходит конформация и открытие канала.

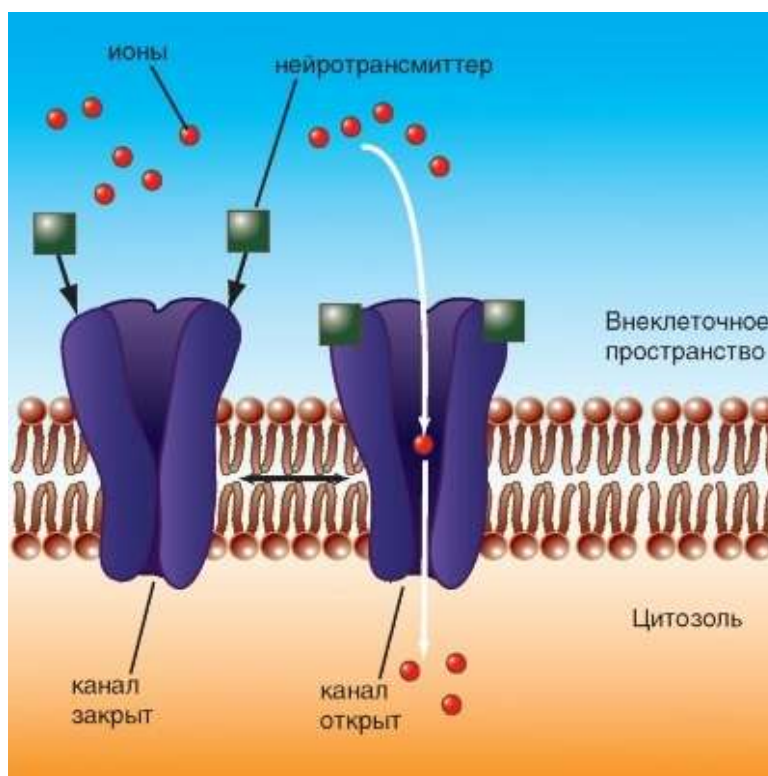


Рисунок 5 – Ионотропный рецептор.

В структуре P2X есть «посадочная площадка» для АТФ и ионный канал – миниатюрное отверстие для протекающих через мембрану ионов. P2X-рецептор представляет собой длинную цепь последовательно связанных аминокислот (рис. 6). Эта цепь образует большую петлю снаружи клетки, обоими концами цепи проходит насквозь мембрану так, что оба конечных фрагмента цепи находятся внутри клетки.

Возбуждение P2X-рецепторов приводит к открытию в мембране каналов, пропускающих ряд ионов (натрий, калий, кальций), в результате чего изменяется электрический заряд на мембране. Именно это вызывает ответ клетки.

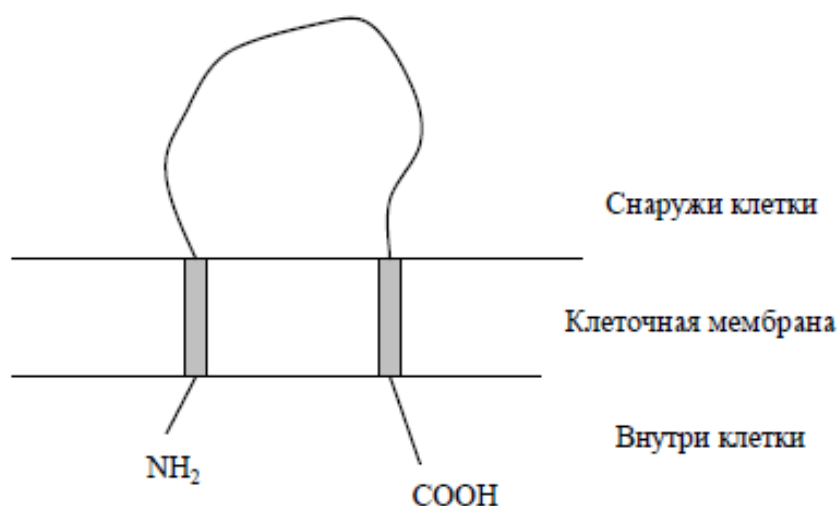


Рисунок 6 – Схематическая структура P2X-рецептора.

Молекулы P2Y-рецептора проходят насквозь мембрану клетки семь раз, образуя по три небольшие петли снаружи и изнутри клетки (рис. 7).

Рецепторы этого вида часто вообще не имеют отношения к ионным каналам. Они через внутриклеточный G-белок инициируют образование мелких активных молекул, меняющих клеточный обмен. В этой цепочке в большинстве случаев первый фермент – фосфолипаза C. Она расщепляет фосфолипиды клеточной мембраны до активных производных. Вторым ферментом – протеинкиназа C, фосфорилирующая белки-мишени. В результате этих последовательных реакций обеспечивается ответная реакция клетки.

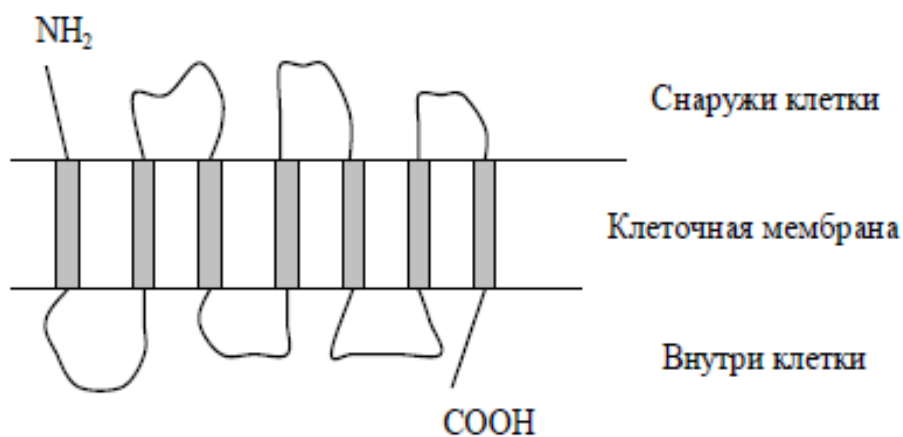


Рисунок 7 – Схематическая структура P2Y-рецептора.

Для активации рецепторов обоих типов достаточно концентрации внеклеточного АТФ, в 1000 раз меньшей той, которая внутри самой клетки. P2X- и P2Y-рецепторы широко представлены в органах и тканях млекопитающих, в том числе и человека [7, 8].

1.5 Пуринорецептор P2X7.

P2X рецепторы, представленные подъединицами P2X1-7, являются семейством лиганд-зависимых рецепторов, которые активируются внеклеточной АТФ. Наиболее крупной молекулой из этого семейства обладают P2X7-рецепторы. Они образуют большую (до 4 нм) пору в мембране клетки, проходимость для веществ (рис. 8). Активация рецептора внеклеточной АТФ способствует открытию пор на долгое время, пока агонист находится в связи с рецептором без развития десенситизации. Под десенситилизованным состоянием понимается обратимая потеря рецепторами способности нормально функционировать в результате продолжительного действия агониста. Предполагается, что рецептор переходит в особое состояние, в котором он теряет способность служить лиганд-зависимым каналом. Размещение одного или двух АТФ-связывающих участков способствует медленному переходу рецептора в десенситилизованное (уменьшение чувствительности к воздействию агониста) состояние, а размещение третьего участка способствует к переходу в сенситилизованное (повышение чувствительности к воздействию агониста) состояние. Таким образом, подтип рецепторов P2X7, кроме открытия неселективных ионных каналов, могут открывать и большие ионные поры во время длительного действия агониста.

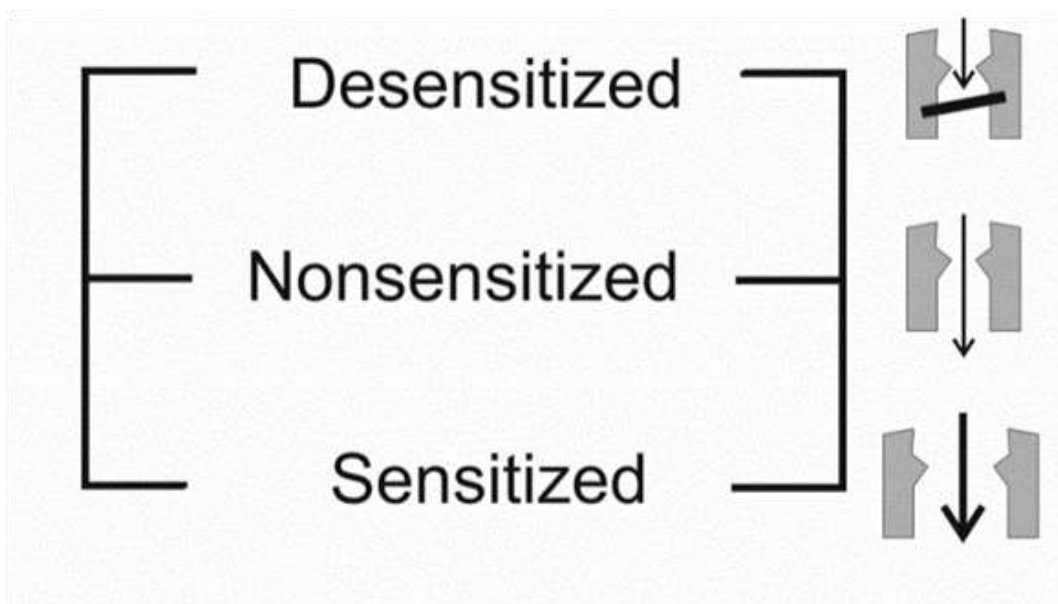


Рисунок 8 – Возможные состояния рецептора P2X7.

У P2X7 рецепторов имеются три возможных состояний:

- Десенсибилизация;
- Открытое состояние;
- Сенсibilизация;

P2X7 рецепторы в основном выражены в иммунных и глиальных клетках. Внеклеточный АТФ регулирует различные клеточные реакции во многих типах клеток, взаимодействуя с рецепторами P2X. В зависимости от клеточного содержания активация P2X7-рецепторов вызывает разнообразные физиологические процессы, в том числе нейротрансмиссию, мышечное сокращение, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток крови. В данное время широко обсуждается физиологическая роль рецепторов в иммунологических реакциях организма. Основные механизмы функционирования рецептора P2X7 могут помочь в разработке новых лекарств в нейродегенеративных заболеваниях или хронической боли [6, 9].

1.6 Электрофизиологический эксперимент.

В клетки-мишени, которые находятся в чашке Петри с физиологическим раствором, помещают пуринорецептор (рис. 9). Зафиксировав напряжение на кончике микропипетки на уровне примерно -70 мВ, через цилиндрическую трубочку подают АТФ на рецептор (рис. 10). Фиксация напряжения – технически самый сложный метод, но также самый мощный с точки зрения исследования различных токов, изменяющих разность потенциалов по обе стороны мембраны. Для написания модели, описывающей кинетическую схему рецептора, кроме величин констант скоростей реакций необходимо также знать, как именно меняется концентрация агониста во времени и пространстве в окрестностях рецептора. В случае, когда агонист подаётся к клетке по системе быстрой перфузии, концентрация подаваемого агониста известна и практически одинакова во всех точках вокруг исследуемой клетки, временной же ход ее изменения можно непосредственно измерить. Для этого необходимо подвести микропипетку к клетке (не создавая контакта), зафиксировать напряжение на сопротивлении кончика пипетки на уровне нескольких мВ и вместо агониста подать по системе быстрой перфузии дистиллированную воду. Так как электрическое сопротивление воды много выше сопротивления физиологического раствора, возникнет скачок тока, форма которого будет соответствовать ходу изменения концентрации агониста около клетки при его подаче по этой же системе быстрой перфузии [19, 20].

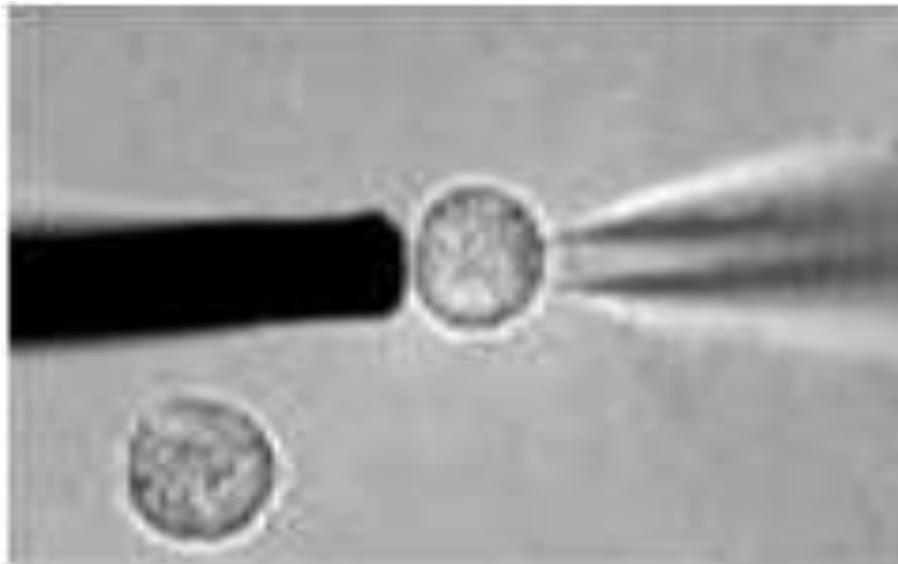


Рисунок 9 – Экспериментальный рабочий объект.

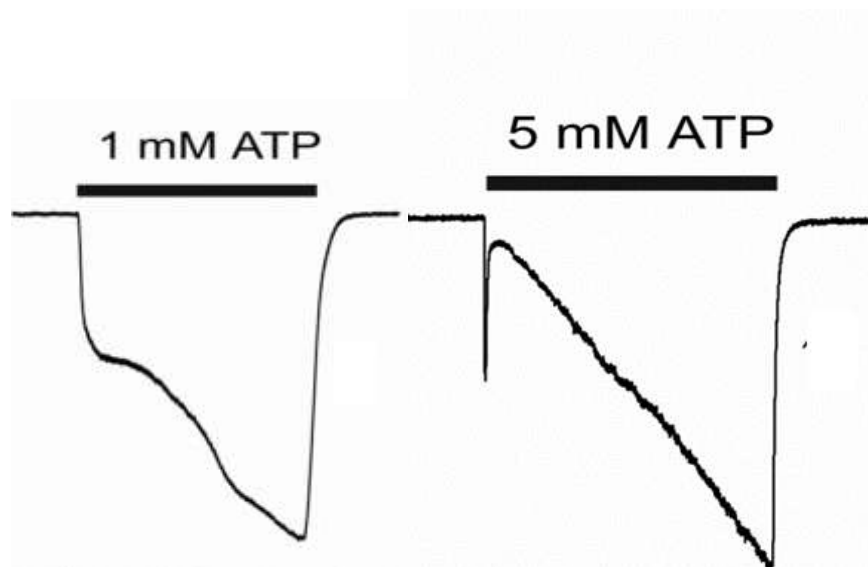


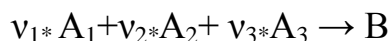
Рисунок 10 – Графики токовых ответов рецептора при разных концентрациях АТФ.

ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

2.1 Компьютерное моделирование.

Для изучения процессов ионного трансмембранного переноса на мембране и законов образования поры, через которую ионы проникают внутрь клетки, была создана модельная система. Использование метода компьютерного моделирования позволяет изучить экспериментально все процессы, использовать хорошо разработанное наукой физическое описание.

Моделирование основано на решении дифференциальных уравнений, в основе которых лежит закон действующих масс. Формулировка закона действующих масс такова: скорость химической реакции в каждый момент времени пропорциональна концентрациям реагентов, возведённым в некоторые степени. Реагентами называют исходные вещества, молекулы которых вступают в реакцию и превращаются в иные молекулы, называемые продуктами реакции. Для элементарной химической реакции:



закон действующих масс может быть записан в виде кинетического уравнения вида:

$$v = k \cdot [A_1]^{v_1} \cdot [A_2]^{v_2} \cdot [A_3]^{v_3},$$

где v – скорость химической реакции, k – константа скорости реакции, $[A_i]$ – концентрация вещества A_i . Важным понятием является скорость химической реакции. Эта величина определяет, как изменяется концентрация компонентов реакции с течением времени.

Для сложных реакций в общем виде это соотношение не выполняется. Тем не менее, многие сложные реакции условно можно рассматривать как ряд последовательных элементарных стадий с неустойчивыми промежуточными продуктами, формально эквивалентный переходу из

начального состояния в конечное в «один шаг». Такие реакции называют формально простыми. Для формально простых реакций кинетическое уравнение может быть получено в виде:

$$v = k_*[A_1]^{n_1} * [A_2]^{n_2} * [A_3]^{n_3}$$

(для трех исходных веществ, аналогично приведённому выше уравнению). Здесь n_1, n_2, n_3 – порядок реакции по веществам A_1, A_2, A_3 соответственно, а сумма $n = n_1 + n_2 + n_3$ – общий порядок реакции. В большинстве известных биохимических реакций порядок реакции по каждому веществу равен единице.

Система дифференциальных уравнений решается с использованием одношагового метода Рунге – Кутты. При использовании этого метода производная вычисляется в $q+1$ точке, но все эти точки принадлежат промежутку $[x_{i-1}, x_i]$. При этом очередная точка вычисляется по формулам:

$$x_i = x_{i-1} + h,$$

$$y_{j,i} = y_{j,(i-1)} + \sum_{k=1}^{q+1} \omega_k * F_{jk},$$

$$F_{j,1} = h * F_j(x_{i-1}, y_{j,(i-1)}),$$

$$F_{j,2} = h * F_j(x_{i-1} + c_2 * h, y_{j,(i-1)} + a_{2,1} * F_{j,1}),$$

...

$$F_{j,q+1} = h * F_j(x_{i-1} + c_{q+1} * h, y_{j,(i-1)} + a_{q+1,1} * F_{j,1} + a_{q+1,2} * F_{j,2} + \dots + a_{q+1,q} * F_{j,q}).$$

Коэффициенты $\omega_k, c_k, a_{k,m}$ определяются из требования, чтобы погрешность метода имела возможно более высокий порядок малости в сравнении с шагом h . Конкретные значения коэффициентов для разных вариантов метода Рунге-Кутты можно найти в справочниках, погрешность их вычислений пропорциональна h^{q+1} .

Система дифференциальных уравнений, на которых основана модель для данного эксперимента:

$$\frac{ds}{dt} = n_1 \cdot as + d_1 \cdot r - m_1 \cdot s - r_1 \cdot s;$$

$$\frac{das}{dt} = m_1 \cdot s + n_2 \cdot a_2 s_0 + d_2 \cdot ar - m_2 \cdot as \cdot a(t) - r_2 \cdot as - n_1 \cdot as;$$

$$\frac{da_2 s_0}{dt} = m_2 \cdot as \cdot a(t) + n_3 \cdot a_3 s_0 + d_3 \cdot a_2 o - n_2 \cdot a_2 s_0 - m_3 \cdot a_2 s_0 \cdot a(t) - r_3 \cdot a_2 s_0;$$

$$\frac{da_3 s_0}{dt} = m_3 \cdot a_2 s_0 \cdot a(t) + d_4 \cdot a_3 o - r_3 \cdot a_3 s_0 - r_4 \cdot a_3 s_0;$$

$$\frac{dr}{dt} = r_1 \cdot s + l_1 \cdot ar + c_1 \cdot d - d_1 \cdot r - k_1 \cdot r - b_1 \cdot r;$$

$$\frac{dar}{dt} = k_1 \cdot r + r_2 \cdot as + l_2 \cdot a_2 o + c_2 \cdot ad - d_2 \cdot ar - k_2 \cdot ar \cdot a(t) - b_2 \cdot ar - l_1 \cdot ar;$$

$$\frac{da_2 o}{dt} = r_3 \cdot a_2 s_0 + l_3 \cdot a_3 o + c_3 \cdot a_2 d + k_2 \cdot ar \cdot a(t) - d_3 \cdot a_2 o - k_3 \cdot a_2 o \cdot a(t) - b_3 \cdot a_2 o - l_2 \cdot a_2 o;$$

$$\frac{da_3 o}{dt} = r_4 \cdot a_3 s_0 + c_4 \cdot a_3 d + k_3 \cdot a_2 o \cdot a(t) - d_4 \cdot a_3 o - b_4 \cdot a_3 o - l_3 \cdot a_3 o;$$

$$\frac{dad}{dt} = b_2 \cdot ar + s_2 \cdot a_2 d + p_1 \cdot d - s_1 \cdot ad - c_2 \cdot ad - p_2 \cdot ad \cdot a(t);$$

$$\frac{da_2 d}{dt} = p_2 \cdot ad \cdot a(t) + b_3 \cdot a_2 o + s_3 \cdot a_3 d - s_2 \cdot a_2 d - c_3 \cdot a_2 d - p_3 \cdot a_2 d \cdot a(t);$$

$$\frac{da_3 d}{dt} = b_4 \cdot a_3 o + p_3 \cdot a_2 d \cdot a(t) - c_4 \cdot a_3 d - s_3 \cdot a_3 d;$$

Различные электрические сигналы, сгенерированные нервными клетками, возникают в результате изменения токов, протекающих через мембрану клетки. С помощью метода фиксации напряжения (поддерживая мембранный потенциал на любом заданном уровне, измеряем ток, протекающий через мембрану при этом потенциале) можно рассчитать трансмембранный ток по следующему уравнению:

$$I(t) = N \cdot \sigma (V - V_{eq}) \cdot P_{open}(t), \quad (1)$$

где V – мембранный потенциал, V_{eq} – равновесный потенциал (определяется экспериментально для каждого типа каналов), N – общее количество каналов на мембране, $P_{open}(t)$ является вероятностью существования всех открытых состояний в момент времени t , σ – проводимость одиночного канала. Поскольку невозможно точно определить число каналов на мембране (N), мы не можем сравнивать амплитуды тока и модельного сигнала (вероятности открытого состояния канала). Но если V , V_{eq} , N и σ – константы (а это так в описанных выше экспериментальных условиях), тогда ток пропорционален вероятности открытого состояния канала. В этом случае форма трансмембранного тока во всех условиях может быть рассчитана путем анализа $P_{open}(t)$. $P_{open}(t)$ можно рассчитать по формуле:

$$P_{open}(t) = P_{A2R}(t) + P_{A3R}(t) + 3 \cdot (P_{A2S}(t) + P_{A3S}(t)), \quad (2)$$

где $P_{A2R}(t)$, $P_{A3R}(t)$, $P_{A2S}(t)$, $P_{A3S}(t)$ являются вероятностями двойных связанных не сенсibilизированных, тройных связанных не сенсibilизированных, двойных связанных сенсibilизированных и тройных связанных сенсibilизированных открытых состояний соответственно. Эта модель позволяет учитывать вклады чувствительных и нечувствительных состояний в общий ток.

Уравнение (1) по своему смыслу это просто закон Ома. Он позволяет связать экспериментально измеренный ток и вычисленную при моделировании вероятность нахождения каналов в открытом состоянии. Мы не можем напрямую сравнивать амплитуды экспериментального и модельного сигналов, но мы можем сравнивать временные характеристики сигналов (которые от амплитуд не зависят) и мы можем сравнивать изменения амплитуд в ходе воздействия в эксперименте и модели. То есть модель может показать, какие изменения в кинетике взаимодействий приводят к экспериментально наблюдаемым изменениям токовых ответов.

2.2 Выполнение эксперимента.

Мы исследовали изменение свойств рецептора P2X7 при замене фенилаланина в позиции 288 на серин. С помощью компьютерного моделирования была проведена простая мутация P2X7 рецептора. Задача состояла в том, чтобы меня константы скоростей реакций добиться функционирования модели, соответствующего указанной выше мутации рецептора. Необходимо было пронаблюдать изменение времени спада тока при изменении концентрации и времени подачи агониста.

На рисунке 11 представлена гомологическая модель P2X7 рецептора и сама мутация. Одна субъединица P2X7 связывается с молекулой АТФ (выделено в виде сферы).

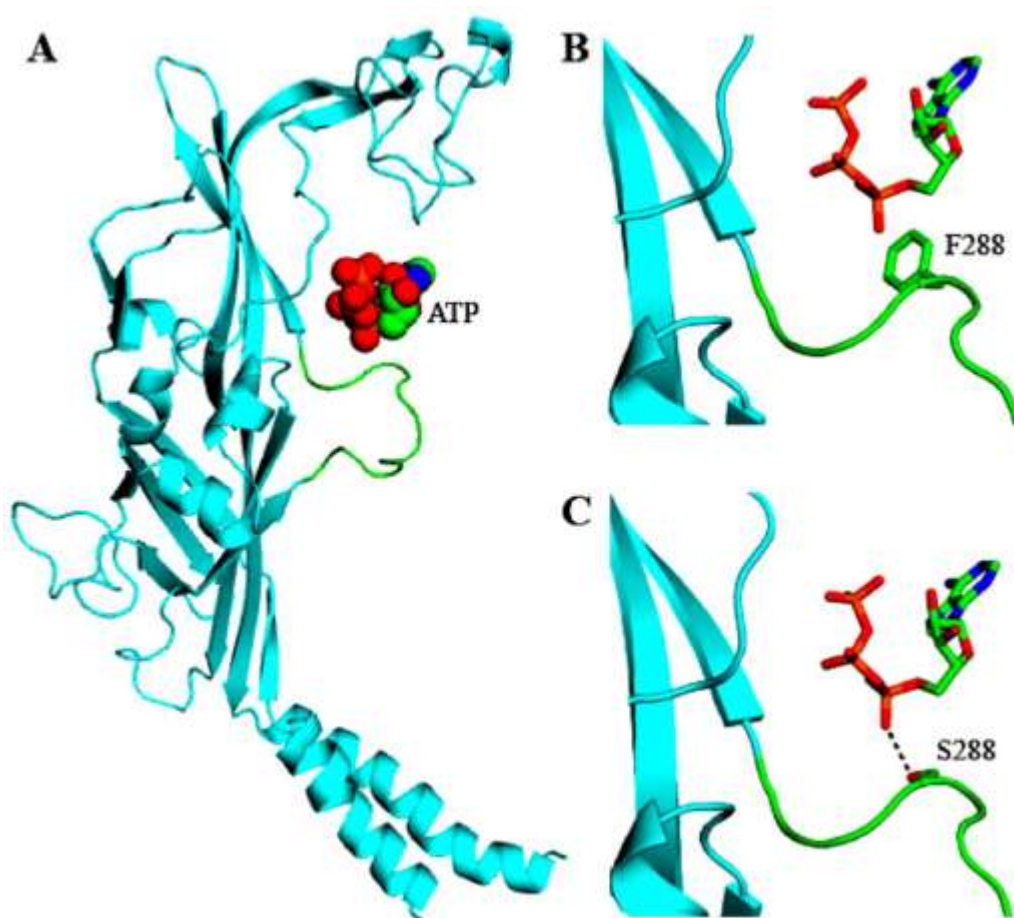


Рисунок 11 – Гомологическая модель P2X7 рецептора.

Справа показаны связывающие карманы с АТФ молекулы в WT (сверху) и F288S мутанта (внизу). Вновь созданная Н-связь между молекулами АТФ и S288 боковой цепи обозначена пунктирной линией.

Загружая файл, в котором были данные нативного рецептора P2X7 (рис. 12), мы можем наблюдать все параметры трансмембранного тока: амплитуда (Amp), постоянная времени спада (τ_1).

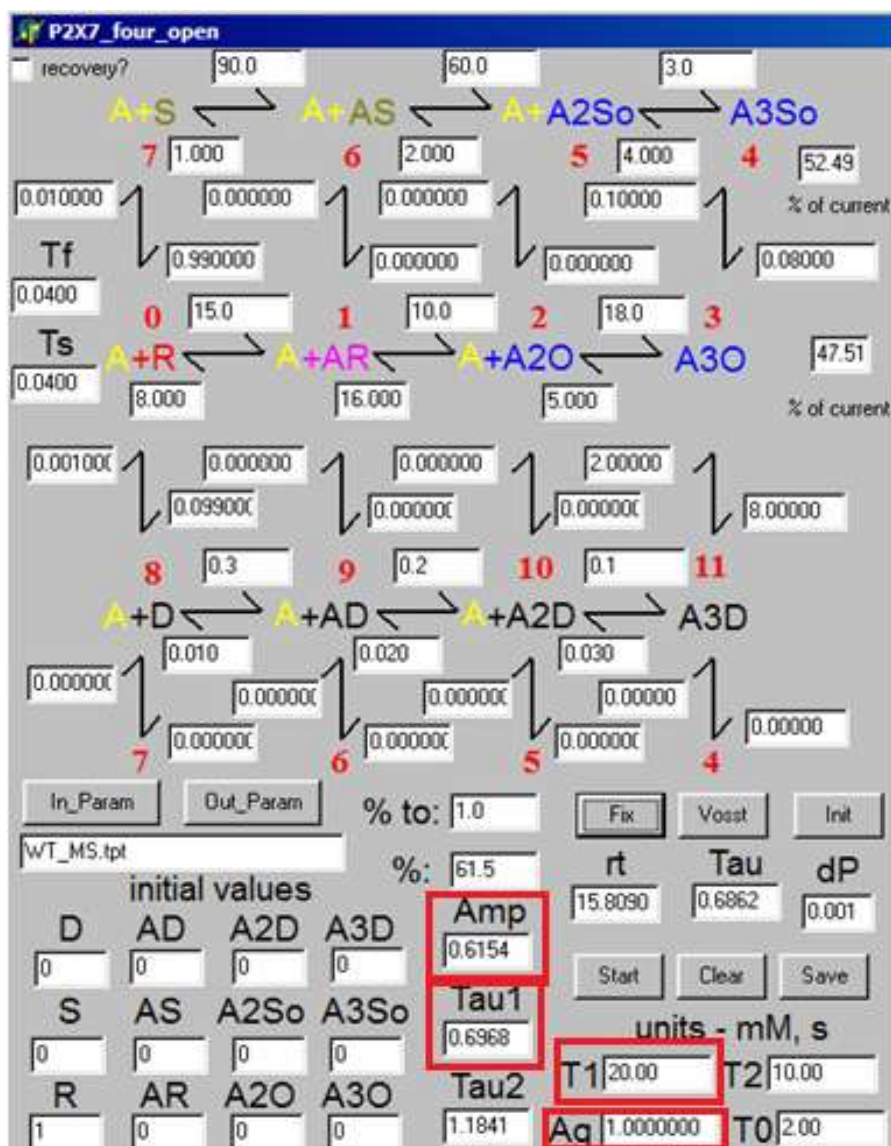


Рисунок 12 – Параметры, полученные при времени подачи агониста 20 с, с концентрацией агониста 1 мМ: Amp = 0.6154, tau1 = 0.6968 с.

На рисунке 12 также представлена цепочка химических реакций при взаимодействии рецептора с агонистом и соответствующие скорости химической реакции.

Цепочка $A+S \leftrightarrow A+AS \leftrightarrow A+A_2S_0 \leftrightarrow A_3S_0$ показывает, что при двойном взаимодействии агониста с рецептором, рецептор P2X7 переходит в сенсibilизированное состояние (повышенная чувствительность к действию агониста).

Вторая цепочка $A+R \leftrightarrow A+AR \leftrightarrow A+A_2O \leftrightarrow A_3O$ показывает, что при двойном действии агониста с рецептором, рецептор может перейти в открытое состояние.

Третья цепочка $A+D \leftrightarrow A+AD \leftrightarrow A+A_2D \leftrightarrow A_3D$ показывает, что при взаимодействии рецептора с агонистом, рецептор может перейти в десенсibilизированное состояние (уменьшение чувствительности рецептора на действие агониста).

Эксперимент начинали с задания времени подачи агониста 2 секунды и амплитуды мМ и измеряли постоянную времени спада нативного рецептора P2X7 и мутированного рецептора. Далее, изменив время подачи агониста на 20 секунд, измерили постоянную времени спада при концентрации 1 мМ и 5 мМ для нативного и мутированного рецептора P2X7. Построив график зависимости от количества открытых каналов от времени, мы смогли пронаблюдать, как изменились свойства нативного и мутированного рецептора P2X7.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

В ходе эксперимента были получены графики зависимости количества открытых каналов от времени. Графики были обработаны в программе Origin61.

При концентрации агониста 1 мМ и времени подачи агониста 2 с были получены значения константы времени спада для нативного рецептора P2X7 (WT) и мутированного рецептора (F288S). Для WT $\tau_1 = 0.73$ с, а для F288S $\tau_1 = 2.62$ с. Токовые ответы, вызываемые концентрацией АТФ 1 мМ в нативном и мутированном рецепторе, были очень похожи (рис. 13. 14).

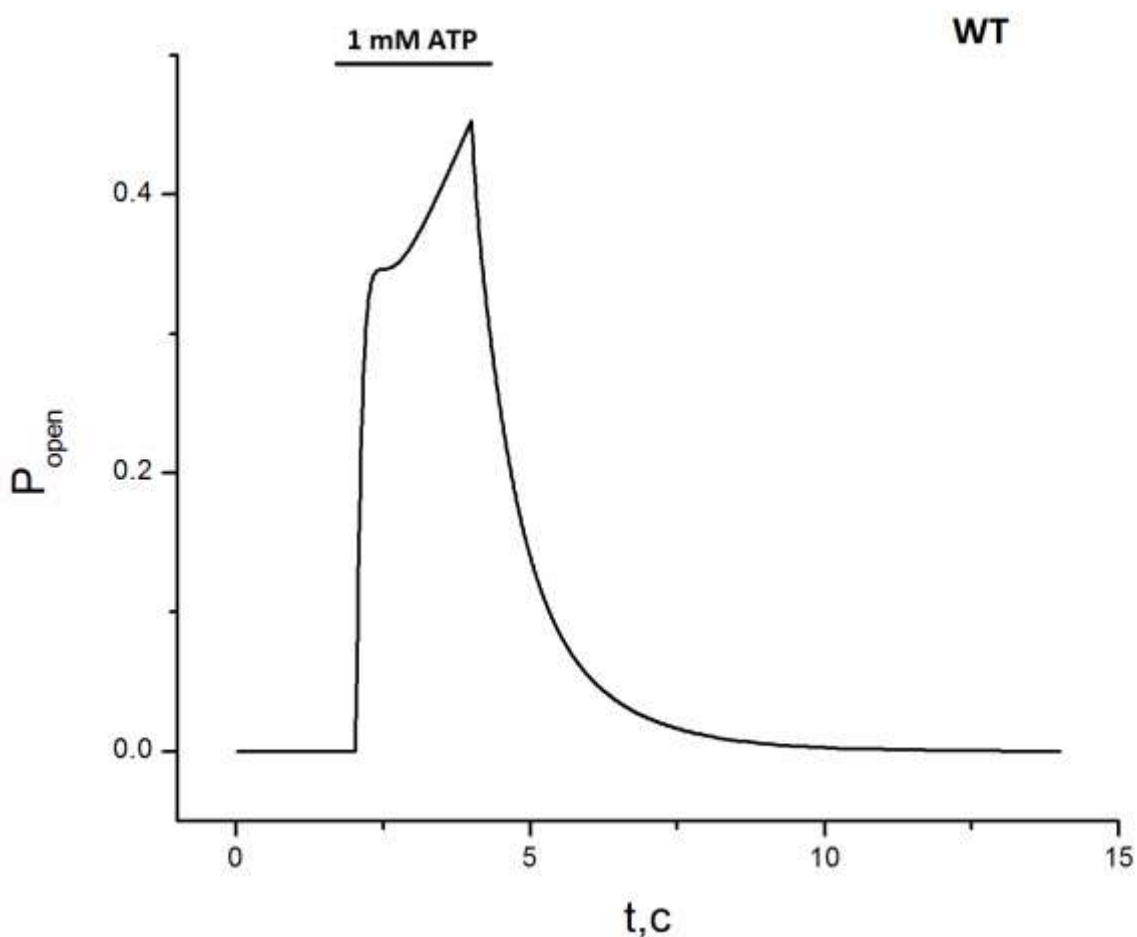


Рисунок 13 – График зависимости количества открытых каналов от времени для рецептора P2X7 при времени подачи агониста на рецептор 20 с и при концентрации агониста 1 мМ.

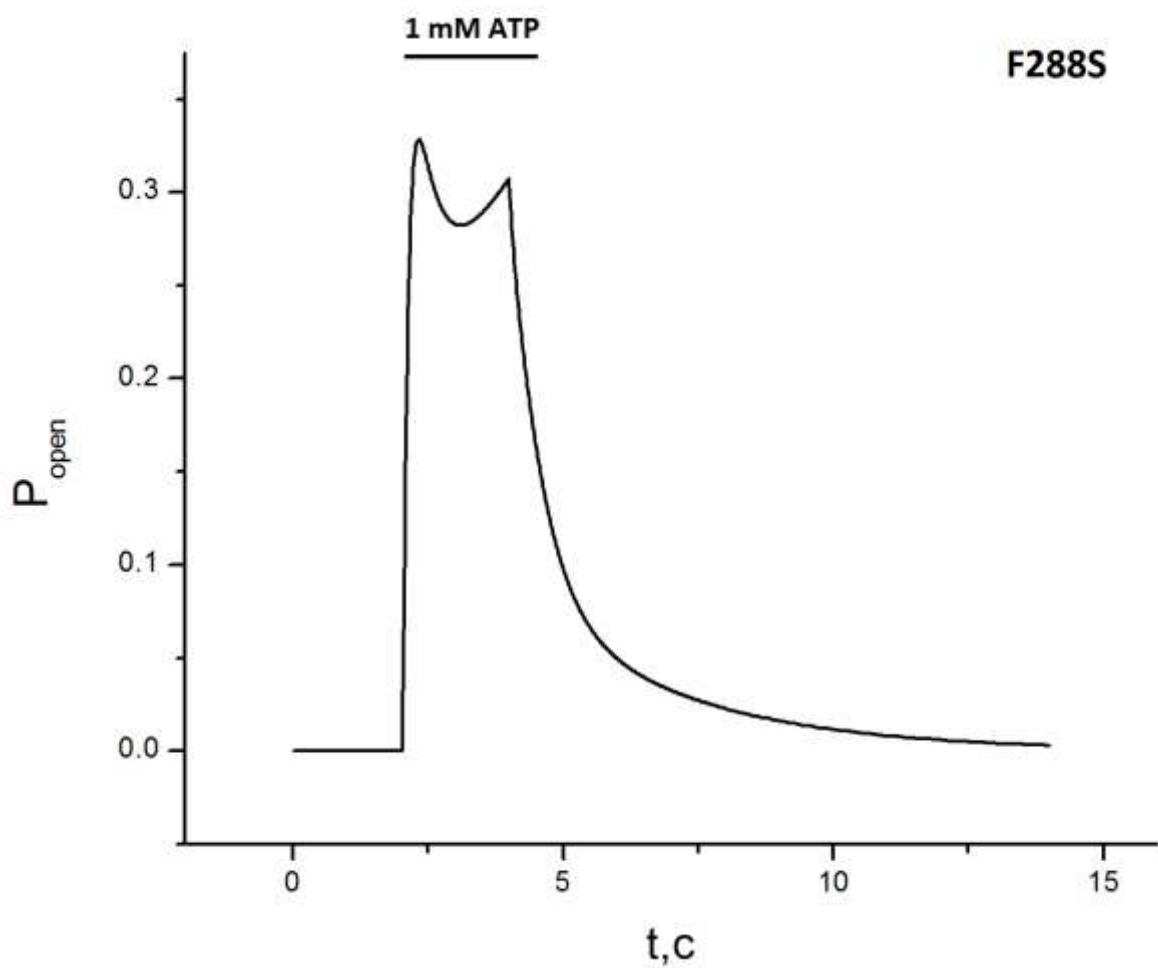


Рисунок 14 – График зависимости количества открытых каналов от времени для мутированного рецептора P2X7 при времени подачи агониста на рецептор 20 с и при концентрации агониста 1 мМ.

Далее сравнивали, как изменится τ_{1} при подаче агониста на 20 с и концентрации агониста 1 мМ. Оказалось что время спада для WT $\tau_{1} = 0.69$ с, для F288S $\tau_{1} = 1.97$ с. Графически разницу можно увидеть на рисунках 15, 16.

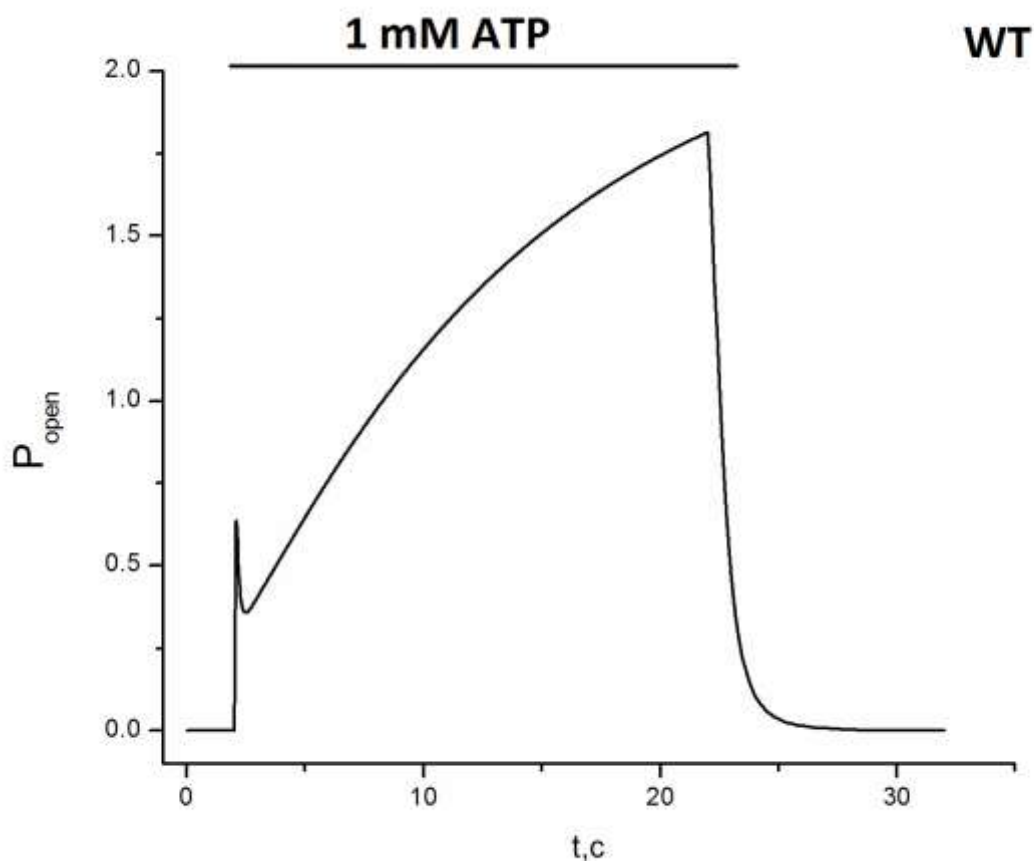


Рисунок 15 – График зависимости количества открытых каналов от времени для рецептора P2X7 при времени подачи агониста на рецептор 20 с и при концентрации агониста 1 мМ.

При коротких импульсах (2 с) мы наблюдали минимизированное открытие пор, а длительные импульсы (20 с) способствовали открытию пор.

Длительное применение (20 с) АТФ с концентрацией 1 мМ на рецептор P2X7 WT вызвало первоначальный быстрый рост тока, за которым следует вторичный пик (Рис.15). Этот вторичный пик связан с открытием больших пор на мембране. Эта вторичная реакция отсутствовала в мутированном рецепторе F288S, активированном АТФ 1 мМ (Рис.16). Спад тока при окончании действия агониста в мутированном рецепторе F288S ($\tau_1=2.62$ с) в 3 раза медленней чем в WT ($\tau_1=0.73$ с). Отсутствие

вторичного пика в мутированном рецепторе P2X7 означает, что у этого мутанта отсутствует механизм открытия пор или имеет низкую вероятность открытия пор. Чтобы узнать точнее, выполнили дополнительный эксперимент с более высокой концентрацией АТФ.

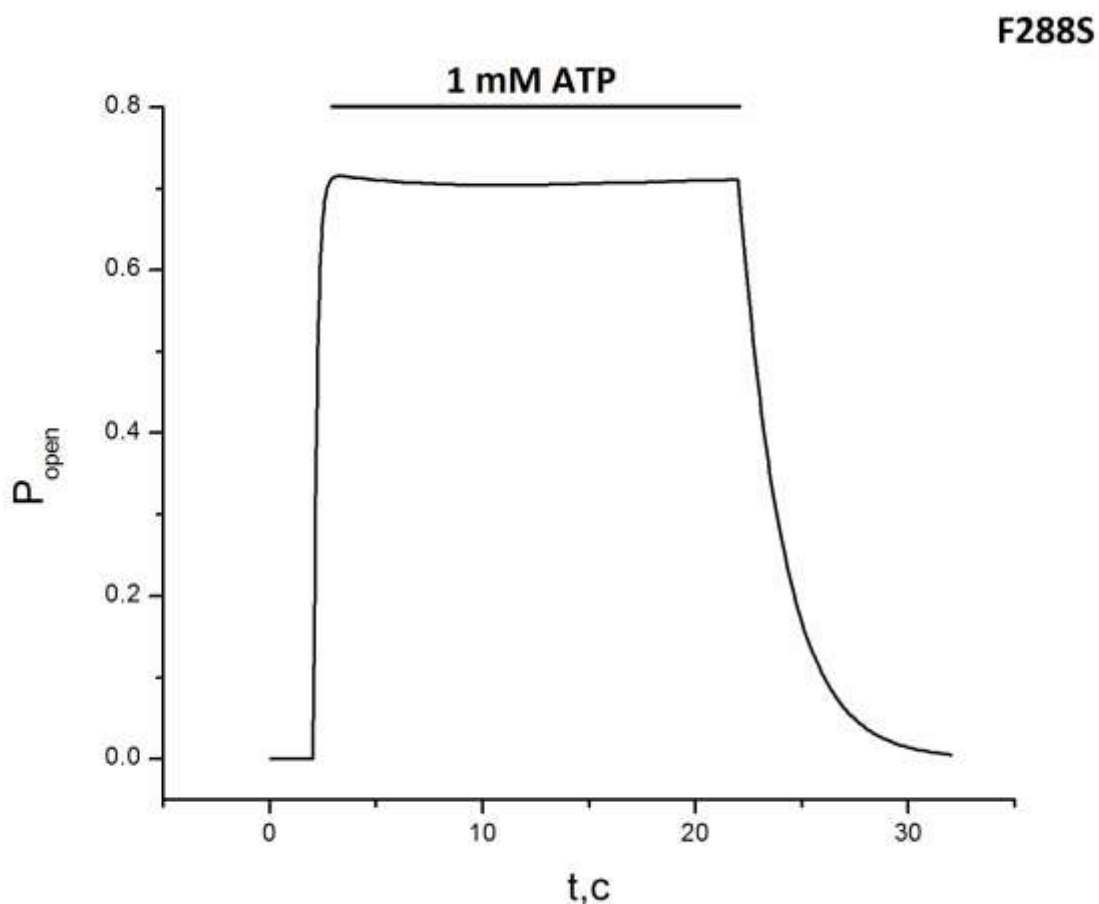


Рисунок 16 – График зависимости количества открытых каналов от времени для мутантного рецептора F288S при времени подачи агониста на рецептор 20с и при концентрации агониста 1 mM.

При времени подачи агониста 20 с и концентрации агониста 5 mM было получено, что время спада $\tau_1 = 0.77$ с для нативного рецептора P2X7 (WT), а

для рецептора после мутации (F288S) $\tau_1 = 1.98$ с. Графически разницу можно увидеть на рисунках 17 и 18.

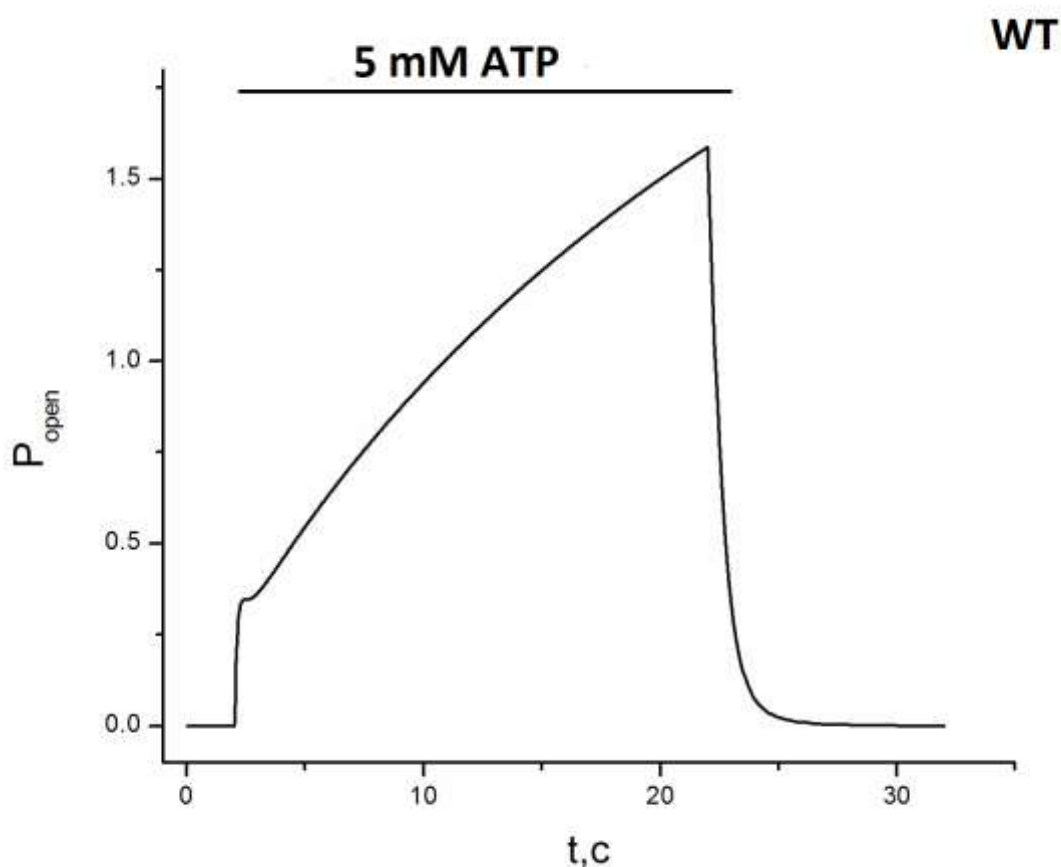


Рисунок 17 – График зависимости количества открытых каналов от времени для рецептора P2X7 при времени подачи агониста на рецептор 20 с и при концентрации агониста 5 мМ.

Применение АТФ с концентрацией 5 мМ в течение 20 с на нативном рецепторе P2X7 показало сложную реакцию с начальным пиком тока, затем быстрым снижением тока с последующим медленным ростом вторичного пика (рис. 17). Это объясняется первоначальной десенсibilизацией после «нормального» открытия каналов с последующим открытием больших пор. В мутантном рецепторе наблюдалось похожая последовательность действий, но с меньшим открытием пор (рис. 18).

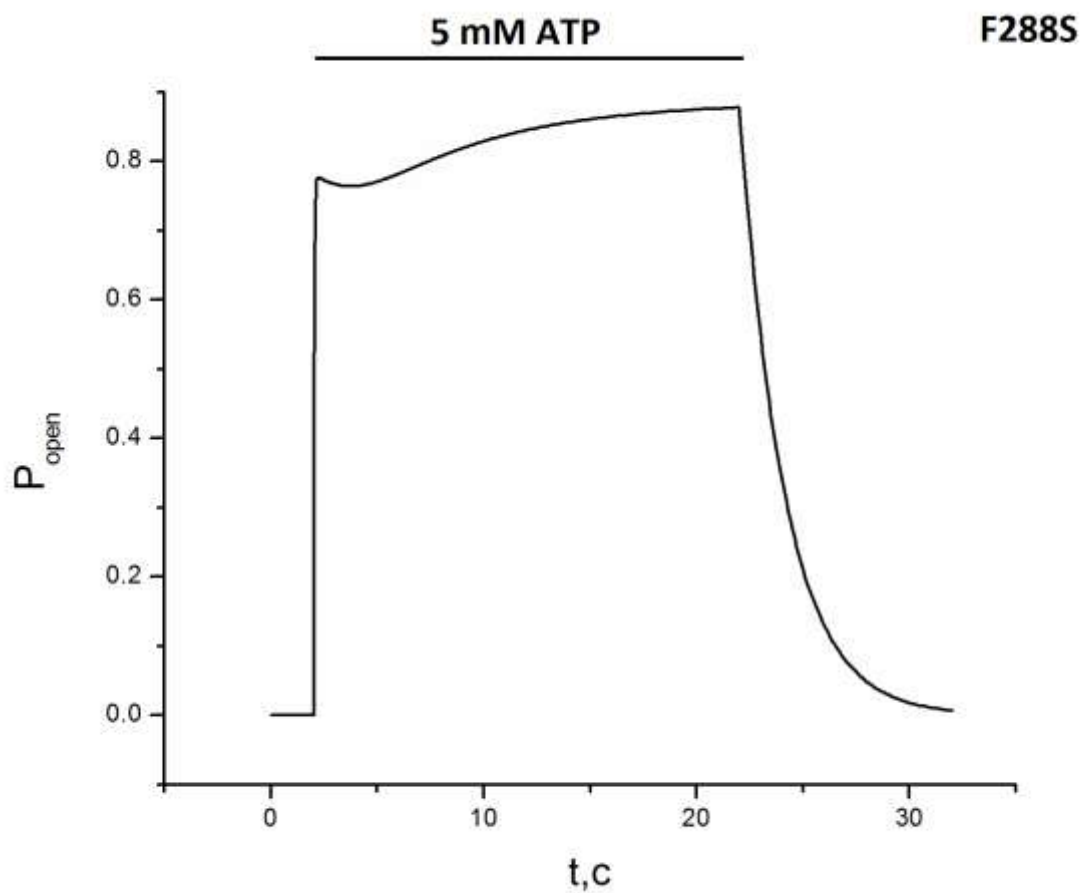


Рисунок 18. График зависимости количества открытых каналов от времени для мутантного рецептора F288S при времени подачи агониста на рецептор 20с и при концентрации агониста 5 мМ.

Основные численные результаты модельного эксперимента приведены в таблице 1.

| Параметры | WT | F288S |
|----------------------------|----------------------|----------------------|
| $T_1 = 2$ с $Ag = 1$ мМ | $\tau_{01} = 0.73$ с | $\tau_{01} = 2.62$ с |

| | | |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| $T_1 = 20 \text{ с}$ $A_g = 1 \text{ мМ}$ | $\tau_{0.69} = 0.69 \text{ с}$ | $\tau_{0.97} = 1.97 \text{ с}$ |
| $T_1 = 20 \text{ с}$ $A_g = 5 \text{ мМ}$ | $\tau_{0.77} = 0.77 \text{ с}$ | $\tau_{0.98} = 1.98 \text{ с}$ |
| $T_1 = 20 \text{ с}$ | $EC_{50} = 1.23 \text{ мМ}$ | $EC_{50} = 1.59 \text{ мМ}$ |

Таблица 1 – Результаты модельного эксперимента.

Ниже приведены кинетические схемы переходов рецепторов в различные состояния, на которых видны измененные константы скоростей в ходе мутации.

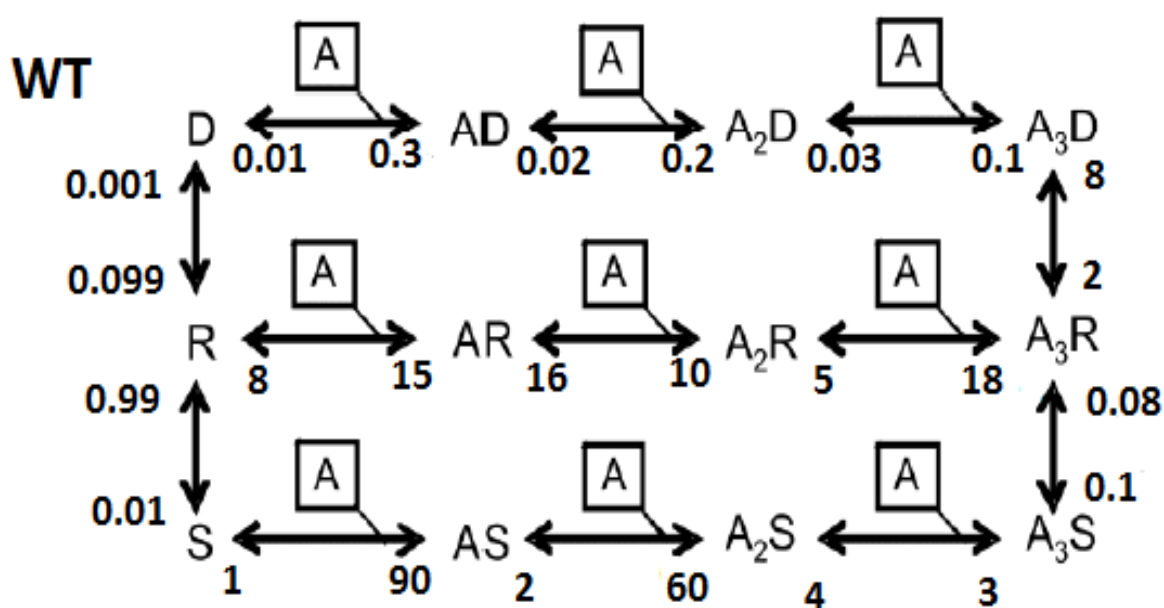


Рисунок 19 – Кинетическая схема переходов нативного рецептора в различные состояния.

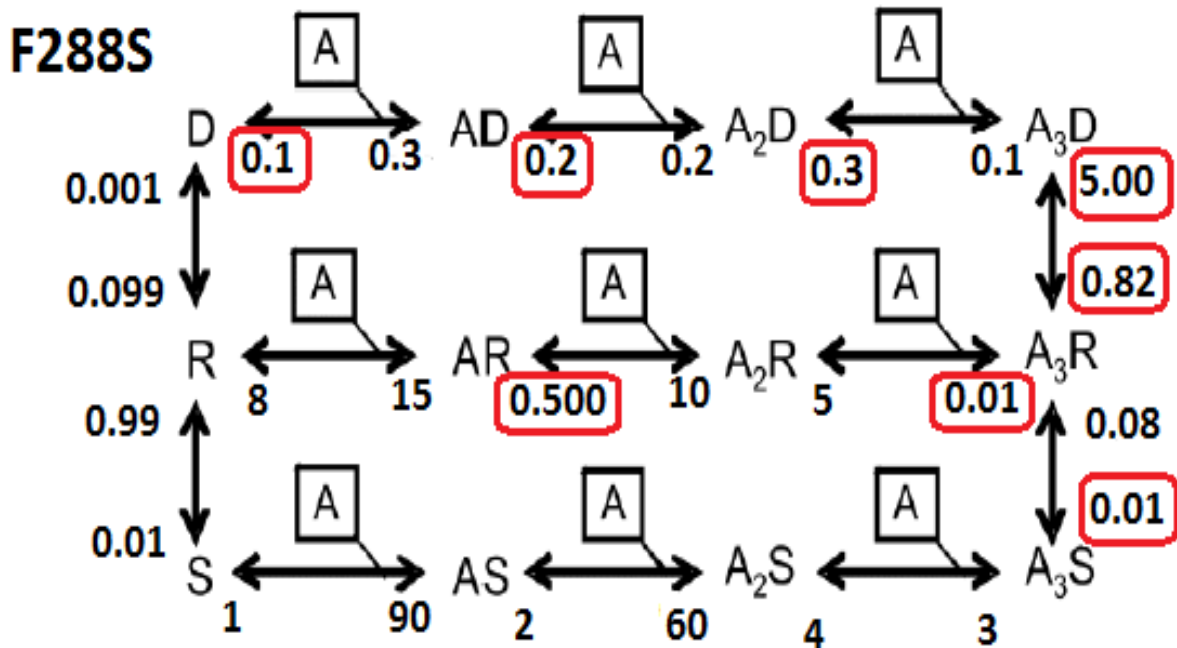


Рисунок 20 – Кинетическая схема переходов мутированного рецептора в различные состояния.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структура рецептора P2X7 позволяет открывать большие ионные поры в дополнение к обычному открытию каналов при длительной активации высокой концентрацией агониста. Сейчас широко обсуждается физиологическая роль открытия пор рецептором P2X7 в модуляции иммунологических реакций. Основанием для этого исследования послужил тот факт, что все P2X рецепторы имеют серин в 288 позиции своей первичной структуры, только рецептор подтипа P2X7 имеет в этом месте фенилаланин. По итогам проделанной работы можно говорить о различной кинетике рецептора P2X7 и мутированного рецептора P2X7 (с заменой фенилаланина в 288 позиции на обычный для P2X серин) и о роли отдельных аминокислот в процессе открытия пор. Механизмы функционирования рецептора P2X7, выявленные в данном исследовании, могут помочь в разработке новых лекарств, применимых при нейродегенеративных заболеваниях или хронической боли, где общепризнанной является роль P2X7 рецепторов.

ВЫВОДЫ

1. Была построена математическая модель для структурно-функционального исследования пуринорецептора P2X7 и произведена «замена» фенилаланина на серин в модельном пуринорецепторе P2X7.
2. Исследование показало, что одним из основных свойств F288S мутированного рецептора является снижение вероятности открытия больших пор. Следовательно, находящийся на 288 позиции в нативном рецепторе P2X7 фенилаланин играет важную роль в механизме открытия большой поры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Болдырева А.А. Биомембранология / А.А. Болдырева, Е.И. Кяйвярайнен, В.А. Илюха .– Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН.- 2006.– 5-17 с.
2. Волькенштейн М.В. Биофизика/ М.В. Волькенштейн.– М.: Наука, Гл. ред. физ.-мат. Лит.–1988.– 332-382 с.
3. Гиниатуллин Р.А. Вторая “ профессия ” АТФ / Р.А. Гиниатуллин // Казань. Биология и медицинская наука.– С. 1-6.
4. Гиниатуллин Р.А. Нейрофизиология / Р.А. Гиниатуллин, А.Л. Зефирова, Л.Г. Магазаник, С.Ф. Ощепкова // Neurophysiology.Т.23 – 1991.– С.436-441.
5. Заенцев И.В. Нейронные сети: основные модели / И.В. Заенцев; Воронеж: Изд-во Ворон. ун-та, 1999.– 6- 13с.
6. Зиганшин А.У. АТФ: новая роль для старого знакомого / А.У. Зиганшин // Казань. Химия и жизнь.– 2003. – № 12.– С. 18-20.
7. Зиганшин А.У. P-2 рецепторы: перспективная мишень для будущих лекарств /А.У. Зиганшин, Л.Е. Зиганшина.– М.:ГЭОТАР-Медиа.– 2009. — 136 с.
8. Зиганшин А.У. Роль рецепторов АТФ (P2 – рецепторов) в нервной системе / А.У. Зиганшин// Казань. : Неврологический вестник. вып. 1-2 – 2005. –С. 45-52.
9. Зиганшина А.П. Перспективы использования агонистов и антагонистов P2-рецепторов в офтальмологической практике/ А.П. Зиганшина, Б.А. Зиганшин, А.Н. Самойлов, А.У. Зиганшин // Казань. Казан. мединск. жур-л.– 2012.–№ 3/93.– С. 508- 509.
10. Кэндел Э. Клеточные основы поведения / Э.Кэндел ; Пер. с англ. Н.Ю. Алексеенко, Г.И. Рожковой. – М. : Изд-во Мир, 1980. – 90-99, 119-121, 156-173 с.
11. От нейрона к мозгу / Д.Николс, Мартин Р., Валлас Б., Фукс П., Пер. с англ. Балабана П.М., Галкина А.В., Гиниатуллина Р.А., Хазипова Р.Н., Хируга Л.С. – М.: Изд-во Едиториал УРСС.- 2003.-17, 24-27 с.

12. Покровский В.М. Физиология человека [Электронный ресурс]/ В.М. Покровский, Г.Ф. Коротько.– Режим доступа: <http://lechebnik.info/447/18.htm>, свободный.
13. Ремизов А.Н. Медицинская и биологическая физика / А.Н. Ремизов, А.Г. Максина, А.Я. Потапенко.– М.: Дрофа.– 2003.– 184-213 с.
14. Сазонов В.Ф. Физиология [Электронный ресурс]/ В.Ф. Сазонов.– Режим доступа: <http://kineziolog.bodhy.ru/content/11-stroenie-kletochnoi-membrany>, свободный.
15. Самойлов В.О. Медицинская биофизика / В.О. Самойлов.– Спб.: СпецЛит. –2004.– 19-46 с.
16. Сандаков Д.Б. Курс лекций по физиологии [Электронный ресурс] / Д.Б. Сандаков.– Режим доступа: http://www.studmed.ru/view/sandakov-db-kurs-лекциj-по-физиологии_a0aa2842c20.html#1, свободный.
17. Химический синапс [Электронный ресурс] : [ru.wikipedia.org]/ - Режим доступа: https://ru.wikipedia.org/wiki/Химический_синапс, свободный.
18. Brain Tools [Электронный ресурс]/ - Режим доступа: <http://www.braintools.ru/neuron-the-structure-of-nerve-cell/action-potential>, свободный.
19. Jindrichova M. Highly conserved tyrosine 37 stabilizes desensitized states and restricts calcium permeability of ATP-gated P2X3 receptor / M. Jindrichova, K. Khafizov, A. Skorinkin, D. Eayuk, G. Bart, H. Zemkova, R. Giniatullin // Journal of Neurochemistry. – 2011. - №119. – С. 676-683.
20. Petrenko N. Role of the ectodomain Serine 275 in shaping the binding pocket of the ATP-gated P2X3 receptor / N. Petrenko, K. Khafizov, V. Tvrdonova, A. Skorinkin, R. Giniatullin // Biochemistry. – 2011. - №50. – С. 8427-8435.