

## ИМИТАЦИОННОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ РАБОТЫ ГЛУТАМАТ-ЦИСТЕИН ЛИГАЗЫ

© 2023 г. В.С. Копылова<sup>\*,#</sup>, С.Е. Бороновский<sup>\*</sup>, Я.Р. Нарциссов<sup>\*,\*\*</sup>

<sup>\*</sup>НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, ул. 6-я Радиальная, 24/14, Москва, 115404, Россия

<sup>\*\*</sup>Biomedical Research Group, BiDiPharma GmbH, Bültbek, 5, 22962, Siek, Germany

<sup>#</sup>E-mail: kopilova.veronika@yandex.ru

Поступила в редакцию 27.10.2022 г.

После доработки 22.11.2022 г.

Принята к публикации 07.12.2022 г.

Глутатион ( $\gamma$ -глутамил-цистеинил-глицин) — один из основных внутриклеточных антиоксидантов, играющих важную роль в клеточном обмене. В клетках млекопитающих глутатион синтезируется в две стадии, первая из которых катализируется глутамат-цистеин лигазой и является лимитирующей. В данной работе стохастический алгоритм на основе марковских цепей с непрерывным временем был использован для моделирования работы глутамат-цистеин лигазы. Было рассмотрено несколько механизмов работы, учитывающих обратное ингибирование глутатионом, а также порядок присоединения АТФ. На основании физиологических концентраций участвующих в реакции метаболитов была рассчитана скорость работы глутамат-цистеин лигазы эритроцитов человека. Среди возможных вариантов присоединения субстратов в активный центр исследуемого фермента только механизм, предусматривающий первичное связывание с АТФ, позволяет получить значение для скорости реакции, соответствующее экспериментальной измеренной активности глутамат-цистеин лигазы при физиологических уровнях субстратов. В случае других схем присоединения субстратов различие значений скорости составляет более порядка. Проведенный анализ позволяет сделать вывод о том, что при моделировании биосинтеза глутатиона в условиях *in vivo* необходимо учитывать как концентрацию молекул АТФ, так и обратное ингибирование глутатионом.

*Ключевые слова:* глутатион, глутамат-цистеин лигаза, имитационное моделирование, стохастический алгоритм.

DOI: 10.31857/S0006302923020023, EDN: BZOQUQ

Глутатион представляет собой трипептид, молекула которого содержит глутамат, цистеин и глицин. Это соединение выполняет важную роль в функционировании клеток, являясь партнером по реакции детоксикации ксенобиотиков и кофактором в реакциях изомеризации. Ключевую роль глутатион играет как главный компонент антиоксидантной системы, которая выступает главным защитным механизмом при развитии целого ряда нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся острой и хронической гипоксией [1–3]. Кроме того, глутатион представляет собой форму хранения и транспорта цистеина, необходим для пролиферации клеток и поддерживает окислительно-восстановительный потенциал тиолов, сохраняя сульфгидрильные группы белков в восстановленной форме [4]. Возрастные изменения, стимуляция иммунных реакций, развитие острых и хронических заболеваний ассоциированы с синтезом глутатиона [5]. Глутатион существует в двух основных формах — восстановлен-

ной (GSH) и окисленной (GSSG), структуры которых приведены на рис. 1. Почти все биологические функции глутатиона реализуются за счет превращения восстановленной формы в окисленную с помощью различных ферментов, таких как глутатион пероксидазы, пероксиредоксины, глутаредоксины, глутатион трансферазы и другие [6]. Одновременно с этим происходит восстановление глутатиона при участии NADPH-зависимой глутатион редуктазы, основная функция которой заключается в поддержании соотношения GSH/GSSG.

Основная доля GSH в клетках эукариот находится в цитозоле, митохондриальный пул составляет 9–15%, при этом другие клеточные компартменты (особенно микросомы) имеют значительно более низкое содержание GSH [7]. В целом, уровень глутатиона в клетках млекопитающих очень высок и может достигать 12 мМ [4]. При этом концентрация GSSG в тканях не превышает 0.5–1.0% от GSH, что объясняется необходимо-

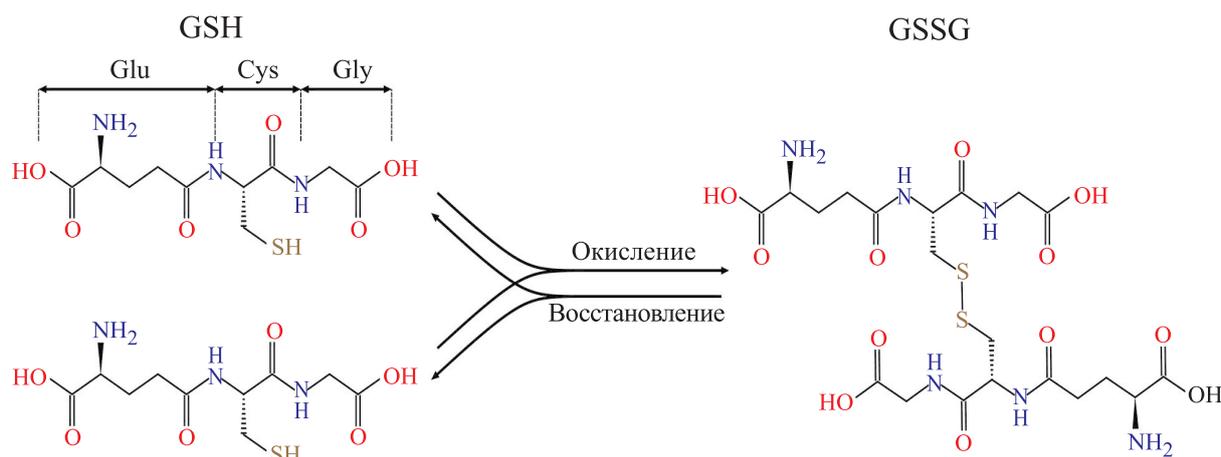


Рис. 1. Структура восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона.

стью поддерживать тиол-дисульфидное равновесие в клетке, препятствуя взаимодействию GSSG с сульфгидрильными группами белков [5].

В отличие от белковых пептидов, образуемых путем матричного синтеза, глутатион имеет свой путь синтеза, который осуществляется в цитозоле всех клеток млекопитающих посредством двух последовательных АТФ-зависимых реакций. Первая реакция катализируется глутамат-цистеин лигазой (GCL) (EC 6.3.2.2) с участием двухвалентных ионов магния или марганца (рис. 2).

На первом этапе синтеза образуется пептидная связь с участием  $\gamma$ -карбоксильной группы глутаминовой кислоты, эта необычная особенность защищает дипептид от гидролиза внутриклеточ-

ными пептидазами и способствует устойчивости глутатиона к внутриклеточной деградации. Глутамат-цистеин лигаза представляет собой гетеродимер, состоящий из тяжелой (~73 кДа) и легкой (~27 кДа) субъединиц. Тяжелая субъединица, активируется во время окислительного стресса и проявляет каталитическую активность фермента, тогда как легкая субъединица играет регулируемую роль, модулируя сродство тяжелой субъединицы к субстратам и ингибиторам [8]. Трехмерная структура GCL была идентифицирована для некоторых видов бактерий, растений, а также дрожжей, однако, фермент человека до сих пор не был кристаллизован [9]. В связи с этим использовать точные методы для моделирования активно-

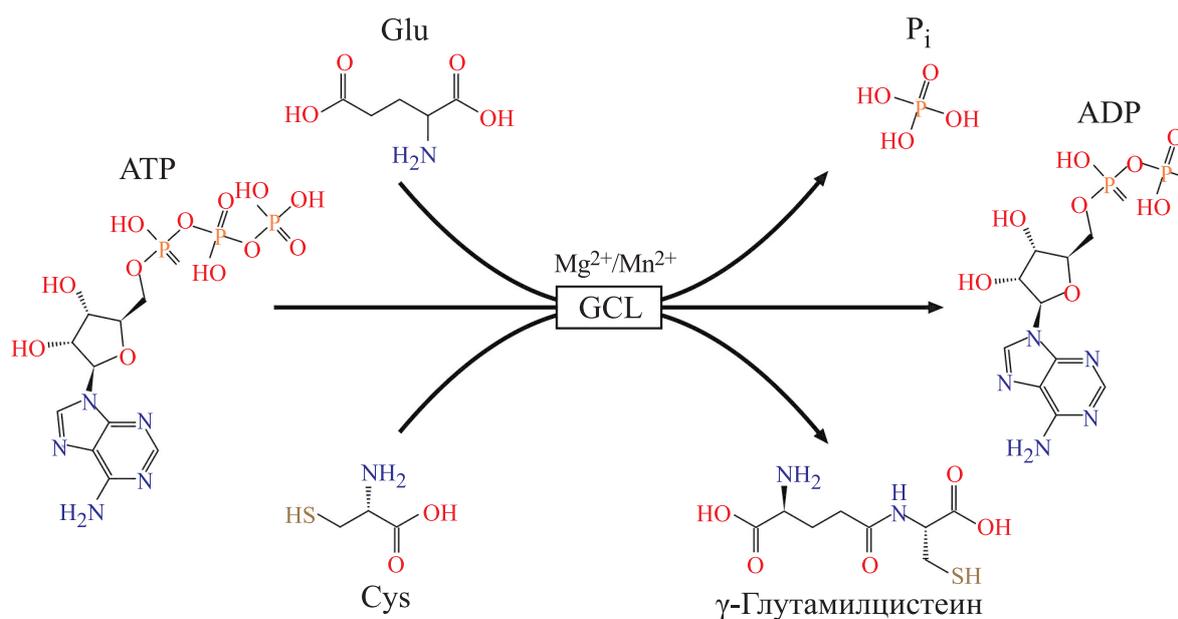


Рис. 2. Первая стадия синтеза глутатиона, катализируемая глутамат-цистеин лигазой.

сти белка человека, такие как, например, методы молекулярной динамики, не представляется возможным.

Активность GCL регулируется на нескольких уровнях, что позволяет ряду стимулов либо индуцировать, либо ингибировать активность фермента. Глутатион может регулировать свой собственный синтез в физиологических концентрациях путем ингибирования GCL по отрицательной обратной связи, что свидетельствует о быстрой реакции фермента на повышенную потребность в GSH [10]. Кроме того, активность глутамат-цистеин лигазы может регулироваться обратимыми ковалентными или нековалентными взаимодействиями между тяжелой и легкой субъединицами. В ответ на окислительный стресс или другие негативные условия, когда требуется больше GSH, экспрессия GCL регулируется двумя редокс-чувствительными сигнальными путями, состоящими из систем Nrf2-EpRE и AP-1 [11].

Вторая реакция катализируется глутатионсинтетазой (EC 6.3.2.3), которая добавляет глицин к  $\gamma$ -глутамилцистеину и образует GSH. Глутатионсинтетаза функционирует как гомодимер, где каждая субъединица имеет молекулярную массу 52 кДа, и принадлежит к суперсемейству глутатионсинтетазных АТФ-связывающих доменов [12]. Эксперименты по сверхэкспрессии GCL и глутатионсинтетазы показали, что лимитирующей стадией синтеза GSH является первая реакция [13]. Помимо описанных выше стадий биосинтеза глутатиона существует также механизм его деградации, включающий четыре реакции [14]. В совокупности они образуют  $\gamma$ -глутамильный цикл, который функционирует следующим образом:  $\gamma$ -глутамилтрансфераза катализирует перенос  $\gamma$ -глутамилового остатка на нуклеофильные акцепторы, в результате чего происходит гидролиз или транслутамилирование. В первом варианте вода выступает в качестве акцептора, гидролизующего GSH, а во втором — акцепторами выступают аминокислоты, дипептиды, а также другая молекула GSH. Наиболее активным акцептором аминокислот является цистин, но и другие нейтральные аминокислоты, особенно метионин и глутамин, могут выступать в этой роли [15]. На следующем этапе цистеинил-глициновая часть GSH гидролизуется на составляющие его аминокислоты дипептидазой. Затем цистеин транспортируется в клетки, где основная его масса расходуется на синтез глутатиона. В свою очередь,  $\gamma$ -глутамиламинокислота метаболизируется до 5-оксипролина и свободной аминокислоты с помощью  $\gamma$ -глутамилциклотрансферазы. В конечном итоге 5-оксипролин раскрывается 5-оксипролиназой, превращая 5-оксипролин в глута-

мат, который затем может использоваться в синтезе GSH. Гамма-глутамильный цикл является сложным метаболическим путем, все функции которого на текущий момент до конца не установлены. Изначально предполагалось, что этот цикл служит для переноса нейтральных аминокислот через плазматическую мембрану [16]. Кроме того, в большинстве клеток он позволяет использовать глутатион в качестве источника цистеина [15]. Помимо этого, в нейрональных клетках  $\gamma$ -глутамильный цикл может компенсировать снижение возбуждающей нейротрансдукции, так как глутатион может являться одной из форм хранения глутамата [17].

Мутации, приводящие к инактивации глутамат-цистеин лигазы, характеризуются развитием различных патологических состояний, которые сопровождаются гемолитической анемией, неврологическими симптомами, миопатией и аминоацидурией. При проведении исследований на нокаутных мышцах было показано, что отсутствие легкой субъединицы фермента приводит к существенному снижению уровня глутатиона в клетках без соматических проявлений, тогда как мышцы без тяжелой субъединицы погибают на ранних сроках беременности [18].

Большое количество экспериментальных работ посвящено изучению кинетики глутамат-цистеин лигазы. Кинетический механизм был описан как упорядоченный [19], с первичным связыванием АТФ и случайным присоединением оставшихся субстратов [20] и полностью случайным связыванием субстратов [21]. Первые исследования начальной скорости и ингибирования указывают на частично случайный механизм работы белка, при котором сначала присоединяется АТФ, а затем цистеин либо глутамат связываются в случайном порядке с GCL. В соответствии с предполагаемым механизмом АДФ является конкурентным ингибитором по отношению к АТФ и неконкурентным ингибитором по отношению к аминокислотным субстратам [20]. При этом при изучении метаболизма глутатиона с использованием математических моделей не всегда учитывается влияние АТФ на скорость работы глутамат-цистеин лигазы. Так, например, в исследовании синтеза GSH и фитохелатина в растениях на основе кинетических уравнений для описания работы GCL использовался обратимый случайный бирактивный механизм Михаэлиса–Ментен с конкурентным ингибированием GSH по глутамату [22]. Аналогичная схема была использована и при исследовании периода полураспада и регуляции синтеза глутатиона, а также его чувствительности к колебаниям поступления аминокислот [23]. В более поздней работе изучалась регуляция концентрации глутатиона в эритроцитах с ис-

пользованием математической модели, в которой для GCL рассматривался упорядоченный механизм работы белка [24]. Кроме того, на основе глобальной аппроксимации данных о начальной скорости глутамат-цистеин лигазы растений было показано, что лучшее совпадение с экспериментальными данными было достигнуто при использовании механизма «random-ter» [25]. Однако авторы утверждают, что факторы взаимодействия указывают на предпочтительный порядок связывания субстратов с активным центром фермента. Необходимо отметить, что данные об образовании различных промежуточных продуктов реакции не подтверждают механизм «пинг-понг» для моделирования активности GCL различных организмов [26].

Для разрешения неопределенности в выборе возможного механизма работы фермента в работе применяются комбинированные методы математического моделирования. Среди неизученных вопросов особо необходимо отметить регуляцию активности GCL глутатионом и АТФ, а также сам механизм присоединения АТФ к белковым комплексам при уровне субстратов близким к состоянию *in vivo*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для моделирования активности глутамат-цистеин лигазы используется компьютерный алгоритм, основанный на стохастическом подходе, в котором каталитический цикл фермента представлен как набор последовательных переходов между отдельными состояниями с различным количеством метаболитов. В данной работе схема переходов между дискретными состояниями реализуется на основе марковских цепей с непрерывным временем. Предполагается, что вероятность перехода из состояния  $i$  в состояние  $j$   $P\{i \rightarrow j | \Delta t\}$  прямо пропорциональна рассматриваемому отрезку времени  $\Delta t$ :

$$P\{i \rightarrow j | \Delta t\} = q_{ij} \cdot \Delta t + o(\Delta t)$$

$$P\{i \rightarrow i | \Delta t\} = 1 - \sum_{i \neq j} q_{ij} \cdot \Delta t + o(\Delta t)$$

где  $q_{ij}$  – интенсивность перехода, характеризующая скорость соответствующего процесса, а  $P\{i \rightarrow j | \Delta t\}$  – вероятность остаться системе в состоянии  $j$ .

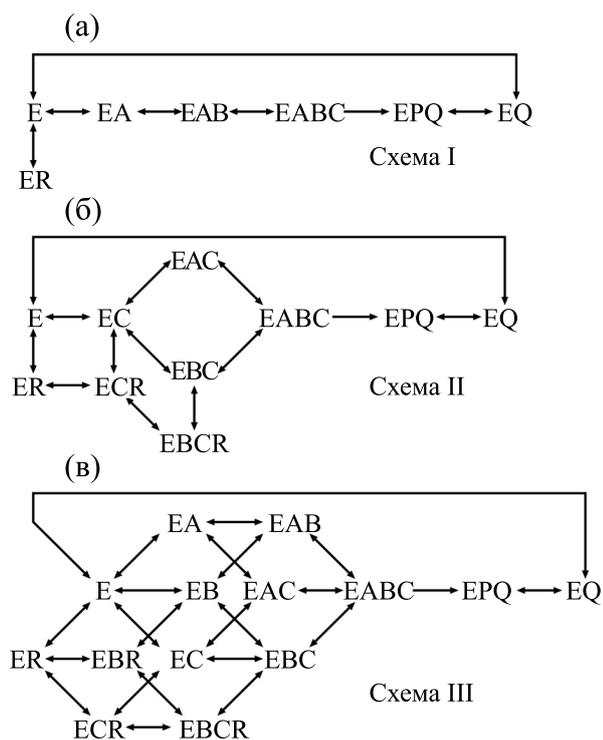
Имитационное моделирование работы белка осуществляется путем генерации непрерывных и дискретных случайных величин, зная законы перехода между различными состояниями и количественные параметры. В качестве основного параметра в данной модели выступает матрица интенсивностей, на основе которой определяется направление перехода по цепи, а также рассчитывается время пребывания в конкретном состоянии.

Таким образом, вероятность перехода из состояния  $i$  в состояние  $j$  за время  $t$  с учетом времени перехода  $\tau$ :

$$P\{i \rightarrow j | t \geq \tau\} = \begin{cases} \frac{q_{ij}}{\sum_{i \neq j} q_{ij}}, & i \neq j \\ 0, & i = j \end{cases}$$

Суть имитационного моделирования таких систем заключается в поиске путей реакции с последующей количественной оценкой необходимых биологических характеристик. В целом задачу по поиску путей протекания процесса с использованием данного метода исследования можно разделить на несколько основных этапов. В первую очередь необходимо выбрать начальное состояние системы. На следующем шаге рассчитывается время перехода в текущее состояние путем генерации непрерывной случайной величины, распределенной экспоненциально. Затем определяется следующее состояние системы с учетом выбранного времени перехода с использованием относительных интенсивностей переходов. Таким образом, полученное состояние становится новым начальным и далее используется для генерации дальнейшего перехода к следующему состоянию. Далее процесс моделирования продолжается до достижения конечного состояния системы, в котором фермент находится в свободной форме. Рассмотренный в работе алгоритм применялся для моделирования работы изолированного белка на примере цитохромоксидазы митохондрий [27]. В целом, методический подход по оценке активности единичного белка на основе различных стохастических комбинированных механизмов использовался также для оценки активности  $F_0F_1$ -АТФ-синтазы [28], глутаминсинтетазы [29] и глутаматного переносчика в нейронах [30].

В связи с тем, что на сегодняшний день точный механизм работы глутамат-цистеин лигазы неизвестен, и существуют разные подходы к моделированию активности этого фермента, в данной работе рассматривается несколько схем работы GCL, учитывающих обратное ингибирование глутатионом, а также порядок присоединения АТФ. На рис. 3а представлена схема I, в которой последовательно присоединяется каждый из субстратов, а затем в обратном порядке происходит диссоциация продукта. При этом ингибирование глутатионом происходит конкурентно с пустой формой белка. Схема II представляет собой расширение относительно конкурентного связывания GSH известной концепции [31], предполагающей, в первую очередь, присоединение АТФ, а затем случайное связывание с остальными субстратами (рис. 3б). Кроме того, интересным для

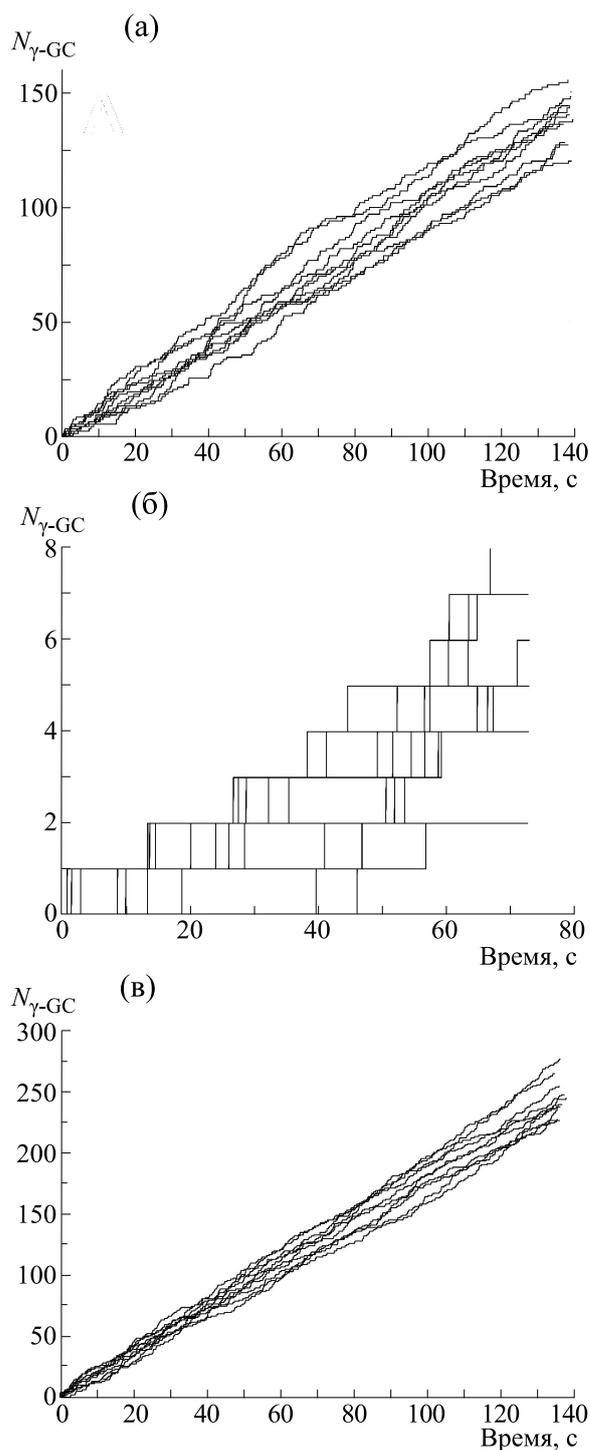


**Рис. 3.** Схемы работы глутамат-цистеин лигазы с конкурентным по глутамату ингибированием глутатионом: (а) – последовательное присоединение каждого из субстратов; (б) – первичное присоединение АТФ с последующим случайным присоединением оставшихся субстратов; (в) – полностью случайный порядок связывания субстратов. Е – GCL в активной форме, А – глутамат, В – цистеин, С – АТФ, Р – ADP, Q –  $\gamma$ -глутамилцистеин, R – глутатион.

рассмотрения представляется механизм, который предусматривает полностью случайный порядок связывания субстратов с конкурентным по глутамату ингибированием глутатионом (схема III, рис. 3в). Моделирование работы белка на основе приведенных схем с использованием методов кинетики позволяет описать ансамбль белков, однако, единичный белок работает стохастически, в отличие от работы в ансамбле. Следовательно, для оценки активности единичного фермента предпочтительнее использовать описанный выше имитационный подход.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Используемый в данной работе подход позволяет воспроизвести процесс протекания реакции, катализируемой GCL. Результатом единичного компьютерного эксперимента является зависимость потоков всех метаболитов от времени в единичной точке пространства концентраций. Чтобы оценить количество полученного в ходе реакции продукта, были построены зависимости произведенного  $\gamma$ -глутамилцистеина от времени для трех описанных выше схем работы глутамат-



**Рис. 4.** Зависимость произведенного единичным белком  $\gamma$ -глутамилцистеина от времени для трех схем работы: (а) – схема I; (б) – схема II; (в) – схема III.

цистеин лигазы (рис. 4). Для каждого варианта моделирования активности фермента было проведено 10 экспериментов, каждый из которых состоял из  $2 \cdot 10^7$  шагов. Как видно из приведенных графиков, в случае первичного связывания с АТФ

**Таблица 1.** Сравнение кинетических параметров GCL, полученных для трех рассматриваемых механизмов работы, с литературными данными

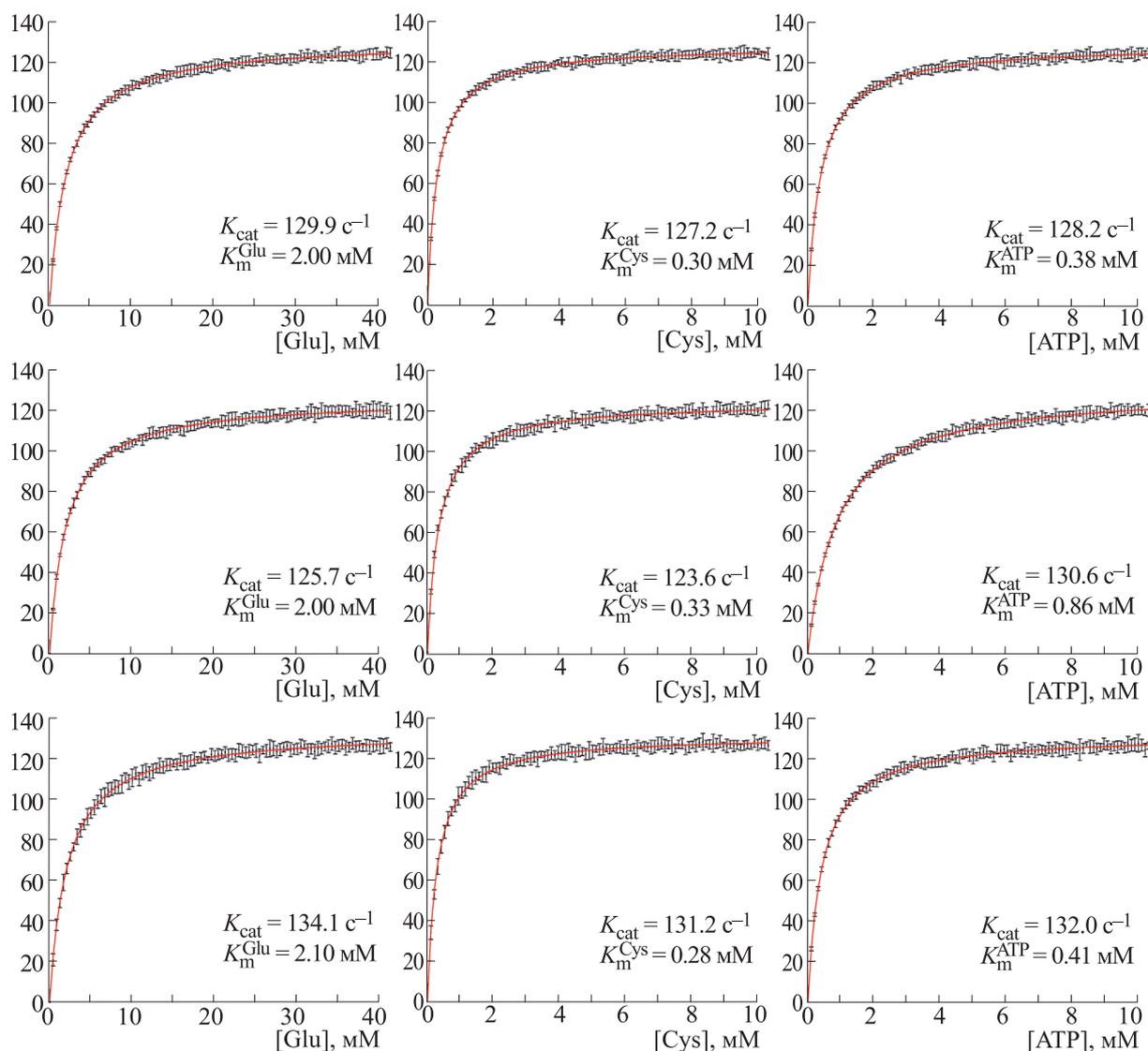
| Субстрат   | Схема | $k_{cat}$ , с <sup>-1</sup> | $K_m$ , мМ               |                          |              |
|------------|-------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
|            |       | Результаты моделирования    | Результаты моделирования | Экспериментальные данные |              |
| L-глутамат | I     | 129.9                       | 2.0                      | 1.9–2.4                  | [8, 31]      |
|            | II    | 125.7                       | 2.0                      |                          |              |
|            | III   | 134.1                       | 2.1                      |                          |              |
| L-цистеин  | I     | 127.2                       | 0.30                     | 0.1–0.5                  | [31, 33]     |
|            | II    | 123.6                       | 0.33                     |                          |              |
|            | III   | 131.2                       | 0.28                     |                          |              |
| АТФ        | I     | 128.2                       | 0.38                     | 0.35–0.88                | [31, 34, 35] |
|            | II    | 130.6                       | 0.86                     |                          |              |
|            | III   | 132.0                       | 0.41                     |                          |              |

поток  $\gamma$ -глутамилцистеина является наименьшим, а максимальная эффективность достигается при полностью случайном порядке присоединения субстратов. Кроме того, схема II характеризуется наиболее стохастическим протеканием реакции, при котором количество произведенного  $\gamma$ -глутамилцистеина существенно отличается от эксперимента к эксперименту, тогда как для схемы III количество продукта практически не изменяется в серии экспериментов. Такой характер работы белка связан с высокой чувствительностью к концентрации АТФ и GSH, которые в данной схеме являются лимитирующими факторами, в особенности в условиях *in vivo*. Большая часть времени модельного эксперимента приходится на переходы между состояниями E, E-АТФ и E-GSH, что приводит как к существенному различию между отдельными модельными экспериментами, так и к кратному падению средней скорости синтеза  $\gamma$ -глутамилцистеина. Для схемы с последовательным присоединением субстратов (рис. 4а) характерно относительно случайное протекание процесса, а количество произведенного  $\gamma$ -глутамилцистеина близко с аналогичной характеристикой для схемы III.

Стохастический алгоритм также применяли для оценки скорости работы фермента при различных концентрациях одного из субстратов, при этом значения концентраций двух других субстратов фиксировались на уровне насыщения, который используется при экспериментальном изучении кинетики GCL [32]. Для каждой точки в пространстве концентраций было рассчитано среднее значение скорости и стандартное отклонение по серии из 20 экспериментов (рис. 5). По-

лученные значения основных кинетических параметров хорошо согласуются с экспериментальными данными для каждой из рассматриваемых схем работы белка (табл. 1). При этом значение константы  $K_m$  для цистеина, учитывая клеточную концентрацию этой аминокислоты в условиях *in vivo*, свидетельствует о том, что именно концентрация цистеина является лимитирующим фактором работы глутамат-цистеин лигазы. Данный вывод подтверждается экспериментальными исследованиями, в которых показано, что регуляция синтеза глутатиона в целом осуществляется на первом этапе за счет нехватки цистеина. Кроме того, молекул АТФ также может быть недостаточно для высокой скорости протекания реакции, исходя из рассчитанных значений  $K_m$ , причем наиболее существенно это сказывается для механизма работы GCL с первичным связыванием с АТФ. Наряду с этим модельное значение  $k_{cat}$  согласуется с результатами исследования глутамат-цистеин лигазы эритроцитов человека [24].

Как было описано ранее, GCL ингибируется глутатионом по типу обратной связи, что указывает на необходимость учитывать влияние данного метаболита при моделировании активности глутамат-цистеин лигазы. Оценка ингибирования GCL глутатионом проводилась путем расчета скорости реакции с увеличением концентрации глутамата для каждой фиксированной концентрации GSH. На рис. 6а приведена зависимость обратной скорости от обратной концентрации глутамата при различных концентрациях GSH, лежащих в пределах физиологического диапазона. Эффект ингибирования активности фермента показан только для схемы с последовательным

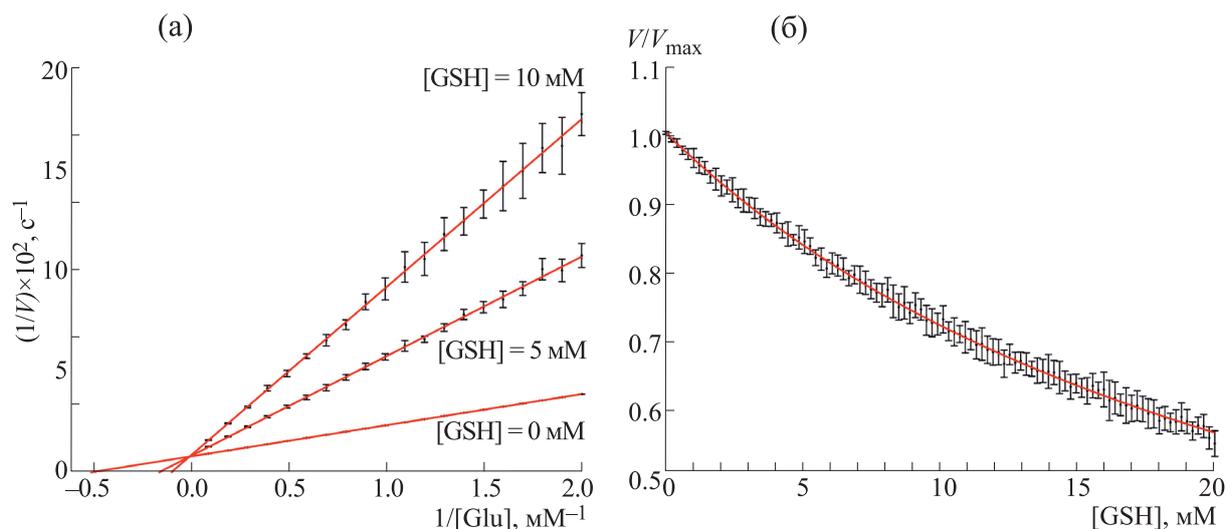


**Рис. 5.** Скорость работы единичного белка в зависимости от концентрации одного из субстратов для каждой из трех схем работы фермента: верхний ряд – схема I; средний ряд – схема II; нижний ряд – схема III. Результаты представлены в виде  $M \pm SD$  для 20 независимо проведенных компьютерных экспериментов.

присоединением субстратов, так как для двух других механизмов двойная обратная зависимость выглядит аналогичным образом. Полученные значения константы ингибирования ( $K_i = 2.27–2.32$ ) согласуются с экспериментальными данными для каждой из рассматриваемых схем работы GCL [36]. Также была построена зависимость относительной активности фермента от концентрации глутатиона (рис. 6б). Относительная активность представляет собой отношение активности GCL в присутствии различных концентраций GSH к аналогичной активности в отсутствии данного ингибитора. Эффективность работы глутамат-цистеин лигазы уменьшается на 10% при концентрации GSH, равной 1 мМ, при этом добавление 10 мМ глутатиона вызывает снижение

активности на 30%. Следует отметить, что такие значения концентраций глутатиона наблюдаются в клетках в условиях *in vivo*. Представленная зависимость полностью совпадает с аналогичной кривой, полученной при экспериментальном исследовании кинетики ингибирования глутатионом глутамат-цистеин лигазы человека [33].

Наиболее интересным представляется изучение активности фермента при концентрациях субстратов и регуляторов, соответствующих измеренному *in vivo*. В данном исследовании с этой целью проводили моделирование работы глутамат-цистеин лигазы эритроцитов человека. Концентрации метаболитов, участвующих в реакции, были зафиксированы на физиологическом уровне в соответствии с экспериментальными данными



**Рис. 6.** Ингибирование единичного белка глутатионом. (а) — двойная обратная зависимость скорости реакции от концентрации глутамата в присутствии 0, 5 и 10 мМ GSH; (б) — зависимость относительной активности от концентрации глутатиона. Результаты представлены в виде  $M \pm SD$  для 20 независимо проведенных компьютерных экспериментов.

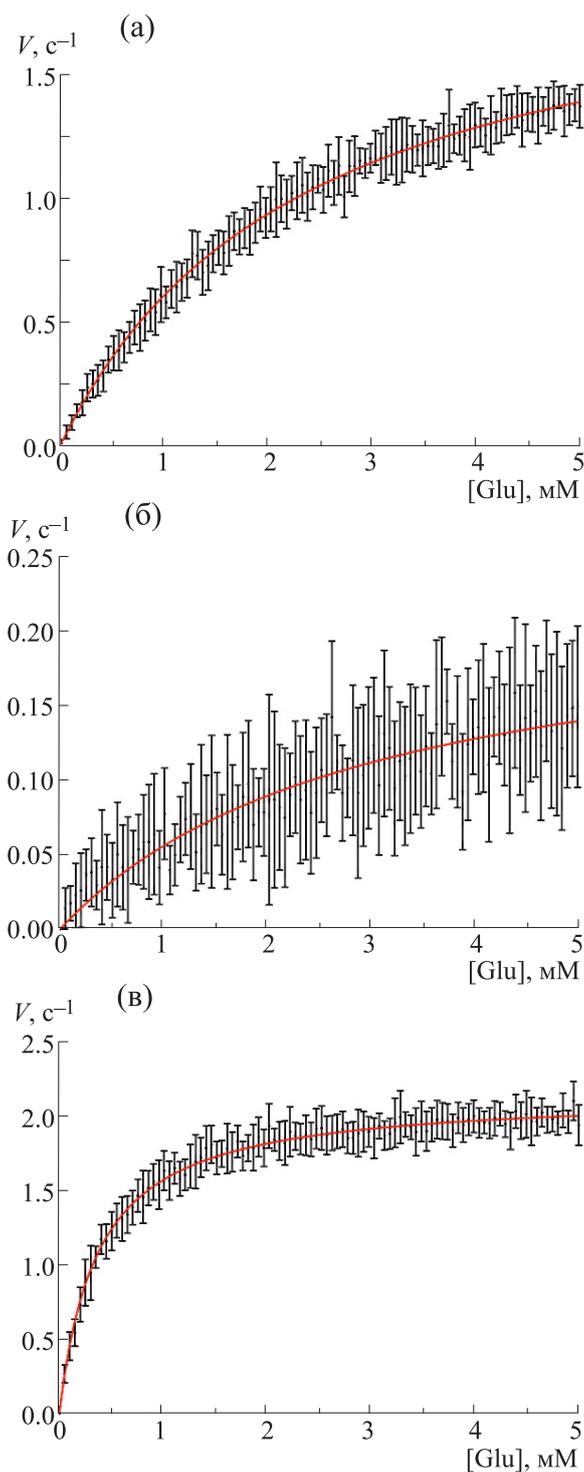
ми. Так, концентрацию цистеина принимали равной 5 мкМ [37], а концентрацию глутатиона — 1.4 мМ [38]. Поскольку гликолиз достаточно стабильно поддерживает концентрации АТФ и АДФ в эритроцитах на одном уровне, концентрации этих двух метаболитов также поддерживались постоянными и равнялись 0.65 мМ и 0.085 мМ соответственно [39]. На рис. 7 представлена зависимость скорости работы GCL от концентрации глутамата для трех рассматриваемых схем. Как видно из приведенных результатов, скорости работы фермента существенно отличаются для каждого из механизмов. Так, с максимальной скоростью работает белок в случае полностью случайного порядка присоединения субстратов (рис. 7в), при этом при последовательном связывании субстратов скорость GCL существенно снижается (рис. 7а). С учетом физиологической концентрации глутамата в эритроцитах человека, равной 0.4 мМ [40], была рассчитана скорость работы глутамат-цистеин лигазы в условиях *in vivo*.

Необходимо отметить, что несмотря на то, что значения  $K_m$ , рассчитанные при концентрациях субстратов, соответствующих уровню насыщения, для всех трех моделей входят в диапазон экспериментальных значений  $K_m$  (табл. 1), только для механизма, предусматривающего первичное связывание с АТФ, величина скорости ( $V = (0.049 \pm 0.027) \text{ s}^{-1}$ ) согласуется с экспериментально измеренной в эритроцитах человека скоростью работы GCL [41]. Так, для схемы с последовательным присоединением субстратов (схема I) скорость работы фермента превосходит экспериментальное значение более, чем в пять

раз, тогда как при полностью случайном порядке связывания субстратов (схема III) различие значений составляет более порядка. Таким образом, можно сделать вывод, что наиболее точно механизм работы фермента в условиях *in vivo* воспроизводится с использованием схемы II. Более того, моделирование биосинтеза глутатиона в предположении, что происходит насыщение АТФ, не отвечает физиологическим условиям, поскольку значения  $K_m$  по АТФ для схемы II (табл. 1) лежат выше соответствующих эритроцитарных концентраций. В условиях стресса, влияющих на биохимические пути выработки АТФ, данное предположение может оказаться еще менее достоверным. Так, например, на модели дрожжей было показано, что снижение концентрации АТФ ниже 2 мМ приводит к резкому снижению уровню глутатиона, аналогичная реакция на изменение АТФ ожидается и от растительной системы [22].

Поскольку экспериментальные измерения концентрации  $\gamma$ -глутамилцистеина в эритроцитах человека не проводились, концентрация данного метаболита в системе принималась равной нулю. Однако если предположить, что концентрация  $\gamma$ -глутамилцистеина сопоставима с измеренной в растительных клетках (0.04 мМ [42]), то скорость работы GCL в случае присоединения АТФ в качестве первого субстрата снизится в полтора раза:  $V = (0.031 \pm 0.018) \text{ s}^{-1}$ . Данная величина также соответствует физиологическому диапазону скорости работы эритроцитарной GCL человека.

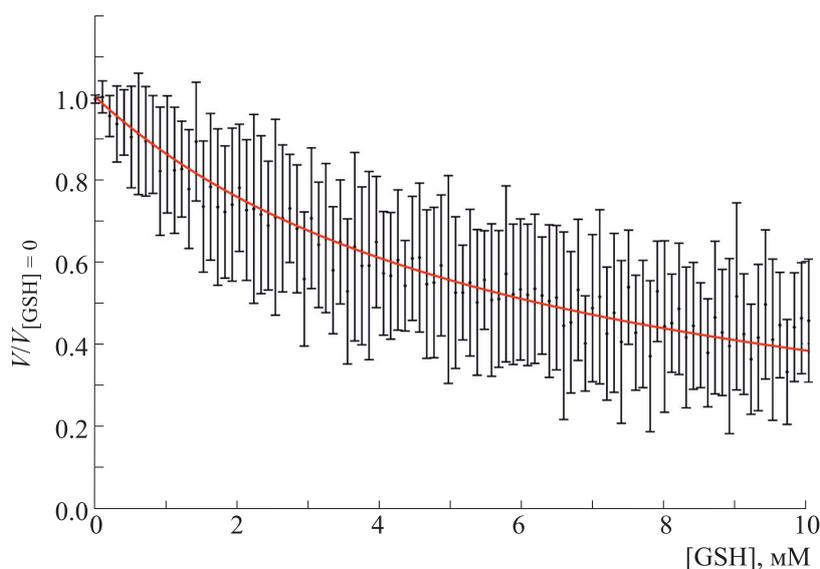
Следует подчеркнуть, что экспериментально измеренные концентрации глутатиона в эритро-



**Рис. 7.** Скорость работы единичного белка при концентрациях субстратов и регуляторов, соответствующих измеренному *in vivo*, в зависимости от концентрации глутамата для каждой из трех схем работы фермента: (а) – схема I; (б) – схема II; (в) – схема III. Результаты представлены в виде  $M \pm SD$  для 20 независимо проведенных компьютерных экспериментов.

цитах человека лежат в широком диапазоне от 1.2 мМ до 8.8 мМ [41, 43]. Увеличение уровня GSH в клетках крови человека может существенно снижать скорость работы глутамат-цистеин

лигазы (рис. 8). Так, изменение концентрации глутатиона в указанном диапазоне приводит к уменьшению относительной активности фермента до 0.41. Таким образом, одним из механизмов

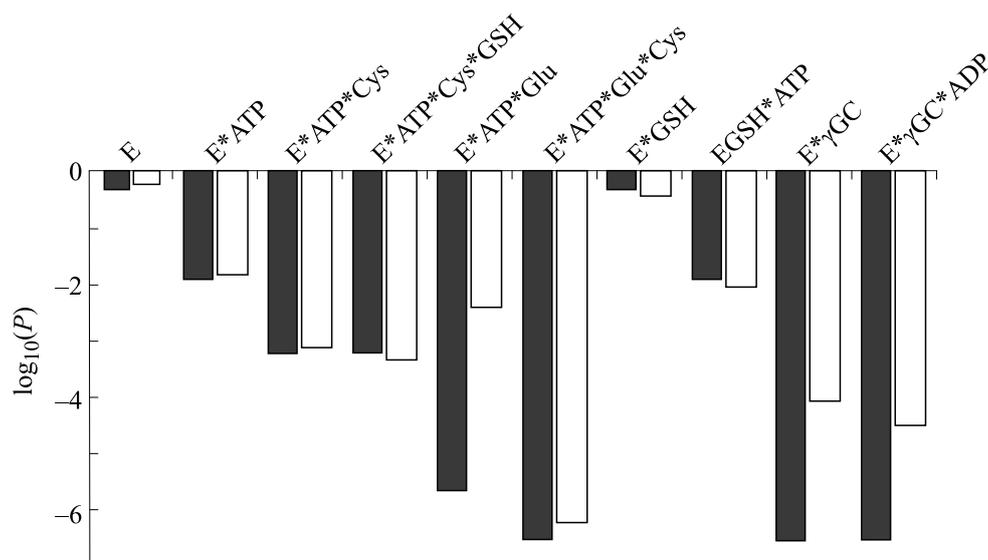


**Рис. 8.** Относительная скорость работы единичного белка при концентрациях субстратов и регуляторов, соответствующих измеренному *in vivo*, в зависимости от концентрации глутатиона для схемы II. Результаты представлены в виде  $M \pm SD$  для 20 независимо проведенных компьютерных экспериментов.

поддержания необходимой концентрации GSH является регуляция активности глутамат-цистеин лигазы. Следовательно, при моделировании синтеза глутатиона в условиях *in vivo* необходимо учитывать обратное ингибирование GCL.

Кроме того, оценивали распределение частот состояний, в которых находилась система в течение модельного эксперимента (рис. 9). Концентрации всех метаболитов в данном исследовании были установлены на физиологическом для эрит-

роцитов человека уровне, концентрация GSH, в частности, принималась равной 1.4 mM. В соответствии с проведенным анализом, белок чаще всего находится в свободном состоянии (E), либо связан с глутатионом (E-GSH). По-видимому, это объясняется достаточно низкими концентрациями аминокислотных метаболитов и высоким уровнем глутатиона в клетках крови человека. Также высока вероятность нахождения фермента связанным с АТФ, причем как в свободном со-



**Рис. 9.** Частота (темные столбики) и взвешенная по времени частота (светлые столбики) нахождения единичного белка в определенном состоянии при концентрациях субстратов и регуляторов, соответствующих измеренным *in vivo*.

стоянии (E-АТФ), так и в комплексе с глутатионом (E-GSH-АТФ). Интересно, что реже всего встречается состояние, в котором GCL связан со всеми субстратами (E-АТФ-Glu-Cys), при этом, исходя из взвешенной по времени гистограммы, данная стадия является достаточно быстрой. Обратная ситуация наблюдается для фермента, связанного с АТФ и глутаматом (E-АТФ-Glu), что, скорее всего, обусловлено конкуренцией глутатиона и глутамата за сайт связывания с GCL.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование активности фермента с использованием стохастических алгоритмов может быть полезно для оценки существующих теорий и экспериментальных данных, так как такой подход позволяет воспроизвести работу единичного белка, основываясь на известных физиологических параметрах. Изучение работы единичного белка является первым шагом на пути моделирования метаболического пути, в частности,  $\gamma$ -глутамильного цикла, что объясняется необходимостью корректного математического представления активности всех участвующих в нем ферментов. В данной работе с помощью описанного подхода было показано, что при моделировании биосинтеза глутатиона в условиях *in vivo* необходимо учитывать влияние концентрации АТФ на эффективность работы глутамат-цистеин лигазы, которая катализирует лимитирующую стадию синтеза GSH. Сравнение рассчитанной скорости работы глутамат-цистеин лигазы в условиях *in vivo* с экспериментальными значениями позволяет сделать вывод о том, что первичной стадией синтеза  $\gamma$ -глутамилцистеина является связывание GCL с молекулой АТФ. Также существенное влияние на скорость работы данного фермента оказывает обратное ингибирование глутатионом, концентрация которого в клетках человека может сильно варьироваться. Необходимо подчеркнуть, что в состоянии оксидативного стресса, сопровождаемого изменениями клеточных концентраций глутатиона, ингибирование будет оказывать еще большее влияние на эффективность синтеза GSH. Данный механизм является одним из способов поддержания необходимой клеточной концентрации глутатиона.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. A. Korneev, I. A. Komissarova, and Y. R. Nartsissov, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **116**, 1089 (1993).
2. В. И. Скворцова, Я. Р. Нарциссов, М. К. Бодыхов и др., *Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **107**, 30 (2007).
3. Y. R. Nartsissov, *Biochem. Soc. Trans.*, **45** (5), 1097 (2017).
4. R. Dringen, *Progr. Neurobiol.* **62** (6), 649 (2000).
5. Л. П. Смирнов и И. В. Суховская, *Учен. зап. Петрозавод. гос. ун-та*, **6** (143), 34 (2014).
6. M. Deponte, *Antioxid. Redox Signal.*, **27** (15), 1130 (2017).
7. V. I. Kulinskii and L. S. Kolesnichenko, *Biomed. Khim.*, **55** (3), 255 (2009).
8. K. Chik, F. Flourie, K. Arab, et al., *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **827** (1), 32 (2005).
9. Y. Yang, E. D. Lenherr, R. Gromes, et al., *Biochem. J.*, **476** (7), 1191 (2019).
10. R. Njalsson, *Cell Mol. Life Sci.*, **62** (17), 1938 (2005).
11. H. Zhang and H. J. Forman, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **23** (7), 722 (2012).
12. A. Dinescu, M. E. Anderson, and T. R. Cundari, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **353** (2), 450 (2007).
13. M. Grant, F. H. MacIver, and I. W. Dawes, *Mol. Biol. Cell.*, **8** (9), 1699 (1997).
14. K. Bachhawat and S. Yadav, *IUBMB Life*, **70** (7), 585 (2018).
15. V. I. Kulinskii and L. S. Kolesnichenko, *Biomed. Khim.*, **55** (4), 365 (2009).
16. A. Meister and M. E. Anderson, *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 711 (1983).
17. T. W. Sedlak, B. D. Paul, G. M. Parker, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116** (7), 2701 (2019).
18. О. А. Борисенко, М. И. Бушма, О. Н. Басалай и др., *Мед. новости*, **7** (298), 3 (2019).
19. G. E. van Buskirk, J. E. Gander, and W. B. Rathbun, *Eur. J. Biochem.*, **85** (2), 589 (1978).
20. B. Yip and F. B. Rudolph, *J. Biol. Chem.*, **251** (12), 3563 (1976).
21. D. L. Brekken and M. A. Phillips, *J. Biol. Chem.*, **273** (41), 26317 (1998).
22. G. Mendoza-Cozatl and R. Moreno-Sanchez, *J. Theor. Biol.*, **238** (4), 919 (2006).
23. M. C. Reed, R. L. Thomas, J. Pavisic, et al., *Theor. Biol. Med. Model.*, **5**, 8 (2008).
24. J. E. Raftos, S. Whillier, and P. W. Kuchel, *J. Biol. Chem.*, **285** (31), 23557 (2010).
25. J. M. Jez, R. E. Cahoon, and S. Chen, *J. Biol. Chem.*, **279** (32), 33463 (2004).
26. M. Orłowski and A. Meister, *Biochemistry*, **10** (3), 372 (1971).
27. V. Y. Titova, S. E. Boronovskiy, J. P. Mazat, et al., *J. Physics: Conf. Series*, **1141**, 012029 (2018).
28. E. Mashkovtseva, S. Boronovsky, and Y. Nartsissov, *Math. Biosci.*, **243** (1), 117 (2013).

29. N. V. Kazmiruk, S. E. Boronovskiy, and Y. R. Nartsissov, *Biophysics*, **63** (3), 318 (2018).
30. O. A. Zagubnaya, S. Boronovskiy, and Y. R. Nartsissov, *J. Physics: Conf. Series*, **1141**, (2018).
31. O. W. Griffith and R. T. Mulcahy, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **73**, 209 (1999).
32. R. Quintana-Cabrera, S. Fernandez-Fernandez, V. Bobo-Jimenez, et al., *Nat. Commun.*, **3**, 718 (2012).
33. Z. Tu and M. W. Anders, *Arch. Biochem. Biophys.*, **354** (2), 247 (1998).
34. M. N. Willis, Y. Liu, E. I. Biterova, et al., *Biochemistry*, **50** (29), 6508 (2011).
35. Y. Chen, H. G. Shertzer, S. N. Schneider, et al., *J. Biol. Chem.*, **280** (40), 33766 (2005).
36. O. W. Griffith, *Free Radic. Biol. Med.*, **27** (9-10), 922 (1999).
37. K. Kiessling, N. Roberts, J. S. Gibson, et al., *Hematol. J.*, **1** (4), 243 (2000).
38. D. Darmaun, S. D. Smith, S. Sweeten, et al., *Diabetes*, **54** (1), 190 (2005).
39. E. Skotnicka, I. Baranowska-Bosiacka, W. Dudzinska, et al., *Biology of Sport*, **25** (1), 35 (2008).
40. J. C. Divino Filho, S. J. Hazel, P. Furst, et al., *J. Endocrinol.*, 156 (3), 519 (1998).
41. Y. Xiong, Y. Xiong, Y. Wang, et al., *Cell Physiol. Biochem.*, **51** (5), 2172 (2018).
42. G. Noctor, A.-C. M. Arisi, L. Jouanin, et al., *Physiol. Plantarum*, **100** (2), 255 (1997).
43. A. Kuster, I. Tea, S. Sweeten, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **390** (5), 1403 (2008).

## Simulation Modeling of Glutamate Cysteine Ligase Activity

V.S. Kopylova\*, S.E. Boronovskiy\*, and Ya.R. Nartsissov\*, \*\*

\**Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology, ul. 6-ya Radialnaya 24/14, Moscow, 115404 Russia*

\*\**Biomedical Research Group, BiDiPharma GmbH, Bültbek, 5, 22962, Siek, Germany*

L- $\gamma$ -glutamyl-L-cysteinyl glycine, or glutathione, as one of the basic intracellular antioxidants, plays a vital role in cellular metabolism. In mammalian cells, glutathione is synthesized via two steps. The first step that is considered rate limiting is catalyzed by glutamate cysteine ligase. In this work, a stochastic algorithm based on continuous-time Markov chains was used to simulate the activity of glutamate-cysteine ligase. Several different mechanisms of enzymatic activity including reversible inhibition of glutathione, and an ATP binding motif have been considered. Based on physiological metabolite measurements made for human erythrocytes, the activity of glutamate cysteine ligase was determined. There are many possible ways for substrates to bind to an active site of the studied enzyme, but, only the mechanism by which primary binding to ATP can occur makes it possible to obtain the catalytic rate value similar to that of the experimentally measured glutamate-cysteine ligase activity relative to physiological concentrations of substrates. In other cases, the values differ by more than one order of magnitude. The performed analysis allows the conclusion that when models for glutathione biosynthesis are constructed *in vivo* conditions, the ATP concentration and reversible inhibition of glutathione should be taken into account.

*Keywords: glutathione, glutamate-cysteine ligase, simulation modeling, stochastic algorithm*