

---

Дмитриев А.В., Марков Н.В.

**МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ НЕФЕРМЕНТАТИВНОЙ  
МОДИФИКАЦИИ БЕЛКОВ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ**

Монография

Санкт-Петербург  
2014

УДК 577:51-76  
ББК 41.2

Д 53

Рецензенты:

*В.А. Твердислов*, доктор физико-математических наук, профессор, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет

*В.Г. Курбатов*, доктор физико-математических наук, профессор, Российская академия народного хозяйства и государственной службы при Президенте РФ

**Дмитриев А.В., Марков Н.В.**

Математические модели неферментативной модификации белков живых организмов: Монография. – СПб: Изд-во РГПУ имени А.И. Герцена, 2014. – 233 с.

ISBN 978-5-8064-2041-2

Научная монография посвящена математическому моделированию деградации белков живых организмов, обусловленной посттрансляционными неферментативными модификациями их аминокислотных остатков. Авторы обобщают и систематизируют результаты собственных системно-динамических и теоретических исследований нарушения механизмов функционирования белков в процессе их неферментативной деградации и старения организма.

Книга адресована широкому кругу специалистов, работающих в области теоретической биофизики, преподавателям, аспирантам и студентам естественнонаучных факультетов вузов, а также всем интересующимся вопросами математического моделирования биологических систем.

**УДК 577:51-76**  
**ББК 41.2**

**ISBN 978-5-8064-2041-2**

© Дмитриев А.В., Марков Н.В., 2014  
© Издательство РГПУ имени А.И. Герцена, 2014

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>Введение</b> .....	5
<b>Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии</b> .....	9
1.1. Изменение хирального и ионного гомеостаза при старении и в патологических состояниях.....	9
1.2. Механизмы неферментативной модификации белков организма.....	21
1.3. Хиральные комплексы и переключатели.....	40
<b>Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии</b> .....	50
2.1. Статистический анализ первичной структуры белков подверженных деградации.....	50
2.2. Линейная модель неферментативной модификации.....	81
2.3. Нелинейная модель неферментативной модификации.....	93
<b>Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp</b> .....	98
3.1. Третичная структура модифицированных ионных каналов.....	98
3.2. Функциональные характеристики модифицированных ионных каналов.....	147
3.3. Третичная структура модифицированного NR1-центра связывания NMDA-рецептора.....	170
<b>Заключение</b> .....	181
<b>Список литературы</b> .....	183



## Введение

Вплоть до 70-х годов прошлого века считалось, что все белки живых организмов состоят из L-аминокислот. Однако экспериментально было установлено, что в процессе старения наблюдается увеличение содержания D-аминокислот в различных тканях организма человека и животных в результате неферментативной рацемизации аминокислот белков. Причем из двадцати аминокислот Asn и Asp в белках являются структурно нестабильными и наиболее подверженными неферментативной рацемизации. Отмечено появление D-аспартата в белках больных болезнью Альцгеймера, Паркинсона, при склеротических изменениях в сердечно-сосудистой системе, при глазной катаракте и т.д. Вероятно, аккумуляция D-аминокислот в белках приводит к изменению их пространственной структуры и нарушению их функциональных свойств.

Все неравновесные системы стремятся к равновесию и увеличению энтропии. Живые организмы как неравновесные системы, состоящие из L-аминокислот, L-фосфолипидов и D-сахаров, стремятся к балансу L/D энантиомеров. В процессе старения наблюдается увеличение содержания D-аминокислот в различных тканях организма человека и животных. Относительно других соединений надежных данных нет.

Эксперименты, проведенные в различных лабораториях в последние годы однозначно указывают на то, что в процессе старения наблюдается увеличение содержания D-аминокислот в тканях организма человека и других живых организмов. При этом рацемизация хиральных соединений в клетках в процессе старения носит не случайный характер, а формирует положительную обратную связь в системе регуляции процессов метаболизма, приводящую к развитию патологических состояний и ускорению старения.

Исследования проведенные командой учёных зуборечебного колледжа Канагава в Японии показали, что в процессе старения поднимается уровень D-аспартата в зубах мышей и крыс [Ohtani et al., 1995]. Исследования Норико Фудзии показали, что в процессе старения человеческих зрачков формируются биологически редкие L-β-аспартат, D-α-аспартат и D-β-аспартат [Fujii, 2005, Fujii et al., 1999]. Исследования группы Фудзии также показали увеличение D-β-аспартата в клетках кожи в процессе облучения ультрафиолетом.

Asn и Asp являются структурно нестабильными и наиболее подверженными рацемизации аминокислотами. Основными причиной появления в белках D-Asp в процессе старения являются как потеря L-

## Введение

аспарагином аминной группы, так и рацемизация L-Asp приводящим к образованию L-isoAsp, D-Asp и D-isoAsp.

В отличие от аминокислот входящих в состав пептидов, увеличение концентрации D-энантиомеров свободных аминокислот наблюдается на ранних стадиях развития и уменьшается в процессе старения.

Группа Данлопа отметила увеличение концентрации свободного D-аспартата в клетках мозга и сетчатки на ранней эмбриональной стадии развития организмов мышей и человека. В клетках мозга на 14-ой неделе развития человеческого эмбриона до 60% всего свободного аспартата находится в D-форме. Однако, к моменту рождения D-аспартат практически не обнаруживается [Dunlop et al., 1986].

Исследования проведённые Хашимото [Hashimoto et al., 1997] выявили функцию свободного D-серина в клетках мозга как рецептор активизируемый N-метил-D-аспартатом (NMDA). Последующие исследования Волоскера [Wolosker et al., 1999] показали, что рацемизация L-серина в D-серин в клетках мозга катализируется сериновой рацемазой и расщепляется D-аминооксидазой.

D-Asp и D-Ser в свободной форме были обнаружены в клетках яичек, пинеальной железы и надпочечников крыс. Отношения L/D энантиомеров изменяется в процессе развития и старения организма. В клетках пинеальной железы у крыс уровень D-Asp увеличивается до 30-40% от всего свободного аспартата между 4-ой и 10-ой неделями жизни и постепенно снижается вплоть до 36-ой недели [Hamase et al., 1997].

Появление D-аминокислот в белках в процессе старения остаётся неисследованным направлением в фармакологии. Многие антибиотики, включая пенициллин, D-стереоспецифичны и работают по пептидным связям D-аминокислот распространенных в белках бактерий. Пенициллин например работает по пептидным связям D-Ala, входящего в состав бактериальных мембранных белков.

Следует предположить, что с увеличением отношения D-аминокислот к L-аминокислот в белках старших организмов, D-стереоспецифичные антибиотики могут оказывать более активное действие на белки организмов более позднего возраста. Поэтому, стереоспецифичные фармацевтические средства должны проходить тестирование на организмах в разных возрастных категориях и употребление D-стереоспецифичных антибиотиков следует ограничивать в зависимости от возраста.

## Введение

Исследования, проведённые Патрицией Мастерс из института океанографии Скриппса, Джеффри Бада из калифорнийского университета и Самуелом Зиглером из медицинского центра университета Дюк показали, что в процессе старения наблюдается увеличение содержания D-Asp в ядрах клеток нормальных человеческих зрачков [Masters et al., 1977]. Учёные были поражены высоким уровнем рацемизации аспартата в брунэсцентных катарактах превосходящим предполагаемые результаты практически в два раза.

Исследования, проведённые командой учёных зубооречебного колледжа Канагава в Японии показали, что в процессе старения поднимается уровень D-Asp в зубах мышей с ускоренным процессом старения. Другая группа подтвердила увеличение содержания D-Asp в зубах крыс [Ohtani et al., 1995, Ohtani et al., 2000].

Исследования Норико Фудзии из университета Киото, Япония показали, что в процессе старения человеческих зрачков формируются биологически редкие L-β-аспарагиновая кислота, D-α-аспарагиновая кислота и D-β-аспарагиновая кислота [Fujii, 2005]. Доктора Фудзии также показали увеличение количества пептидов содержащих D-β-аспарагиновую кислоту в клетках облученной ультрафиолетом кожи [Fujii et al., 2002]. В обзорной статье Норико Фуджи по увеличению содержания D-аминокислот в тканях в процессе старения описывает увеличение содержания D-аспартата и D-серина в β-амилоидных белках мозга и других тканей в процессе старения [Fujii et al., 2002]. Исследования Ингросо и Перна показали увеличение содержания D-аминокислот в клетках эритроцитов [Ingrosso et al., 1998]. Исследования Павела, Вайна и Гроссмана показали аккумуляцию D-аспартата в эластиновых белках в процессе старения [Powell et al., 1992].

Из всех аминокислот, аспартат наиболее подвержен рацемизации в белках, вследствие чего, активность белков в обмене веществ снижается. Аккумуляция D-аминокислот в белке приводит к изменению стереоструктуры белка и приводит к его деактивации.

D-аминокислоты были обнаружены в зрачках при катаракте, в мозге при заболевании Альцгеймера и в аорте при артериосклерозе у престарелых доноров. D-Asp был обнаружен в человеческих α зрачках в А-кристаллине, и в Б-кристаллине и мозге в β-амилоидных белков.

До недавнего времени учёным не удавалось определить механизм формирования D-аспартата в белках и показать что аспартат

## Введение

рацемизируется повсеместно или не только на специфических участках определённых белков.

Группа Норико Фудзии показала, что D-Asp наблюдается только на специфических участках определённых белков. Исследования проведённые Сусуму Обтани, Тоссихару Амамото, Хауро Сугумото, Миеко Сашима и Масанобу Сатох в зубо-врачебном колледже Канагава в Японии показали, что в процессе старения повышается уровень D-аспартата в зубах мышей с ускоренным процессом старения.

Учёные использовали газовую хроматографию для определения D-аминокислот в белках зубов мышей.

В белках человеческих  $\alpha$  зрачков, А-кристаллине и в Б-кристаллине формирование D-аспартата и  $\beta$ -аспартата происходит одновременно. Это указывает на то, что формирование D-аспартата в белках происходит через сукцинимид-посредника.

Важность теоретического исследования влияния неферментативной модификации аминокислотных остатков на структуру и функциональные характеристики ионных каналов обусловлена несколькими причинами.

Во-первых, экспериментально установлены возрастные изменения содержания основных клеточных катионов калия и натрия в мышечной клетке сердца и генетически обусловленными возрастными изменениями в структуре калиевых каналов, следствиями которых, является усиление неферментативной рацемизации аминокислотных остатков каналов.

Во-вторых, отмечается, что патогенез болезней характерных для людей пожилого возраста связан с НРА белков вовлеченных в патофизиологические процессы при данных заболеваниях. Так существуют данные о вовлечении NMDA-рецепторов в патофизиологические процессы при указанных хронических заболеваниях мозга.



# Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

## 1.1. Изменения ионного и хирального гомеостаза при старении и в патологических состояниях

Хиральная чистота ферментов и, вообще, полипептидов, синтезируемых на рибосомах, относительна. Несмотря на стерические затруднения процесс рацемизации аминокислотных остатков идет и в белках. Малая скорость процесса приводит к тому, что в большинстве белков изменения структуры и функций вследствие изменения хиральности звеньев полипептидной цепи обычно не наблюдаются, т.к. за небольшое время жизни белков в клетке рацемизация даже какого-либо одного остатка не успевает пройти. Однако существуют долгоживущие белки, такие как дентин зубов или  $\alpha$ -кристаллин хрусталика глаза, в которых за время жизни белка хиральные дефекты успевают накопиться. Это свойство долгоживущих белков давно используется для определения хронологического возраста, особенно в судебной практике.

В составе белков наиболее нестабилен по отношению к рацемизации остаток аспарагина [Hipkiss, 2001]. При его спонтанном деаминировании могут образовываться четыре продукта: L- и D-изомеры аспартата и изоаспартата. Но остаток аспарагиновой кислоты также нестабилен и изомеризуется с образованием D-изомеров аспартата и изоаспартата, а также L-изоаспартата [Fujii, 1996; Fujii, 1994]. При окислительном стрессе неустойчивость аспарагина еще более возрастает [Ingrosso, 2004]. Поскольку спонтанная дегградация аспарагина идет с заметной скоростью, в ходе эволюции появился специальный механизм репарации его последствий: в клетках имеется специальный фермент – аминотрансфераза белкового изоаспартата (PIMT), – который специфично метилирует свободную  $\alpha$ -карбоксильную группу D-аспартата или изоаспартата. Это облегчает образование сукцинимиды, из которого затем образуется аспарат, но полной репарации до аспарагина не происходит [Hipkiss, 2001]. У мышей с дефектным ферментом PIMT уменьшается продолжительность жизни, наблюдается дисфункция нервной системы, а в мозге накапливаются аберрантные белки.

Рацемизация аспарагина и аспартата в составе белков может непосредственно влиять на механизмы репарации ДНК и апоптоз и, таким образом, на процессы старения и развития некоторых патологий. Уменьшение активности апоптоза может приводить к пролиферации клеток и онкогенезу, а увеличение его активности или изменение специфичности – к таким нейродегенеративным заболеваниям, как

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

болезни Альцгеймера и Паркинсона, амиотрофический латеральный склероз.

В апоптозе важную роль играют специфические протеазы – каспазы, которые содержат аспартат в активном центре и расщепляют субстраты по остатку аспарагиновой кислоты. Очевидно, что деаминирование аспарагина до аспартата приводит к появлению новых центров расщепления и к исчезновению точек N-гликозилирования белков, что может изменять профиль активности каспаз. При изменении структуры активного центра каспазы ее активность уменьшается или полностью исчезает.

В механизме репарации ДНК участвует множество ферментов. В частности последствия окислительного стресса, приводящего к образованию 8-оксогуанина, ликвидируются ферментом 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой (hOGG1). У линии быстро стареющих мышей обнаружены мутации гена hOGG1, приводящие к заметному снижению активности и термоустойчивости этого фермента, поэтому его считают по крайней мере частично ответственным за накопление дефектов в ДНК при старении. Существенно, что hOGG1 имеет в активном центре триплет остатков аспарагина (положения 149–151), которые обеспечивают связывание этого фермента с ДНК [Bruner, 2000]. С другой стороны, при мутации, приводящей к замене аспарагина на аланин в активном центре сходного фермента – тимин-ДНК-гликозилазы человека, этот фермент теряет активность. Поэтому можно предполагать, что рацемизация аспарагина и аспарагиновой кислоты в составе ферментов репарации ДНК может быть ответственна, хотя бы частично, за накопление дефектов в ДНК, сопровождающее старение.

Для появления хиральных дефектов в полипептидной цепи белка необходимо время, поэтому для нормальной жизни клетки важно четкое сопряжение процессов синтеза и разрушения белков. С возрастом скорость этих процессов снижается, что приводит к увеличению сроков использования белков в клетках и, соответственно, к увеличению вероятности появления дефектов в их структурах [Hardeland, 2000; Ward, 2000]. Кроме того, с возрастом, по-видимому, снижается и способность клетки к репарации белков, что проявляется в известном факте накопления aberrантных белков при старении. Конечно, источников aberrантных белков множество и помимо процессов рацемизации, но мы их здесь рассматривать не будем. Важно отметить, что накопление aberrантных белков нелинейно связано с их действием. Сильно

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

окисленные белки, например, могут образовывать конгломераты, не поддающиеся протеолизу и даже ингибирующие протеосомальный механизм деградации белков. В других случаях aberrантные белки могут оказывать токсическое действие на клетки. В любом случае, превышение некоторого критического уровня aberrантных белков в клетке может привести к возникновению положительной обратной связи в этом процессе.

Среди молекулярных патологий, связанных со старением, следует отметить т.н. молекулярные ошибки считывания [van Leeuwen, 2000]. Под эти понимают делецию динуклеотида ( $\delta$ -GA,  $\delta$ -GU) в мРНК в области простых повторов – мотивов типа GAGAG – при транскрипции. Если механизмы контроля качества транскрипции не устранят дефект, что происходит довольно часто у пожилых людей (старше 51 года), в процессе трансляции появится мутантный белок. Такие белки принято называть (+1)-белками. Полипептидная цепь такого белка имеет нормальный N-конец, но от места делеции до C-конца первичная структура будет совсем другой. Если в измененной области находятся функционально значимые участки, то белок полностью или частично теряет свою функциональность. Такой тип мутаций обнаружен в клетках разных типов. В частности, ошибки считывания происходят в генах, связанных с болезнью Альцгеймера (убиквитин (UBB), предшественник  $\delta$ -амилоида (APP)). Дефектные белки AP(+1) и UBB(+1) накапливаются в типичных участках патологии (бляшках, узлах, тяжах) в мозге. Убиквитин(+1) не способен связываться с белками и, более того, ингибирует протеосомы, поэтому замедляется «круговорот» белков в клетках, что способствует включению механизмов повреждения клетки за счет рацемизации аминокислот.

Существуют данные о том, что даже следы ионов металлов, попадающие в реакционную смесь из стекла, могут приводить к заметному ускорению рацемизации, аспартата в растворе, которая затрудняет точное определение соотношения концентраций энантиомеров [van den Oetelaar, 2000]. В этой связи интересно, что многие продукты питания, в том числе и диетические, содержат D-аминокислоты в больших концентрациях, что объясняется способами их предварительной обработки, ускоряющими рацемизацию [Sarkadi, 2004]. Многие продукты, например, молочнокислые, содержат D-аминокислоты бактериального происхождения. Но и в таких продуктах, как свежие фрукты и овощи уровень D-аминокислот довольно

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

высок. Пока не ясно, к чему приводит избыточное потребление D-аминокислот с пищей.

Исследование энантиомерного состава аминокислот единичных клеток показало, что свободные D-аминокислоты, особенно аспарат и глутамат, встречаются в значительных концентрациях в нейронах различных животных, а в нейронах аплизии – традиционной модели в нейробиологии – содержание D-глутамата было выше, чем L-глутамата [Quan, 2003].

Комплексы аминокислот с ионами переходных металлов проявляют каталитические свойства при синтезе энантиомеров хиральных веществ из ахиральных предшественников. При этом, хиральность аминокислоты в составе катализатора влияет на хиральность образующегося продукта. Поскольку в клетках различного происхождения присутствуют свободные D-аминокислоты, появление в клетке ионов переходных металлов может приводить к формированию катализаторов, ускоряющих рацемизацию аминокислот. Это имеет непосредственное отношение к проблемам загрязнения окружающей среды ионами тяжелых металлов.

Активный транспорт ионов натрия и калия через клеточную мембрану – очень энергоемкий процесс, поэтому при старении, когда ресурсы организма уменьшены, можно ожидать, что активность Na-насоса в клеточных мембранах будет снижаться. Это было подтверждено экспериментально на крысах [Koçak, 2002]. Дополнительной нагрузкой для системы поддержания ионного гомеостаза являются ионные каналы, образуемые в мембранах растворимыми амилоидными белками [Quist, 2005]. Эти каналы, в частности, могут приводить к повышению внутриклеточного содержания свободного кальция до токсического уровня. Помимо этого, активные формы кислорода, в частности, перекись водорода, уровень которой в некоторых клетках мозга повышается при нейродегенеративных заболеваниях и старении, приводят к накоплению в этих клетках анионов хлора, зависящему от концентраций  $K^+$  и  $Ca^{2+}$  [Sah, 1999]. Уменьшение трансмембранных градиентов  $Cl^-$  может приводить к снижению эффективности ГАМК<sub>A</sub> рецепторов. В то же время хорошо известно, что самые различные ферменты (оксидазы, редуктазы и др.) при образовании комплексов с ионами переходных металлов продуцируют всевозможные активные формы кислорода.

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

Таким образом, ионный гомеостаз, особенно по отношению к ионам переходных металлов, в значительной мере определяет интенсивность разнообразных процессов, сопровождающих старение и возникновение патологических состояний клетки, таких как рацемизация аминокислот, образование аберрантных белков и их конгломератов и т.п. и в то же время эти процессы влияют на ионный гомеостаз.

Поскольку энантимеры аминокислот эквивалентны с точки зрения термодинамики, то замкнутая система с любым соотношением их концентраций со временем перейдет в состояние с нулевой хиральной поляризацией. Константы скорости рацемизации сильно зависят от температуры, поэтому при повышенной температуре рацемизацию легко наблюдать в эксперименте. Открытые системы, такие как ТПС океана или гидротермальные источники, характеризуются наличием градиентов температуры и конвекционным переносом вещества. Аппарат химической кинетики, разработанный для условий термического равновесия, при наличии больших градиентов температуры следует применять с осторожностью, т.е. заранее не ясно, как изменяются активационные характеристики реакций рацемизации в данной среде при наличии резких градиентов температуры. Если кинетика рацемизации L- и D-изомеров сколько-нибудь различна в изотермических условиях, то при наличии резких градиентов температуры эти различия могут, как усиливаться, так и уменьшаться.

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

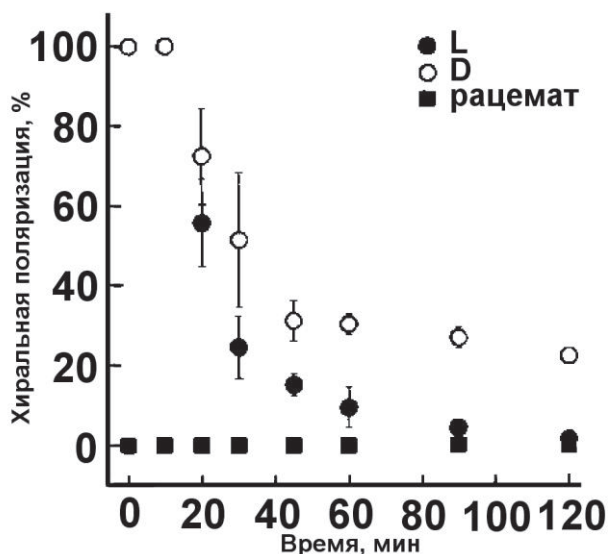


Рис. 1.1. Зависимость хиральной поляризации раствора аланина от времени. Приведены половины стандартных отклонений от средних значений хиральной поляризации, определенных по 3–5 независимым экспериментам.

Экспериментально влияние градиента температуры на кинетику рацемизации можно определить в модельной системе – проточном реакторе с большим перепадом температур между входом и выходом. В экспериментах были использованы две камеры с перемешиванием, одна объемом 15 мл, нагретая до 230 °С, и другая, большего объема, поддерживаемая при температуре 0 °С. Давление в обеих камерах составляло около 24 МПа. Раствор, содержащий либо хирально чистые энантиомеры аланина, либо его рацемат, проходил через отверстие диаметром 0,8 мм из горячей камеры в холодную со скоростью около 8 мл/мин. Направление подачи раствора изменялось на противоположное через каждую минуту. В начале каждого эксперимента (продолжительностью 2 часа) температура горячей камеры была комнатной, через 15 мин она достигла 150 °С, а через 20 мин – стационарного значения 230 °С. Изменение хиральной поляризации определяли в пробах, отбираемых из холодной камеры, стандартным методом с помощью ВЭЖХ с хиральными носителями [Aswad, 1994].

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

Все исходные растворы аланина имели концентрацию 50 мМ и рН 5,7 при комнатной температуре. В конце эксперимента рН растворов изменялся и становился 7,6 в случае L-аланина и 7,8 в случае D-аланина. Зависимость хиральной поляризации от времени приведена на рис. 1.1. Очевидно, что при использовании в исходного вещества D-аланина хиральная поляризация конечной смеси оказывается существенно больше, т.е. рацемизация D-аланина проходит существенно медленнее, чем L-аланина.

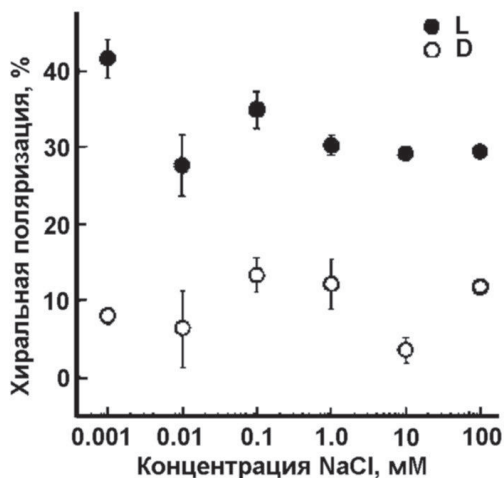


Рис. 1.2. Зависимость хиральной поляризации системы, измеренной через 2 ч после начала эксперимента, от концентрации добавленного NaCl.

Для проверки влияния рН раствора на кинетику рацемизации были проведены эксперименты с фиксированными значениями рН в холодной камере. Величину рН поддерживали постоянной, добавляя необходимое количество HCl или NaOH в холодную камеру. Результаты свидетельствуют, что нет существенных различий в кинетике рацемизации при фиксированных значениях рН 4 и рН 8 в холодной камере.

Для проверки возможной зависимости кинетики рацемизации от солевого состава среды были проведены эксперименты с добавлением в раствор NaCl в различных концентрациях. Результаты приведены на рис.

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

1.2. Существенно, что в присутствии NaCl наблюдается инверсия кинетики рацемизации: хотя скорость рацемизации D-аланина не изменяется, но скорость рацемизации L-аланина существенно падает. При этом эффект наблюдается в диапазоне концентраций NaCl менее 1 мкМ.

Очевидно, что независимо от состава исходной смеси, хиральная поляризация раствора, в конце концов, станет равной нулю, и чем выше температура, тем скорее. Однако циклическое смещение раствора из горячей области в холодную возможно пространственное разделение энантиомеров, подобно тому, как происходит разделение веществ и ионов в параметрическом насосе. При этом результат разделения энантиомеров может существенно зависеть от распределения концентраций ионов в среде.

Поскольку в ТПС океана, помимо температурного градиента, имеются градиенты концентраций ионов, можно предполагать, что и в этой системе циклические смещения жидкой фазы за счет термокапиллярной и термогравитационной конвекции приведут к пространственному разделению энантиомеров хиральных веществ.

Существенные различия в поведении L- и D-изомеров аминокислот в различных физико-химических условиях вряд ли могут быть объяснены непосредственно нарушением четности при слабых взаимодействиях, поскольку различия в полных энергиях молекул составляют по порядку величины около  $10^{-17}$  кТ. Однако имеются данные и о различиях физико-химических свойств гомохиральных олигопептидов – полиглутамата и полилизина, имеющих по 24 остатка L- или D-энантиомеров аминокислот [Scolnik, 2006]. Олигопептиды разной хиральности имели различные рН денатурации, различные теплоты переходов спираль–клубок и т.д. Добавление тяжелой воды (4:1) изменяло поведение поли-L-глутамата и значительно меньше влияло на поведение поли-D-глутамата, при этом различия в поведении олигопептидов исчезало. Авторы работы связывают эти эффекты с различной гидратацией L- и D-олигопептидов, причиной которой может быть наличие магнитных свойств у орто-воды (вода на 75% состоит из орто-воды и на 25% из пара-воды), из-за которых ее взаимодействие с L-олигопептидом должно быть несколько более сильным, чем с D-олигопептидом. Такое объяснение находится в качественном согласии с полученными данными.



## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

В отличие от аминокислот входящих в состав пептидов, увеличение концентрации D-энантимеров свободных аминокислот наблюдается на ранних стадиях развития и уменьшается в процессе старения. Они могут работать как факторы, контролирующие развитие и дифференцировку клеток в органах.

Группа Данлопа отметила увеличение концентрации свободного D-аспартата в клетках мозга и сетчатки на ранней эмбриональной стадии развития организмов мышей и человека. В клетках мозга на 14-ой неделе развития человеческого эмбриона до 60% всего свободного аспартата находится в D-форме. Однако, к моменту рождения D-аспартат практически обнаруживается.

Исследования проведенные Хашимото выявили функцию свободного D-серина в клетках мозга как рецептор активизируемый N-метил-D-аспартатом (NMDA). Последующие исследования Волоскера показали, что рацемизация L-серина в D-серин в клетках мозга катализируется сериновой рацемазой и расщепляется D-аминоксидазой.

D-аспартат и D-серин в свободной форме были обнаружены в клетках яичек, пинеальной железы и надпочечников крыс. Отношения L/D энантимеров изменяется в процессе развития и старения организма. В клетках пинеальной железы у крыс уровень D-аспартата увеличивается до 30-40% от всего свободного аспартата между 4ой и 10ой неделями жизни и постепенно снижается вплоть до 36ой недели.

Появление D-аминокислот в белках в процессе старения остаётся неисследованным направлением в фармакологии. Многие антибиотики, включая пенициллин, D-стереоспецифичны и работают по пептидным связям D-аминокислот распространённых в белках бактерий. Пенициллин например работает по пептидным связям D-аланина, входящего в состав бактериальных мембранных белков.

Следует предположить, что с увеличением отношения D-аминокислот к L-аминокислот в белках старших организмов, D-стереоспецифичные антибиотики могут оказывать более активное действие на белки организмов более позднего возраста. Поэтому, стереоспецифичные фармацевтические средства должны проходить тестирование на организмах в разных возрастных категориях и употребление D-стереоспецифичных антибиотиков следует ограничивать в зависимости от возраста.

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

D-аминокислоты могут спонтанно появляться в организме в результате естественной рацемизации, так же могут попадать в организм из вне, как фрагменты бактерий и могут целенаправленно синтезироваться в организме (D-серин) как нейропептид (нейротрансмиттер).

В хрусталике глаза с возрастом происходит рацемизация Аспарагиновой кислоты в  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - кристаллине. В кристаллине Аспарагиновая кислота превращается в D-аминокислоту не везде, а только в определенных местах, где есть подходящее окружение, которое зависит как от первичной, так и от вторичной и третичной структуры белка.

Рацемизация Аспарагиновой кислоты приводит к ускорению агрегации  $\beta$ -амилоидного белка в мозге и, следовательно, к развитию Атеросклероза.

D-аминокислоты содержащие протеины были обнаружены в эластичных волокнах кожи лица у пожилых. Рацемизация происходит, по видимому, по действием ультрафиолета.

Было показано, что D-аспарагиновая кислота накапливается в тканях зубов (эмале и денте). У 60-летник около 8% всей Аспарагиновой кислоты находится в D-форме. Предполагают, что D-аспарагиновая кислота накапливается в фосфофоре (phosphophoryn).

D-аспарагиновая кислота найдена в фрагментах коллагена I-типа в моче. D-аминокислоты были обнаружены у дрожжей и бактерий. Недавно были обнаружены небольшие D-аминокислоты содержащие пептиды у позвоночных и беспозвоночных. Дерморфин был выделен из кожи лягушки. Он является опиоидным пептидом. Для его активности необходим D-Ala.

Также D-аминокислоты содержащие пептиды были выделены у некоторых видов улиток. Длинный пептид содержащий D-аминокислоты был выделен из яда паука (D-Ser).

Свободные D-аминокислоты были найдены в тканях млекопитающих, в основном в мозгах. Так же недавно они найдены в эндокринных органах.

Попавшие в организм и синтезированные в организме D-аминокислоты транспортируются в ткани, где они окисляются D-аминокислотной оксидазой и D-аспартат оксидазой до кетокислот. Если D-аминокислоты не утилизируются в организме, то они аккумулируются

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

в тканях и могут вызывать там серьёзные повреждения. С возрастом активность этих оксидаз повышается.

Алюминиево-аминокислотный комплекс может моделировать топологию ДНК. При этом алюминий может выступать в качестве катализатора рацемизации.

Реакция цепного окисления липидов играет важную роль в развитии многих патологических процессов, включая так же и процесс старения. АФК чаще повреждают митохондриальную ДНК.

Между прочим, уместно заметить, что медицинская статистика уже засвидетельствовала полную не эффективность антиоксидантов в профилактике старения человека, живущего в относительно комфортных условиях современной цивилизации. Чувствительность тканей к оксидативному повреждению ДНК и/или сама оксидативная опасность, действительно, могут стать угрозой для сердца, мозга и скелетных мышц при старении, но первопричину этого надо искать в возрастзависимом изменении уровня нейротрофического и нейроэндокринного снабжения тканей, а также в нарушении экспрессии структурных генов, находящиеся под контролем собственных редусом тканей мишеней.

Синтетические антиоксиданты, по видимому, играют регуляторную роль, а не роль «антиоксиданта», в деле защиты организма от АФК.

Деструктивный потенциал перикисного окисления был использован природой для совершенствования ряда катобалических процессов, например, внутриклеточного пищеварения, фагоцитоза, окислительной деструкции чужеродных и токсических веществ, разборки избыточных мембранных структур. АФК участвуют в регуляции внутриклеточного уровня кальция.

Мозг животных и человека, и нервная система в целом, играют ключевую роль в старении высших организмов и могут с возрастом подвергаться прогрессирующим изменениям, прежде всего износу, на всех уровнях организации - структурно, биохимически и функционально.

Связь между нервной и иммунной системами опосредуется гормонами и нейромедиаторами, которые достигают лимфоидных органов и клеток через кровь или прямые связи с вегетативной нервной системой. Нейроэндокринные-иммунные взаимодействия осуществляются циркуляцией гуморальных факторов эпифизарно-гипоталамо-гипофизарной системы, либо непосредственно нейропептидами и гормонами, либо опосредовано через действие

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

компонентов этой системы на секрецию гормонов периферических эндокринных желез, которые тоже обладают иммуномодулирующей активностью. По-видимому, нейроэндокринная система действует не только как модулятор иммунной системы, но так же как мишень для сигналов, генерируемых в иммунной системе. Эти реципрокные связи между нейроэндокринной и иммунной системами имеют место в течение всей жизни, но приобретают особое значение в период старения.

В последние годы было установлено, что некоторые иммуномодуляторы, в частности витамин Е, калорийно-ограниченная диета и физические упражнения, вакцины, пептидные препараты тимуса могут восстанавливать компетентность иммунных клеток в старом организме и увеличивать ПЖ животных.

Эндотоксин (ЭТ) или липополисахарид (ЛПС) входит в состав *грамотрицательных бактерий* которые в большом количестве находятся в нашем кишечнике и имеет в своей структуре общий для ЭТ любого происхождения гидрофобный фрагмент - *липид А*, обладающий очень широким спектром свойств, которые могут иметь как полезную, так и патогенную направленность своего биологического действия. ЛПС способен активировать протеинкиназу С (снимать репрессию с генома) и нейроглию, взаимодействовать с Toll-рецепторами (активировать врожденный и адаптивный иммунитет), регулировать активность системы гемостаза, вызывать лейкоцитоз и лейкопению, обуславливать развитие практически всех синдромов: ДВС, АФЛ, SIR, острой полиорганной недостаточности, др.

Было показано, что кишечный ЛПС всегда присутствует в общем кровотоке в связанном с гранулоцитами состоянии, а концентрация его в плазме крови колеблется от 0 до 1,0 EU/мл, т.к. поступает кишечный ЭТ в общий кровоток дробно, по мере необходимости, которая определяется активностью симпатoadреналовой системы. Объем поступления кишечного ЛПС в общую гемоциркуляцию определяет уровень активности практически всех систем организма. Наиболее «нуждающимся» в ЭТ органом является печень, потребляющая до 95% всего кишечного ЛПС, под воздействием которого ее система фиксированных макрофагов синтезирует столь необходимые для неспецифической резистентности факторы противоопухолевого (ФНО-а), антибактериального (интерлейкины) и противовирусного иммунитета (интерфероны). Непотребленный печенью ЭТ выводится с желчью. Другая часть кишечного ЛПС (около 5%) вбрасывается в общий кровоток

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

по портокавальным анастомозам и определяет уровень активности иных систем, включая мышечную (у спортсменов кон-центрация ЭТ значительно выше). Главной ЛПС-акцептирующей клеткой крови являются гранулоциты, которые при взаимодействии с эндотоксином активируются и рекрутируются в «пристеночный пул» и выполняют функцию «пограничников-камикадзе» в слизистых оболочках.

«Эндотоксиновая агрессия» (ЭА) как общепатологическое явление, без которого не обходится патогенез ни одного из воспалительных процессов (к числу которых относится и атеро-склероз), был постулирован также отечественными учеными. Избыток ЛПС при абсолютной или относительной недостаточности антиэндотоксинового иммунитета (АЭИ) манифестируется в виде той или иной нозологической формы болезни при наличии генетической предраспо-ложенности к ней и/или действию локальных и общих внешних факторов. Главными причинами развития и прогрессирования Эндотоксиновой агрессии являются: стресс, дисбактериоз кишечника и недостаточность ЭТ-потребляющих (печень, мышцы), связывающих (белки, липотеиды и клетки крови) и эли-минирующих (почки, печень, легкие, кожа, др) органов и систем. ЭА инициирует развитие ате-росклероза (прямо и опосредовано) за счет способности вызывать: альтерацию и десквамацию эндотелиальных клеток (эндотелиальную дисфункцию) и пролиферацию практически всех клеток соединительной ткани и гладкомышечных и целый ряд других серьезных заболеваний.

### **1.2. Механизмы неферментативной модификации белков организма**

Накопление изменений – главный элемент старения организма [Ritz-Timme & Collins, 2002]. Одно из таких изменений, происходящее в аминокислотах белков, – это рацемизация. Общеизвестно, что белки синтезируются, используя только одну оптически активную форму аминокислот – L-аминокислоты. Однако через определенное время оптическая чистота такого раствора теряется за счет медленной рацемизации его аминокислот. В конечном счете, когда относительные соотношения D- и L-аминокислот становятся равными, наступает равновесие. Еще 1936 году В. Канн утверждал [Kuhn, 1936, 1958], что сохранение оптической чистоты в человеческом организме – «серьезная кинетическая, термодинамическая и, в конечном счете, жизненно важная

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

проблема». Однако аналитические ограничения не позволили ему выяснить, что будет происходить в организме при нарушении оптической чистоты с возрастом [Kuhn, 1955, 1958].

Только в начале 70-х годов прошлого века экспериментально была установлена связь между возрастом и рацемизацией аминокислот. Причем, эта связь была установлена не в ходе биомедицинских исследований, а в результате анализа хиральности аминокислот в лунном камне и метеоритах [Kvenvolden et al., 1970]. В этих исследованиях, впервые, проведен анализ кинетики рацемизации аминокислот. Дж. Бада использовал рацемизацию аминокислот для определения возраста кости [Bada & Protch, 1973]. Большинство аминокислот медленно аккумулировало D-аминокислоты, но Asx<sup>1</sup> рацемизировались достаточно быстро, чтобы их можно было обнаружить не только в археологической кости, но и в живом человеческом организме. Позднее было обнаружено увеличение количества D-Asx в эмали и дентине зубов человека с возрастом, а также тесная зависимость между концентрацией D-Asx и возрастом этих тканей (особенно в дентине) [Helfman & Bada, 1975, 1976]. Было высказано предположение, что в естественных условиях рацемизация Asx – достаточно распространенное явление в метаболически с табильных белках млекопитающих, а также увеличение количества метаболически инертных белков, подвергшихся конформационным изменениям, с возрастом из-за рацемизации их аминокислот [Helfman et al., 1977].

Аккумуляция D-Asx характерна для многих тканей человека и животных и тесная связь между рацемизацией Asx и возрастом долгоживущих белков используется для развития точных методов определения возраста в судебной медицине [Ogino et al., 1985, Ritz et al., 1993, Mornstad et al., 1994, Fu et al., 1995, Ohtani, 1995, Ritz-Timme, 2000]. По мнению Хельмана, рацемизация все больше и больше используется как критерий сроков жизни белков *in vivo* [Helfman et al., 1977]. Рацемизация используется для исследования изменения в тканях и патогенеза типичных болезней пожилого возраста, таких как хроническая эмфизема легкого, атеросклероз, дегенеративная дисфункция суставного хряща [Shapiro et al., 1991, Powell et al., 1992, Maroudas et al., 1998, Gineyts et al., 2000, Verzijl et al., 2000].

---

<sup>1</sup> Asx это общее название для Asn и Asp

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

На сегодняшний день, не вызывает сомнений, что рацемизация Asx:

1) это неизбежный процесс в ходе естественного старения белков и широко распространенное явление, спонтанно происходящее в различных тканях человека и животного;

2) может использоваться в качестве молекулярного индикатора старения белков и для идентификации долгоживущих белков, стареющих вместе с человеческим организмом;

3) в основном действует на долгоживущие структурные белки, но, в некоторых временных интервалах, может быть значительной для сигнальных белков и ферментов;

4) может происходить как вторичное явление, вызванное деградацией белков, например в патологических состояниях,

5) имеет важные патофизиологические последствия и играет существенную роль в патогенезе болезней пожилого возраста.

Таблица 1.1

Ткани, содержащие значительные концентрации долгоживущих белков в которых установлена аккумуляция D-Asx в ходе старения

№ п/п	Ткань	Литература
1	Зубной дентин	Helfman & Bada, 1976, Ritz et al., 1993, Mornstad et al., 1994, Ohtani, 1995
2	Зубная эмаль	Helfman & Bada, 1975
3	Зубной цемент	Ohtani et al., 1995
4	Позвоночные диски	Ritz & Schultz, 1993
5	Суставный хрящ	Maroudas et al., 1992, 1998
6	Хрящ	Pfeiffer et al., 1995a, Verzijl et al., 2000
7	Кожа	Fujii et al., 1987, Verzijl et al., 2000
8	Кость (коллаген I, телопептиды, остеокальцин)	Ritz et al., 1994, 1996, Pfeiffer et al., 1995b, Ohtani, 1998, 1998a, 1998b, Brady et al., 1999, Gineyts et al., 2000

Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной  
модификация белков организма в норме и патологии

9	Глазной хрусталик ( $\alpha$ A-кристаллин)	Masters et al., 1977, 1978, Vandenoetelaar & Hoenders, 1989, Groenen et al., 1990, Fujii et al., 1997, 1999a, 1999b, George et al., 1999
10	Головной мозг (белое вещество, миелиновый белок, $\tau$ -белок, синапсин, протеогликаны, тубулин)	Man et al., 1983, Johnson & Aswad, 1985, Fisher et al., 1986, Shapira et al., 1987, 1988, Payan et al., 1992, Roher et al., 1993, Kenessey et al., 1995, Paranandi & Aswad, 1995, Najbauer et al., 1996, David et al., 1998, Watanabe et al., 1999
11	Легочная паренхима (эластин)	Shapiro et al., 1991
12	Стенка артерии (эластин)	Powell et al., 1992
13	Мембранные белки эритроцитов	Brunauer & Clarke, 1986, Inaba et al., 1992, Galleti et al., 1995, Perna et al., 1997, Ingrosso & Perna, 1998
14	Печень (сериновая гидроксиметилтрансфераза)	Di Salvo et al., 1999
15	Сердечная мышца	Kinzel et al., 2000

Для свободных аминокислот, быстрая рацемизация Asx относительно других аминокислот первоначально объяснялась простой кислотно-щелочной химией  $\alpha$ -углерода [Neuberger, 1948, Bada, 1984], но в белках относительно быстрая рацемизация остатков Asx происходит до гидролиза пептидных связей.

Рацемизация происходит в пятичленном кольце сукцинимида (Asu), который образуется, когда боковая цепь конденсируется с N+1 пептидной связью азота [Clarke, 1987, Geiger & Clarke, 1987, Lowenson & Clarke, 1988, Capasso et al., 1992], потому что хиральный центр Asu может легко рацемизироваться [Radkiewicz et al., 1996]. Однако Asu – нестабильная структура, подвергающаяся быстрому гидролизу в любом месте имидного азота (NH-группа), чтобы произвести оба  $\alpha$ - и  $\beta$ -связанные остатки Asp. Как правило, гидролиз  $\alpha$ -углерода производит



## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

остатки isoAsp и Asp в соотношении 3 к 1 в гибких последовательностях [Capasso & Di Cerbo, 2000]. Скорость реакции остатков Asn больше чем остатков Asp, но в этом случае образование Asu вызывает диамидирование. Следовательно, через какое-то время два остатка Asn и Asp распадутся на четыре остатка: L-Asp, D-Asp, L-isoAsp и D-isoAsp, каждый из которых находится в химическом равновесии с D- и L-Asu (рис. 1.3, 1.4).

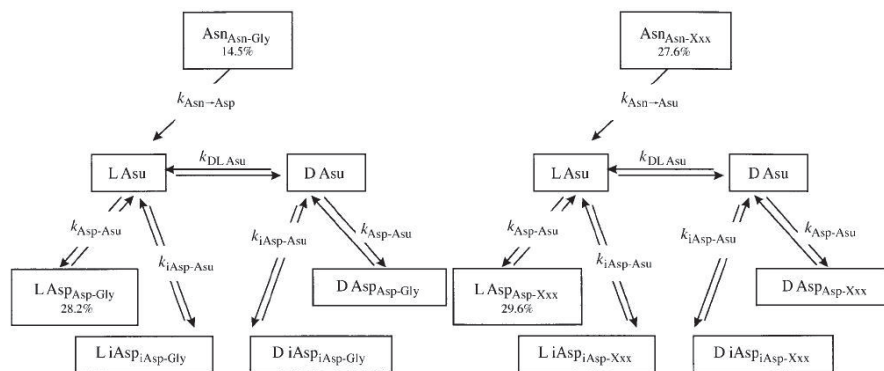


Рис. 1.3. Схема реакции образования L-Asp, D-Asp, L-iAsp и D-iAsp из Asn в белке для остатка Gly, следующего за Asn, и произвольного остатка Xxx [Geiger, 1987]

Ряд продуктов химической реакции, образовавшихся из Asu, оспариваются аналитически и большинство методов не распознают всех этих форм. Масс-спектрометрия может обнаружить массовые изменения, вызванные диамидированием [Robinson & Robinson, 2001a], но ни один из Asp-изомеров не является легко распознаваемым [Lehmann et al., 2000]. Ферментативное метилирование, употребляющее PIMT [Lowenson & Clarke, 1992], может распознать isoAsp и D-Asp, но не может различить их и не может распознать остатки недоступные ферменту [Aswad et al., 2000]. Аминокислотный анализ может разделять L- и D-Asp, но не  $\beta$ -связанные остатки. Только иммунологические методы могут различать индивидуальные изомерные формы и этот метод все больше используется

Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной  
модификация белков организма в норме и патологии

для исследования роли рацемизации в старении белков [Lehrman et al., 1992, Fledelius et al., 1997, Brady et al., 1999, Fujii et al., 2000, Shimizu et al., 2000].

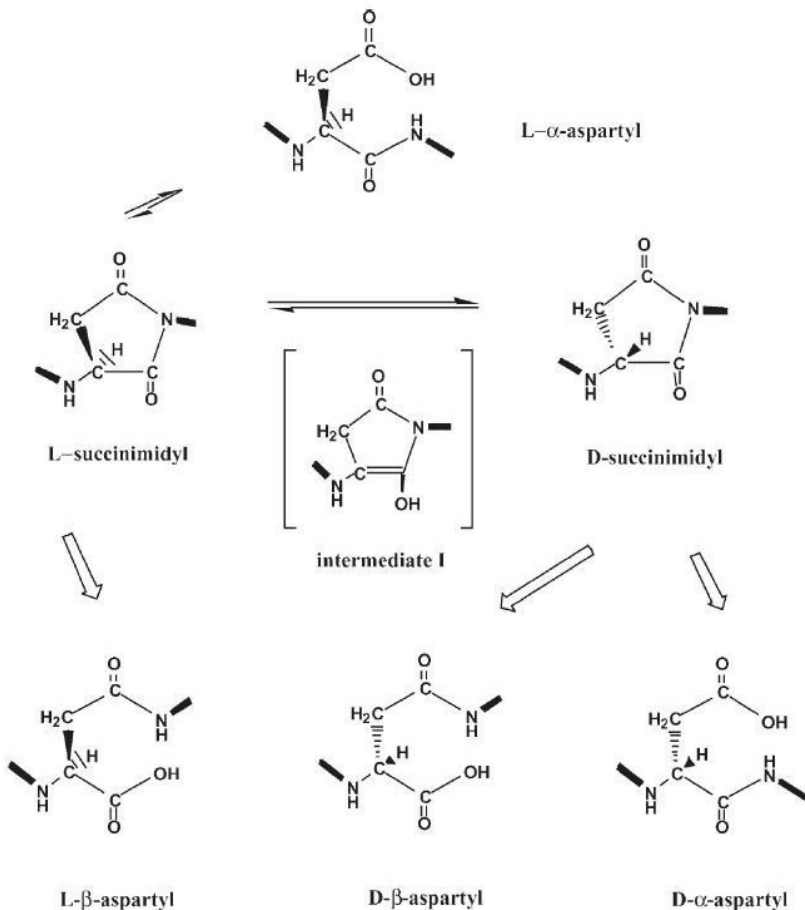


Рис. 1.4. Схема реакции спонтанной рацемизации и изомеризации Asp в белке [Nakamura, 2006]

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

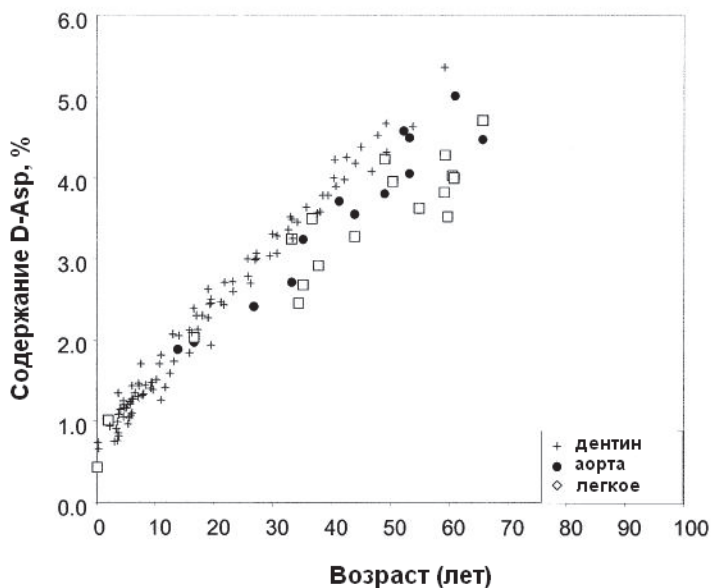


Рис. 1.5. Тесная взаимосвязь между возрастом и содержанием D-Asx в дентине, легком и аорте

Физико-химические параметры аминокислотных остатков определяют скорость рацемизации Asx *in vivo*. Т.к. физические параметры, такие как концентрация, pH и температура, являются в значительной степени постоянными [Capasso et al., 1991, Brennan & Clarke, 1993], скорость рацемизации (и скорость диамирования Asn) зависит главным образом от природы соседних остатков (особенно N+1 остаток [Clarke, 1987, Lowenson & Clarke, 1988, Lura & Schirch, 1988, Wright, 1995, Robinson & Robinson, 2001a]), локальной среды остатка в пределах белков [Fujii et al., 1996, 1999a] и физических ограничений, относящихся к высокоорганизованным структурам [Kossiakoff, 1988, Chazin & Kossiakoff, 1995, Van Duin & Collins, 1998, Xie & Schowen, 1999, Robinson & Robinson, 2001b]. Большинство сайтов образования Asu встречаются в терминальных областях белков [Roher et al., 1993, Di Salvo et al., 1999, Gineyts et al., 2000], около внешней поверхности или в конформационно гибких областях белков [Clarke, 1987, Lowenson &

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

Clarke, 1988, Potter et al., 1993, Capasso et al., 1996, Fujii et al., 1996, 1999a, Noguchi et al., 1998, Capasso & Salvadori, 1999, Sandmeier et al., 1999]. В неограниченных сайтах с подходящей последовательностью (особенно Asx-Gly [Radkiewicz et al., 2001]) рацемизация настолько быстра ( $t = 1$  день – 1 год), что все, особенно недавно синтезированные, белки будут содержать значительный процент D-Asx.

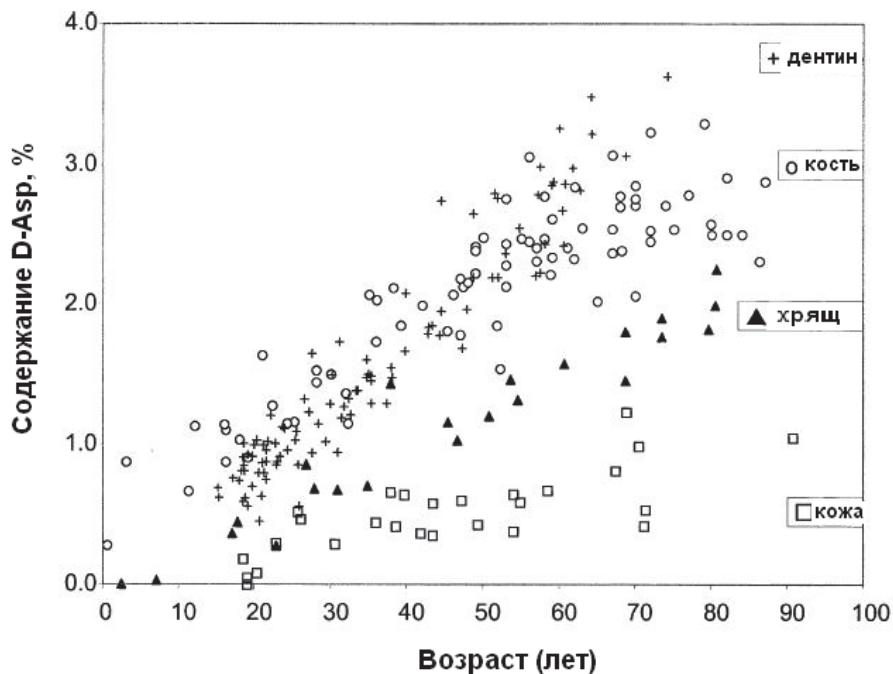


Рис. 1.6. Связь между содержанием D-Asx и возрастом в четырех богатых коллагеном тканях

Конформационно ограниченные сайты и сайты с первичными структурами менее благоприятными для образования Asu накапливают D-Asx медленнее [Kosiakoff, 1988], ведя к аккумуляции, зависящей от возраста. Локальная среда может приводить к равновесным соотношениям D:L большим 1 [Fujii et al., 1996]. Однако в большинстве жестких структур, особенно в тройной спирали коллагена [Van Duin & Collins, 1998] образование Asu эффективно предотвращается.

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

Значительное накопление D-Asx никогда не наблюдалось в богатой коллагеном нерастворимой фракции археологической кости возрастом более десятка тысяч лет [Matsu'ura & Ueta, 1980].

Диамидирование Asn и рацемизация Asx – два процесса, неразрывно связанных между собой. Диамидирование Asn также происходит с образованием Asu и последующим образованием остатков D-Asx и isoAsx [Geiger & Clarke, 1987, Brennan & Clarke, 1993]. Диамидирование Asn-Gly через образование Asu может происходить достаточно быстро в гибких последовательностях ( $t = 1$  день [Robinson & Robinson, 2001a]). Скорость реакции, изменение в химии пептидов и отсутствие систем репарации (PIMT восстанавливает диамидированные остатки Asn до L-Asp) – все это позволяет утверждать, что диамидирование может функционировать как молекулярный таймер [Robinson et al., 1970, Robinson & Robinson, 2001a]. Анализ роли скорости диамидирования [Robinson & Robinson, 2001a, Capasso, 2000] дает возможность оценивать степень диамидирования белков [Robinson & Robinson, 2001b] путем увеличения скорости рацемизации.

Важность учета более высокоорганизованной структуры, установленная в последнем исследовании, выдвигает на первый план проблему использования высоко температурных кинетических показателей для предсказания скорости рацемизации Asx в нативных белках. При более высоких температурах белки будут денатурировать, повышая конформационную свободу отдельных остатков Asx и общее количество остатков Asx, которые могут быть подвержены рацемизации. Коллинс с сотрудниками [Collins, 1999] смогли использовать предиктивную модель для оценки скоростей рацемизации в коллагене при высокой температуре, но эта модель сильно переоценивает скорости *in vivo* [Verzijl et al., 2000].

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

Автономная (в отсутствии патологических состояний) рацемизация Asx может использоваться в качестве молекулярного

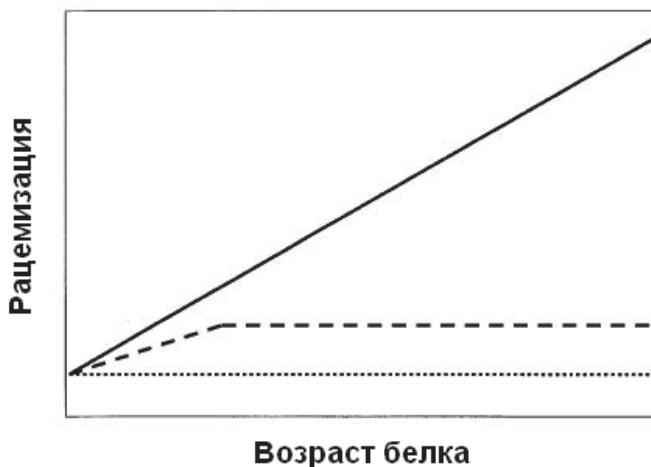


Рис. 1.7. *In vivo* оценка времени жизни белков, основанная на соотношении между возрастом и уровнем рацемизации Asx

индикатора старения белков. Используя эти молекулярные часы можно оценить *in vivo* время жизни внеклеточных белков, т.к. существует соотношение между возрастом определенного белка и содержанием в нем D-Asx, в зависимости от его обновления:

1) Белки со значительным обновлением изменяются перед аккумуляцией D-Asx. Эти белки не показывают аккумуляции остатков D-Asx с возрастом (линия из точек на рис. 1.7).

2) Долгоживущие белки с незначительным обновлением могут накапливать D-Asx. Однако, из-за обновления соотношение между рацемизацией Asx и возрастом не значимо. Равновесие между аккумуляцией остатков D-Asx и L-Asx вновь синтезируемых белков может приводить к значительным концентрациям D-Asx на постоянном уровне (линия из тире на рис. 1.7).

3) Только в стабильных белках без какого-либо обновления можно обнаружить тесную зависимость между аккумуляцией модифицированных Asx и возрастом: концентрация D-Asx увеличивается

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

с возрастом (сплошная линия на рис. 1.7). Это может быть основой для идентификации стабильных и долгоживущих белков, стареющих вместе с организмом человека.

Созревшие мембранные белки подвергаются непрерывному обновлению. Так период полуобновления Na-канала составляет около 30 часов [Schmidt et al., 1987], что типично для поверхностных белков. Обновление большой субъединицы Na/K-АТФазы в растущих клетках в культуре происходит за время 20 – 40 часов [Karin et al., 1986, Tamkun et al., 1986]. По-видимому, деградация по крайней мере некоторых белков происходит в лизосомах. В качестве примера можно привести цитохром P450, содержащийся в эндоплазматическом ретикулуме [Masaki et al., 1987].

В целом же, по времени полужизни белки животных можно разделить на четыре группы:

1) очень быстро обновляющиеся белки (время полужизни – менее 1 часа): белок-супрессор опухолей p53, продукты протоонкогенов c-fos и c-myc, орнитиндеарбоксилаза, циклины;

2) быстро обновляющиеся белки (время полужизни 1 – 24 часа): тирозинаминотрансфераза, триптофан-2,3-диоксигеназа, гамма-глутамилтрансфераза, Hsp70, РНК-полимераза I, рецептор инсулина, убиквитин;

3) медленно обновляющиеся белки (время полужизни 1 – 5 дней): каталаза, калпаины, катепсины, протеасомы, тубулины, актины, альдолаза, лактатдегидрогеназа, аргиназа;

4) очень медленно обновляющиеся белки (время полужизни – больше 5 дней): митохондриальная фумараза, цитохромы b и c, миозин, гемоглобин, гистоны в интерфазном ядре, эластин, коллаген.

Тесная связь между рацемизацией Asx и возрастом в очищенных белках [Shapiro et al., 1991, Powell et al., 1992, Ritz et al., 1996] показывает, что накопление D-Asx в течение естественного старения встречается автономно. Однако связь между патологией ткани и повышением концентрации D-Asx также наблюдалась, например, в остеоартрическом хряще [Maroudas et al., 1992] и в глазных хрусталиках, которые являются брусесцентными [Masters et al., 1977] или были подвержены ультрафиолетовому облучению [Fujii et al., 1997]. Т.к. деградация может ускорять рацемизацию, которая *in vivo* может привести к дальнейшему конформационному изменению [Fabian et al., 1994, Orpizewski & Benson, 1999, Mizuno et al., 2000], существует возможность для цикла: деградация

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

белка → повышенная конформационная свобода → рацемизация Asx → дальнейшее конформационное изменение → дальнейшая деградация.

Один из механизмов контроля рацемизации Asx – репарация. Биологическое значение рацемизации Asx показано широким распространением репаративного фермента белок-L-изоаспартат O-метилтрансфераза (PIMT [McFadden & Clarke, 1982, 1987, Johnson et al., 1991, Aswad, 1995, Kagan et al., 1997a]).

Фермент функционирует селективно метилируя остатки L-isoAsp. Аспарагиновый метил аспартил превращается в Asu, повторное метилирование которого может вновь превратить его в L-Asp. Однако субстратный характер L-Asp достаточно низок и не существует механизма для дальнейшего диамирования остатков Asp.

Отсутствие PIMT ухудшает выживание [Kagan et al., 1997b, Kim et al., 1997, Visick et al., 1998, Yamamoto et al., 1998, Shimizu et al., 2000] и возможно существует связь между экспрессией этого репаративного фермента и старением [DeVry & Clarke, 1999, Yamamoto et al., 1998]. PIMT сводит на нет смерть мышей в течение 42 дней [Kim et al., 1997, Yamamoto et al., 1998], но продолжительность их жизни можно увеличить локальной выработкой PIMT в мозге [Lowenson et al., 2001]. Однако следует отметить, что PIMT – внутриклеточный фермент (модификации внеклеточных белков обычно не могут восстанавливаться [Weber & McFadden, 1997]).

Рацемизация аспарагина и аспартата в составе белков может непосредственно влиять на механизмы репарации ДНК и апоптоз и, таким образом, на процессы старения и развития некоторых патологий. Уменьшение активности апоптоза может приводить к пролиферации клеток и онкогенезу, а увеличение его активности или изменение специфичности – к таким нейродегенеративным заболеваниям, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, амиотрофический латеральный склероз.

В апоптозе важную роль играют специфические протеазы – каспазы, которые содержат аспартат в активном центре и расщепляют субстраты по остатку аспарагиновой кислоты. Очевидно, что деаминирование аспарагина до аспартата приводит к появлению новых центров расщепления и к исчезновению точек N-гликозилирования белков, что может изменять профиль активности каспаз. При изменении структуры активного центра каспазы ее активность уменьшается или полностью исчезает.



## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

В механизме репарации ДНК участвует множество ферментов. В частности последствия окислительного стресса, приводящего к образованию 8-оксогуанина, ликвидируются ферментом 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой (hOGG1). У линии быстро стареющих мышей обнаружены мутации гена hOGG1, приводящие к заметному снижению активности и термоустойчивости этого фермента, поэтому его считают по крайней мере частично ответственным за накопление дефектов в ДНК при старении. Существенно, что hOGG1 имеет в активном центре триплет остатков аспарагина (положения 149–151), которые обеспечивают связывание этого фермента с ДНК [Bruner et al., 2000]. С другой стороны, при мутации, приводящей к замене аспарагина на аланин в активном центре сходного фермента – тимин-ДНК-гликозилазы человека, этот фермент теряет активность. Поэтому можно предполагать, что рацемизация аспарагина и аспарагиновой кислоты в составе ферментов репарации ДНК может быть ответственна, хотя бы частично, за накопление дефектов в ДНК, сопровождающее старение.

Для появления хиральных дефектов в полипептидной цепи белка необходимо время, поэтому для нормальной жизни клетки важно четкое сопряжение процессов синтеза и разрушения белков. С возрастом скорость этих процессов снижается, что приводит к увеличению сроков использования белков в клетках и, соответственно, к увеличению вероятности появления дефектов в их структурах [Ward et al., 2000]. Кроме того, с возрастом, по-видимому, снижается и способность клетки к репарации белков, что проявляется в известном факте накопления aberrантных белков при старении. Конечно, источников aberrантных белков множество и помимо процессов рацемизации, но мы их здесь рассматривать не будем. Важно отметить, что накопление aberrантных белков нелинейно связано с их действием. Сильно окисленные белки, например, могут образовывать конгломераты, не поддающиеся протеолизу и даже ингибирующие протеосомальный механизм деградации белков. В других случаях aberrантные белки могут оказывать токсическое действие на клетки. В любом случае, превышение некоторого критического уровня aberrантных белков в клетке может привести к возникновению положительной обратной связи в этом процессе.

Деградация поврежденных белков – альтернатива восстановлению [Niewmierzycka & Clarke, 1999, Lowenson et al., 2001]. Белки с быстрым обновлением изменятся прежде, чем

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

посттрансляционные модификации станут существенными, пока наличие остатков isoAsp маркируют белки для деградации [Szymanska et al., 1998]. Обновление белков можно расценить как способ преодоления старения белков; с увеличением времени жизни белка риск разрушения путем молекулярного старения возрастает. Рацемизация может действовать как молекулярный таймер для инициации обновления белков [Robinson & Robinson, 2001a, 2001b].

Даже в белках с относительно низкой скоростью рацемизации Asx могут происходить стереохимические изменения. Гейгер и Кларк [Geiger & Clarke, 1987] указывали, что «типичный белок с молекулярной массой 100.000 может включать 100 остатков Asn и Asp, и общее содержание 1% поврежденных остатков может отражать совокупность, в которой каждая полипептидная цепь изменена». Такая совокупность измененных остатков может развиваться в относительно короткое время; в случае белков мембраны эритроцита требуется 39 дней, чтобы генерировать 1% остатков в D-конфигурации [Brunauer & Clarke, 1986].

Патофизиологические последствия рацемизации Asx могут включать:

1) Потеря функции белка вследствие его деградации при расщеплении.

Существует предположение, что некоторые внутриклеточные протеазы и пептидазы могут играть определенную роль в обнаружении и деградации белков, содержащих измененные остатки Asn и Asp [Geiger & Clarke, 1987, Lowenson & Clarke, 1988, Szymanska et al., 1988]. Внеклеточные белки могут распадаться в результате молекулярной нестабильности, вызванными конформационными изменениями, индуцированными рацемизацией Asx. Это может быть причиной различных хронических заболеваний [Lian & Gundberg, 1988, Powell et al., 1992].

2) Потеря функции белка вследствие структурных изменений.

Рацемизация Asx имеет важное значение для исследования биологической активности пептидов и белков [Powell, 1994]. Соотношение между рацемизацией Asx и изменением биологической активности пептидных гормонов была выявлена Мастерсом в 1982 году [Masters, 1982]. Если поврежденные остатки Asp и Asn находятся в пределах активного центра фермента, рацемизация может перемещать  $\beta$ -карбоксыльную группу в положение, в котором фермент не может активно функционировать [Lowenson & Clarke, 1988]. В случае

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

структурных белков, рацемизация Asx может, например, приводить к триггерным конформационным изменениям и белковому скоплению [Masters et al., 1978, Masters, 1982, Roher et al., 1993, Tomiyama et al., 1994, Sandmeier et al., 1999, Shimuzu et al., 2000], как показано для синтетических пептидов [Orpiszewski & Benson, 1999].

Существует несколько прямых доказательств патофизиологических последствий от рацемизации Asx *in vivo* при естественном старении. Повышенные уровни рацемизации Asx связаны с уменьшением анион-транспортирующей активности белков мембраны эритроцитов в старых клетках [Lowenson & Clarke, 1988] и патологические значения рацемизации Asx наблюдались в тканях с болезнями пожилого возраста [Masters et al, 1977, 1978, Masters, 1982, Maroudas et al., 1992, Ritz & Schultz, 1993]. Ряд авторов рассматривают рацемизацию Asx как патофизиологический фактор в патогенезе болезней пожилого возраста, таких как атеросклероз, эмфизема легкого, пресбиопия, катаракта, дегенеративные заболевания хряща и возрастная дисфункция головного мозга [Masters et al., 1977, 1978, Masters, 1982, Man et al., 1983, Shapiro et al., 1991, Powell et al., 1992, Orpiszewski et al., 2000].

Однако чрезвычайно трудно получить конкретные данные относительно влияния рацемизации Asx на функции белков. Модифицированные рацемизацией белки должны быть отделены от нативных белков, если рацемизация действительно коррелирует с изменением активности или функций белков. Структурные изменения, приводящие к конформационной свободе, могут также ускорять другие деградационные реакции. Повышенные уровни рацемизации Asx в брунэсцентных катарактах предполагают, что рацемизация Asx поддерживает гликацию [Masters et al., 1977].

Среди молекулярных патологий, связанных со старением, следует отметить т.н. молекулярные ошибки считывания [van Leeuwen et al., 2000]. Под эти понимают делецию динуклеотида ( $\delta$ -GA,  $\delta$ -GU) в мРНК в области простых повторов – мотивов типа GAGAG – при транскрипции. Если механизмы контроля качества транскрипции не устранят дефект, что происходит довольно часто у пожилых людей (старше 51 года), в процессе трансляции появится мутантный белок. Такие белки принято называть (+1)-белками. Полипептидная цепь такого белка имеет нормальный N-конец, но от места делеции до C-конца первичная структура будет совсем другой. Если в измененной области находятся функционально значимые участки, то белок полностью или частично

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

теряет свою функциональность. Такой тип мутаций обнаружен в клетках разных типов. В частности, ошибки считывания происходят в генах, связанных с болезнью Альцгеймера (убиквитин (UBB), предшественник  $\delta$ -амилоида (APP)). Дефектные белки AP(+1) и UBB(+1) накапливаются в типичных участках патологии (бляшках, узлах, тяжах) в мозге. Убиквитин-(+1) не способен связываться с белками и, более того, ингибирует протеосомы, поэтому замедляется «круговорот» белков в клетках, что способствует включению механизмов повреждения клетки за счет рацемизации аминокислот.

Поскольку энантимеры аминокислот эквивалентны с точки зрения термодинамики, то замкнутая система с любым соотношением их концентраций со временем перейдет в состояние с нулевой хиральной поляризацией. Константы скорости рацемизации сильно зависят от температуры, поэтому при повышенной температуре рацемизацию легко наблюдать в эксперименте.

Существенные различия в поведении L- и D-изомеров аминокислот в различных физико-химических условиях вряд ли могут быть объяснены непосредственно нарушением четности при слабых взаимодействиях, поскольку различия в полных энергиях молекул составляют по порядку величины около  $10^{-17}$  кТ. Однако имеются данные и о различиях физико-химических свойств гомохиральных олигопептидов – полиглутамата и полилизина, имеющих по 24 остатка L- или D-энантимеров аминокислот [Scolnik et al., 2006]. Олигопептиды разной хиральности имели различные рН денатурации, различные теплоты переходов спираль–клубок и т.д. Добавление тяжелой воды (4:1) изменяло поведение поли-L-глутамата и значительно меньше влияло на поведение поли-D-глутамата, при этом различия в поведении олигопептидов исчезало. Авторы работы связывают эти эффекты с различной гидратацией L- и D-олигопептидов, причиной которой может быть наличие магнитных свойств у орто-воды (вода на 75% состоит из орто-воды и на 25% из пара-воды), из-за которых ее взаимодействие с L-олигопептидом должно быть несколько более сильным, чем с D-олигопептидом.

Существуют данные о том, что даже следы ионов металлов, попадающие в реакционную смесь из стекла, могут приводить к заметному ускорению рацемизации, аспартата в растворе, которая затрудняет точное определение соотношения концентраций энантимеров [van den Oetelaar et al., 1986]. В этой связи интересно, что

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

многие продукты питания, в том числе и диетические, содержат D-аминокислоты в больших концентрациях, что объясняется способами их предварительной обработки, ускоряющими рацемизацию [Sarkadi, 2004]. Многие продукты, например, молочнокислые, содержат D-аминокислоты бактериального происхождения. Но и в таких продуктах, как свежие фрукты и овощи уровень D-аминокислот довольно высок. Пока не ясно, к чему приводит избыточное потребление D-аминокислот с пищей.

Очевидно, что рацемизация Asx – неизбежный процесс в ходе естественного старения белков. Ее локализация определяется, прежде всего, первичной и более высокой структурой белка. Эти молекулярные характеристики, по крайней мере, определяются генетической информацией. Поэтому рацемизацию Asx можно интерпретировать как часть программируемого процесса старения.

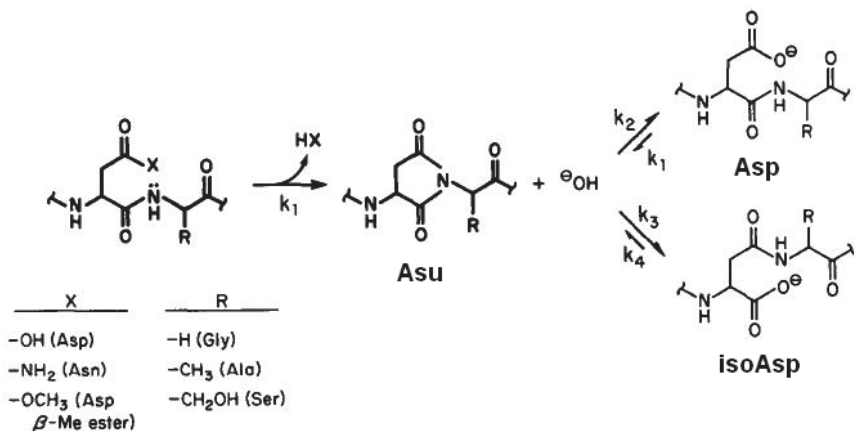
Рацемизация Asx только одна из нескольких посттрансляционных модификаций белка, которую можно интерпретировать как проявление старения белков. Наиболее часто обсуждаемые модификации (помимо рацемизации Asx) – окисление, гликация и диамидирование [McKerrow, 1979, Rosenberg, 1991, Wright, 1991, Rattan et al., 1992, Bailey, 2001, Sajdok et al., 2001, Robinson & Robinson, 2001a, 2001b]. Эти модификации белков могут параллельно встречаться, например, в  $\alpha$ A-кристаллине хрусталика человеческого глаза [Fujii et al., 1999a], хряще и коллагене кожи [Verzijl et al., 2000]. Рацемизацию Asx, также как и окисление или гликацию, можно рассматривать как патогенетический фактор в атеросклерозе, пресбиопии и катаракте [Ruttan et al., 1992, Thornally, 1999, Stadtman & Levine, 2000]. Таким образом, можно сделать вывод, что различные посттрансляционные модификации белков аддитивно составляют основу патогенеза болезней пожилого возраста. Кроме того повторная рацемизация Asx, вызванная деградацией белка, например в дегенеративных заболеваниях пожилого возраста, может иметь патофизиологическое значение.

Хотя остается достаточно много вопросов, очевидно, что рацемизация Asx (и другие посттрансляционные модификации) играет важную роль в биологии старения. Без более глубокого понимания важности этих белковых модификаций наше знание молекулярных основ старения неполно и недостаточно.

Подводя итог, отметим следующее [Ritz-Timme & Collins, 2002]. Рацемизация Asx представляет собой один из главных типов

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

неферментативной ковалентной модификации, приводящей к накоплению модифицированного белка в многочисленных человеческих тканях с возрастом. В естественных условиях, рацемизация - автономный процесс в ходе естественного старения белков, коррелирующая с возрастом долгоживущих белков. Рацемизация Asx может использоваться как молекулярный индикатор старения белков и для идентификации постоянных белков, которые подвергаются старению вместе с человеческим организмом. Рацемизация Asx, в определенных временных интервалах, действует в основном на долгоживущие белки, а также на ферменты и сигнальные белки. Это может приводить к потере функции белка из-за его разложения или из-за изменений в молекулярном строении. В естественных условиях рацемизация может усиливаться при патологических состояниях. Рацемизацию Asx можно рассматривать как патофизиологический фактор в патогенезе болезней пожилого возраста, таких как атеросклероз, эмфизема легкого, пресбиопия, катаракта, дегенеративное заболевание хряща и возрастных дисфункций головного мозга.



## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

Рис. 1.8. Схема реакции спонтанной деградации пептидов, содержащих остатки Asp, Asn и Asp- $\beta$ -Me через Asu-посредников. Атака азота пептидной связи карбоксильной стороны остатка  $\gamma$ -углерода остатка Asx в результате дает пятичленное кольцо Asu. Это кольцо нестабильно при физиологических условиях и гидролизуясь дает смесь Asp- и isoAsp-содержащих пептидов в соотношении, примерно, 1 к 3.

Белки являются субъектом различных реакций спонтанных деградаций при физиологических условиях, что ограничивает их обычное время жизни. Остатки Asx особенно чувствительны к неферментативной деградации, потому что внутримолекулярные реакции формирования Asu в некоторых сайтах приводят к их изомеризации и рацемизации (рис. 1.8).

Неферментативные внутримолекулярные реакции могут быть результатом диамидации, рацемизации и изомеризации остатков Asx белка и пептида через Asu-посредника. Стивенсоном и Кларком [Stephenson & Clark, 1989] измерены скорости образования Asu в группе синтетических пептидов при pH 7.4. Эти пептиды (Val-Tyr-Pro-X-Y-Ala) содержали внутренние остатки Asp, Asn, Asp- $\beta$ ( $\alpha$ )-Me (X) и, следующие за ними, остатки Gly, Ser и Ala (Y). Скорости образования Asu в Asn-содержащих пептидах в 13.1-35.6 раз больше чем в Asp-содержащих пептидах; в Gly-содержащих пептидах больше чем в Ala-содержащих пептидах; в Ser-содержащих пептидах в 1.6-4.5 раз больше чем в Ala-содержащих пептидах. Результаты их эксперимента представлены в табл. 1.2.

Таблица 1.2

Время полужизни ( $T_{1/2}$ ) Asp-, Asn- и Asp- $\beta$ -Me-остатков пептидов при деградации с участием Asu-посредника (pH 7.4,  $t=37^\circ\text{C}$ )

№ п/п	Пептид	$T_{1/2}$
1	Val-Tyr-Pro- <b>Asn</b> -Gly-Ala	1.14 дн.
2	Val-Tyr-Pro- <b>Asn</b> -Ala-Ala	20.2 дн.
3	Val-Tyr-Pro- <b>Asn</b> -Ser-Ala	8.0 дн.
4	Val-Tyr-Pro- <b>Asn</b> -Leu-Ala	70 дн.
5	Val-Tyr-Pro- <b>Asn</b> -Pro-Ala	106 дн.

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

6	Acе-Val-Asn-Gly-Ala	3.3 дн.
7	Val-Tyr-Pro-Asp-Gly-Ala	40.8 дн.
8	Val-Tyr-Pro-Asp-Ala-Ala	266 дн.
9	Val-Tyr-Pro-Asp-Ser-Ala	168 дн.
10	Val-Tyr-Pro-Asp(Me)-Gly-Ala-Me	3.71 мин.
11	Val-Tyr-Pro-Asp(Me)-Ala-Ala-Me	39.9 мин.
12	Val-Tyr-Pro-Asp(Me)-Ser-Ala-Me	13.9 мин.
13	Trp-Met-Asp(Me)-Phe-NH <sub>2</sub>	124 мин.

### 1.3. Хиральные комплексы и переключатели

Природные аминокислоты образуют комплексы с ионами металлов, координированными  $\alpha$ -амино и  $\alpha$ -карбоксильной группами. Структура, стабильность, растворимость реакционная способность комплексов в сильной степени зависит от характера боковых цепей аминокислот. Несмотря на то, что многие аминокислоты имеют в боковых цепях группы с типичными свойствами лигандов, только у трех из них (His, Asp и Cys) эти группы могут участвовать в образовании комплексов.

Химическое равновесие при образовании комплекса аминокислоты с ионом металла в водном растворе характеризуется довольно большим числом реакций.



Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной  
модификация белков организма в норме и патологии

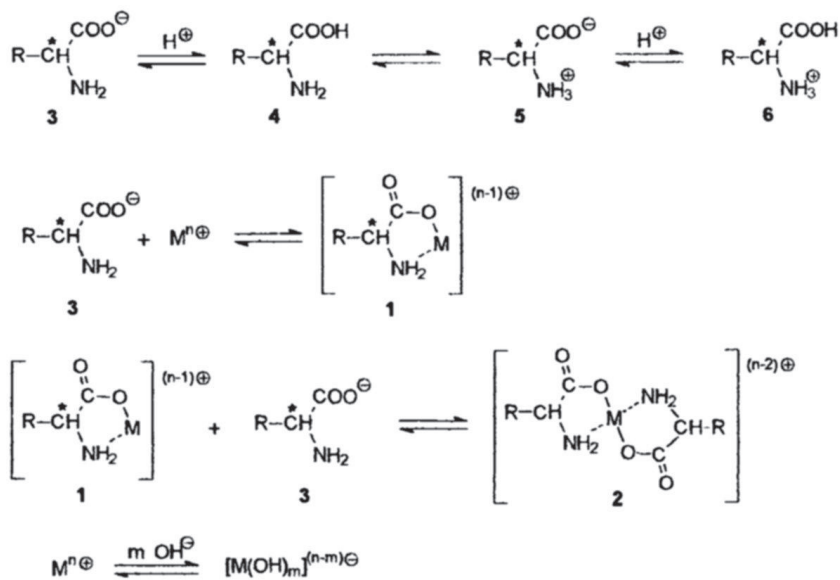


Рис. 1.9. Образование комплексов аминокислот с ионами металлов.

Реакция депротонирования (4–5 на рис. 1.9) имеет большое значение при образовании комплексов, поскольку карбоксильная группа является гораздо более слабым лигандом. В щелочной среде параллельно или совместно с ионом металла может координироваться ион гидроксила. Существенно, что, например, для аланина комплекс (1) с ионом  $\text{Cr}^{2+}$  стабилен в области pH 7–7,7, а комплекс (2) – в области pH 8,2–9,5. Для других аминокислот области существования комплексов с хромом (II) примерно такие же.

Комплексы аминокислот с двухвалентным хромом служат катализаторами в реакциях восстановления двойных связей  $\text{C}=\text{O}$  и  $\text{C}=\text{N}$  у различных малых молекул. При этом сам ион хрома (II) каталитическими свойствами в этих реакциях не обладает. Однако еще более важно то, что при образовании хирального продукта в таких реакциях, например, при восстановлении ацетофенона до фенилэтанола, хиральность аминокислот,

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

входящих в комплекс, определяет в большой степени хиральную поляризацию продукта. При этом, хотя знак хиральной поляризации для каждого конкретного комплекса постоянен, при замене лигандов в комплексе на другие лиганды той же хиральности, знак хиральной поляризации продукта может измениться [Micskei, 2004].

Ионы металлов могут катализировать неферментативное образование олигонуклеотидов [Sawai, 2004]. Нуклеотиды координируют ионы по-разному: ионы щелочных и щелочноземельных металлов координируются фосфатом, ионы серебра и ртути – основанием, ионы переходных металлов – и фосфатом, и основанием, а ион уранила – фосфатом и гидроксильной группой рибозы.

С использованием нуклеозид-5'-фосфоримидазолида (ImpA) в качестве исходного вещества и ионов  $Pb^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$   $UO^{2+}$  в качестве катализаторов, экспериментально получены цепочки олиго-РНК длиной 4–18 оснований. Короткие цепочки получались при снижении концентрации катализатора с 1 мМ до 10 мкМ. Для реакции олигомеризации оптимальное значение рН равно 7,5. В присутствии уранила из хиральной смеси ImpA образовывались гомохиральные и гетерохиральные димеры аденилата, при этом их соотношение было 2:1, что указывает на предпочтительный синтез гомохиральных олигонуклеотидов. Этот результат весьма важен для рассмотрения механизмов образования гомохиральных предшественников нуклеиновых кислот в ходе предбиологической эволюции, поскольку из термодинамики равновесных систем следует, что гомохиральных олигонуклеотидов должно было бы быть гораздо меньше, чем гетерохиральных.

Асимметричный синтез энантиомеров хиральных веществ можно провести с помощью хиральных катализаторов. Однако, например, асимметричное восстановление прохиральных кетонов с участием простых хиральных комплексов борана дает очень небольшое смещение хиральной поляризации от нулевого значения (1,5–3,5%). Значительное смещение хиральной поляризации удалось получить при использовании оксазаборолитидинов [Narasimhan, 2001], в которых боран координирован азотом, что объясняется наличием у этих соединений двух центров катализа – кислоты Льюиса и основания Льюиса. Максимальный избыток R-энантиомера (90%) при восстановлении ацетофенона до фенолэтанола с максимальным выходом (95%) получался при замещении бокового радикала R остатком валина. При использовании комплекса

Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной  
модификация белков организма в норме и патологии

диоксазалюминия с бораном происходил преимущественный синтез S-энантиомера, хотя и с меньшим изменением хиральной поляризации.

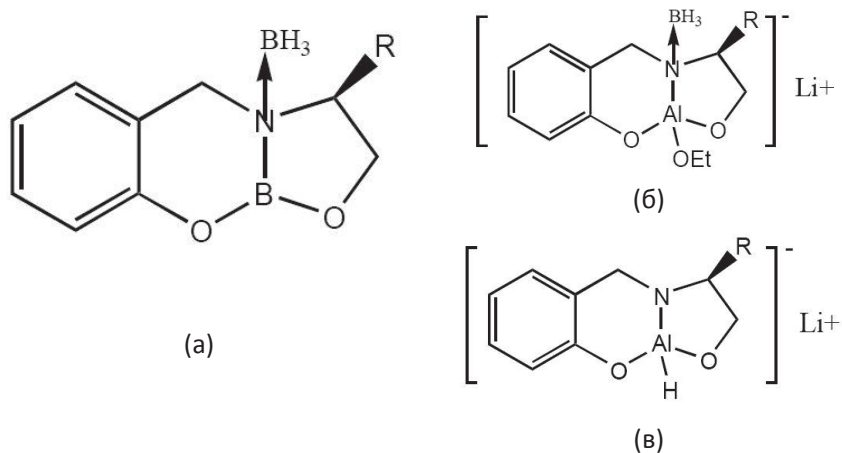


Рис. 1.10. Общая формула оксазаборолидинов  
(а, R – валин, лейцин или изолейцин) и  
комплекса диоксазалюмината лития (б,в).

С точки зрения нарушения хиральной симметрии в этих реакциях представляет интерес разная зависимость скорости синтеза R- и S-энантиомеров от температуры при использовании в качестве катализатора диоксазалюмината лития без борана (рис. 1.10в, табл. 1.3).

Таблица 1.3  
Асимметричное восстановление кетонов при различных температурах

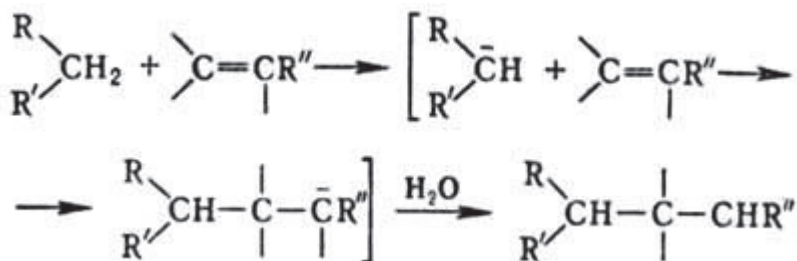
Кетон	T, °C	Продукт	Выход,%	Избыток энантиомера
Ацетофенон	30	1-Фенилэтанол	95	90 (R)
Ацетофенон	0	1-Фенилэтанол	90	60 (S)
Фенацилхлорид	30	2-Хлор-1-фенилэтанол	90	85 (S)

Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной  
модификация белков организма в норме и патологии

Фенацилхлорид	0	2-Хлор-1-фенилэтанол	90	55 (R)
---------------	---	----------------------	----	--------

Таким образом, в разных частях ТПС, в котором наблюдаются большие градиенты температуры, при наличии хирального катализатора мог идти преимущественный синтез различных энантиомеров одних и тех же органических соединений. Иначе говоря, могло возникнуть неравномерное пространственное распределение различных энантиомеров.

В органической химии хорошо известна реакция присоединения Михаэля, открытая в 1887 г., в которой молекула с реакционно-способной метиленовой или метиновой группой (доноры электронов) присоединяется к молекуле с активированной двойной связью (акцепторы электронов) в присутствии оснований. В качестве оснований обычно используют алкоголяты, гидриды, гидроксиды и карбонаты щелочных и щелочно-земельных металлов, амины. Донорами могут служить малоновый и алкилмалоновый эфиры, β-дикетоны, нитро- и α,α-динитроалканы, бензилцианиды, сульфоны. В качестве акцепторов используют α,β-ненасыщенные альдегиды и кетоны, эфиры, амиды и нитрилы α,β-ненасыщенных кислот, нитросоединения и др., принадлежащие к алифатическому, алициклическому и жирно-ароматическому рядам. Реакцию проводят в органических растворителях, таких как спирты, эфиры, 1,4-диоксан, бензол, диметилсульфоксид и др.



При использовании в качестве катализаторов комплексов алюминия (рис. 1.11), сходных с описанными выше, можно осуществить асимметричную реакцию Михаэля.

# Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

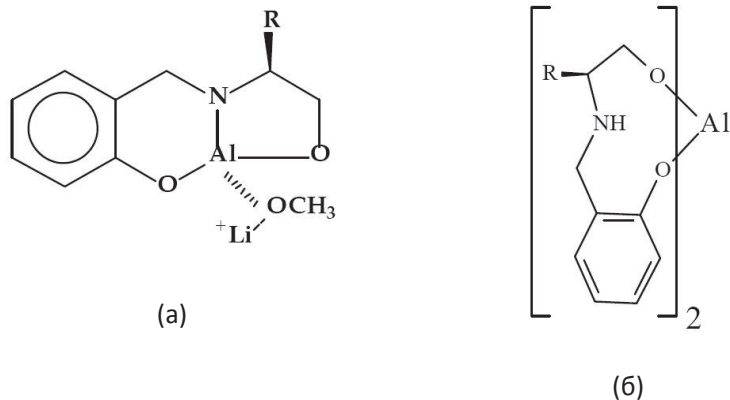


Рис. 1.11. Структурные формулы комплексов диоксазальюминия, использованных в асимметричной реакции Михаэля

Так, например, реакция циклогексенона с дтэтилмалонатом, протекающая по механизму Михаэля, заканчивается за 4 часа и в присутствии комплекса, изображенного на рис. 1.11а, приводит к преимущественному образованию S-изомера (избыток 80%), а в присутствии комплекса, изображенного на рис. 1.11б, – к преимущественному образованию R-изомера (избыток 60%). Существенно, что при СВЧ-облучении реакционной среды в обычной микроволновой печи (750 Вт, импульсный режим, длительность импульса облучения 30 с), реакция завершалась за 2–3 минуты без существенного изменения выхода и хиральной поляризации. Сходные выходы были получены в реакции Михаэля с использованием ациклических реагентов, в частности,  $\alpha,\beta$ -ненасыщенных кетонов и альдегидов, однако продукты в этом случае представляли собой рацемические смеси (в обычных условиях эти реакции также давали рацемические продукты).

Неизменность хиральной поляризации продуктов при воздействии электромагнитного СВЧ-излучения свидетельствует в пользу изоэнтропийного механизма реакции.

## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

В то же время, электромагнитное излучение может быть, в принципе, использовано, чтобы ахиральную молекулу превратить в хиральную, причем с заранее заданной симметрией [Kröner, 2007]. Так, при облучении тиооксантенов при комнатной температуре светом, поляризованным по кругу, при длине волны 250 и 300 нм М-цис форма составляла 68% и 64%, а Р-транс форма – 32% и 36%, соответственно, и рацемизация не наблюдалась.

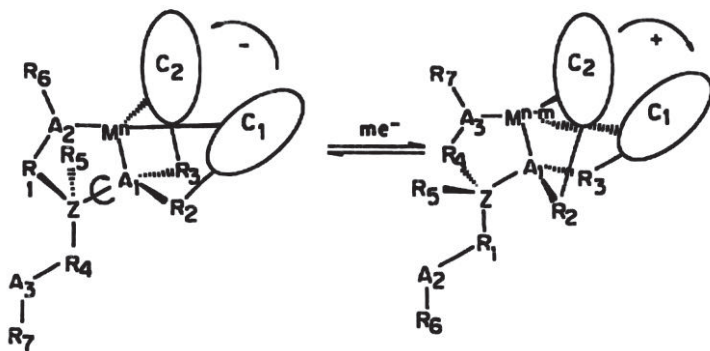
Недавно на теоретической модели было показано, что и линейно поляризованный свет может приводить к появлению хиральной поляризации в исходно ахиральной среде. Для квантовохимических расчетов в качестве ахирального предшественника хиральных продуктов было использовано фтор-производное стирена (рис. 1.12). Одинарная С–С- связь, соединяющая бензольное кольцо с этинильной группой, допускает вращение, поэтому это соединение может существовать в трех конформациях: R, S и ахиральной (на рисунке слева), которая только и реализуется при комнатной температуре, поскольку соответствует минимуму энергии молекулы. С помощью импульса линейно поляризованного инфракрасного света в молекуле возбуждается вращение вокруг хиральной оси. Второй импульс останавливает вращение, при этом может быть получена любая из хиральных форм молекулы. С помощью импульса линейно поляризованного ультрафиолетового света можно избирательно изменять хиральность полученной молекулы уже за счет перехода через электронно-возбужденное состояние.



## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

Рис. 1.12. Схематическое изображение предполагаемого превращения ахиральной молекулы фтор-производного стирена в S- или R-изомер под действием последовательности импульсов инфракрасного (IR) и ультрафиолетового (UV) лазеров.

Процессы рацемизации аминокислот в составе белков и содержание свободных D-аминокислот в клетках изменяется с возрастом и при некоторых патологических состояниях организма. До сих пор на роль этих изменений в связи с возможностью образования комплексов D-аминокислот с металлами и их последующего взаимодействия с нуклеиновыми кислотами в качестве регуляторов экспрессии генов обращали мало внимания. Можно ожидать, что внутренняя среда клеток, включая и генетический аппарат, по-разному будет реагировать на комплексы L- и D-аминокислот с металлами вследствие хиральной асимметрии. Действительно уже появились экспериментальные данные о том, что при взаимодействии с B-формой ДНК комплекс D-аспартата с  $Al^{3+}$  вызывает конформационный переход в C-форму, а комплекс L-аспартата с  $Al^{3+}$  не активен [Bharathi, 2003].



## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

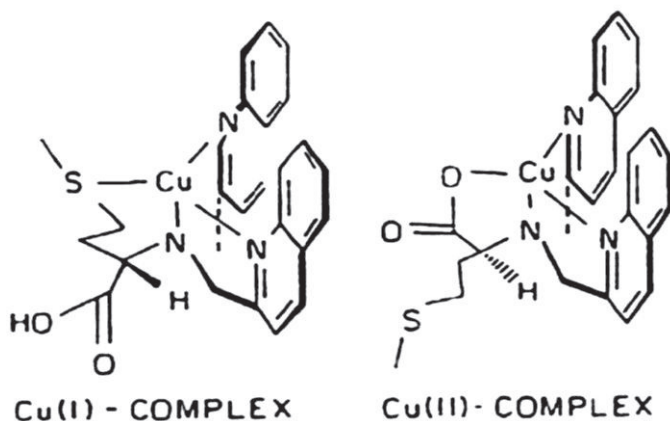


Рис. 1.13. Общая схема изменения структуры трехцентрового лиганда иона металла при изменении его редокс-состояния (вверху) и конкретный пример для ионов меди.

Координационные комплексы иона железа с трехцепочечными лигандами могут переходить один в другой с соответствующим изменением конформации при изменении степени окисления иона [Zelikovich, 2002]. Таким образом такие комплексы могли бы быть использованы как управляемые электроном переключатели. Однако этот процесс необратим, и переход совершается однократно. В другой версии такого переключателя используется обмен лигандами между двумя различными редокс-состояниями комплекса. Основой такого переключателя является молекула с наборами групп, жестко и мягко связывающих лиганды. Эти группы связываются с кольцом каликс арена попеременно, так что для иона железа они могут образовывать либо мягко связывающую полость, либо жестко связывающую. Ион Fe(III) жестко связывается с гидроксаматными группами, а после восстановления до Fe(II) – мягко связывается с бипиридилными группами. Окисление Fe(II) сопровождается обратным процессом.

Более универсальный подход к созданию электронного хирального переключателя состоит в использовании любого иона переменной валентности (M на рис. 1.13) [Canary, 2003]. Помимо



## Глава 1. Экспериментальные данные по неферментативной модификация белков организма в норме и патологии

лигандов, изображенных на рисунке, с этим ионом могут связываться дополнительные лиганды: молекулы растворителя, противоионы и т.п. Органический лиганд имеет три цепи, которые соединяются на центральном атоме ( $A_1$ ), и каждая цепь имеет атомы, которые могут координировать ион металла. По крайней мере две цепи имеют хромофорные группы ( $C_1$  и  $C_2$ ) и по крайней мере на одной цепи есть две различные группы, которые могут координировать ион металла, например, атомы  $A_2$  и  $A_3$ , причем  $A_2$  связывается с ионом металла в одном редокс-состоянии, а  $A_3$  – в другом.

Такое изменение координации иона металла приводит к повороту вокруг «осевого атома» Р цепи, содержащей  $A_2$  и  $A_3$ . При этом изменяется положение боковой группы  $R_5$  и в результате происходит инверсия расположения хромофорных групп  $C_1$  и  $C_2$  относительно друг друга. За счет того, что положение этих двух хромофоров изменяется в трехмерном пространстве, происходит существенное изменение поглощения циркулярно поляризованного света.

В разных редокс-состояниях ион металла может иметь различные химические свойства. В данном случае поляризуемость иона возрастает с увеличением числа электронов, при этом ион приобретает тенденцию к образованию более мягких связей. Например, ион  $Cu(II)$  легче образует связи с кислородом, а  $Cu(I)$  – с серой. Это позволяет выбрать атомы  $A_2$  и  $A_3$  так, чтобы происходили описанные изменения структуры.

Эффект переключения может быть значительно усилен, если хиральный переключатель находится в нематическом жидком кристалле: за счет кооперативности фазового перехода нематик–холестерик изменение пространственной структуры переключателя приводит к изменению хиральности всего кристалла, что легко наблюдать в эксперименте.

## **Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии**

### **2.1. Статистический анализ первичной структуры белков подверженных деградации**

В последние десятилетия обнаружены отступления от декларировавшейся ранее хиральной чистоты биосферы, и, в частности, D-аминокислоты играют заметную роль в жизнедеятельности, как прокариот, так и эукариот. Появились данные, о том, что в процессе старения, а также развития некоторых патологий, процентное содержание D-аминокислот в белках различных тканей организма человека и животных увеличивается. Накопление D-аминокислот в белках, характеризующихся большими временами жизни, стало основой определения возраста в судебной практике и археологии.

Наиболее подверженными рацемизации аминокислотами в белках являются аспарагин и аспарат (Asx). Так, в дентине аспарат рацемизуется со скоростью до 0,1 % в год. Скорость рацемизации Asx в искусственно синтезированных пептидах зависит от того, какие аминокислоты находятся в соседних с ним позициях первичной структуры. Кроме того, недавно появились данные о том, что скорость рацемизации Asx в искусственно синтезированных пептидах зависит от положения во вторичной структуре. Так, для аспарата расположенного в  $\alpha$ -спирали скорость этого процесса на порядок выше, чем для входящего в  $\beta$ -слой. На сегодняшний день остаются открытыми вопросы о химико-физических особенностях аспартата и аспарагина, ведущих к относительно высокой скорости рацемизации этих аминокислот; а также о степени влияния первичной, вторичной и третичной структур природных белков на скорость рацемизации аспартата и аспарагина.

Для того чтобы попытаться ответить на эти вопросы, в настоящей работе мы провели качественный и статистический анализы первичной, вторичной и третичной структур некоторых белков в области расположения Asx.

Все аминокислоты, за исключением глицина, содержат хиральный центр - ассиметрический атом углерода, с которым связаны четыре различные замещающие группы: карбоксильная группа, аминогруппа, боковой радикал и атом водорода.

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

Все соединения с одним хиральным центром могут встречаться в двух различных изомерных формах (называемых энантиомерами), у которых одинаковы все химические и физические свойства, за исключением одного – направления вращения плоскости поляризации проходящего через них плоскополяризованного света. Таким образом, каждая аминокислота, имеющая один асимметричный углерод, может находиться в двух стереических формах. Эти формы зеркально-симметричны, в них боковой радикал и атом водорода, стоящие при асимметричном атоме углерода, меняются местами. Раствор одного стереоизомера данной аминокислоты вращает плоскость поляризации влево и называется левовращающим (L-). Раствор же другого стереоизомера этой аминокислоты поворачивает плоскость поляризации на такой же угол, но вправо, и называется правовращающим (D-).

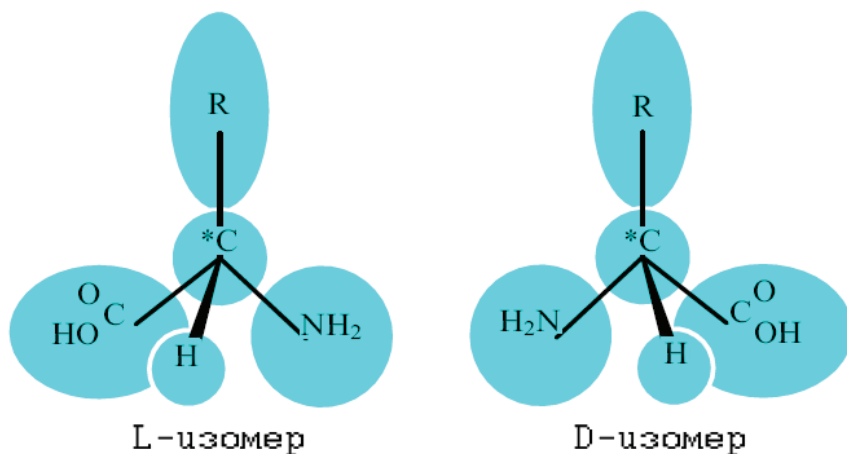


Рис 2.1. Пространственная структура аминокислоты

Если молекулы вещества ахиральны, то среда инвариантна к операции зеркального отображения и оптически не активна. Если молекулы хиральны, но смесь содержит равные концентрации L- и D-энантиомеров, то эта смесь, называемая рацемической, также не будет проявлять оптической активности. Однако, если концентрация одного

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

энантиомера существенно больше концентрации другого, смесь будет проявлять оптическую активность, максимальную в том случае, когда смесь содержит всего один стереоизомер. Таким образом, оптическая активность среды указывает на избыток одного из энантиомеров хирального соединения.

В обычных химических реакциях энантиомеры образуются в равных количествах. Но в живой природе этого не происходит. Исследуя растворы продуктов жизнедеятельности бактерий, Пастер обнаружил, что они оптически активны. Более того, он показал, что некоторые бактерии выбирают только один энантиомер из рацемического субстрата, оставляя другой изомер в растворе. В результате, он пришел к выводу, что молекулярная основа жизни хирально асимметрична.

В настоящее время под хиральной асимметрией живой природы понимается примечательное свойство биологических макромолекул: в клетках для рибосомального синтеза белков используются только L-аминокислоты, а в состав нуклеиновых кислот входят только D-остатки сахаров.

Предпосылки гомохиральности биополимеров изучены достаточно хорошо.

Во-первых, гомохиральность белков и нуклеиновых кислот определяет их стереоспецифичность – необходимое условие матричного синтеза. Так, показано, что замена D-дезоксирибозы лишь одного природного нуклеотида в двунитевой структуре ДНК на зеркально сопряженную ей L-дезоксирибозу приводит к образованию структуры с большей энергией и нарушению комплементарности, причем данный дефект не является локальным, а разрушает большую область двунитевой структуры.

Во-вторых, гомохиральность белков и нуклеиновых кислот обеспечивает стабильность их структур.

В-третьих, для катализа химических реакций, в которых участвуют лишь гомохиральные биополимеры, требуется вдвое меньший набор ферментов, чем для реакций происходящих в рацемической смеси.

К вопросу о механизмах возникновения хиральной чистоты существует два принципиально различных подхода. Основная идея одного из них, биогенного, состоит в том, что в изначально рацемической органической среде возникли неспецифичные по отношению к хиральности первые простейшие биологические структуры. Затем же, в результате эволюции этой «ахиральной» биосферы, по каким-то

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

причинам произошло принципиальное изменение типа информационных и функциональных носителей и возник класс гомохиральных структур. Данный подход сталкивается с неразрешимыми противоречиями: возникновение уже простейших самореплицирующихся систем могло произойти только в среде с сильным нарушением зеркальной симметрии.

Основная идея второго подхода, абиогенного, заключается в том, что на этапе химической эволюции в результате физико-химических процессов в «первичном бульоне» симметрия органической среды оказалась нарушенной.

В рамках абиогенного подхода развиваются два направления решения вопроса о возникновении хиральной чистоты. Один из них связывает нарушение зеркальной симметрии с воздействием какого-либо асимметрического фактора, обеспечивающего преимущество одному типу зеркальных изомеров, а постепенное «накопление» этого преимущества и привело к доминированию этого типа изомера. Эта гипотеза, также сталкивается с принципиальными трудностями: нейтральные процессы, усиленные преимущественным фактором не способны разрушить исходно рацемическое состояние органической среды.

Совершенно другой путь возникновения хиральной чистоты органической среды рассматривается в рамках сценария спонтанного нарушения зеркальной симметрии на стадии химической эволюции. Согласно гипотезе спонтанного нарушения зеркальной симметрии при определенных условиях зеркально-симметричное состояние теряет устойчивость и происходит самопроизвольное нарушение данной симметрии, скачкообразный переход к хирально-упорядоченному состоянию. На сегодняшний день это наиболее приемлимый сценарий возникновения хиральной чистоты предбиосферы.

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области исследования гомохиральности биополимеров, ответ на вопрос, почему аминокислоты белков и сахара нуклеиновых кислот имеют определенный знак хиральности, остается неизвестным.

Долгое время декларировалось, что все природные биологические соединения, содержащие хиральный центр, встречаются только в одной стереической форме. Однако последние исследования показывают, что из этого правила есть исключения, и, в частности, D-аминокислоты играют существенную роль в жизнедеятельности всех организмов – от бактерий до млекопитающих. Так, D-глутаминовая кислота и D-аланин входят в

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

состав пептидогликана муреина, создающего жестких каркас бактериальных клеток; D-серин обнаружен в составе ломбрицина земляного червя *Lumbricus terrestris*. D-изомер цистеина входит в состав люцефирина, который при воздействии люцеферазы вызывает биолюминесценцию светлячков *Photinus*. D-аминокислоты обнаруживаются в составе некоторых пептидных антибиотиков. В организмах млекопитающих и человека, свободные D-аминокислоты обнаруживаются в плазме крови и других жидкостях. В нервных клетках высших организмов находят D-аланин, D-аспартат и D-серин, иногда в значительных концентрациях. D-серин, в частности, является агонистом NMDA-рецепторов в центральной нервной системе. Присутствие D-аминокислот в составе пептидов обусловлено посттрансляционной изомеризацией, обеспечивающейся специальными ферментами – рацемазами. В составе пептидов, синтезируемых рибосомами, D-аминокислоты пока обнаружены не были.

Известно, также, что в процессе старения происходит увеличение процентного содержания D-энантиомеров аминокислот в белках различных тканей организмов человека и животных. Этот процесс имеет термодинамическую природу: по оценке, энтропия гомохиральной цепи меньше энтропии гетерохиральной на величину:

$$\Delta S = kN \ln(x_L \ln x_L + x_D \ln x_D);$$

где  $k$  – постоянная Больцмана,  $N$  – число мономеров в цепи,  $x_i$  - доля молекул  $i$ -го энантиомера в цепи.

Таким образом, организм, как неравновесная система, состоящая исключительно из L-энантиомеров, стремится к равновесию, и, согласно принципу максимума энтропии, к балансу L/D энантиомеров.

В настоящее время не вызывает сомнений, что рацемизация аминокислот это неизбежный процесс, сопровождающий старение организма, спонтанно происходящий во многих тканях различных организмов, и, в частности, в организме человека. Процентное содержание D-аминокислот может служить для определения возраста белков. Кроме того, хотя рацемизация и наиболее заметна в долгоживущих, структурных белках, некоторые опосредованные ею эффекты, такие, как изменение пространственной структуры, могут иметь существенное значение для ферментов и других короткоживущих белков.

Существует сходная точка зрения, согласно которой рацемизация хиральных соединений в клетках в процессе старения носит не

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

случайный характер, а формирует положительную обратную связь в системе регуляции процессов метаболизма, приводящую к развитию патологических состояний и ускорению старения: деградация белка → увеличение конформационной свободы → увеличение скорости рацемизации → конформационные и пространственные изменения → ускорение деградации.

Таблица 2.6  
Белки, подверженные рацемизации в процессе старения

Белок	Ткань	Заболевание	Аминокислота
Фосфорин	Дентин	Кариес	D-аспартат
$\alpha$ -В-Кристаллин	Хрусталик	Катаракта	D-аспартат
$\alpha$ -А-Кристаллин	Хрусталик	Катаракта	D-аспартат
Аквапорин	Хрусталик	Катаракта	D-аспартат
$\beta$ -Амилоид	Мозг	Болезнь Альцгеймера	D-аспартат, D-серин
Миелин	Мозг	Болезнь Альцгеймера	D-аспартат
T-белок	Мозг	Болезнь Альцгеймера	D-аспартат
Остеокальцин	Костная ткань	Остеоартрит	D-аспартат
Агрекан	Хрящевая ткань	Поражения суставов	D-аспартат
Коллаген типа 1	Гладкая мускулатура, костная ткань	Остеопороз, болезнь Педжета	D-аспартат
Эластин	Легкие, аорта, кожа	Эластоз	D-аспартат

Аспарагин и аспартат являются структурно нестабильными и наиболее подверженными рацемизации аминокислотами. Основными причиной появления в белках D-аспартата в процессе старения являются как потеря L-аспарагином аминной группы, так и рацемизация L-аспартата приводящим к образованию L-изоаспартата, D-аспартата и D-изоаспартата.

Долгое время механизм рацемизации аспартата не был ясен. Недавние исследования, показали, что в белках хрусталика,  $\alpha$ -В-кристаллине и  $\alpha$ -А-кристаллине, формирование L- $\beta$ -аспартата, D- $\alpha$ -аспартата и D- $\beta$ -аспартата происходит одновременно. Это указывает на то, что

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

формирование D-аспартата в белках происходит через сукцинимид-посредника. Этот процесс реализуется в 4 стадии:

1) карбонильная группа остатка L- $\alpha$ -аспартата атакуется азотным остатком аминокислоты, следующей за аспартатом, и, посредством интрамолекулярной циклизации, формируется L-сукцинимид;

2) L-сукцинимид может быть изменён в D-сукцинимид через I-посредника, имеющего прохиральный  $\alpha$ -углерод в плоскости кольца;

3) протонация I-посредника происходит с равной вероятностью в верхней или нижней части пептида;

4) D- и L-энантиомеры сукцинимида гидролизуются с любой стороны их карбонильных групп.

Формирование сукцинимид-посредника может происходить также при потере аспарагином аминной группы. Этот процесс называется деамидацией.

Скорость рацемизации аспартата *in vivo* зависит от физико-химических характеристик окружающей среды. Так как концентрации солей, pH, температура флуктуируют весьма незначительно, скорость рацемизации аспартата зависит, от соседних аминокислотных остатков, от положения аспартата во вторичной структуре, от пространственного окружения, опосредованного третичной структурой. Во многих случаях образование сукцинимида происходит в терминальных концах белков, в открытых регионах на поверхности белков, а также на изгибах белковых цепей.

Механизм контролирования рацемизации аспартата в организме осуществляется ферментом L-изоаспартат(D-аспартат)-O-метилтрансферазой. Это широко распространенный фермент, что свидетельствует и о повсеместно происходящей рацемизации. Фермент селективно метилирует L-изоаспартат и D-аспартат, после чего происходит формирование сукцинимида, который после, повторного метилирования, переключается в L-аспартат. Однако, субстратная специфичность D-аспартата к ферменту достаточно низкая. Механизмов, контролирующих деамидирование в организме пока не выявлено.

Скорость рацемизации аспарата в белках и его процентное содержание может служить для определения времени жизни белков *in vivo*. Так, D-аспартата в короткоживущих белках практически не наблюдается, то есть скорость рацемизации значительно меньше, чем скорость обновления белка. В белках с большим временем жизни уровень D-аспартата постоянный, что является следствием равновесия между



## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

скоростью рацемизации и скоростью обновления белка. В структурных белках, обновления которых не происходит совсем, уровень содержания D-аспартата линейно увеличивается с возрастом.

В связи с тем, что рацемизация наблюдается в некоторых белках, характеризующихся большими временами жизни и влечет за собой патологические изменения в организмах при различных заболеваниях, представляется важным вопрос о том, в какой степени рацемизации подвержены другие белки (глобулярные, мембранные), а также в чем заключается отличие белков, подверженных рацемизации от белков, в которых рацемизация не наблюдается.

Литературные данные свидетельствуют о том, что скорость рацемизации аспартата и аспарагина в искусственно синтезированных пептидах зависит от окружающих его аминокислотных остатков, от положения во вторичной структуре, от пространственной конфигурации. В связи с этим встает вопрос о степени влияния этих трех факторов на наблюдаемую скорость рацемизации *in vivo*.

В настоящей работе мы попытались приблизиться к пониманию этих двух вопросов. Для этого мы проанализировали частоты встречаемости аминокислот в соседних с аспартатом и аспарагином позициях аминокислотных последовательностей 9 белков, в которых наблюдается рацемизация, и эти же частоты встречаемости в 32 белках, в которых рацемизация не обнаружена. Кроме того, мы анализировали частоты встречаемости аминокислотных остатков в соседних с аспартатом и аспарагином позициях в зависимости от вторичной структуры исследуемых белков и пространственного расположения аспартата и аспарагина.

Нами был проведен статистический анализ первичной и вторичной структуры 36 белков. Мы анализировали частоты встречаемости каждой из 20 аминокислот в соседних с аспартатом (Asp) и аспарагином (Asn) позициях для трипептидов (X-D-X, X-N-X) и пентапептидов (X-X-D-X-X, X-X-N-X-X), в аминокислотных последовательностях исследуемых белков в соответствии с положением Asx во вторичной структуре белка, а также без учета положения во вторичной структуре.

Для проведения анализа первичной структуры была разработана программа в среде Matlab, позволяющая проводить все численные вычисления. Для анализа вторичной и третичной структур дополнительно использовалась стандартная программа, визуализирующая

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

пространственную структуру белков, *Cn3D 4.1*, находящаяся в открытом для использования доступе.

Частота встречаемости каждой аминокислоты считались по формуле:

$$p_i = \frac{N_i}{M} \times 100\% ;$$

где  $N_i$  - общее число позиций, занимаемых  $i$ -ой аминокислотой в трипептидах (пентапептидах),  $M$  - число всех возможных позиций.

Стандартное отклонение частоты встречаемости:

$$\delta p_i = \sqrt{\frac{(p_i - p_i^k)^2}{(N_p - 1)}} ;$$

где  $p_i^k$  - частота встречаемости  $i$ -ой аминокислоты в  $k$ -ом белке,  $N_p$  - число исследуемых белков ( $N_p = 36$ ).

Полученная, таким образом, для каждой аминокислоты частота сравнивались со средней частотой встречаемости этой аминокислоты в Банке аминокислотных последовательностей Swiss-Prot по следующей схеме:

$$\{\Delta p_i\} = \{p_i\} - \{\bar{p}_i\};$$
$$\{\delta(\Delta p_i)\} = \sqrt{\left(\frac{\partial(\{\Delta p_i\})}{\partial(\{p_i\})}\right)^2 + \left(\frac{\partial(\{\Delta p_i\})}{\partial(\{\bar{p}_i\})}\right)^2};$$

где  $\bar{p}_i$  - средняя частота встречаемости  $i$ -ой аминокислоты в Банке аминокислотных последовательностей.

Критерий достоверного различия частоты встречаемости аминокислоты в соседних с Asx позициях от средней частоты встречаемости этой аминокислоты:

$$|\Delta p_i - \delta(\Delta p_i)| > 0;$$

В рамках исследования был проведен статистический анализ первичной и вторичной структуры 41 белка. Для анализа из базы данных белковых структур (PDB) были выбраны белки эукариот с хорошо изученной пространственной структурой. Из этих белков 11 являются структурными (остеокальцин,  $\gamma$ -кристаллин В,  $\alpha$ -Кристаллин А,  $\alpha$ -

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

Кристаллин В, миелин, эластин, тау-белок, родопсин, кинезин, бигликан, фиколин), 8 – мембранными (рецепторы: глутаматный метаботропный рецептор, эритропоэтиновый рецептор, интегрин, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, кальмодулин; каналы: Na/K канал, аквапорин, хлорный канал) и 22 – глобулярными ( $\beta$ -амилоид, интерферон, убиквитин, гормоны: эндостатин, лептин, резистин, интерлейкин, пролактин, эритропоэтин, соматотропин; ферменты: лизоцим, динамин, рибонуклеаза А, алкогольдегидрогеназа, каталаза, пируваткиназа, трипсин, цитохром С; транспортные: миоглобин, альбумин, трансферрин, липокалин). В девяти белках ( $\beta$ -амилоид, остеокальцин, аквапорин, лизоцим,  $\alpha$ -Кристаллин А,  $\alpha$ -Кристаллин В, миелин, эластин, тау-белок) наблюдается рацемизация. Данные о молекулярной массе, количестве аминокислотных остатков и вторичной структуре исследуемых белков представлены в таблице 2.2.

Результаты расчета частот встречаемости каждой из 20 аминокислот в соседних с аспаратом (Asp) и аспарагином (Asn) позициях для трипептидов (X-D-X, X-N-X) и пентапептидов (X-X-D-X-X, X-X-N-X-X) (см. рис 2.1), в аминокислотных последовательностях исследуемых белков в соответствии с положением Asx во вторичной структуре белка, а также без учета положения во вторичной структуре приведены в таблицах 2.2, а также на рисунках.



Рис. 2.1. Трипептиды и пентапептиды в соседних с Asx позициях на примере  $\beta$ -милоида

Таблица 2.3

### Общие характеристики исследуемых белков

N	Белок	Тип	Организм	M, kDa	N aa	N Asp	N Asn
---	-------	-----	----------	--------	------	-------	-------

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

1	Аквапорин	мембранный	Ovis Aries	28,3	263	2	8
2	Лизоцим	глобулярный	Homo sapiens	14,4	130	8	10
3	Остеокальцин	структурный	Sus Scrofa	5,2	49	5	1
4	$\beta$ -амилоид	глобулярный	Homo sapiens	4,3	40	3	1
5	$\alpha$ -Кристаллин А	структурный	Homo sapiens	19,9	173	15	2
6	$\alpha$ -Кристаллин В	структурный	Homo sapiens	20,2	175	11	2
7	Миелин	структурный	Homo sapiens	21,5	197	9	3
8	$\tau$ -белок	структурный	Homo sapiens	43	412	27	11
9	Эластин	структурный	Homo sapiens	66,1	757	3	0
10	Липокалин	глобулярный	Equus Caballus	14,5	131	6	8
11	$\gamma$ -Кристаллин В	структурный	Homo sapiens	21,8	182	11	6
12	Никотиновый ацетилхолиновый рецептор	мембранный	Torpedo marmorata	42,5	370	20	13
				42,1	370	24	17
				42,2	369	15	34
				42,5	370	20	13
				42,3	370	17	26
13	Na/K канал	мембранный	Homo sapiens	12,4	110	4	3
	Глутаматный метаботропный рецептор	мембранный	Rattus norvegicus	55,2	490	33	20
14	Интегрин	мембранный	Homo sapiens	21,4	192	6	10
15	Динамин	глобулярный	Homo sapiens	14,4	122	7	7
16	Родопсин	структурный	Bos Taurus	39	348	5	15
17	Кинезин	структурный	Rattus norvegicus	27	238	15	12
				13,2	117	2	9
18	Бигликан	структурный	Bos taurus	37,3	332	18	25
19	Трансферрин	глобулярный	Homo sapiens	74,9	676	44	34
20	Эндостатин	глобулярный	Mus musculus	18,9	172	8	4
21	Фиколин	структурный	Homo sapiens	24,7	218	18	16

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

23	Рибонуклеаза А	глобулярный	Bos taurus	13,7	124	5	10
24	Кальмодулин	мембранный	Rattus rattus	16,7	148	16	7
25	Лептин	глобулярный	Homo sapiens	16	146	10	4
26	Резистин	глобулярный	Mus musculus	12,5	114	5	5
27	Интерлейкин	глобулярный	Homo sapiens	18,6	160	8	12
28	Интерферон	глобулярный	Mus musculus	19,7	161	2	12
29	Алкогольдегидрогеназа	глобулярный	Equus caballus	39,8	374	17	8
30	Каталаза	глобулярный	Bos taurus	57,6	506	39	30
31	Пируваткиназа	глобулярный	Homo sapiens	56,9	528	24	13
32	Пролактин	глобулярный	Homo sapiens	22,9	199	8	10
33	Эритропоэтин	глобулярный	Homo sapiens	18,4	166	6	4
34	Эритропоэтиновый рецептор	мембранный	Homo sapiens	25,2	227	9	3
35	Соматотропин	глобулярный	Homo sapiens	21,9	191	11	7
36	Трипсин	глобулярный	Bos taurus	23,2	223	6	16
37	Миоглобин	глобулярный	Physeter catodon	17,2	153	7	1
38	Убиквитин	глобулярный	Homo sapiens	8,5	76	5	2
39	Альбумин	глобулярный	Homo sapiens	66,5	585	36	17
40	Цитохром С	глобулярный	Homo sapiens	11,6	104	3	5
41	Хлорный канал	мембранный	Homo sapiens	28,4	247	17	13

Таблица 2.4

Частоты встречаемости аминокислот в соседних с аспаргатом позициях

Частоты встречаемости аминокислот в соседних с аспаргатом позициях трипептидов					
АК	база данных Swiss-Prot	первичная структура	$\alpha$ -спираль	$\beta$ -лист	петля

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

	средняя стота	ошиб ка	часто та	ошибк а	часто та	ошиб ка	часто та	ошиб ка	часто та	ошибка
Ala	6,4 8	0,76	7,52	0,88	7,25	1,98	3,19	2,03	9,00	1,21
Arg	5,2 4	0,49	5,33	0,57	6,87	1,31	3,72	1,27	5,17	0,84
Asp	5,3 1	0,35	3,71	0,41	3,44	0,96	3,72	0,88	3,83	0,64
Asn	4,7 6	0,90	3,62	1,04	4,96	2,32	1,60	2,42	3,67	1,41
Cys	1,8 6	0,35	1,90	0,41	1,91	0,96	2,66	0,88	1,67	0,64
Glu	6,6 4	0,28	3,14	0,32	3,44	0,79	1,06	0,68	3,67	0,54
Gln	4,2 8	0,69	6,76	0,80	9,16	1,80	5,85	1,83	6,00	1,12
Gly	5,8 8	0,72	7,33	0,84	2,29	1,88	9,04	1,92	9,00	1,16
His	2,4 1	0,21	2,00	0,24	3,05	0,62	2,66	0,49	1,33	0,44
Ile	5,4 8	0,92	5,24	1,07	6,11	2,37	9,04	2,48	3,67	1,44
Leu	9,3 5	0,42	9,71	0,49	12,21	1,14	13,83	1,08	7,33	0,74
Lys	6,3 0	0,69	7,24	0,80	8,02	1,80	4,26	1,83	7,83	1,12
Met	2,3 3	0,21	2,29	0,24	3,05	0,62	3,72	0,49	1,50	0,44
Phe	4,2 0	0,59	5,90	0,68	8,02	1,56	2,66	1,55	6,00	0,98
Pro	5,1 5	0,75	5,81	0,87	1,91	1,95	2,13	2,00	8,67	1,20
Ser	8,5 0	0,47	6,57	0,55	5,73	1,26	3,19	1,22	8,00	0,81
Thr	5,5 7	0,32	4,29	0,37	4,58	0,89	5,32	0,80	3,83	0,60
Trp	1,3 0	0,12	1,33	0,14	0,76	0,40	1,60	0,24	1,50	0,32
Tyr	3,0 3	0,26	3,81	0,30	3,05	0,74	7,98	0,63	2,83	0,51
Val	6,0 9	0,42	6,48	0,49	4,20	1,14	12,77	1,08	5,50	0,74
<b>Частоты встречаемости аминокислот в соседних с аспаратом позициях пентапептидов</b>										
А К	база данных Swiss- Prot	первичная структура			α-спираль		β-лист		петля	

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

	средняя частота	ошибка	частота	ошибка	частота	ошибка	частота	ошибка	частота	ошибка
Al	6,48	0,76	6,67	0,87	7,63	1,74	3,72	1,84	7,17	0,95
Ar	5,24	0,49	5,48	0,58	5,92	1,10	6,12	1,14	5,08	0,60
As	5,31	0,35	4,10	0,43	1,91	0,76	4,79	0,79	4,83	0,42
As	4,76	0,90	4,71	1,02	3,24	2,07	2,39	2,19	6,08	1,13
C	1,86	0,35	1,95	0,43	1,34	0,76	1,86	0,79	2,25	0,42
Gl	6,64	0,28	3,33	0,35	3,24	0,60	1,86	0,61	3,83	0,32
Gl	4,28	0,69	6,05	0,80	7,82	1,57	5,05	1,66	5,58	0,86
Gl	5,88	0,72	6,52	0,83	4,39	1,64	7,71	1,73	7,08	0,90
Hi	2,41	0,21	2,33	0,28	2,48	0,43	3,19	0,43	2,00	0,23
Ile	5,48	0,92	5,14	1,04	6,49	2,12	8,24	2,25	3,58	1,16
Le	9,35	0,42	10,71	0,50	14,31	0,93	10,64	0,97	9,17	0,51
Ly	6,30	0,69	6,10	0,80	6,87	1,57	3,46	1,66	6,58	0,86
M	2,33	0,21	2,43	0,28	3,82	0,43	2,93	0,43	1,67	0,23
Ph	4,20	0,59	4,90	0,69	7,82	1,33	2,39	1,40	4,42	0,73
Pr	5,15	0,75	5,71	0,86	2,10	1,72	1,60	1,81	8,58	0,94
Se	8,50	0,47	6,24	0,56	4,96	1,05	5,05	1,09	7,17	0,57
Th	5,57	0,32	5,10	0,40	4,01	0,69	7,45	0,71	4,83	0,38
Tr	1,30	0,12	1,57	0,18	1,15	0,22	2,66	0,20	1,42	0,12
Ty	3,03	0,26	3,81	0,33	3,24	0,55	7,71	0,56	2,83	0,30

Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

Таблица 2.5

Частоты встречаемости аминокислот в соседних с аспарагином позициях

<b>Частоты встречаемости аминокислот в соседних с аспарагином позициях трипептидов</b>										
AK	база данных Swiss-Prot		первичная структура		$\alpha$ -спираль		$\beta$ -лист		петля	
	средняя частота	ошибка	частота	ошибка	частота	ошибка	частота	ошибка	частота	ошибка
Ala	6,48	0,76	5,43	0,93	9,09	1,95	2,08	2,11	6,46	1,19
Arg	5,24	0,49	3,72	0,60	3,18	1,25	1,25	1,36	4,79	0,76
Asp	5,31	0,35	5,11	0,43	0,45	0,90	8,33	0,97	6,15	0,55
Asn	4,76	0,90	4,04	1,11	3,18	2,30	4,17	2,50	5,21	1,40
Cys	1,86	0,35	3,51	0,43	4,09	0,90	4,58	0,97	3,23	0,55
Glu	6,64	0,28	4,15	0,34	5,45	0,72	4,17	0,78	3,96	0,44
Gln	4,28	0,69	7,34	0,85	7,73	1,77	5,83	1,92	7,40	1,08
Gly	5,88	0,72	5,96	0,89	3,64	1,84	4,58	2,00	6,98	1,12
His	2,41	0,21	1,70	0,26	1,82	0,54	1,67	0,58	2,50	0,33
Ile	5,48	0,92	5,53	1,13	8,64	2,36	6,67	2,56	3,96	1,44
Leu	9,35	0,42	10,00	0,52	13,18	1,08	10,83	1,17	7,29	0,66
Lys	6,30	0,69	6,28	0,85	5,45	1,77	5,83	1,92	6,04	1,08
Met	2,33	0,21	2,34	0,26	2,73	0,54	2,92	0,58	1,77	0,33
Phe	4,20	0,59	3,94	0,73	7,27	1,51	2,92	1,64	3,33	0,92
Pro	5,15	0,75	5,74	0,92	1,82	1,92	2,08	2,09	7,71	1,17
Ser	8,50	0,47	5,21	0,58	4,09	1,20	6,67	1,31	5,52	0,73
Thr	5,57	0,32	5,00	0,39	2,73	0,82	7,50	0,89	5,42	0,50
Trp	1,30	0,12	2,02	0,15	2,73	0,31	2,50	0,33	1,56	0,19
Tyr	3,03	0,26	6,28	0,32	4,09	0,67	5,42	0,72	6,04	0,41
Val	6,09	0,42	6,70	0,52	8,64	1,08	10,00	1,17	4,69	0,66
<b>Частоты встречаемости аминокислот в соседних с аспарагином позициях пентапептидов</b>										
AK	база данных Swiss-Prot	первичная структура	$\alpha$ -спираль	$\beta$ -лист	петля					

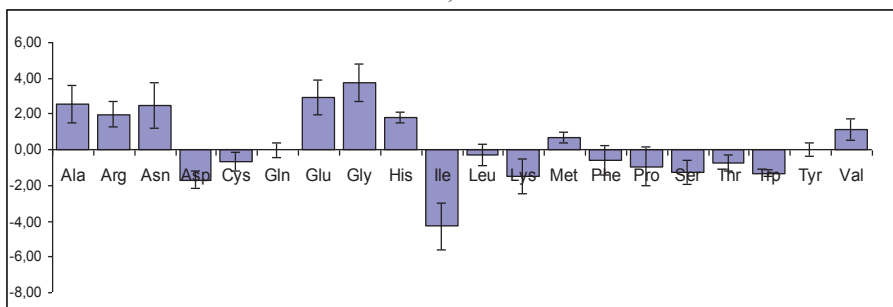


## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

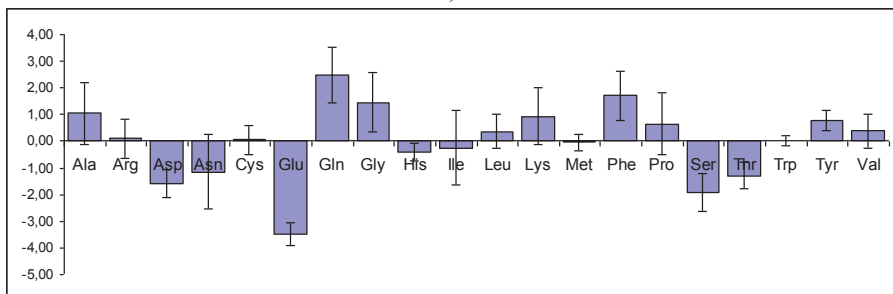
	сре дня я час тота	ошибк а	частота	ошиб ка	часто та	ошиб ка	часто та	ошиб ка	часто та	ошиб ка
Ala	6,48	0,76	6,01	0,84	8,18	1,76	3,13	1,88	6,46	0,95
Arg	5,24	0,49	3,88	0,54	3,41	1,13	2,50	1,22	4,79	0,61
Asp	5,31	0,35	5,64	0,39	2,50	0,81	7,50	0,87	6,15	0,44
Asn	4,76	0,90	4,52	1,00	2,50	2,08	5,00	2,23	5,21	1,13
Cys	1,86	0,35	3,03	0,39	2,73	0,81	2,92	0,87	3,23	0,44
Glu	6,64	0,28	4,31	0,31	3,41	0,65	5,83	0,69	3,96	0,35
Gln	4,28	0,69	6,70	0,77	6,14	1,59	5,83	1,71	7,40	0,86
Gly	5,88	0,72	6,12	0,80	5,23	1,66	5,21	1,79	6,98	0,90
His	2,41	0,21	2,45	0,23	2,73	0,49	2,08	0,52	2,50	0,26
Ile	5,48	0,92	6,01	1,02	10,00	2,13	6,46	2,28	3,96	1,15
Leu	9,35	0,42	9,57	0,47	13,18	0,97	10,83	1,04	7,29	0,53
Lys	6,30	0,69	5,80	0,77	5,00	1,59	6,04	1,71	6,04	0,86
Met	2,33	0,21	2,13	0,23	3,18	0,49	1,88	0,52	1,77	0,26
Phe	4,20	0,59	3,94	0,65	6,14	1,36	3,13	1,46	3,33	0,74
Pro	5,15	0,75	5,11	0,83	2,95	1,73	1,88	1,86	7,71	0,94
Ser	8,50	0,47	5,90	0,52	5,23	1,09	7,29	1,17	5,52	0,59
Thr	5,57	0,32	5,11	0,36	1,36	0,74	7,92	0,79	5,42	0,40
Trp	1,30	0,12	1,81	0,13	1,36	0,28	2,71	0,30	1,56	0,15
Tyr	3,03	0,26	5,05	0,29	3,64	0,60	4,38	0,64	6,04	0,33
Val	6,09	0,42	6,91	0,47	11,14	0,97	7,50	1,04	4,69	0,53

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

а)



б)



## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

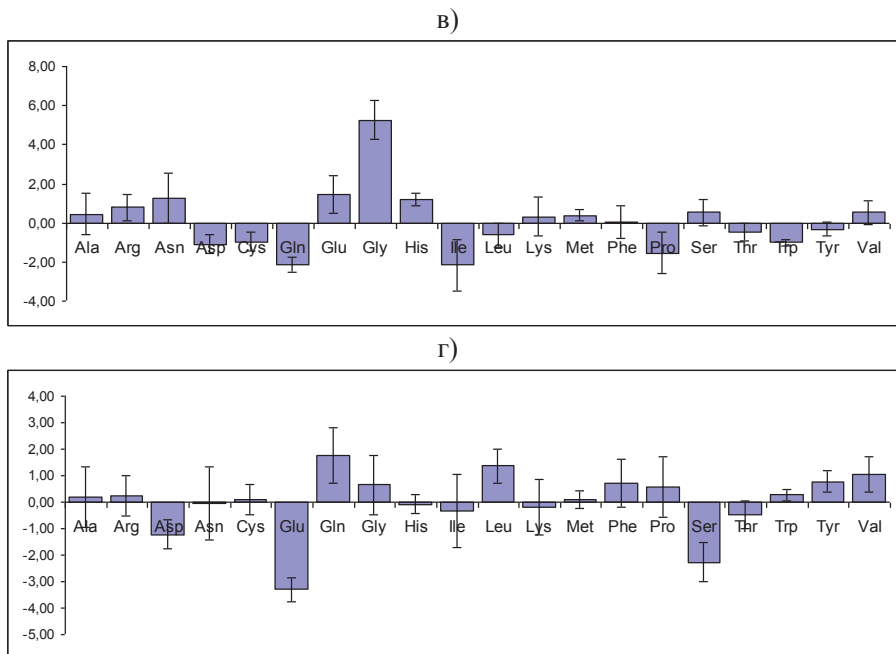
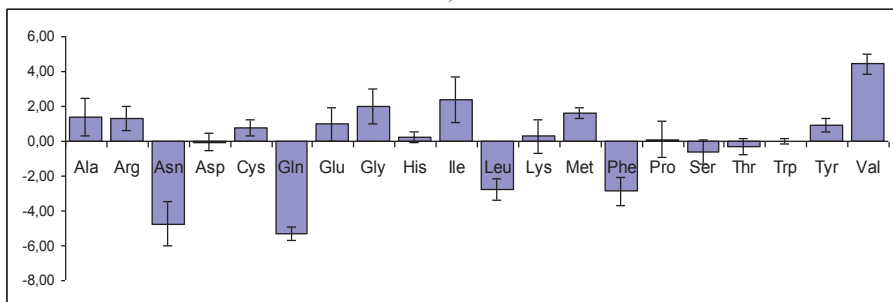


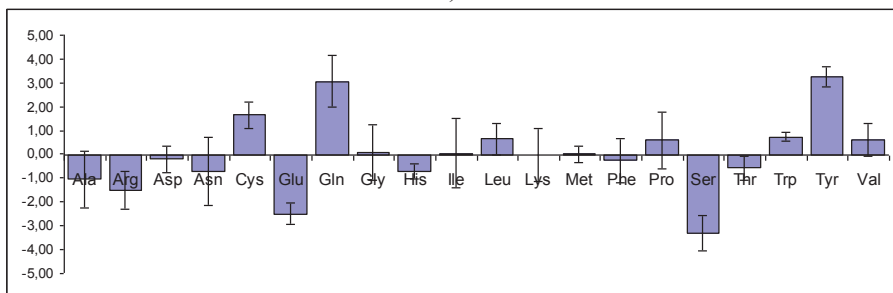
Рис. 2.2. Гистограммы разности между частотой встречаемости аминокислот в соседних с аспаратом позициях аминокислотных последовательностей белков, в которых наблюдается рацемизация (а, в); всех исследуемых белков (б, г) и средней частотой встречаемости аминокислот для трипептидов (X-D-X) (а, б), пентапептидов (X-X-D-X-X) (в, г).

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

а)



б)



## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

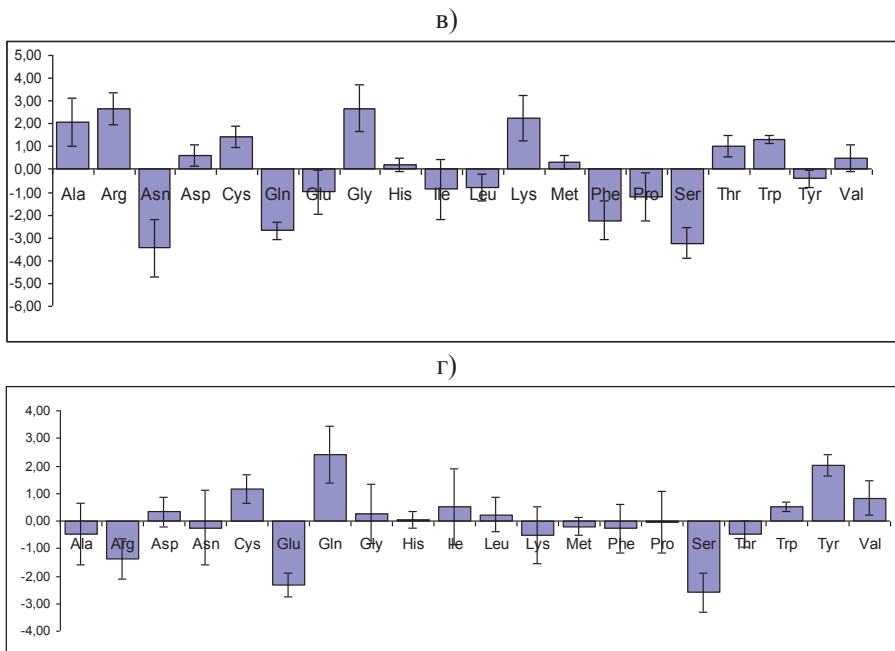
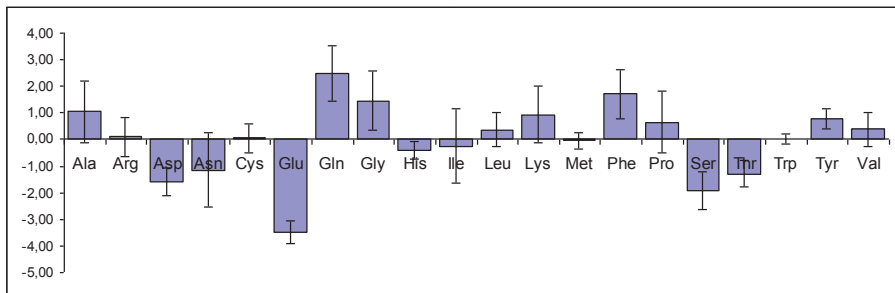


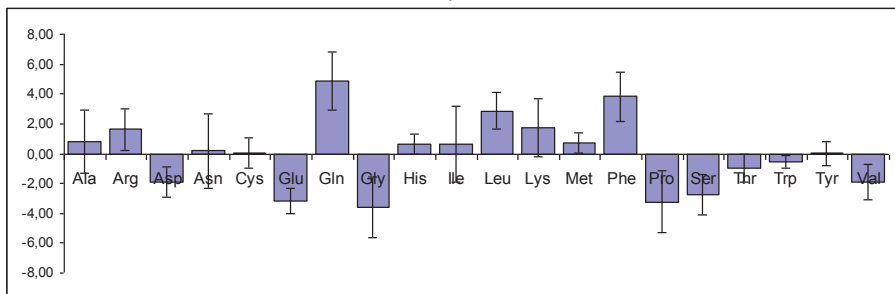
Рис. 2.3. Гистограммы разности между частотой встречаемости аминокислот в соседних с аспарагином позициях аминокислотных последовательностей белков, в которых наблюдается рацемизация (а, в); всех исследуемых белков (б, г) и средней частотой встречаемости аминокислот для трипептидов (X-D-X) (а, б), пентапептидов (X-X-D-X-X) (в, г).

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

а)



б)



## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

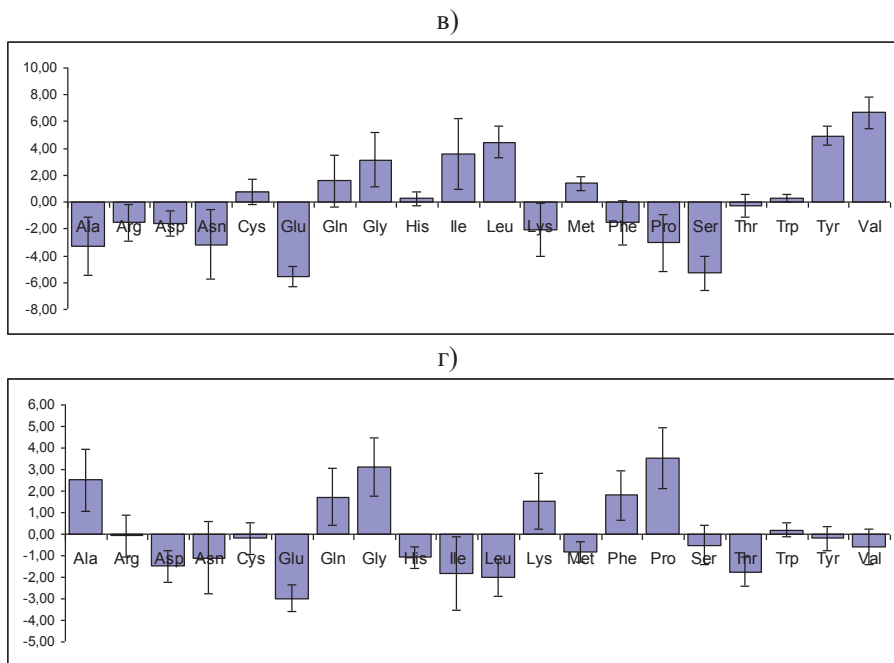
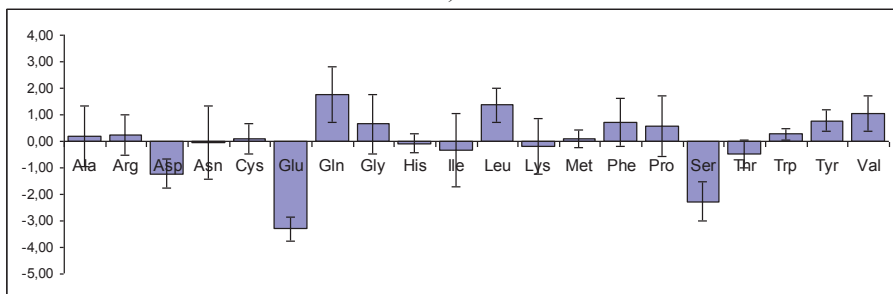


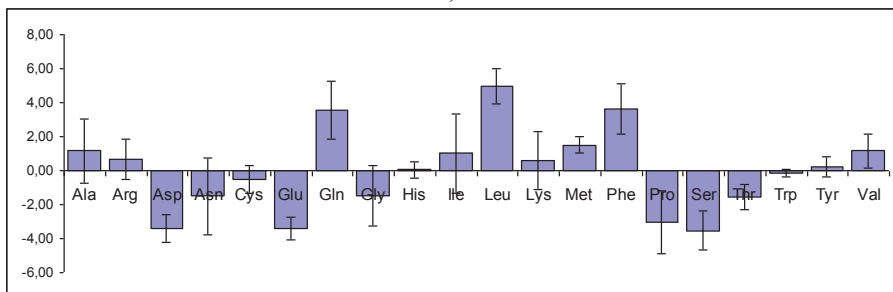
Рис. 2.4. Гистограммы разности между частотой встречаемости аминокислот в соседних с аспаргатом позициях трипептидов (X-D-X) и средней частотой встречаемости аминокислот а) без учета вторичной структуры; б) в  $\alpha$ -спиралях; в) в  $\beta$ -слоях; г) в петлях.

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

а)



б)





## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

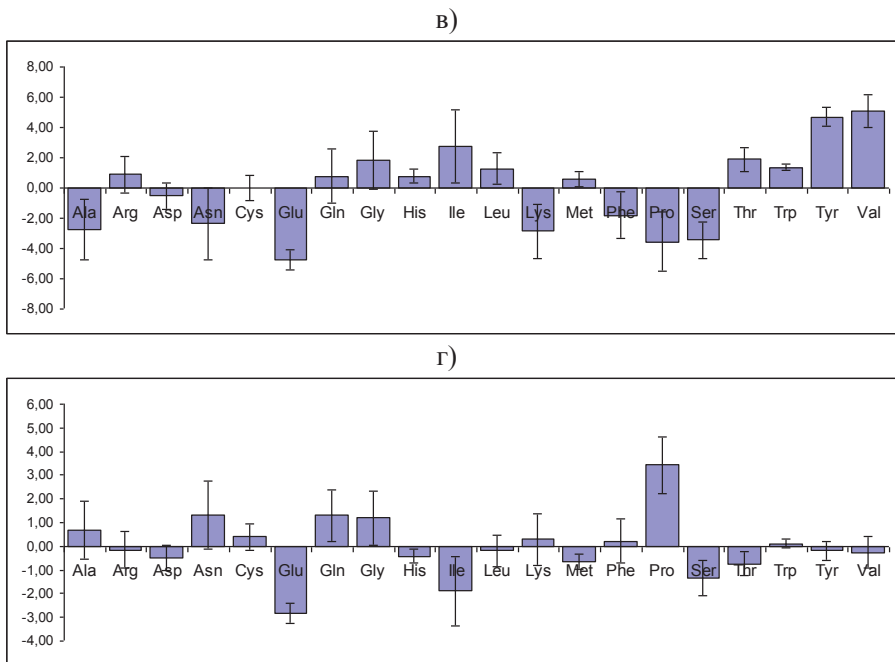
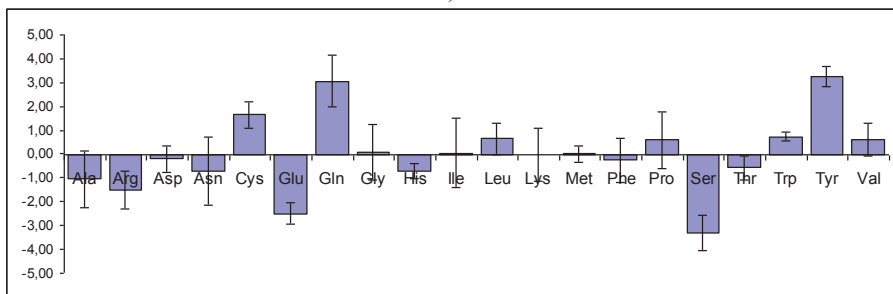


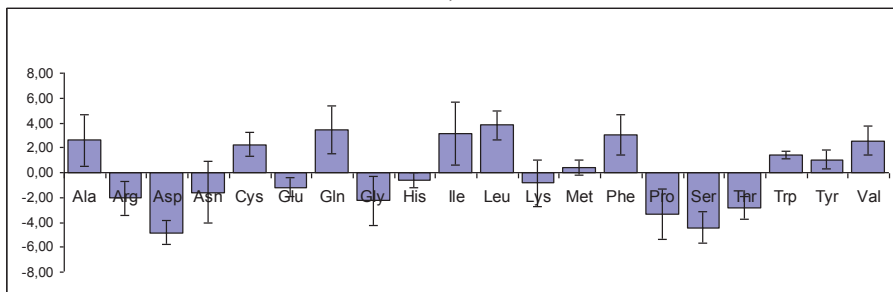
Рис. 2.5. Гистограммы разности между частотой встречаемости аминокислот в соседним с аспаратом позициях пентапептидов (X-X-D-X-X) и средней частотой встречаемости аминокислот а) без учета вторичной структуры; б) в  $\alpha$ -спиралях; в) в  $\beta$ -слоях; г) в петлях.

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

а)



б)



## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

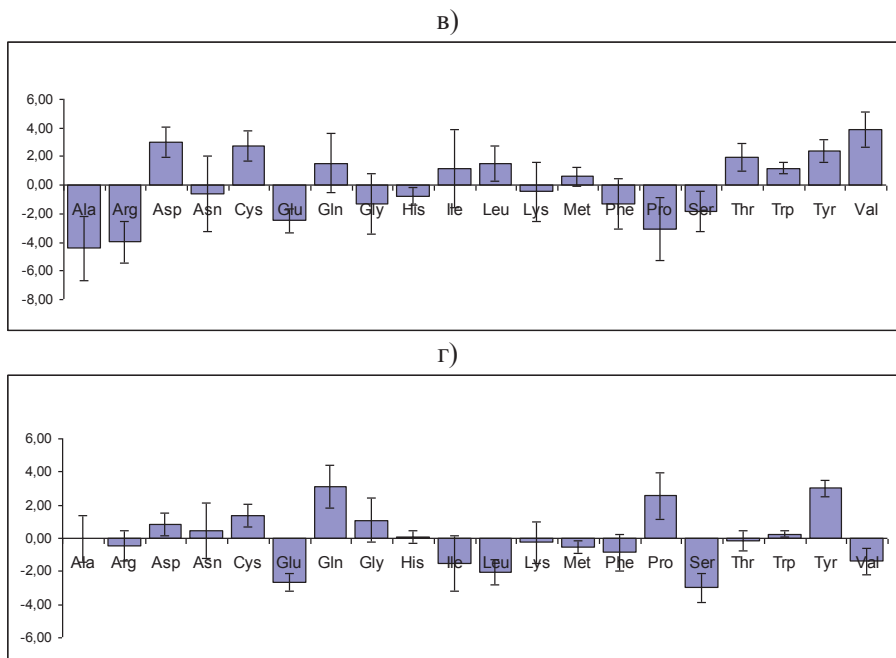
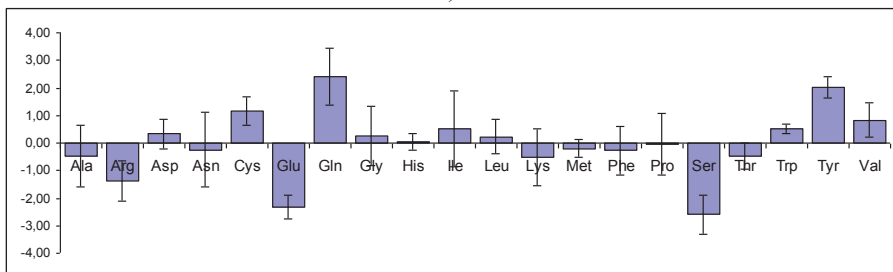


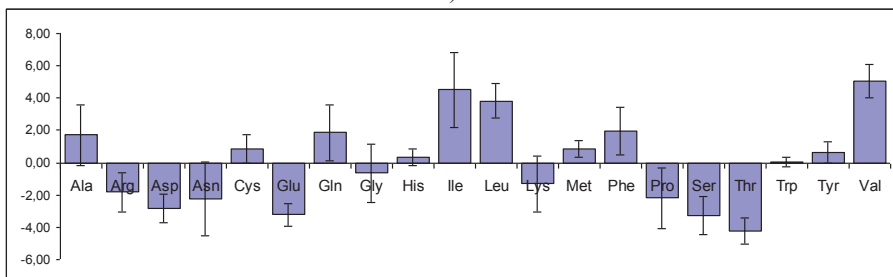
Рис. 2.6. Гистограммы разности между частотой встречаемости аминокислот в соседних с аспарагином позициях трипептидов (X-N-X) и средней частотой встречаемости аминокислот а) без учета вторичной структуры; б) в  $\alpha$ -спиралях; в) в  $\beta$ -слоях; г) в петлях.

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

а)



б)



## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

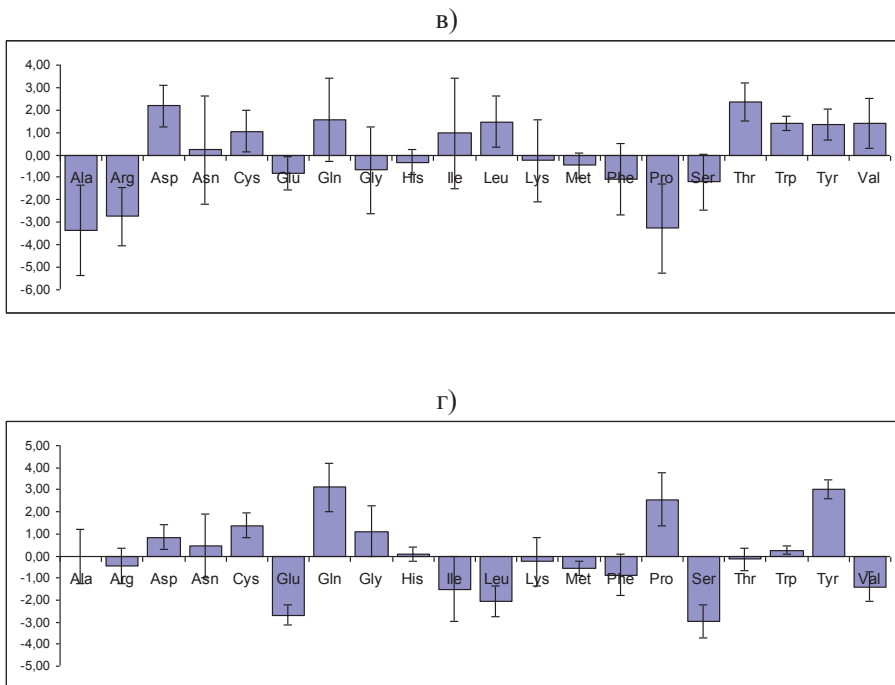


Рис. 2.7. Гистограммы разности между частотой встречаемости аминокислот в соседним с аспарагином позициях пентапептидов (X-X-N-X-X) и средней частотой встречаемости аминокислот а) без учета вторичной структуры; б) в  $\alpha$ -спиралях; в) в  $\beta$ -слоях; г) в петлях.

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

Также был проведен качественный анализ пространственной структуры белков, в которых наблюдается рацемизация (тех белков, пространственная структура которых известна:  $\beta$ -амилоид, остеокальцин, аквапорин, лизоцим). Было установлено, что остатки Asx и Glx на некоторых участках пространственно сближены.

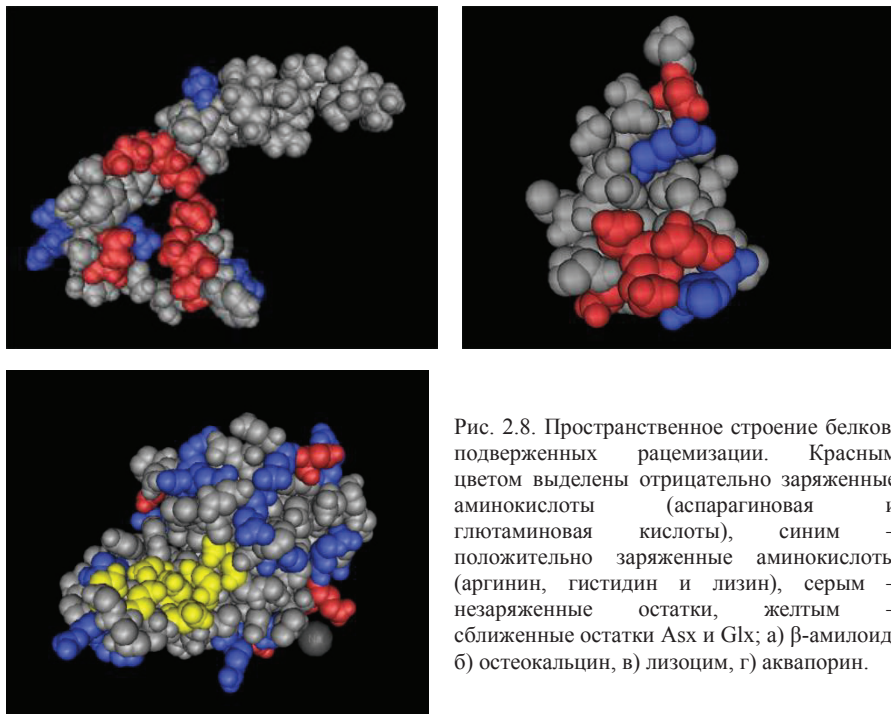


Рис. 2.8. Пространственное строение белков, подверженных рацемизации. Красным цветом выделены отрицательно заряженные аминокислоты (аспарагиновая и глутаминовая кислоты), синим – положительно заряженные аминокислоты (аргинин, гистидин и лизин), серым – незаряженные остатки, желтым – сближенные остатки Asx и Glx; а)  $\beta$ -амилоид, б) остеокальцин, в) лизоцим, г) аквапорин.

Увеличение частоты встречаемости глицина в соседних как с аспаратом так и с аспарагином позициях трипептидов в первичной структуре белков, в которых наблюдается рацемизация относительно всего пула белков, вполне ожидаемый результат. Согласно литературным данным глицин в следующей за Asx позиции приводит к максимальной скорости рацемизации. Немного увеличиваются частоты встречаемости и других аминокислот (гистидин, аланин), при соседстве с которыми скорость рацемизации Asx наибольшая. Однако, результаты не однозначны. Так, увеличиваются частоты встречаемости валина и

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

глутаминовой кислоты, аминокислот, при соседстве с которыми скорость рацемизации  $Asx$  низкая. А частота встречаемости серина наоборот, уменьшается, хотя скорость рацемизации  $Asx$  в соседних с серином позициях сравнительно высокая. Необходимо отметить, что выборка подверженных рацемизации белков не велика. Это ограничение возникает ввиду недостаточности, на сегодняшний день, информации о таких белках. Но число белков, в которых наблюдают рацемизацию, приводящую к различным патологиям, возрастает с каждым годом. Именно поэтому представляется важным обобщить свойства подверженных рацемизации белков, для того чтобы попытаться предсказать подверженность рацемизации белков, где на сегодняшний день она не замечена.

В целом, анализ не выявил разительных отличий в частотах встречаемости аминокислот в соседних с аспаратом позициях от средней частоты встречаемости аминокислот. Можно предположить, что скорость рацемизации *in vivo* определяется не столько первичной структурой, но и вторичной, третичной структурой белков, пространственным окружением. С другой стороны, отсутствие принципиальных отличий в частотах встречаемости аминокислот в соседних с аспаратом позициях от средней частоты встречаемости аминокислот может свидетельствовать о том, что существующие на сегодняшний день данные о белках, в которых наблюдается рацемизация далеко не полные, и другие белки также могут оказаться подверженными рацемизации. Но у короткоживущих белков скорость рацемизации меньше скорости, с которой происходит обновление белка, и следовательно, D-аминокислоты в таких белках накапливаться не будут. В случае долгоживущих белков уровень содержания D-аминокислот прямо пропорционален времени жизни белка, и для некоторых белков может быть весьма низким, что ведет к трудностям в определении присутствия D-аминокислот. Однако, даже самые маленькие концентрации D-аминокислот могут привести к изменению пространственной структуры, стереоспецифичности и полной потере функции белка.

Анализ показал, что частоты встречаемости аминокислот в соседних с  $Asx$  позициях зависят от положения  $Asx$  во вторичной структуре. Так как наиболее подвержены рацемизации  $Asx$ , находящиеся на открытых участках, изгибах, петлях, а располагающиеся в  $\alpha$ -спиралях и  $\beta$ -листах рацемизируются в меньшей степени, а скорость рацемизации определяется в некоторой степени первичной структурой, то некоторого

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

различия в частотах встречаемости аминокислот в соседних с Asx позициях следовало ожидать. Наиболее примечательным является увеличение частоты встречаемости глицина в петлях вторичной структуры в соседних с аспаратом позициях и уменьшение частот встречаемости аланина, серина и аспартата в  $\alpha$ -спиралях и  $\beta$ -листах. Но, согласно литературным данным, даже при сходной первичной структуре, скорость рацемизации Asx зависит от вторичной структуры. Таким образом, можно предположить, что степень влияния вторичной структуры на скорость рацемизации аспартата больше, чем принято считать.

В белках, в которых наблюдается рацемизация, выделяются участки, где остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот пространственно сближены, и, таким образом, возникает локальный отрицательный заряд. В белках остеокальцине и  $\beta$ -амилоиде в непосредственной близости от отрицательно заряженных областей располагаются области положительного заряда. Можно предположить, что в этих случаях возникает локальное электростатическое поле, а переход L-Asp  $\rightarrow$  D-Asp энергетически выгоден и ведет к локальному уменьшению энергии в этой области. Предметом дальнейших исследований могут стать детальный анализ пространственной структуры рацемизирующихся белков и расчет энергий электростатического взаимодействия заряженных групп для L- и D-конфигураций аспартата.

Присутствие отрицательно заряженных областей, в которых и происходит рацемизация наталкивает на мысль, что *in vivo* такие области могут взаимодействовать с положительно заряженными ионами металлов, которые, находясь в определенном стерическом положении, могут перетягивать на себя и электронную плотность азотного остатка аминокислоты, следующей за Asx, и тем самым, увеличивать вероятность образования суцинимид-посредника. Взаимодействие отрицательно заряженных радикалов с металлами переменной валентности может приводить к интересным эффектам: так, недавно, на основе комплексов хиральных органических лигандов и редокс-активных ионов металлов переменной валентности, был сконструирован биоорганический «переключатель». Компьютерное моделирование комплексов остатков Asx с различными металлами, расчет энергий и конформаций образующихся комплексов, вероятности образования суцинимид-посредника в этих комплексах, могут служить предметом дальнейших исследований.



## 2.2. Линейная модель неферментативной модификации

Если обозначить через  $X(t) \geq 0$  – концентрацию изоаспарагиновой кислоты (isoAsp) или D-аспарагиновой кислоты (D-Asp) в белке, то дифференциальное уравнение, описывающее изменение данной концентрации во времени, примет следующий вид

$$\dot{X} = v \left( 1 - \frac{X}{C_0} \right), \quad (2.1)$$

где  $v$  – скорость изомеризации (или рацемизации) Asn (или Asp) в белке,  $C_0$  – наибольшая достижимая концентрация isoAsp или D-Asp в белке (концентрация насыщения).

Скорость  $v$  представляет собой постоянную величину, независящую от концентраций Asn, Asp, D-Asp и isoAsp. Выражение в скобках отражает наличие сдерживающего фактора, который, при больших  $X$ , полностью останавливает ее дальнейший рост. Концентрация насыщения  $C_0$  связана с возможностью обратной реакции.

Уравнение (2.1) следует дополнить периодическими граничными условиями

$$X(nT_0) = 0, \quad n = 0, 1, 2, 3, \dots \quad (2.2)$$

Здесь  $T_0$  – время жизни (обновления) белка,  $n$  – определяет периодичность обновления белка.

Представляют интерес только те случаи, когда  $T_0 > 1/v$  (время жизни белка больше времени неферментативной модификации аминокислотного остатка). В противном случае, за время жизни белка в нем не успевают аккумулироваться D-Asp и isoAsp.

### Одиночный модельный белок

Уравнение (2.1) представляет собой линейное дифференциальное уравнение с разделяющимися переменными. Решением (2.1) с учетом граничных условий (2.2), для одиночного белка при  $v = \text{const}$  (не

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

зависит от структуры следующего за Asn (или Asp) аминокислотного остатка) и  $T_0 > 1/v$ , является функция

$$X = C_0 - C_0 \exp\left[-\frac{v}{C_0}(t - nT_0)\right]. \quad (2.3)$$

График (2.3) представлен на рис. 2.9. Вид полученной зависимости наглядно демонстрирует, что в изменение концентрации модифицированных Asp-остатков носит периодический характер, а обновление аспарагиновых кислот происходит за счет обновления белка.

В этом случае, концентрация модифицированных аспарагиновых кислот в белке не является постоянной за время жизни организма, а также не увеличивается и не уменьшается за это время.

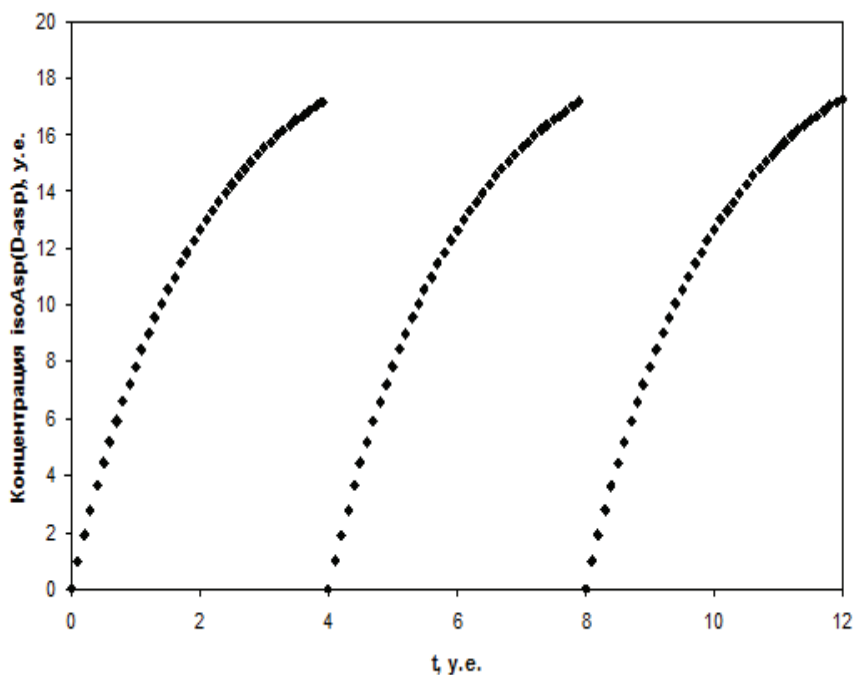


Рис. 2.9. Зависимость концентрации isoAsp (D-asp) в одиночном белке от времени

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

Представленная зависимость может показывать стабильное увеличение содержания модифицированных Asp с возрастом, только в случае совпадения (или соизмеримости) времени жизни белка со временем жизни организма. Такая ситуация характерна для некоторых очень медленно обновляющихся белков, таких как эластин, коллаген и т.п.

### **Совокупность белков организма в норме с учетом распределения скоростей изомеризации и относительных частот фрагмента Asn-Xxx**

Живой организм не ограничивается одним белком. Так для обеспечения существования жизненно важных процессов в высокоорганизованном организме требуется  $10^4 - 10^5$  ферментов [Эбелинг, 2001]. Поэтому для усовершенствования модели необходим учет совокупности белков организма, не ограничиваясь одиночным белком.

Более реалистичная модель предполагает также учет зависимости скорости образования isoAsp из Asn в зависимости от соседнего (справа) аминокислотного остатка в белке [Stephenson & Clarke, 1989], а также распределения относительных частот  $X_{Asn-Xxx} = X_{Asn-Xxx} / C_{Asn}$  – отношение количества Asn в фрагменте Asn-Xxx аминокислотной последовательности к общему количеству Asn в белке.

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

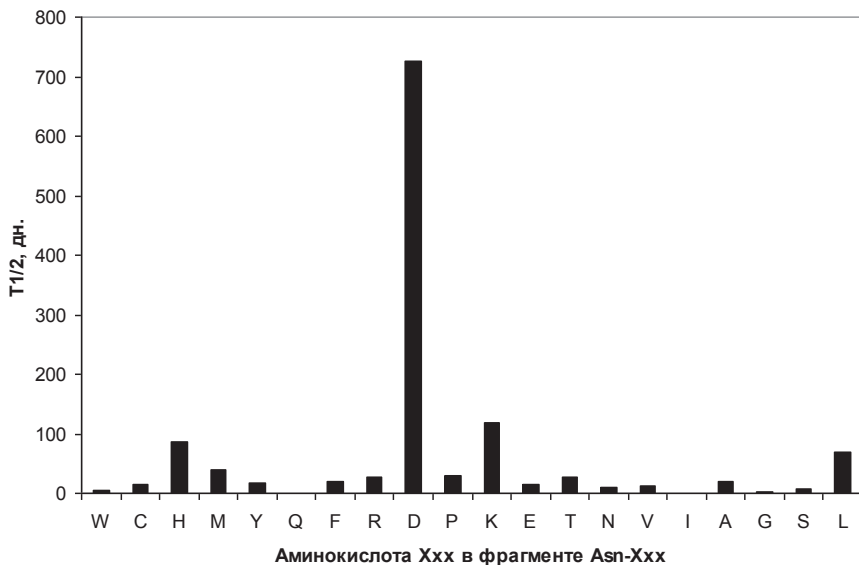


Рис. 2.10. Распределение времен полужизни ( $T_{1/2}$ ) Asn в фрагментах Asn-Xxx белков

Время реакции образования isoAsp, прежде всего, зависит от структуры следующей (справа от данной) аминокислоты в аминокислотной последовательности белка. Причем, как установлено [Stephenson & Clark, 1988], образование isoAsp из Asn происходит значительно быстрее, чем образования isoAsp из Asp. Так время полужизни ( $T_{1/2}$ ) Asn составляет не более 100 дней: для Asn фрагмента Asn-Gly последовательности  $T_{1/2} = 1$  день (для фрагмента Asp-Gly  $T_{1/2} = 53$  дня), фрагмента Asn-Ala –  $T_{1/2} = 20$  дней (для фрагмента Asp-Ala  $T_{1/2} = 266$  дней), фрагмента Asn-Ser –  $T_{1/2} = 8$  дней (для фрагмента Asp-Ser  $T_{1/2} = 168$  дней), фрагмента Asn-Leu –  $T_{1/2} = 70$  дней (для других комбинаций аминокислот экспериментальные данные отсутствуют).

Величина  $T_{1/2}$ , с хорошей степенью точности, представляет собой время реакции  $\text{Asn} \rightarrow \text{isoAsp}$  в полипептиде Val-Tyr-Pro-Asx-Xxx-Ala, которая происходит с участием Asu-посредника. Для получения точной оценки  $T_{1/2}$  наиболее оправданным является использование неэмпирического квантовохимического расчета, который требует

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

значительных затрат расчетного времени. Одним из эффективных подходов к оценке  $T_{1/2}$  является использования формализма метода KCCC (количественные соотношения структура-свойство) [Molnar & King, 2001], причем в качестве дескриптора структуры можно использовать величину  $\Delta E = E_{\text{isoAsp-Xxx}} - E_{\text{Asn-Xxx}}$ , где  $E$  – полная энергия дипептида isoAsp-Xxx и Asn-Xxx, соответственно. Величину  $\Delta E$  рассчитывали полуэмпирическим квантовохимическим методом MNDO/AM1 в стандартной параметризации [Honorio & Da Silva, 2003].

Полученное, по имеющимся экспериментальным значениям  $T_{1/2}$ (дн.) и рассчитанным  $\Delta E$ (ккал/моль), регрессионное уравнение имеет вид

$$T_{1/2} = 6.31(\pm 0.85)\Delta E - 2.09(\pm 2.25), \quad (2.4)$$

с критериями статистической значимости  $R=0.97$ ,  $R^2=0.93$ ,  $R_a^2=0.90$ .

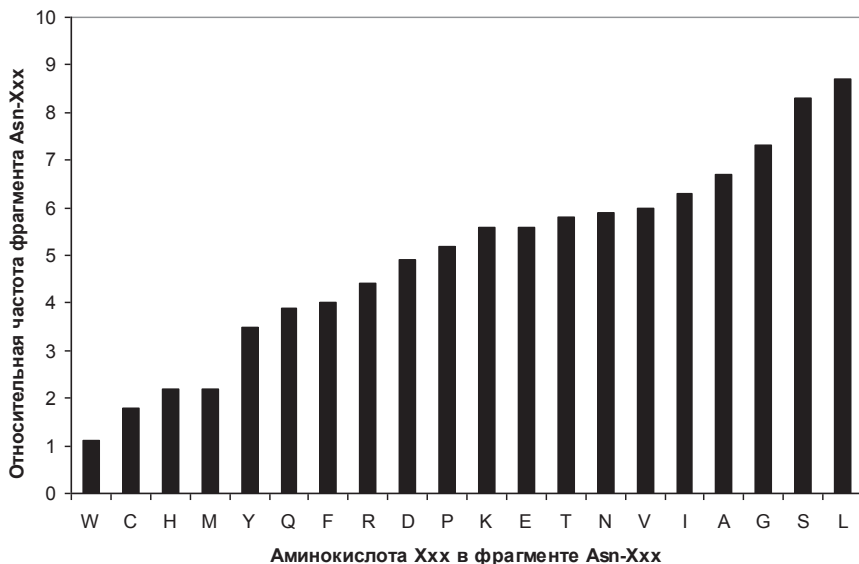


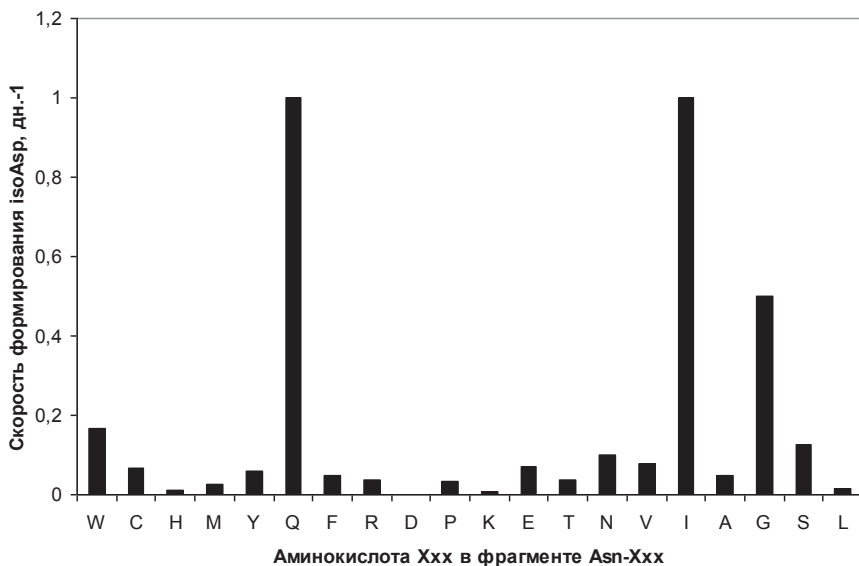
Рис. 2.11. Распределение относительных частот фрагментов Asn-Xxx в белках

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

Результаты прогнозирования по уравнению (2.4) значений  $T_{1/2}$  для Asn не вошедших в это уравнение представлены на рис. 2.11. Время полужизни Asn различных фрагментов Asn-Xxx не превышает 100 дней. Исключение составляет дипептид Asn-Asp, для которого  $T_{1/2} = 746$  дней.

Расчет предельных значений  $X_{Asn-Xxx}$  (относительных частот  $C_{Asn-Xxx} = C_{Asn-Xxx} / C_{Asn}$ ) проводили по результатам статистического анализа 17074 аминокислотных последовательностей включающих Asn. Данные брали из Банка белковых структур (Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, USA). Распределение  $C_{Asn-Xxx}$  представлено на рис. 2.12.

Анализ данного распределения показывает, что встречающимися фрагментами последовательности являются NL, NS, NG, NA, NI, NV, NN, NT, NE, NK и NP ( $C_{NJ} > 5\%$ ). При этом время необходимое для изомеризации Asn в этих фрагментах, за исключением NL, NA, NV, NT, NE, NK и NP, составляет не более 2.5 дней.



## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

Рис. 2.12. Распределение скоростей формирования isoAsp в фрагментах Asp-Xxx белков

Поэтому исследование динамики неферментативной изомеризации Asp в фрагментах NS, NG, NI, NN, NW, NQ и NC представляет интерес для ионных каналов (среднее время жизни 2.5 дня).

В некотором отношении, подобные исследования представлены в работе [Жаворонковс, 2008]. Установлено, что увеличение частоты встречаемости глицина в соседних как с аспаратом так и с аспарагином позициях трипептидов в первичной структуре белков, в которых наблюдается рацемизация относительно всего пула белков, вполне ожидаемый результат. Согласно литературным данным глицин в следующей за Asp позиции приводит к максимальной скорости рацемизации. Немного увеличиваются частоты встречаемости и других аминокислот (гистидин, аланин), при соседстве с которыми скорость рацемизации Asp наибольшая. Однако, результаты не однозначны. Так, увеличиваются частоты встречаемости валина и глютаминовой кислоты, аминокислот, при соседстве с которыми скорость рацемизации Asp низкая. А частота встречаемости серина наоборот, уменьшается, хотя скорость рацемизации Asp в соседних с серином позициях сравнительно высокая. Необходимо отметить, что выборка подверженных рацемизации белков не велика. Это ограничение возникает ввиду недостаточности, на сегодняшний день, информации о таких белках. Но число белков, в которых наблюдают рацемизацию, приводящую к различным патологиям, возрастает с каждым годом. Именно поэтому представляется важным обобщить свойства подверженных рацемизации белков, для того чтобы попытаться предсказать подверженность рацемизации белков, где на сегодняшний день она не замечена.

В общем случае, уравнение для  $X_{iAsp} - X_{xxx}$  примет следующий вид

$$\dot{X}_{iAsp-Xxx} = V_{iAsp-Xxx} \left( \frac{1}{C_{Asn}} - \frac{X_{iAsp-Xxx}}{C_{iAsp-Xxx}} \right),$$

$$X_{xxx} = W, C, H, M, Y, Q, F, R, D, P, K, E, T, N, V, I, A, G, S, L. \quad (2.5)$$

Периодические граничные условия

$$X_{iAsp-Xxx}(nT_0) = 0,$$

Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

$$X_{xx} = W, C, H, M, Y, Q, F, R, D, P, K, E, T, N, V, I, A, G, S, L \quad (2.6)$$

Решением (4.5) с учетом (4.6) является функция

$$x_{iAsp-X_{xx}} = c_{Asn-X_{xx}} - c_{Asn-X_{xx}} \exp\left[-\frac{v_{iAsp-X_{xx}}}{C_{iAsp-X_{xx}}}(t - nT_0)\right]. \quad (2.7)$$

Тогда изменение относительной частоты isoAsp в k-м белке определяется выражением

$$x_k = \sum_{X_{xx}} c_{Asn-X_{xx}} - \sum_{X_{xx}} c_{Asn-X_{xx}} \exp\left[-\frac{v_{iAsp-X_{xx}}}{C_{iAsp-X_{xx}}}(t - nT_0)\right]. \quad (2.8)$$

График зависимостей (2.8) для 10 белков представлен на рис. 2.13.

Наибольший интерес представляет исследование совокупности белков организма с одинаковым временем жизни  $T_0$ . Очевидно, в этом случае, зависимости относительных частот isoAsp от времени для всех белков будут иметь вид, представленный на рисунке, а графики функций  $x = x(t)$  в единой системе координат будут транслированы на  $\Delta t_k$  относительно графика функции (2.8). Причем  $\Delta t_k < T_0$  будет принимать как положительные (запаздывание обновления белка), так и отрицательные (опережение обновления белка) значения.



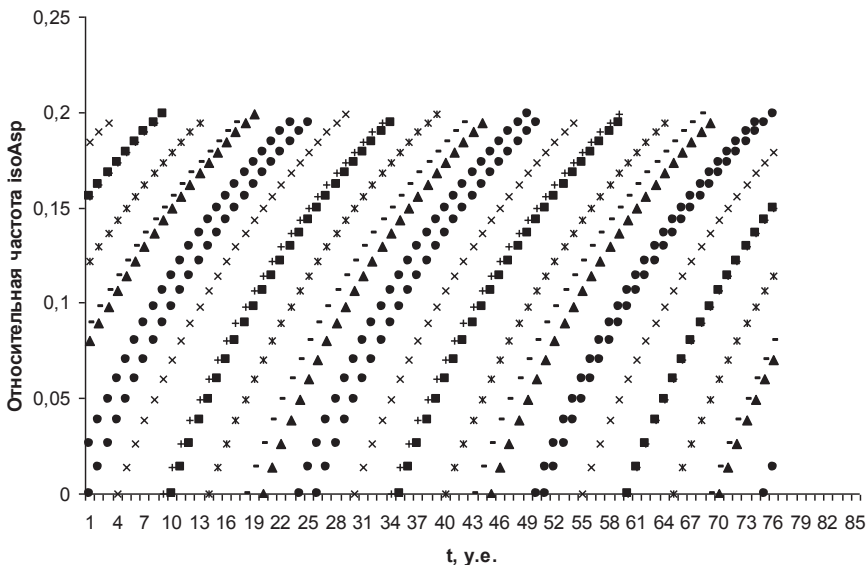


Рис. 2.14. Зависимости относительной частоты isoAsp от времени для 10 белков

Учитывая периодичность (2.8), среднее значение  $\langle X \rangle$  относительной частоты isoAsp в любой момент времени для совокупности  $N_0$  белков организма можно определить, разбив отрезок  $[0, T_0]$  на  $N_0$  малых отрезков длиной  $\Delta t$  каждый.

$$\langle X \rangle = \frac{1}{N_0} \sum_{k=0}^{N_0} \left( \sum_J c_{NJ} - \sum_J c_{NJ} \exp \left[ -\frac{v_{NJ}}{C_{NJ}} (k\Delta t) \right] \right). \quad (2.9)$$

Таким образом, в отличие от одиночного белка для которого  $x \in \left[ 0, \sum_J c_{NJ} \right]$ , средняя относительная частота isoAsp в любой момент времени равна  $\langle X \rangle$ .

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

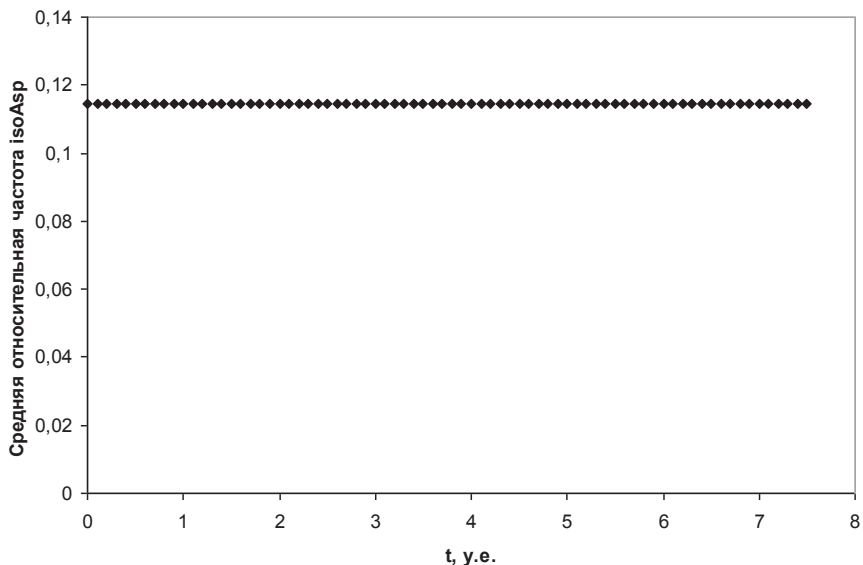


Рис. 2.15. Зависимость средней по совокупности белков относительной частоты isoAsp от времени

График зависимости (2.9) представлен на рис. 2.16. Этот график показывает, что средняя по совокупности аминокислот относительная частота isoAsp имеет постоянное значение на протяжении жизни организма и составляет примерно 12%. Следовательно, если время жизни белка больше времени реакции образования isoAsp, то даже в медленно обновляющихся белках возможно определенное содержание изоаспарагиновой кислоты на протяжении жизни организма и это содержание не меняется с возрастом организма.

### **Одиночный белок с учетом увеличения времени жизни белков с возрастом**

Для появления хиральных дефектов в полипептидной цепи белка необходимо время, поэтому для нормальной жизни клетки важно четкое сопряжение процессов синтеза и разрушения белков. С возрастом скорость этих процессов снижается, что приводит к увеличению сроков

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

использования белков в клетках и, соответственно, к увеличению вероятности появления дефектов в их структурах [Ward, 2000]. Поэтому дальнейшее усовершенствование модели требует учета изменения времени обновления белка с возрастом организма.

Изменение относительной частоты isoAsp в одиночном белке при увеличении его времени жизни на  $\Delta t_m$  с возрастом организма в каждом из  $m$ -х периодов определяется по формуле

$$x = \sum_J c_{NJ} - \sum_J c_{NJ} \exp\left[-\frac{v_{NJ}}{C_{NJ}}(t - n(T_0 + \Delta t_m))\right]. \quad (2.10)$$

Среднее значение по совокупности белков в  $m$ -м периоде

$$\langle x \rangle = \frac{1}{N_0} \sum_{k=0}^{N_0} \left( \sum_J c_{NJ} - \sum_J c_{NJ} \exp\left[-\frac{v_{NJ}}{C_{NJ}}(t - n(T_0 + \Delta t_m))\right] \right). \quad (2.11)$$

Графики зависимостей (2.10) и (2.11) представлены на рис. 2.17 и 2.18, соответственно. График зависимости (2.10) наглядно демонстрирует, что с возрастом организма на интервалах соответствующих времени жизни белка происходит увеличение относительной частоты isoAsp. При этом среднее по совокупности белков значение относительной частоты isoAsp увеличивается с возрастом организма.

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

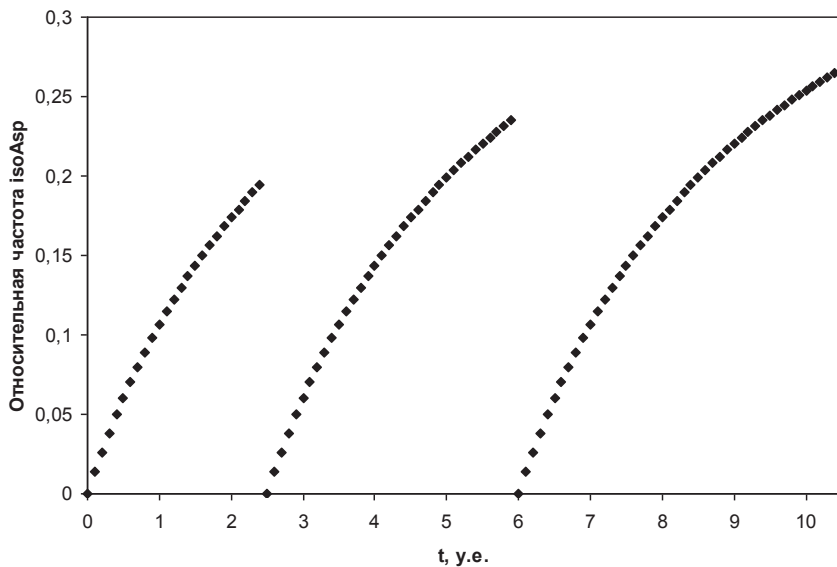


Рис. 2.17. Зависимость относительной частоты isoAsp в одиночном белке от времени с учетом изменения времени обновления белка с возрастом организма

Таким образом, аккумуляция isoAsp – это процесс который имеет значение не только для очень медленно обновляющихся белков, но и для медленно обновляющихся белков со временем жизни превышающим время протекания реакции образования isoAsp из Asn.

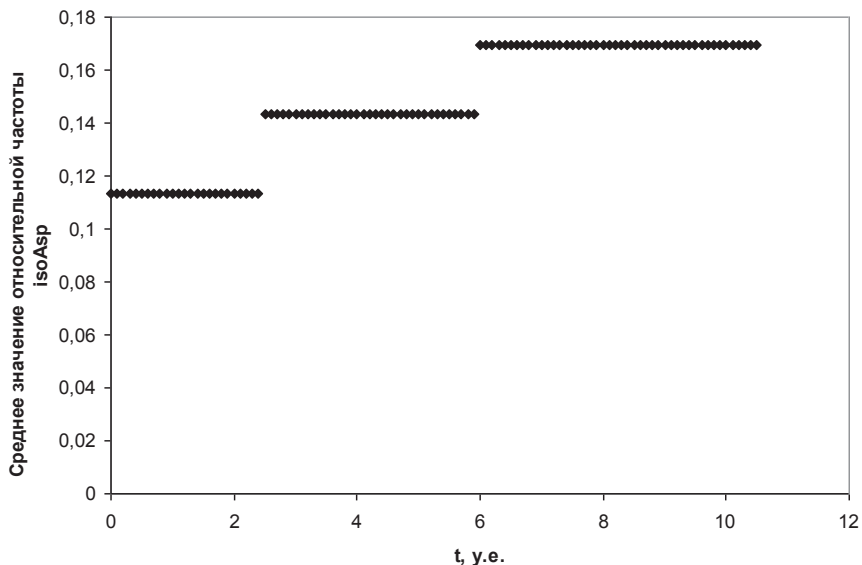


Рис. 2.18. Зависимость средней по совокупности белков относительной частоты isoAsp от времени с учетом изменения времени обновления белков с возрастом организма

### 2.3. Нелинейная модель неферментативной модификации

Известно, что все белки, синтезируемые в рибосомах, это L-аминокислотные белки. Вместе с тем, в процессе старения происходит увеличение процентного содержания D-энантиомеров аминокислот в белках различных тканей организмов человека и животных. В настоящее время не вызывает сомнений, что модификация (рацемизация и изомеризация) аминокислот это неизбежный процесс, сопровождающий старение организма, спонтанно происходящий во многих тканях различных организмов, и, в частности, в организме человека. Наиболее подверженными изомеризации аминокислотами в белках являются Asp и Asn (Asx).

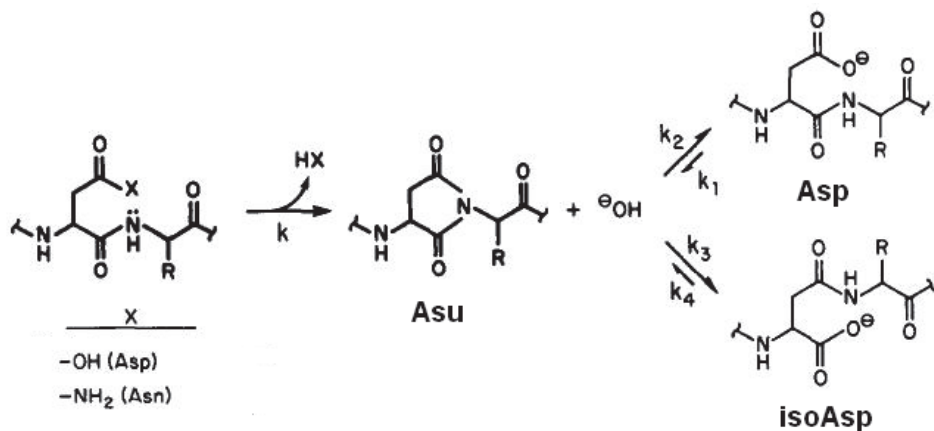


Рис. 2.19. Схема реакции спонтанной деградации пептидов, содержащих остатки Asx с участием сукцинимид-посредника (Asu)

Долгое время механизм изомеризации и рацемизации Asx не был ясен. Только в 1989 году Р. Стивенсон и С. Кларк, исследуя синтетические пептиды, объяснили механизм изомеризации Asx: остатки iAsp это продукты реакции посттрансляционной неферментативной изомеризации остатков Asx в белках.

Карбонильная группа остатка Asx атакуется азотным остатком аминокислоты, следующей за Asx. В результате формируется Asu, который при физиологических условиях не стабилен. Затем Asu гидролизуется с образованием Asp и iAsp. При этом  $[\text{Asp}]/[\text{iAsp}] = 1/3$ .

Скорость изомеризации Asx в искусственно синтезированных пептидах, прежде всего, зависит от того, какие аминокислоты находятся в соседних с ним позициях первичной структуры. Так время полужизни ( $t_{\text{Asx}}$ ) остатков Asx в зависимости от следующего остатка находится в последовательности Gly<Ser<Ala<Leu<Pro. Причем  $t_{\text{Asn}}$  в фрагменте первичной структуры -Asn-Gly- составляет 1,14 дня, в фрагменте -Asn-Pro- – 106 дней;  $t_{\text{Asp}}$  в фрагменте -Asn-Gly- составляет 40,8 дней, в фрагменте -Asn-Ala- – 266 дней. Кроме того, скорость изомеризации Asx зависит от вторичной и третичной структуры белков, но достоверных количественных результатов нам не известно.

Не вызывает сомнений, что скорость изомеризации Asx прямо пропорциональна  $[\text{OH}^-]$ . С помощью специализированных ферментов все

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

формы жизни сохраняют восстанавливающую среду внутри своих клеток. Но с возрастом организма, за счет нарушения работы восстанавливающей системы,  $[\text{OH}^-]$  увеличивается.

Ранее нами были проведены модельные исследования влияния изомеризации остатков  $\text{Asx}$  белков на структуру и механизмы функционирования ионных каналов клетки [1-3]. Результаты численного эксперимента позволили нам предположить, что возможные при старении и патологиях процессы изомеризации и рацемизации приводят к драматическому изменению ионной специфичности клеточных мембран.

Для дополнения ранее проведенных структурных исследований, моделированием кинетики реакции изомеризации, мы провели исследование значимости аккумуляции остатков  $i\text{Asp}$  и  $\text{Asp}$  в четырех классах белков: очень быстро обновляющихся ( $T_0 < 2$  час.), быстро обновляющихся ( $2 \text{ час.} < T_0 < 48$  час.), медленно обновляющихся ( $2 \text{ дн.} < T_0 < 10$  дн.) и очень медленно обновляющихся ( $T_0 > 10$  дн.) белков. Здесь  $T_0$  – время полужизни белка. Если биологическая значимость изомеризации аминокислот очень медленно обновляющихся белков, таких как коллаген и дентин, не вызывает сомнений, то для трех других классов белков вопрос о биологической значимости остается открытым. Последнее связано с тем, что для организма в норме  $T_0 < t_{\text{Asx}}$ .

Кинетика реакции описывается системой дифференциальных уравнений

$$\begin{cases} \dot{X}_1 = -kX_1 \\ \dot{X}_2 = kX_1 - (k_1 + k_2)X_2X_3 + k_3X_4 + k_4X_5 \\ \dot{X}_3 = -(k_1 + k_2)X_2X_3 + k_3X_4 + k_4X_5 \\ \dot{X}_4 = k_1X_2X_3 - k_3X_4 \\ \dot{X}_5 = k_2X_2X_3 - k_4X_5 \end{cases} \quad (2.12)$$

## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

с начальными условиями  $X_1|_{t=0} = X_{10}$ ,  $X_3|_{t=0} = X_{30}$ ,  $X_2|_{t=0} = X_4|_{t=0} = X_5|_{t=0} = 0$ , в которой  $X_1 = [\text{Asx}]$ ,  $X_2 = [\text{Asu}]$ ,  $X_3 = [\text{OH}]$ ,  $X_4 = [\text{Asp}]$ ,  $X_5 = [\text{iAsp}]$ .

Авторам работы не удалось получить аналитическое решение системы (численное решение представлено ниже), но удалось проанализировать изменение разности концентраций  $[\text{OH}]$  и  $[\text{Asu}]$ :  $\Delta X_{32} = X_3 - X_2$ . С позиций формализма нелинейной динамики, вид и характер функций  $X_2$  и  $X_3$  представляют наибольший интерес.

Совместное решение первых трех уравнений системы (2.12) дает зависимость:

$$\Delta X_{32} = X_{10} \left[ \exp(-kt) + \left( \frac{X_{30}}{X_{10}} - 1 \right) \right]. \quad (2.13)$$

Очевидна фуркация решения в точке  $t=0$ : при  $X_{30} > X_{10}$  и при  $X_{30} < X_{10}$ . В точке  $t=t_0$  происходит изменение знака  $\Delta X_{32}$ . Несложные преобразования дают следующее выражение

$$t_0 = -\frac{1}{k} \ln \left( 1 - \frac{X_{30}}{X_{10}} \right). \quad (2.14)$$

Таким образом, если справедливо неравенство  $X_{30} < X_{10}$ , то при  $t < t_0$   $[\text{OH}] > [\text{Asu}]$ ; при  $t = t_0$   $[\text{OH}] = [\text{Asu}]$ ; при  $t > t_0$   $[\text{OH}] < [\text{Asu}]$ . Если справедливо неравенство  $X_{30} > X_{10}$ , то  $[\text{OH}] > [\text{Asu}]$ .

Следуя зависимости (2.13), мы рассмотрели два наиболее интересных случая ( $X_{30} < X_{10}$  и  $X_{30} > X_{10}$ ) при различных значениях начальных концентраций.

Вид и характер полученных зависимостей  $X_i = X_i(t)$  позволяет сделать следующие выводы.

1. При любых значениях начальных концентраций  $X_{10}$  и  $X_{30}$  в ходе реакции происходит экспоненциальное уменьшение  $[\text{Asx}]$ .

2. Если  $[\text{OH}]_0 < [\text{Asx}]_0$ , то происходит увеличение  $[\text{Asu}]$  и уменьшение  $[\text{OH}]$ . При этом равенство концентраций наблюдается в момент времени  $t_0$ , определяемый соотношением (3).



## Глава 2. Математические модели неферментативных модификаций аминокислотных остатков белков организма в норме и патологии

3. Если  $[\text{OH}]_0 > [\text{Asx}]_0$ , то при любых  $t$   $[\text{Asu}] < [\text{OH}]$ . В этом случае,  $[\text{Asu}]$  достигает наибольшего значения.

4. При любых значениях начальных концентраций  $X_{10}$  и  $X_{30}$  концентрации  $i\text{Asp}$  и  $\text{Asp}$  увеличиваются.

Полученные зависимости лишены каких-либо принципиальных противоречий для очень медленно обновляющихся белков. Действительно, для большинства таких белков  $t_{\text{Asx}} < T_0$  и единственным временным ограничением является  $T_0$ .

Возможны следующие пути адаптации  $X_i = X_i(t)$  на другие классы белков.

Ранее отмечалось, что величины  $t_{\text{Asx}}$  получены для синтетических пептидов, содержащих не более 6 аминокислотных остатков. Но белки живых организмов существенно более содержательные аминокислотные структуры. Существуют данные, что  $t_{\text{Asx}}$  зависит от положения  $\text{Asx}$  во вторичной структуре, от пространственного окружения, опосредованного третичной структурой. Поэтому, в определенных случаях, возможно уменьшение  $t_{\text{Asx}}$ , а, следовательно, увеличение количества белков организма, в которых возможна изомеризация  $\text{Asx}$ .

Изомеризация  $\text{Asx}$  также возможна при увеличении значения  $T_0$ . Для нормального функционирования клетки важно четкое сопряжение процессов обновления и разрушения белков. С возрастом скорость этих процессов снижается, что приводит к увеличению сроков использования белков в клетках и, соответственно, к увеличению вероятности появления  $i\text{Asp}$  в их структурах. В таком случае,  $T_0$  – возрастающая функция от времени жизни организма.

## Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

### 3.1. Третичная структура модифицированных ионных каналов

Как показано в работе [Ward, 2000], с возрастом, скорость процессов синтеза и расщепления белка снижается, что приводит к увеличению сроков использования белков в клетках и, соответственно, к увеличению вероятности появления дефектов в их структурах. Учитывая это можно утверждать, что, даже в норме, в определенном интервале времени жизни организма, время формирования isoAsp в ионных каналах не превышает их времени жизни. Таким образом, представляет интерес исследование структуры и механизмов функционирования белков ионных каналов, в которых проведена замена L-Asn на isoAsp.

Важность исследования влияния такой замены на структуру и функциональные характеристики ионных каналов обусловлена несколькими причинами.

Во-первых, экспериментально установлены возрастные изменения содержания основных клеточных катионов калия и натрия в мышечной клетке сердца [Погорелов, 2006], что возможно обусловлено возрастными изменениями в структуре калиевых каналов или увеличением содержания isoAsp в их структуре.

Во-вторых, патогенез болезней характерных для людей пожилого возраста связан с неферментативной модификацией белков вовлеченных в патофизиологические процессы при данных заболеваниях.

#### 3.1.1. Структура и механизмы функционирования ионных каналов

Структура калиевого канала из *Streptomyces lividans* была изучена рентгеновской кристаллографией с разрешением 3.2Å [Doyle et al., 1998]. Такие каналы относятся к классу калиевых каналов, субъединицы которых имеют два трансмембранных домена. Канал KcsA является тетрамером. На рисунке 1.1 представлен поперечный срез канала, демонстрирующий две из четырех его субъединиц. Рядом с N-концом каждой субъединицы имеется наружная спираль, которая пронизывает мембрану от цитоплазматической стороны до наружной поверхности. За наружной спиралью следует короткая спираль, направленная в пору. Затем располагается внутренняя спираль, которая возвращается к

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

цитоплазматической стороне. В каждой субъединице петля между центральным концом короткой спирали и внутренней спиралью формирует структуру ионной поры. Четыре такие петли, объединяясь, образуют узкий проход, ответственный за ионную избирательность канала – селективный фильтр (I). Относительно большая центральная полость (II) и нижняя внутренняя пора (III) соединяют селективный фильтр с цитоплазмой.

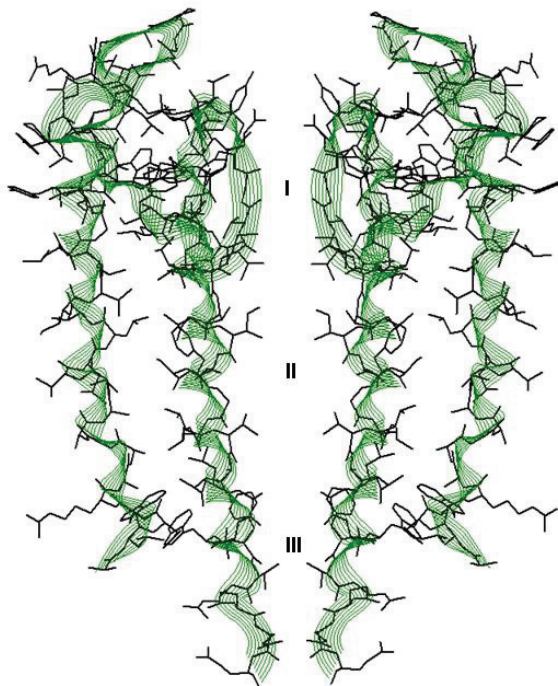


Рис. 1.1. Поперечный срез канала KcsA, показывающий две из четырех его субъединиц

Канал KcsA имеет следующую аминокислотную последовательность:

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

ALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAERGAPGAQLITYPRALWWS  
VETATTVGYGDLYPVTLWGRCVAVVVMVAGITSFGLVTAALATWFFV  
GREQ

Согласно литературным данным [Николлс и др., 2003], избирательность для калия достигается как размером, так и молекулярным строением селективного фильтра. Диаметр фильтра составляет около  $3\text{\AA}$  и аминокислоты в его стенке ориентированы таким образом, что последовательные кольца, образованные четырьмя карбонильными группами (по одной от каждой субъединицы), обращены внутрь поры. Диаметр поры достаточен для прохождения дегидратированного иона калия (диаметром около  $2.7\text{\AA}$ ). Следует заметить, что дегидратация проникающего иона могла потребовать значительной энергии. Однако этот фактор минимизируется за счет кислорода стенки канала, который заменяет атомы кислорода воды в гидратированном комплексе. Ионы меньшего размера, такие как натрий (диаметр  $1.9\text{\AA}$ ) или литий (диаметр  $1.2\text{\AA}$ ), не способны проникнуть через калиевый канал, поскольку они не смогут сформировать достаточно плотный контакт одновременно со всеми четырьмя кислородами, поэтому они остаются гидратированными. Ионы большего размера, такие как цезий (диаметр  $3.3\text{\AA}$ ), не могут проникнуть через пору из-за своих размеров. Эти структурные основы ионной избирательности вполне согласуются с традиционными воззрениями на ионную проницаемость каналов [Doyle et al., 1998, Corry et al., 2001, Eisenman, 1962, Eisenman, 1963, Eisenman et al., 1983, Eisenman et al., 1975, Hille, 1973, Laio et al., 1999, MacKinnon, 1998, Zhao et al., 1987].

Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

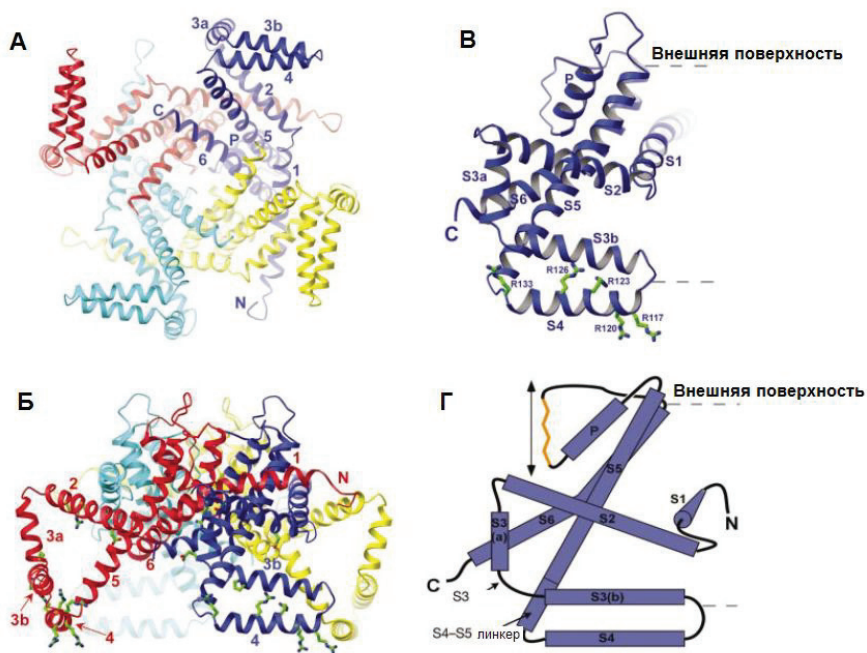


Рис. 3.2. Ленточная структура открытого потенциал-зависимого калиевого канала KvAP. (А) Вид сверху. (Б) Вид с боку. (В) и (Г) Вид сбоку на одну субъединицу

Все представители семейства потенциал-зависимых ионных каналов содержат шесть гидрофобных  $\alpha$ -спиральных сегментов (S1 – S6) в каждой субъединице [Николлс и др., 2003]. При этом четыре субъединицы  $K^+$ -канала окружают центральную пору, проводящую исключительно ионы калия. Сегменты S5 – S6 стабилизируют пору и определяют, согласно традиционным представлениям, калиевую избирательность в селективном фильтре, сегменты S1 – S4 формируют сенсор (см. рисунок 3.2), ответственный за открывание и закрывание канала.

Потенциал-зависимый канал KvAP [Jiang et al., 2003a] содержит стандартную  $K^+$ -пору, окруженную сенсорами напряжения. Сенсоры напряжения включают в себя S1 и S2 спирали рядом с порой и «лопасти» по внешнему периметру. Петли – сенсоры напряжения представляют

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

собой две спирали повернутые относительно друг друга. Они состоят из S3b и N-концевой половиной S4-спирали. Их аминокислотная композиция преимущественно гидрофобная с важным исключением аргининовых остатков из S4-спирали. Петли подвижны по отношению к поре из-за гибкого прикрепления посредством петель S3. Движение петель будет спарено с движениями спиралей S5, и тем самым, с порой через линкер (связку) S4-S5.

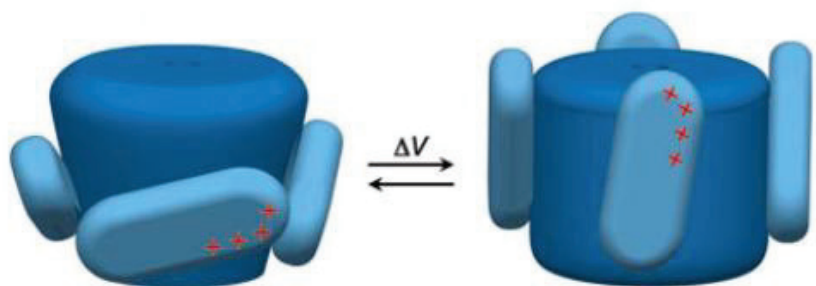


Рис. 3.3. Схематическое изображение перехода канала из открытого состояния в закрытое

Данная структурная модель показывает, каким образом сенсоры напряжения могут двигаться в ответ на изменения мембранного напряжения и открывать пору. В кристаллической структуре, сенсоры напряжения находятся рядом с внутриклеточной стороной канала, но электрофизиологические исследования с использованием токсинов паука и тиол-реактивных соединений показывают, что аминокислоты в лопасти могут открываться в сторону внеклеточной жидкости [Jiang et al., 2003a, Larsson et al., 1996, Yusaf et al., 1996, Baker et al., 1998, Swartz et al., 1997]. Эти наблюдения приводят к предположению о том, что спирали сенсора напряжения двигаются в мембране, за счет энергии воротных зарядов в изменяющемся электрическом поле. Последующие модели потенциал-зависимого воротного механизма утверждают, что спирали S4 двигаются по своим собственным траекториям, определяемым белком, как показано в работах [Horn, 2002, Gandhi et al., 2002, Bezanilla, 2002]. Данная новая модель находится в противоречии с наблюдениями Финкельштейна [Slatin et al., 1994, Qiu et al., 1996], согласно которым воротный механизм

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

пороформирующих токсинов колицина определяется положительно заряженными пептидами проникающими через мембрану. Предположение о том, что лопасти сенсора напряжения несут воротные заряды через мембрану в протеино-липидном слое следует из экспериментальных данных. В работе [Jiang et al., 2002a, Jiang et al., 2002], авторы развивают некоторые из этих идей, фиксируя позиции спиралей сенсора напряжения в мембране, и исследуя насколько далеко двигаются сенсоры, когда пора открывается в ответ на деполяризацию мембраны [Jiang et al., 2002, Jiang et al., 2003].

В работе [Jiang et al., 2002a, Jiang et al., 2002] была определена атомная структура калиевого канала и дан гипотетический ответ на вопрос: каким образом трансмембранный потенциал открывает пору ионного канала. Так потенциал-зависимый калиевый канал, в зависимости от направления трансмембранного потенциала, определяющего положение сенсора в пространстве, может находиться в двух конформациях: открытой – пропускающей ионы, и закрытой – не пропускающей ионы (см. рисунок 3.3).

При изменении разности потенциалов на концах мембраны, достаточно лабильный сенсор канала занимает новое положение, что приводит к переходу канала из открытого состояния в закрытое состояние и наоборот.

Предложенная модель, объясняющая переход канала из одного состояния в другое, не дает ответа на вопрос о механизмах исключительно калиевой избирательности открытого канала и отсутствия таковой для закрытого ионного канала.

Потенциал-зависимый калиевый канал KvAP может находиться в двух состояниях: открытом, проводящем состоянии и закрытом, непроводящем состоянии. Исходя из этого, нами проведено исследование двух соответствующих состояний канала KvAP.

Потенциал-зависимые калиевые каналы обычно экспрессируются вместе с дополнительными  $\beta$ -субъединицами [Jiang et al., 2002a]. Идентифицировано два подсемейства этих дополнительных субъединиц: Kv $\beta$ 1.1 – Kv $\beta$ 1.3 и Kv $\beta$ 2.1. Экспрессированные с основными субъединицами,  $\beta$ -субъединицы определяют потенциал-чувствительность и инактивационные свойства калиевых каналов. Инкрустированные в мембране, данные каналы формируются в виде комплекса двух субъединиц, так называемых  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц [Aidley et al., 1996]. При

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

этом функциональные мембранные  $\alpha$ -субъединицы определяют ионную избирательность потенциал-зависимых калиевых каналов.

До недавнего времени структура и функции  $\beta$ -субъединицы оставались неизвестными. Только в работе [Long et al., 2005a] была представлена структура  $\beta$ -субъединицы калиевого канала определенная методом рентгеноструктурного анализа с разрешением 2.8 Å.

Авторы [Long et al., 2005a] отмечают следующие структурные особенности  $\beta$ -субъединицы потенциал-зависимого калиевого канала:

1)  $\beta$ -субъединица представляет собой четырехкратно свернутый симметричный тетрамер (см. рисунок 2.8), что определяет молекулярную симметрию интегральной мембранной компоненты калиевых каналов [Isacoff et al., 1990]. Основываясь на предположении, что оси аксиальной симметрии четырехкратно свернутой  $\alpha$ -субъединицы и  $\beta$ -субъединицы совпадают, тетрамер  $\beta$ -субъединицы должен стыковаться напротив цитоплазматической поверхности тетрамера  $\alpha$ -субъединицы в одной или двух общих ориентациях. При этом вогнутая поверхность должна находиться лицевой стороной либо к мембранному каналу, либо к цитоплазме.

2) Компактная упаковка  $\alpha$ -спиралей тетрамера определяет локализацию четырех активных участков (приблизительно на расстоянии 30-35 Å дальше от оси аксиальной симметрии канала). При этом возможно использовать структуру потенциал-независимого калиевого канала KcsA как каноническую поруформирующую  $\alpha$ -субъединицу потенциал-зависимого калиевого канала. Активные участки  $\beta$ -субъединицы, формируемые сегментами S1 – S4 (сегменты S1 – S4 не присутствуют в канале KcsA), должны быть локализованы за пределами  $\alpha$ -субъединицы. Трансмембранные сегменты S1 – S4 включают сенсор напряжения потенциал-зависимых калиевых каналов [Yusaf et al., 1996].

3) Каждый активный участок  $\beta$ -субъединицы содержит кофактор NADP<sup>+</sup>, каталитический тирозин и ассоциированные аминокислоты для стабилизации аниона тирозината. Активные участки способны посредничать в переносе гидридов и кофактор достаточно прочно связан с активным участком.

Отмеченные структурные особенности позволили авторам [Long et al., 2005a] сделать вывод о том, что  $\beta$ -субъединица структурно и функционально эквивалентна ферменту – альтокеторедуктазе. Такие ферменты уменьшают альдегидные и кетоновые функциональные группы до первичных или вторичных спиртов. Некоторые представители



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

семейства ферментов катализируют сокращение двойных углерод – углеродных связей [Kuhn et al., 1958]. При этом основной химической реакцией является стереоспецифический перенос гидридов между никотинамидным кольцом кофактора и углеродным центром в молекуле субстрата. В результате уменьшается размер субстрата за счет окисления кофактора или происходит обратное в зависимости от концентрации субстрат/продукта и редокс-потенциала в отношении  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ . Ферменты-альтокеторедуктазы участвуют в обмене большого количества субстратов небольших молекул, включая сахара, алифатические альдегиды, ароматические гидроксиды, стероиды и простагландины [Bogusz et al., 1992, Jez et al., 1997]. Отметим, что авторам [Long et al., 2005a] не удалось определить биологический субстрат для активного участка  $\beta$ -субъединицы, хотя было сделано предположение, что субстратом является небольшой кетон или альдегид присутствующий в цитоплазме.

Установленная структура  $\beta$ -субъединицы калиевого канала со связанным кофактором, позволяет сформулировать вопрос о том, почему определенные потенциал-зависимые калиевые каналы включают в качестве субъединицы оксиредуктазу и какую роль она играет в клеточной биологии.

Авторы [Long et al., 2005a] предположили два ответа на сформулированный выше вопрос:

1)  $\beta$ -субъединица потенциал-зависимого калиевого канала имеет все необходимые компоненты для формирования потенциал-зависимого фермента. При этом  $\alpha$ -субъединица могла бы служить в качестве регуляторщика для сцепления конформационных изменений ионного канала с молекулярными перестройками  $\beta$ -субъединицы в окрестностях активного участка фермента, что может повлиять на связывание кофактора с молекулой субстрата. Таким образом при деполяризации мембраны потенциал-зависимый калиевый канал, в результате конформационных перестроек за счет докинга, может открыть активные участки  $\beta$ -субъединицы и инициировать катализ. При скорости  $1000 \text{ c}^{-1}$  молекулярная система производила бы 40 молекул продукта на один калиевый канал каждые 10 мс мембранной деполяризации. Данный механизм обеспечил бы прямое сопряжение между электрической возбудимостью мембраны и внутриклеточной химией.

2) Если могут возникнуть конформационные изменения в ферменте, которые возникают в  $\text{NADPH}$  в результате его окисления до

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

NADP<sup>+</sup>, то небольшая молекула-субстрат, связываясь с активным участком и окисляясь уменьшением кофактора, может повлиять на молекулярный докинг в канале. Данный механизм потребовал бы только одной передачи гидрида между субстратом и кофактором, вместо нескольких каталитических циклов. В таком механизме постоянно связанный кофактор имел бы явные преимущества и согласовался бы с экспериментальными данными. В таком случае внутриклеточная химия инициировала бы активность калиевого канала, возможно, в течении длительного периода времени. Данный сценарий согласует включение  $\beta$ -субъединицы в калиевый канал и «кислородную чувствительность» в мембранном канале [Perez-Garcia et al., 1999].

Изложенные выше предположения о механизме работы калиевого канала термодинамически эквивалентны. Обе модели построены на идее о том, что конформационные изменения активного участка  $\beta$ -субъединицы связаны с конформационными изменениями в калиевом канале. Несмотря на то, что требуются экспериментальные подтверждения этих предположений, частичное подтверждение может быть получено из указанных ранее данных, включая структуру  $\beta$ -субъединицы. Например известно, что во время катализа происходят передвижения  $\alpha$ -спиралей в активных участках ферментов. Так в случае связывания NADPH с редуктазой альдозы происходят достаточно большие изменения в структуре  $\alpha$ -спиралей [Borhani et al., 1992].

Следует отметить роль  $\beta_1$ -субъединицы в открывании калиевого канала А-типа [Retting, 1980]. Было показано, что  $\beta_1$ -субъединица инициирует пассивный транспорт из-за наличия пассивных ворот локализованных на N-конце. Исключая N-конец, аминокислотная последовательность  $\beta_1$ -субъединицы гомологична последовательности  $\beta_2$ -субъединицы. Тем самым пассивные ворота в  $\beta_1$ -субъединице должны быть локализованы на периферических выемках  $\beta$ -тетрамера. Для начала пассивного транспорта, связанные ворота должны достичь мембрану, чтобы получить доступ к участку рецептора на  $\alpha$ -субъединицах.

В заключении можно предположить, что основополагающая роль  $\beta$ -субъединиц потенциал-зависимого калиевого канала относится к их ферментативной функции. В частности химия клетки связана с изменениями в мембранном потенциале через взаимодействие  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц в потенциал-зависимом калиевом канале.

При построении структуры потенциал-зависимого калиевого канала в виде комплекса  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц ( $\alpha/\beta$ -канал) мы исходили из

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

предположения авторов работы [Long et al., 2005a], согласно которому оси аксиальной симметрии  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы совпадают. При этом  $\alpha$ -субъединица стыкуется с вогнутой поверхностью  $\beta$ -субъединицы. В качестве  $\alpha$ -субъединицы мы использовали аксиально-симметричный тетрамер потенциал-независимого калиевого канала  $K_{CSA}$ , как каноническую пороформирующую субъединицу трансмембранных калиевых каналов клетки.

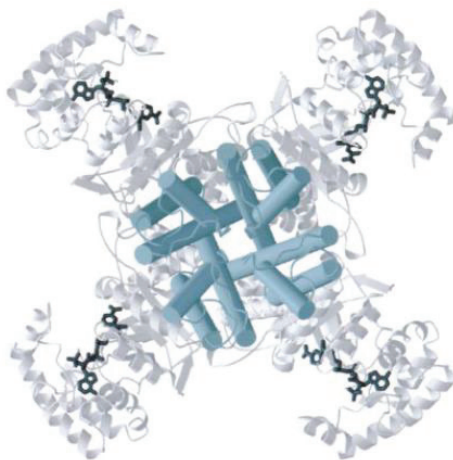


Рис. 3.4. Ленточная структура модельного  $\alpha/\beta$ -канала

В работах [Long et al., 2005a, Long et al., 2005] была определена кристаллическая структура канала Kv1.2 из семейства *Shaker*-каналов Kv в комплексе с  $\beta_2$ -субъединицей. Оба белка были коэкспрессированы в *Pichia pastoris*. При этом были важны два критических фактора для получения кристаллов и определения структуры. Смесь липидов и детергента была использована во время очищения и кристаллизации, и было предпринято много шагов для минимизации окисления. Важность липидов в этом исследовании предполагает тотальное применение липидов в мембранно-протеиновых структурных исследованиях в

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

будущем. Кристаллическая решетка I4 альтернативной мембраны и водных слоев близка к природному расположению для канала. Отношения между интегральными мембранными компонентами, внутриклеточным доменом T1 и  $\beta$ -субъединицей соединенной с доменом T1 согласуются с электрофизиологическими исследованиями механизма инактивации в  $K^+$ -каналах типа *Shaker*.

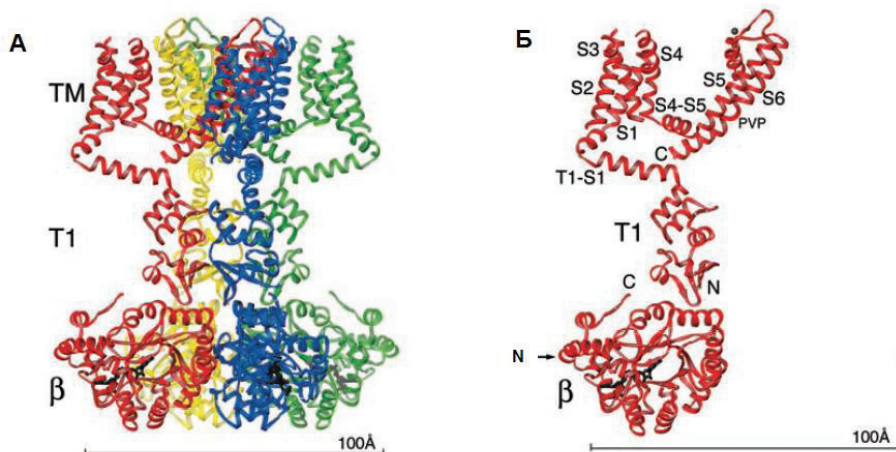


Рис. 3.5. Ленточная структура полного (А) и одиночной субъединицы (Б) канала Kv1.2

Потенциал-зависимый калиевый канал Kv1.2 содержит  $\beta$ -субъединицу, домен T1, пору (спираль S5, спираль поры, селективный фильтр и спираль S6) и S4-S5-линкер спиралей. Линкер связывающий домен T1 и S1-спираль составлен из двух поли-глициновых спиралей.

Пора канала Kv1.2 схожа по структуре с порами прокариотических калиевых каналов. Скрученные внутренние спирали образуются последовательностью Pro-X-Pro в семействе калиевых каналов *Shaker* и глицином в KvAP, и возможно многих других Kv-каналов.

Результаты сравнения пор различных прокариотических калиевых каналов позволили сделать следующие выводы [Long et al., 2005a]:

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

1) Структура селективного фильтра и внеклеточного участка поры потенциал-зависимого калиевого канала Kv1.2 очень консервативны;

2) Внутренняя пора (между селективным фильтром и внутриклеточной жидкостью) незначительно меняется в классе прокариотических калиевых каналов.

Большие боковые порталы между доменом T1 и порой соединяют пору с цитоплазмой. Электростатические свойства боковых порталов обусловлены дальними электростатическими взаимодействиями, управляющими инактивацией пептидов.

Кофактор  $\text{NADP}^+$ , каталитические остатки, и повышенная плотность активного участка  $\beta$ -субъединицы предполагает эксперименты для тестирования влияния каталитической функции бета субъединицы на активность калиевого канала.

Сенсоры напряжения S1-S4 расположены около внеклеточной поверхности и находятся в мембранном слое под влиянием электрического возмущения. Сенсоры находятся в контакте с S6-спиралями поры канала. Воротные заряды локализованы в липиде и рядом S1-S2-спиралями, но не рядом с каналом. При изменении знака разности потенциалов на концах мембраны, происходит поворот сенсора на угол  $30^\circ$ . Результатом такого поворота является деформация S6-спиралей, что приводит к уменьшению диаметра поры и, возможно, переходе канала в закрытое состояние.

Известно, что глутамат является наиболее важным и наиболее распространенным возбуждающим нейротрансмиттером центральной нервной системы, активирующим, по меньшей мере, три типа катионных каналов. Все три типа рецепторно-канальных комплексов обладают различными функциональными свойствами и отличаются друг от друга по чувствительности к разным аналогам глутамата [Armstrong et al., 2002, Armstrong et al., 1998]. Один из рецепторов, называемый NMDA-рецептор, избирательно отвечает на N-метил-D-аспартат [Cull-Candy et al., 1995, Kemp et al., 2002, Kohr et al., 1994, Lipton et al., 2002, Madden, 2002].

Молекулярное клонирование позволило идентифицировать кДНК для 16 субъединиц глутаматного рецептора. Пять из этих субъединиц, названные NR1 и NR2 [Williams et al., 1996, Wood et al., 1999, Zheng et al., 2001, Laube et al., 1997, Miyazaki et al., 1999, Perez-Otano et al., 2001,

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Tikhonova et al., 2002], могут принимать участие в формировании NMDA-рецептора.

У NMDA-рецептора существует семь различных центров связывания. Три из них находятся снаружи поверхности клетки, два – внутри, один внутри канала, и еще один магниевый центр связывания на наружной и внутренней поверхностях. Два центра для агонистов соответствует возбуждающей аминокислоте (Glu или Asp) и Gly. Оба центра должны находиться в связанном с лигандом состоянии перед тем, как канал перейдет в открытое состояние. Третий центр, связывающий  $Zn^{2+}$ , который блокирует канал.

В работе [Furukawa et al., 2003] была определена структура NR1-центра связывания NMDA-рецептора в комплексе с D-глицином, D-серином и D-цикloserином.

Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

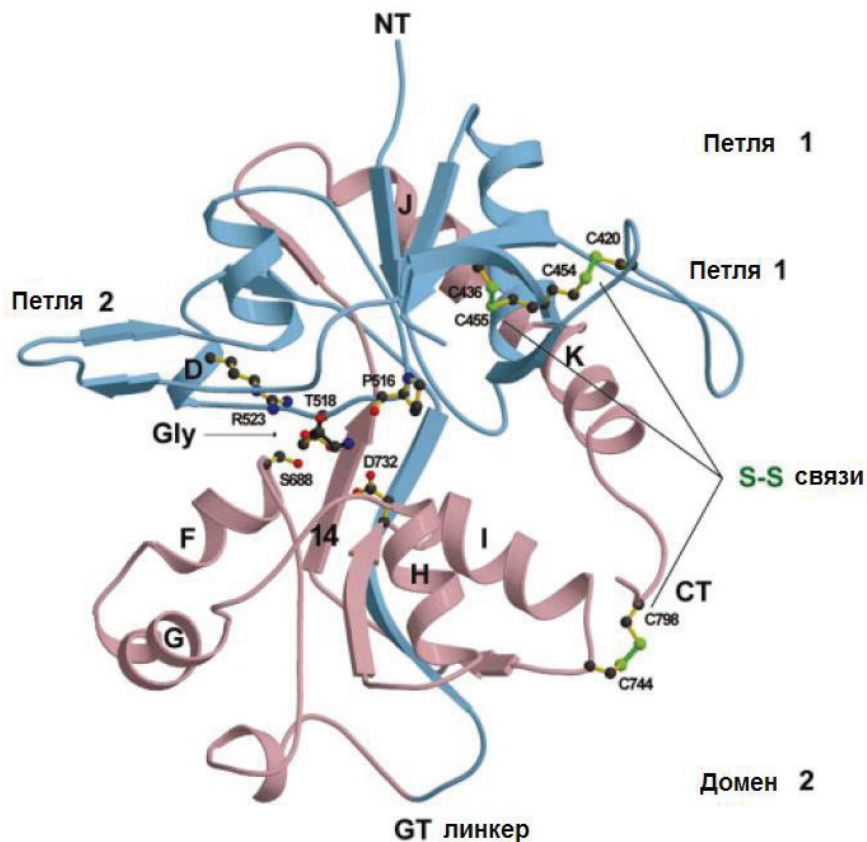


Рис. 3.6. Центр связывания NMDA-рецептора в комплексе с D-Gly

Для активации NR1 и NR2 глициновых и глутаматных центров NMDA-рецептора необходимо, преимущественно, глицин и глутамат. В данной работе представлены кристаллические структуры NR1-S1S2 лиганд-связывающего центра с агонистическим D-глицином и D-серином, частично агонистическим D-циклосерином. Полость S1S2

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

открыта в присутствии антагонистической 5,7-дихлорокинурической кислоты и закрыта в глициновых D-Ser и D-cSer комплексах.

#### 3.1.2. Методы расчета третичной структуры и энергетических профилей ионных каналов

Вид энергетического профиля иона в поре мембранного канала, в большинстве случаев, однозначно определяет поведение иона в канале, количественные характеристики которого (траектория движения иона, изменение концентрации ионов, константы перехода через энергетические барьеры и вероятности заполнения энергетических ям), позволяют рассчитать функциональные характеристики одиночных каналов (вольтамперная характеристика, проводимость, отношение коэффициентов проницаемостей различных ионов). Кроме того, энергетические профили дают исходную информацию для полуколичественного объяснения ионной селективности мембранных каналов. Так в современном подходе к объяснению ионной селективности мембранных каналов, основанный главным образом на теории Эйзенмана [Eisenman et al., 1983, Eisenman et al., 1975, Eyring et al., 1946, Feller et al., 1997], селективность каналов объясняется различием свободной энергии гидратации иона и энергии его взаимодействия с заряженными участками поры канала.

Профиль свободной энергии Гиббса комплекса ион-вода-канал, в случае однорядного движения иона в аксиально-симметричных каналах, представляет собой зависимость  $G_{iwc} = G_{iwc}(Z)$ , где  $Z$  – координата оси аксиальной симметрии канала. В наиболее общем виде

$$G_{iwc}(Z) = E_{ic}(Z) + E_{iw}(Z) + E_{wc}(Z) + E_{ww}(Z) - TS_{iwc}(Z), \quad (3.1)$$

где  $E_{ic}(Z)$  – внутренняя энергия комплекса ион-канал при локализации иона в точке с координатой  $Z$ ,  $E_{iw}(Z)$  – внутренняя энергия ион-водного комплекса,  $E_{wc}(Z)$  – внутренняя энергия комплекса вода-канал,  $E_{ww}(Z)$  – внутренняя энергия комплекса вода-канал при локализации иона в точке с координатой  $Z$ ,  $S_{iwc}(Z)$  – энтропия. Составляющие  $E_{ic}(Z)$ ,  $E_{wc}(Z)$  и  $E_{ww}(Z)$  обусловлены тем, что, находясь в поре канала, ион является частично дегидратированным [Conway, 1981, Zhou et al., 2001].



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Зависимость  $\varepsilon = \varepsilon(d)$  рассчитывали численным решением уравнения Буза [Conway, 1981], величину  $E_{iw}(Z) - TS_{iw}(Z)$  – по полуэмпирическим формулам Лайо-Торрэ [Laio et al., 1999], включающим экспериментальные значения свободной энергии Гиббса комплексов, включающих  $i$  молекул воды и катион в газовой фазе.

Величину  $E_{ww}(Z) + E_{wc}(Z)$  с хорошей степенью точности можно считать постоянной, не зависящей от локализации иона, для определенного канала. По результатам численного моделирования методом Монте-Карло установлено, что в зависимости от положения иона на оси канала  $E_{ww}(Z) + E_{wc}(Z)$  принимает постоянное значение для определенного канала, при этом ошибка составляет не более 2%. Данный результат может быть обоснован статистической природой рассматриваемых взаимодействий и свойствами потенциалов межмолекулярного взаимодействия.

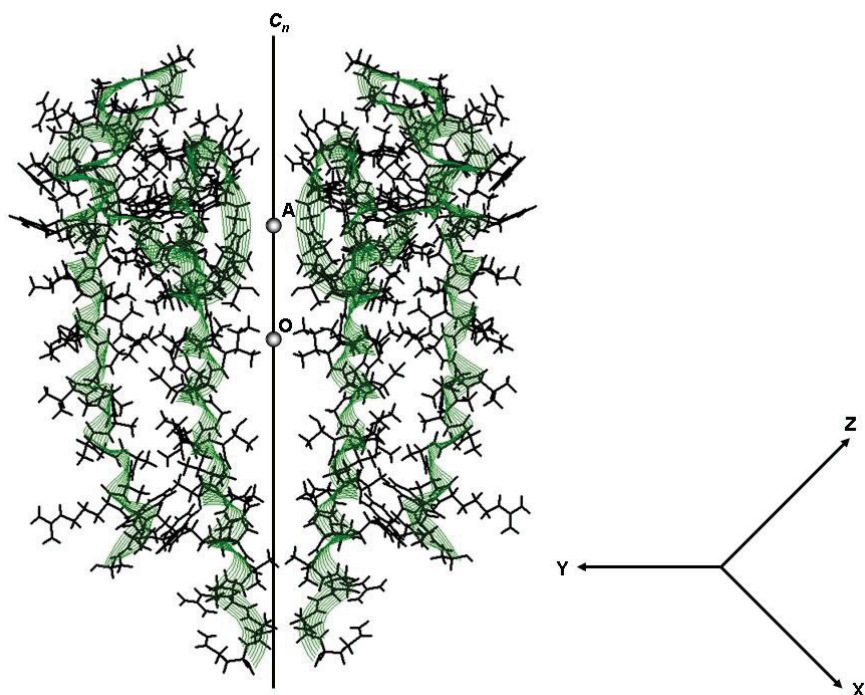


Рис. 3.7. Поворотная ось симметрии и лабораторная система координат калиевого канала KcsA

Учитывая, что различные методы расчета дают, как правило, различные количественные результаты, целесообразно провести расчет зависимостей  $E = E(Z)$  полученных различными методами и по полученным зависимостям рассчитать функциональные характеристики канала, а последние сопоставить с экспериментальными данными. Данный анализ позволит сделать выводы о возможностях и ограничениях традиционных методов расчета  $E = E(Z)$  и выборе лучшего из них в исследовании механизмов функционирования мембранных каналов.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Знание атомных моделей мембранных каналов является необходимым для детального исследования ионного транспорта через биологические мембраны. Этого требуют практически все традиционные теоретические методы исследования движения ионов в каналах. Атомная структура канала определяет  $E = E(Z)$ . При этом если рассматривать ионные каналы, имеющие поворотную ось симметрии любого порядка  $C_n$  [Фудзинага, 1983, Джаффе и др., 1967, Guardia et al., 1991, Вейль, 1968, Петрашень и Трифонов, 1967], наибольший интерес представляет  $E = E(Z)$  ионов, в которой  $Z$  – ось аксиальной симметрии канала. Группой поворотной симметрии обладает практически все представители генетического суперсемейства потенциал-зависимых  $Na^+$ ,  $K^+$  и  $Ca^{2+}$ -каналов [Николлс и др., 2003, Гладик, 1983].

Тем самым, выше сказанное определяет необходимость представления атомной структуры аксиально-симметричных ионных каналов в системе координат с осью поворотной симметрии  $C_n$ , для последующего расчета энергетических профилей ионов и моделирования ионного транспорта в каналах. Учитывая, что большинство мембранных каналов приводимых в Банке белковых структур представлены в произвольной системе координат, особый интерес представляет определение значений атомных координат в системе координат с поворотной осью симметрии. Получить формулы данных преобразований и является задачей данного параграфа.

Назовем систему координат, в которой заданы атомные координаты каналов из Банка белковых структур, лабораторной системой координат ( $XYZ$ -система); систему координат, одна из осей которых, например  $Z$ -ось, совпадает с осью поворотной симметрии  $C_n$  канала, – естественной системой координат ( $X'Y'Z'$ -система). При этом ось  $C_n$  проходит через две точки с заданными координатами в  $XYZ$ -системе:  $O(x_0, y_0, z_0)$  и  $A(x_1, y_1, z_1)$ . В некоторых случаях, это могут быть координаты ионов, локализованных в поре канала [Дмитриев и Исаев, 2005, Дмитриев и Исаев, 2005a].

С учетом введенных выше определений, задача состоит в том, чтобы записать координаты атомов канала в естественной системе координат. Формальное решение данной задачи сводится к определению коэффициентов матрицы преобразования  $A$  матричного равенства:

$$\bar{x}' = A^{-1}(\bar{x} - \bar{x}_0), \quad (3.2)$$

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

где  $\vec{\bar{x}}' = (x', y', z')$  – вектор координат атома канала в  $X'Y'Z'$ -системе,  $\vec{\bar{x}} = (x, y, z)$  – вектор координат атома канала в  $XYZ$ -системе,  $\vec{\bar{x}}_0 = (x_0, y_0, z_0)$  – вектор координат заданной точки (иона) в  $XYZ$ -системе, принимаемый за начало естественной системы координат.

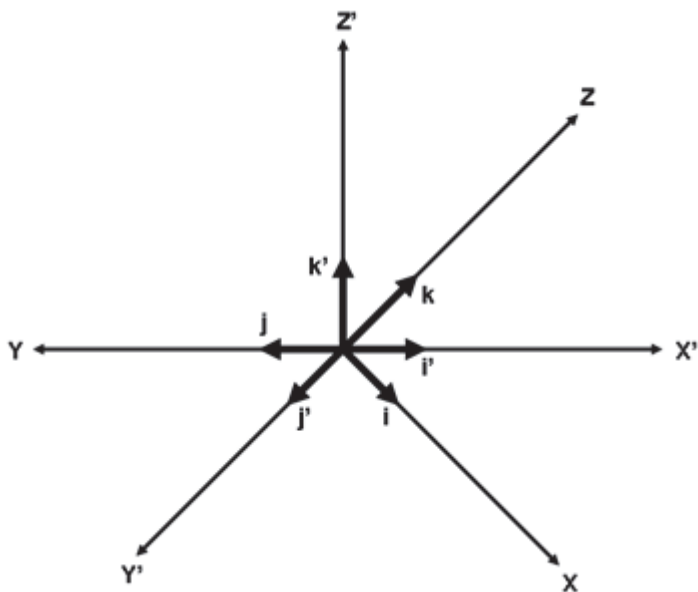


Рис. 3.8. Лабораторная и естественная системы координат

Разность векторов  $\vec{\bar{x}} - \vec{\bar{x}}_0$  задает параллельный перенос  $XYZ$ -системы в точку  $O(x_0, y_0, z_0)$ . Матрица  $A$  задает поворот транслированной  $XYZ$ -системы до совмещения с  $X'Y'Z'$ -системой. Коэффициенты данной матрицы есть соответствующие направляющие косинусы:

Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

$$\mathbf{A} = \begin{pmatrix} \cos(\mathbf{i}', \mathbf{i}) & \cos(\mathbf{j}', \mathbf{i}) & \cos(\mathbf{k}', \mathbf{i}) \\ \cos(\mathbf{i}', \mathbf{j}) & \cos(\mathbf{j}', \mathbf{j}) & \cos(\mathbf{k}', \mathbf{j}) \\ \cos(\mathbf{i}', \mathbf{k}) & \cos(\mathbf{j}', \mathbf{k}) & \cos(\mathbf{k}', \mathbf{k}) \end{pmatrix}. \quad (3.3)$$

Здесь  $\mathbf{i}, \mathbf{j}, \mathbf{k}$  – орты XYZ-системы,  $\mathbf{i}', \mathbf{j}', \mathbf{k}'$  – орты X'Y'Z'-системы, представленные в XYZ-системе. Орт  $\mathbf{k}' = (x_1 - x_0, y_1 - y_0, z_1 - z_0)$ , орты  $\mathbf{i}'$  и  $\mathbf{j}'$  определим из условия их ортогональности:

$$\begin{cases} (x_1 - x_0)x^i + (y_1 - y_0)y^i + (z_1 - z_0)z^i = 0 \\ (x_1 - x_0)x^j + (y_1 - y_0)y^j + (z_1 - z_0)z^j = 0 \\ x^i x^j + y^i y^j + z^i z^j = 0 \end{cases} \quad (3.4)$$

Для того чтобы система (3.4) была определенной, зафиксируем координаты  $x^i = 0.5$ ,  $y^i = 0.7$ ,  $x^j = 1$  (выбор произвольный). В таком случае решение системы (3.4) будет иметь вид:

$$\begin{cases} z^i = -\frac{0.5(x_1 - x_0) + 0.7(y_1 - y_0)}{z_1 - z_0} \\ y^j = -\frac{0.5(z_1 - z_0)^2 + (0.5(x_1 - x_0) + 0.7(y_1 - y_0))(x_1 - x_0)}{0.7(z_1 - z_0)^2 + (0.5(x_1 - x_0) + 0.7(y_1 - y_0))(y_1 - y_0)} \\ z^j = \frac{(z_1 - z_0)(0.7y^j + 0.5)}{0.5(x_1 - x_0) + 0.7(y_1 - y_0)} \end{cases} \quad (3.5)$$

Направляющие косинусы определим через соответствующие скалярные произведения.

$$\cos(\mathbf{i}', \mathbf{i}) = \frac{x^i}{\sqrt{x^{i2} + y^{i2} + z^{i2}}}, \quad \cos(\mathbf{j}', \mathbf{i}) = \frac{x^j}{\sqrt{x^{j2} + y^{j2} + z^{j2}}},$$

$$\cos(\mathbf{k}', \mathbf{i}) = \frac{x_1 - x_0}{\sqrt{(x_1 - x_0)^2 + (y_1 - y_0)^2 + (z_1 - z_0)^2}},$$

$$\cos(\mathbf{i}', \mathbf{j}) = \frac{y^i}{\sqrt{x^{i2} + y^{i2} + z^{i2}}}, \quad \cos(\mathbf{j}', \mathbf{j}) = \frac{y^j}{\sqrt{x^{j2} + y^{j2} + z^{j2}}},$$

Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

$$\cos(\mathbf{k}', \mathbf{j}) = \frac{y_1 - y_0}{\sqrt{(x_1 - x_0)^2 + (y_1 - y_0)^2 + (z_1 - z_0)^2}},$$

$$\cos(\mathbf{i}', \mathbf{k}) = \frac{z^i}{\sqrt{x^{i2} + y^{i2} + z^{i2}}}, \quad \cos(\mathbf{j}', \mathbf{k}) = \frac{z^j}{\sqrt{x^{j2} + y^{j2} + z^{j2}}},$$

$$\cos(\mathbf{k}', \mathbf{k}) = \frac{z_1 - z_0}{\sqrt{(x_1 - x_0)^2 + (y_1 - y_0)^2 + (z_1 - z_0)^2}}.$$

Матричное равенство (3.2) с выше определенными коэффициентами матрицы  $\mathbf{A}$  задает преобразование координат атомов канала из лабораторной системы координат в естественную систему координат, ось которой совпадает с осью поворота симметрии канала.

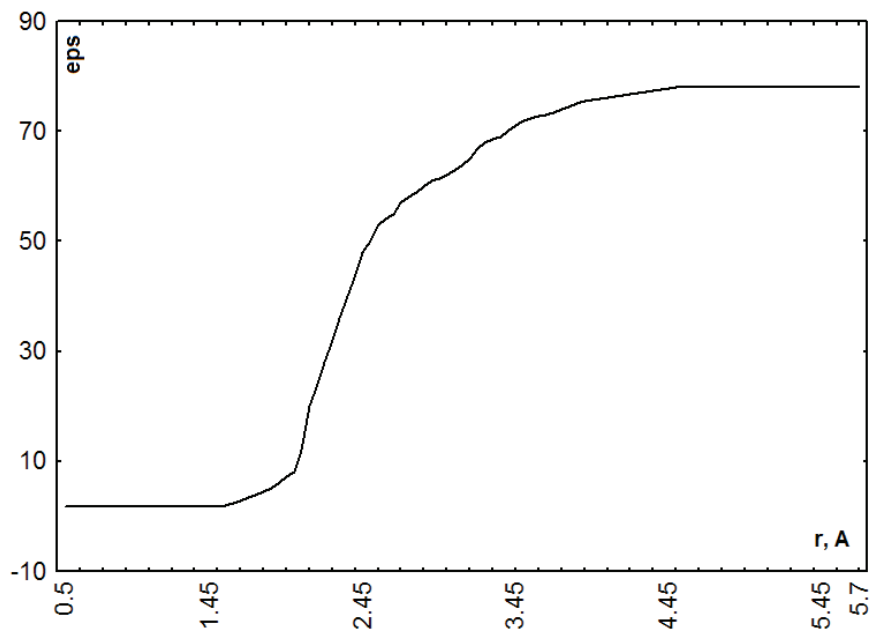


Рис. 3.9. Зависимость эффективной диэлектрической постоянной от радиуса канала

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Попадая в пору канала, ион взаимодействует с заряженными или полярными группами, локализованными внутри поры канала. Обычно предполагается, что ион и центр связывания не контактируют и, следовательно, они взаимодействуют только кулоновским притяжением. Это электростатическое взаимодействие экранируется диполями окружающими ион и центр связывания. Таким образом, энергия взаимодействия ион-канал  $E=E(\varepsilon)$ , где  $\varepsilon$  – зависящий от расстояния  $r_i$  между взаимодействующим ионом и  $i$ -м зарядом канала, экранирующий фактор (эффективная диэлектрическая постоянная). В случае, когда  $r_i$  достаточно велико,  $\varepsilon(r_i)$  приближается к значению макроскопической диэлектрической постоянной  $\varepsilon_w$ , но когда  $r_i$  становится малым, электрическое поле достаточно сильно ориентирует диполи молекул воды, что, таким образом, ведет к понижению значения  $\varepsilon(r_i)$  [Тихонов и др., 2003].

Данное явление представляет собой принципиально квантовомеханический эффект и может быть полностью объяснено в рамках квантовохимического приближения *ab initio*. Вместе с тем полуколичественное рассмотрение возможно, если предположить что  $\varepsilon(r_i)$  рассчитывается в рамках модели диэлектрической ориентации Буза [Conway, 1981]. В этом случае диэлектрическая постоянная в присутствии электрического поля  $\varphi$  рассчитывается по формуле

$$\varepsilon = \frac{\varepsilon_w - n^2}{b^{1/2}\varphi} \arctan(b^{1/2}\varphi) - n^2, \quad (3.6)$$

где  $n^2$  – квадрат индекса оптической рефрактерности ( $n^2=1.78$  для воды),  $\varepsilon_w$  – предел, при больших  $r$ , значения  $\varepsilon$  ( $\varepsilon_w=78$  при  $T=298K$ ),  $b=1.08 \cdot 10^{-8}$ . Численное решение уравнение (3.6) представлено на рисунке 3.9.

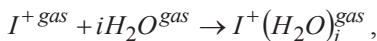
В пору канала проникающий ион теряет некоторое количество молекул воды из его гидратной оболочки. Количество молекул воды в частичной гидратной оболочке зависит от локализации иона на оси канала и геометрии поры канала. Пренебрегая эффектом второй гидратной оболочки, энергия гидратации зависит только от количества молекул воды  $i$  в ион-водном комплексе. Формула расчета свободной энергии ион-водного комплекса  $G_i^{v \rightarrow c}$  получена в работах А. Лайо [Laio et al., 1999].

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

В работе [Laio et al., 1999] рассматривается реакция  $I^{+gas} \rightarrow I^{+}(H_2O)^{channel}$  со свободной энергией Гиббса  $G_i^{v \rightarrow c}$ , которая может быть получена учитывая, что в поре канала ион, окруженный  $i$  молекулами воды, блокируются стенками поры канала. В газовой фазе молекулы воды могут иметь любую локализацию относительно иона. С хорошей степенью точности, значение  $G_i^{v \rightarrow c}$  может быть вычислено по формуле

$$G_i^{v \rightarrow c} = G_i^{gas} - TS^{gas},$$

где  $S^{gas}$  – энтропия. По определению,  $G_i^{gas}$  – свободная энергия Гиббса реакции



где  $I^{+}(H_2O)_i^{gas}$  – кластер, включающий ион и  $i$  молекул воды.

Если обозначить через  $n_c$  координационное число, то число независимых конфигураций  $i$  молекул воды вокруг иона определяется выражением

$$\binom{n_c}{i} = \frac{n_c(n_c - 1) \dots (n_c - i + 1)}{i!},$$

а формула для расчета  $S^{gas}$  имеет вид

$$S^{gas} = R \ln \binom{n_c}{i}.$$

Таким образом

$$G_i^{v \rightarrow c} = G_i^{gas} - RT \ln \binom{n_c}{i}, \quad (3.7)$$

где  $G_i^{gas}$  – экспериментальные значения свободной энергии Гиббса комплексов, включающих  $i$  молекул воды и катион в газовой фазе [Kebarle, 1974],  $n_c^X$  – координационное число иона  $X$  [Бацанов, 2000].

Результаты расчета свободной энергии ион-водного комплекса по формуле (3.7) для ионов  $Li^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Cs^+$  представлены в таблице 3.1.



Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Таблица 3.1

Координационные числа ( $n_c$ ) ионов и энергии ион-водного комплекса  $G_i$

X	$n_c^X$	$G_2$ , ккал/моль	$G_3$ , ккал/моль	$G_4$ , ккал/моль	$G_5$ , ккал/моль
Li <sup>+</sup>	4.9	18.35	12.17	6.11	4.84
Na <sup>+</sup>	6.8	11.62	7.34	4.47	1.92
K <sup>+</sup>	7.7	6.86	3.78	2.08	1.26
Rb <sup>+</sup>	8.2	5.38	2.35	0.89	-0.003
Cs <sup>+</sup>	9.3	3.22	1.09	1.12	-3.01

Далее формулы (3.6) и (3.7) будут использованы для расчета различными методами функции  $E_{ic}(Z) + G_i^{v \rightarrow c}(Z)$ .

Метод силового поля (молекулярной механики) эффективный теоретический метод исследования геометрического строения молекулярных систем. В данном методе молекула рассматривается как набор атомов, который управляется потенциальными функциями, заимствованными из классической механики [Mazur et al., 1989]. Функция потенциальной энергии молекулы представляется в виде суммы различных вкладов атом-атомных взаимодействий, которые можно разделить на два основных класса [Roux, 2002]: взаимодействия связанных и несвязанных химическими связями атомов. К связанным взаимодействиям относятся деформации валентных углов и связей, двухгранных углов, водородных связей. Учет данных взаимодействий необходим, если целью исследования является моделирование динамики или структуры молекул. При определении профилей потенциальной энергии взаимодействия иона с молекулой достаточно ограничится рассмотрением несвязанных взаимодействий, которые представляются в виде суммы двух вкладов: энергии электростатических взаимодействий и энергии вандерваальсовых взаимодействий атомов. Данное представление связано с тем, что ион находясь в канале не связывается ковалентно с атомами канала. Для исследования строения и динамики биологических молекул, наибольшее распространение [Cornell et al., 1995] получили силовое поле AMBER (*Assisted Model Building and Energy Refinement*) [Kollman et al., 1997] и CHARMM (*Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*) [Brooks et al., 1983], OPLS (*Optimized*

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

*Potentials for Liquid Simulations*). Параметры силового поля AMBER, соответствующие зарядам на атомах, в последней модификации метода [Kollman et al., 1997], определялись путем неэмпирического квантовохимического расчета. Остальные параметры силового поля калибровались по белковым молекулам, аминокислотам и некоторым органическим молекулам. В работах [MacKerrell et al., 1995, MacKerrell et al., 1998] представлено силовое поле, в котором добавлены параметры для ионов щелочных металлов. Силовое поле CHARMM калибровалось структуре аминокислот, белков, липидов, цинксвязывающих белков [Feller et al., 1997]. Параметры данных силовых полей, а следовательно, энергии атом-атомных взаимодействий отличаются друг от друга [Roux, 2002]. Это, вероятно, является одной из причин расхождения профилей потенциальной энергии для одних и тех же порообразующих белковых молекул. Силовое поле AMBER использовалось для исследования связывания ионов  $K^+$  и  $Na^+$  с внешним устьем потенциалзависимого калиевого канала [Guidoni et al., 1999], силовое поле CHARMM – для исследования динамики потенциалзависимого калиевого канала [Allen et al., 1999] и распределения потенциала фторированного грамицидинового канала [Anderson et al., 2001].

В методах силового поля, потенциальная энергия иона в канале представляется в виде суммы энергии кулоновского и вандерваальсового взаимодействия (потенциал Леннарда-Джонса) атомов канала и иона:

$$E_{ic} = \sum_{i=1}^n \frac{q_i}{R_i} + \sum_{i=1}^n \left( \frac{A_i}{R_i^{12}} - \frac{B_i}{R_i^6} \right),$$

(3.8)

где  $q_i$  – кулоновский заряд  $i$ -го атома канала,  $R_i$  – расстояние от  $i$ -го атома канала до иона,  $A_i$ ,  $B_i$  – параметры вандерваальсового взаимодействия  $i$ -го атома и иона. Первое слагаемое с точностью до множителя  $q_{ion}$  (заряд катиона) определяет распределение потенциала в канале, поэтому профили потенциальной энергии ионов формируются вторым слагаемым в выражении (3.8). Практически все традиционные силовые поля (например, AMBER, CHARMM, OPLS), применяемые в исследовании биомолекул, используют данное представление потенциальной энергии. Отличие наблюдается лишь в выражениях для параметров  $A_i$  и  $B_i$ . Силовые поля AMBER и CHARMM используют  $r^* \epsilon$ -параметризацию:

Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

$$A_i = \left( \frac{r_i^*}{2} + \frac{r_{ion}^*}{2} \right)^{12} \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_{ion}}, \quad B_i = 2 \left( \frac{r_i^*}{2} + \frac{r_{ion}^*}{2} \right)^6 \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_{ion}}, \quad (3.9)$$

где  $r_i^*$ ,  $r_{ion}^*$ ,  $\varepsilon_i^*$ ,  $\varepsilon_{ion}^*$  – параметры силового поля. Силовое поле OPLS традиционно использует  $\sigma\varepsilon$ -параметризацию:

$$A_i = 4(\sigma_i \sigma_{ion})^6 \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_{ion}}, \quad B_i = 4(\sigma_i \sigma_{ion})^3 \sqrt{\varepsilon_i \varepsilon_{ion}}, \quad (3.10)$$

где  $\sigma_i$ ,  $\sigma_{ion}$ ,  $\varepsilon_i^*$ ,  $\varepsilon_{ion}^*$  – параметры силового поля. В случае потенциальной энергии взаимодействия двух одинаковых атомов или ионов параметр  $r^*$  соответствует их вандерваальсову радиусу,  $\varepsilon$  – их равновесной энергии.

Важно отметить, что в подобных расчетах величины  $r^*$ ,  $\varepsilon$ ,  $\sigma$  являются калибровочными параметрами, прежде всего по равновесной геометрии и молекулярной динамике биомолекулярных систем. Поэтому нами исследована возможность замены параметра  $r^*$  кристаллографическими и реальными ионными радиусами для возможного улучшения результатов.

Следует отметить, что кроме представления вида (3.8), неэлектростатическую часть потенциальной энергии взаимодействия иона с атомами белковых и липидных молекул можно представить в виде [Corry et al., 2001a, Corry et al., 2001]

$$U_{IW}(\vec{R}) = \sum_{i=1}^N \frac{F_0}{9} \frac{(r_i^I + r^W)^{10}}{(R_c(z) + r^W - a)^9}, \quad (3.11)$$

где  $r_i^I$  – радиус  $i$ -го иона,  $r^W$  – радиус атомов белковых и липидных молекул,  $R_c(z)$  – радиус порообразующей белковой молекулы, как функция поперечной координаты,  $F_0$ ,  $a$  – постоянные величины. Функция потенциальной энергии взаимодействия в системе ион – ион имеет вид [Guardia et al., 1991]

$$U_{SR}(\vec{R}) = U_0 \left\{ \left( \frac{r_c}{R} \right)^9 - \exp \left[ \frac{r - R}{c_e} \right] \cos \left[ \frac{2\pi(r - R)}{c_w} \right] \right\}, \quad (3.12)$$

где  $c_e$ ,  $c_w$  – постоянные величины,  $r_c = r_1 + r_2$ ,  $r = r_c - 0.2$ . Функции вида (3.11) и (3.12) использовались для теоретического исследования проницаемости

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

и селективности кальциевых каналов [Corry et al., 2001a, Corry et al., 2001].

Для получения траекторий движений атомов биомолекулярных систем, методами численного интегрирования динамических уравнений, требуется достаточно длительное машинное время. Данное время можно сократить, используя методы ограничения числа степеней свободы молекулярной системы [Braun, 1987, Helfand, 1979, Van Gunsteren et al., 1977, Van Gunsteren et al., 1981, Нymphreys et al., 1994, Дмитриев и др., 2002, Дмитриев и др., 2001, Барышников и др. 2002, Вересов, 1986, Дмитриев и др., 2002]. Применительно к расчету распределения электростатического потенциала, кроме «полноатомного» представления, используют различные приближенные представления молекулярной системы: представление «полярных водородов», представление «тяжелых атомов» и представление «ближних атомов». В представлении «полярных водородов» в расчете потенциала учитываются только «тяжелые» (неводородные) и все полярные атомы водорода, способные образовывать водородную связь, в представлении «тяжелых атомов» – только «тяжелые» атомы. При расчете распределения электростатического потенциала в представлении «ближних атомов» учитываются только атомы (тяжелые и легкие) отстоящие от определенной точки на оси белковой поры на расстоянии не превышающем «радиус обрезания» (обычно 10-15Å) [Saito, 1994]. Недавно был предложен метод расчета электростатических взаимодействий, в котором каждый атом взаимодействует с ближайшими атомами по кулоновской схеме, а с далеко отстоящими атомами, моделируемыми кубическими ячейками, через общий заряд и дипольный момент этой ячейки. Причем размеры ячеек возрастают как функции расстояния от данного атома. Представление «полярных водородов» применялось для расчета распределения потенциала в ацетилхолиновом рецепторе [Adcock et al., 1998]. На примере грамицидинового канала, нами тестированы все приближенные представления силовых в расчетах электростатического потенциала распределенного в поре канала [Дмитриев и др., 2002, Дмитриев и др., 2004, Дмитриев и Твердислов, 2006, Дмитриев и др., 2006, Исаева и др., 2003, Исаева и др., 2002, Дмитриев и др., 2001]. В результате было установлено, что достаточно надежные результаты дает только полноатомное приближение.

Для расчета распределений энергии, из всего разнообразия силовых полей нами выбраны два силовых поля: AMBER и OPLS. Это

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

обусловлено тем, что данные силовые поля используют два различных представления параметров  $A_i$  и  $B_i$ :  $r^*\varepsilon$  - и  $\sigma\varepsilon$ -представление.

Другим способом расчета энергетического профиля иона в канале является квантовохимический расчет, который для белков, как многоатомных систем, требует значительных затрат расчетного времени. Несмотря на это, квантовохимический расчет функций потенциальной энергии является важнейшим инструментом при исследовании конденсированного состояния вещества [Glasstone et al., 1941, Gray et al., 1984]. В настоящее время таким способом получены потенциалы взаимодействия многих низкомолекулярных соединений [Пюльман, 1981, Clementy, 1980], спиртов [Okazaki et al., 1984], аминокислот и других, биологически важные молекулы [Clementy et al., 1983, Дмитриев и Твердислов, 2006, Дмитриев и др., 2006, Дмитриев и др., 2006a, Зайнутдинов и др., 2002, Зайнутдинов и др., 2001, Зайнутдинов и др., 2001a, Исаева и др., 2001, Исаева и др., 2001a, Лузянин и др., 2002].

Поэтому представляется целесообразным предложить расчетный метод, не требующий значительных затрат машинного времени и сохраняющий точность квантовохимического расчета. Данный метод может быть получен, если учесть, что специфические квантовомеханические эффекты, возникающие при расчете взаимодействия ион-канал существенны лишь на небольших расстояниях (на расстояниях, где значимо перекрывание электронных оболочек иона и атомов канала) [Грибов и др., 1999, Степанов и др., 1991].

В связи с этим, результирующая потенциальная энергии иона в канале  $E_{ic} = E_{ic}^q + E_{ic}^c$ , где  $E_{ic}^q$  – квантово-механическая составляющая результирующей энергии, существенная при небольших расстояниях ион – атомы канала,  $E_{ic}^c$  – классическая (кулоновская) составляющая, существенная при больших расстояниях ион – атомы канала. В таком случае принято условно разделять силы невалентного взаимодействия на короткодействующие и дальнедействующие [Гершфельдер и др., 1961, Каплан, 1982, Пюльман, 1981, Бараш, 1988, Ландау и Лифшиц, 1973, Бредов и др., 1985]. Принципиальное различие между дальнедействующими и короткодействующими силами состоит в том, что первые могут быть в обобщенной форме выражены через свойства изолированных молекул, а вторые требуют для описания методов,

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

учитывающих обменные эффекты, для описания которых используется квантовохимический подход [Margenau et al., 1971].

Приведем обоснование аддитивного разделения результирующего взаимодействия и установим расстояние в системе ион-канал, на котором возможно такое разделение и независимый расчет составляющих. Данные рассуждения приведем для системы двух взаимодействующих молекул и, как частный случай, для системы ион-канал.

Дальнодействующая (электростатическая) энергия представляет собой энергию взаимодействия постоянных распределений заряда взаимодействующих молекул.

Гамильтониан двух взаимодействующих молекул  $H = H_0 + V$ , где  $H_0 = H_A + H_B$  – сумма гамильтонианов изолированных молекул,  $\hat{V}$  – оператор их электростатического взаимодействия:

$$V = - \sum_{\alpha=1}^{n_A} \sum_{j=1}^{N_B} \frac{Z_{\alpha}}{r_{\alpha j}} - \sum_{\beta=1}^{n_B} \sum_{i=1}^{N_A} \frac{Z_{\beta}}{r_{\beta i}} + \sum_{i=1}^{N_B} \sum_{j=1}^{N_A} \frac{1}{r_{ij}} + \sum_{\alpha=1}^{n_A} \sum_{\beta=1}^{n_B} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta}}{R_{\alpha\beta}}. \quad (3.13)$$

Здесь индексы  $\alpha, \beta$  нумеруют ядра, индексы  $i, j$  – электроны молекул А и В соответственно.

По теореме Гельмана-Фейнмана [Фудзинага, 1983] силы, действующие на ядра, могут быть вычислены по законам кулоновской электростатики, если известно соответствующее электронное распределение. Функции электронной плотности в молекулах можно представить через волновые функции молекул  $\Psi_n^A$  и  $\Psi_n^B$ :

$$\rho_{mm}^A(i) = N_A \int \left| \Psi_n^A(1 \dots i \dots N_A) \right|^2 dv^{(i)}, \quad \rho_{mm}^B(j) = N_B \int \left| \Psi_m^B(1 \dots j \dots N_B) \right|^2 dv^{(j)}, \quad (3.14)$$

где  $n, m$  – совокупности квантовых чисел, характеризующих состояния изолированных молекул,  $dv^{(i)}$  – элемент объема конфигурационного пространства всех электронов молекулы А, кроме  $i$ -го.

Математическая проблема разделения переменных в дифференциальных уравнениях накладывает принципиальное ограничение, согласно которому точное решение уравнения Шредингера для многоатомных молекул невозможно. Таким образом, для вычисления электростатического взаимодействия молекул можно использовать теорию возмущений. На далеких расстояниях между молекулами оператор  $\hat{V}$  можно рассматривать как малое возмущение. В первом

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

приближении теории возмущений энергия электростатического взаимодействия определяется выражением

$$E_{el}^{(1)} = \langle \psi_n^A \psi_m^B | V | \psi_n^A \psi_m^B \rangle. \quad (3.15)$$

Подставив в выражение (3.15) выражение (3.13) с учетом (3.14) получим выражение классической электростатики для энергии взаимодействия двух систем зарядов, состоящих из точечных ядер и пространственно распределенных зарядов электронов:

$$E_{el}^{(1)} = -\sum_{\alpha} Z_{\alpha} \int \rho_{mm}^B(j) \frac{1}{r_{\alpha j}} dv_j - \sum_{\beta} Z_{\beta} \int \rho_{nn}^A(i) \frac{1}{r_{\beta i}} dv_i + \int \rho_{nn}^A(i) \rho_{mm}^B(j) \frac{1}{r_{ij}} dv_i dv_j + \sum_{\alpha, \beta} \frac{Z_{\alpha} Z_{\beta}}{R_{\alpha \beta}}. \quad (3.16)$$

По физическому смыслу первые два члена в правой части (3.16) представляют собой энергии притяжения ядер одной молекулы электронным облаком другой. Третий и четвертый члены – энергии отталкивания электронных облаков и зарядов ядер соответственно.

Как правило, для практических расчетов межмолекулярных потенциалов требуются дальнейшие приближения. На больших расстояниях между взаимодействующими молекулами их электронные оболочки не перекрываются, и энергия электростатического взаимодействия с хорошей точностью может быть представлена в виде суммы нескольких первых членов разложения  $E_{el}^{(1)}$  в ряд по степеням  $1/R$  [Каплан, 1982, Пюльман, 1981]. С этой целью используется известное из электростатики мультипольное разложение потенциала в ряд Тейлора [Ландау и др., 1989, 6]. Данное разложение использовалось нами при исследовании межмолекулярных взаимодействий блокаторов проводимости с поверхностью мембраны нервного волокна [Дмитриев и др., 2000, Дмитриев и др., 2001, Дмитриев и др., 2000а, Дмитриев и др., 2000б, Дмитриев и др., 2000в, Дмитриев и др., 2001а, Дмитриев и др., 2001б, Исаева и др., 2001, Исаева и др., 2002, Исаева и др., 1999, Исаева и др., 1998, Исаева и др., 2000, Исаева и др., 2003, Исаева и др., 2000а, Исаева и др., 2001а, 2001б, Исаева и др., 2000б, 2000в, 2000г, Исаева и др., 2004, Лузянин и др., 2002].

Если электронные оболочки взаимодействующих молекул перекрываются, то возникают силы дисперсионного и индукционного взаимодействия. Для описания данных сил необходим второй и более высокие порядки теории возмущений.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Энергию взаимодействия молекул А и В во втором порядке теории возмущений [Ландау и др., 1989] можно представить в виде

$$E_{pol}^{(2)} = - \sum_{n,m} \frac{\left| \langle \psi_n^A \psi_m^B | V | \psi_0^A \psi_0^B \rangle \right|^2}{E_n^A + E_m^B - (E_0^A + E_0^B)}, \quad (3.17)$$

где  $E_n^A$  и  $E_m^B$  – энергии молекул А и В в состояниях  $n$  и  $m$  соответственно. Сумма по  $n$  и  $m$  может быть разбита на две части, имеющие различный физический смысл:

$$E_{pol}^{(2)} = E_{ind}^{(2)} + E_{disp}^{(2)}. \quad (3.18)$$

Первое слагаемое выражения (3.18) – энергия индукционного взаимодействия, соответствует электростатическому взаимодействию зарядов невозмущенной молекулы с электрическим полем, возникающем в результате деформации распределения заряда в другой молекуле. В него входят члены суммы (3.17), получающиеся, если положить  $n = 0$  и  $m = 0$ :

$$E_{ind}^{(2)} = - \sum_{m \neq 0} \frac{\left| \langle \psi_0^A \psi_m^B | V | \psi_0^A \psi_0^B \rangle \right|^2}{E_m^B - E_0^B} - \sum_{n \neq 0} \frac{\left| \langle \psi_n^A \psi_0^B | V | \psi_0^A \psi_0^B \rangle \right|^2}{E_n^A - E_0^A}. \quad (3.19)$$

Первое слагаемое в (3.19) отвечает взаимодействию молекулы А в основном состоянии с индуцированным ее электрическим полем в молекуле В. Второе – аналогично для молекулы В. Поскольку знаменатели в выражении (3.19) положительны, то энергия индукционного взаимодействия молекул в основном состоянии всегда отрицательна, т.е. соответствует притяжению. В возбужденном состоянии индукционная энергия может быть как отрицательной, так и положительной.

Второе слагаемое в (3.19) соответствует энергии дисперсионного взаимодействия:

$$E_{disp}^{(2)} = - \sum_{n,m \neq 0} \frac{\left| \langle \psi_n^A \psi_m^B | V | \psi_0^A \psi_0^B \rangle \right|^2}{E_n^A + E_m^B - (E_0^A + E_0^B)}. \quad (3.20)$$

Входящие в данное выражение матричные элементы  $\langle \psi_n^A \psi_m^B | V | \psi_0^A \psi_0^B \rangle$  не диагональны по обеим собственным функциям. Они отвечают



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

электростатическому взаимодействию двух взаимно индуцированных электронных распределений молекул А и В, т.е. дисперсионная энергия обусловлена одновременными флуктуациями распределений заряда в каждой молекуле. Дисперсионное взаимодействие не имеет классического аналога. Так же как и индукционная энергия, для молекул в основных состояниях энергия дисперсионного взаимодействия всегда отрицательна.

На малых расстояниях между взаимодействующими молекулами возникают обменные взаимодействия. Их проявление становится заметным на расстояниях менее  $10a_0$ , где  $a_0$  – радиус Бора взаимодействующих атомов. На близких расстояниях, когда перекрывание электронных оболочек становится существенным, энергия отталкивания, обусловленная обменными взаимодействиями, вносит преобладающий вклад в общую энергию взаимодействующих молекул. С увеличением расстояния обменные силы экспоненциально спадают.

При малых расстояниях между молекулами возникают значительные трудности в построении теории возмущений для обменных взаимодействий. Несмотря на многочисленные попытки [Certain et al., 1972], в настоящее время не создано общепринятого варианта теории возмущений для короткодействующих сил, выражающей их энергию через свойства изолированных молекул. В отсутствие такой теории вычисление энергии обменного взаимодействия должно выполняться для каждой системы при различных положениях и относительных ориентациях взаимодействующих подсистем. Наиболее простым способом расчета энергии в этой ситуации является теория самосогласованного поля.

Таким образом, представление энергии взаимодействия в системе ион-канал в виде  $E_{ic} = E_{ic}^q + E_{ic}^c$  является обоснованным.

Энергию  $E_{ic}^q$  целесообразно рассчитывать одним из квантовохимических методов для системы ион – ближние к нему аминокислоты, энергию  $E_{ic}^c$  рассчитывать в приближении точечных зарядов на атомах  $q_i$  дальних аминокислот по традиционной кулоновской схеме  $E_{ic}^c = \sum_{i=1}^N q_i/r_i$ . Причем в качестве зарядов на атомах  $q_i$ , можно использовать параметры электростатических взаимодействий

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

одного из силовых полей или точечные заряды на атомах, рассчитанные квантовохимически.

Квантовохимическая функция потенциальной энергии учитывает дальнедействующие и близкодействующие взаимодействия, а также описывает механизмы образования ковалентных, донорно-акцепторных и водородных связей [Жидомиров и др., 1979].

В основе современной квантовой химии лежит уравнение Шредингера для стационарных состояний. Обычно используют адиабатическое приближение, т.е. предполагают, что ядра неподвижны и можно решать уравнения только для движения электронов. Однако даже в этом случае точно решить уравнение Шредингера можно только для одноэлектронных систем. Поэтому в квантовохимических расчетах используют различные приближенные методы, наиболее распространенным из которых является метод самосогласованного поля (ССП) или метод Хартри-Фока. В этом методе полагается, что каждый электрон движется в поле атомных ядер и эффективном усредненном поле других электронов. Многоэлектронную волновую функцию ищут в виде антисимметричного произведения спин-орбиталей, т.е. одноэлектронных МО  $\phi_i$ , умноженных на спиновые волновые функции  $\alpha$  или  $\beta$  соответствующего электрона [Бурштейн и др., 1989]:

$$\Phi = \|\phi_1\alpha \cdot \phi_1\beta \cdot \phi_2\alpha \cdot \phi_2\beta \cdot \dots \cdot \phi_N\alpha \cdot \phi_N\beta\|. \quad (3.21)$$

Для расчетов систем с закрытыми оболочками (где нет неспаренных электронов) используют обычно ограниченный метод Хартри-Фока (RHF), когда каждая одноэлектронная МО (молекулярная орбиталь)  $\phi_i$  занята двумя электронами с противоположными спинами. Тогда уравнение Шредингера преобразуется в систему интегрально-дифференциальных уравнений для движения каждого отдельного электрона [Бурштейн и др., 1989]:

$$F\phi_i = \varepsilon_i\phi_i \quad (3.22)$$

где  $F$  – фокиан (гамильтониан специального вида в приближении СП),  $\varepsilon_i$  – энергия  $i$ -й МО. Молекулярные орбитали  $\phi_i$ , как правило, ищут в виде линейных комбинаций атомных орбиталей  $\chi_i$  (приближение ЛКАО):

$$\phi_i = \sum_j c_{ij}\chi_j \quad (3.23)$$

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

где  $c_i$  – искомые коэффициенты. Таким образом, совокупность атомных орбиталей (АО)  $\chi_i$  является базисом для построения молекулярной волновой функции  $\phi_i$ . Количество базисных АО, как правило, недостаточно велико, т.е. базис является неполным. Необходимо, чтобы базисный набор АО мог достаточно точно передавать распределение электронной плотности в молекуле. Выполнить это требование на практике бывает достаточно трудно и выбор подходящего базисного набора является серьезной задачей [Бурштейн и др., 1989]. Для определения величин  $c_i$  используется вариационная процедура минимизации полной электронной энергии молекулы  $E$ . Для этого решается система линейных уравнений специального вида [Бурштейн и др., 1989]:

$$\sum_j (F_{ij} - \varepsilon S_{ij}) c_j = 0 \quad (3.24)$$

где

$$F_{ij} = F'_{ij} + \sum_{kl} P_{kl} \left( \langle ij|kl \rangle - \frac{1}{2} \langle ik|jl \rangle \right) \quad (3.25)$$

Здесь  $S_{ij}$  – интеграл перекрывания АО  $\chi_i$  и  $\chi_j$ ,  $F'_{ij}$  – матричный элемент одноэлектронного гамильтониана, включающий кинетическую энергию электронов и энергию взаимодействия электронов и атомных ядер,  $P_{kl}$  – матрица зарядов и порядков связей,  $\langle ij|kl \rangle$  – кулоновский многоцентровый двухэлектронный интеграл вида:

$$\langle ij|kl \rangle = \int \chi_i^*(1) \chi_j^*(1) \frac{1}{r_{12}} \chi_k(2) \chi_l(2) d\tau_1 d\tau_2 \quad (3.26)$$

Решение системы (1.24) проводят методом самосогласования. Для этого в качестве нулевого приближения берется произвольная совокупность коэффициентов  $c_i$ , по ним строится матрица  $F_{ij}$  и решение (3.14) дает новый набор  $c_i$ , который дает новую матрицу  $F_{ij}$  и т.д., пока коэффициенты  $c_i$  не перестанут изменяться [Бурштейн и др., 1989].

На практике обычно пользуются как неэмпирическими (*ab initio*), так и полуэмпирическими методами. Они отличаются методикой вычисления матричных элементов, описывающих электрон-электронные и электрон-ядерные взаимодействия в системе (3.24). В полуэмпирических методах для этой цели используют приближенные эмпирические формулы и известные из экспериментов параметры атомов.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

В неэмпирических методах проводится непосредственный аналитический расчет матричных элементов [Фудзинага, 1983]. На практике чаще пользуются полуэмпирическими методами, чем более сложными и требующими гораздо больше (на несколько порядков) машинного времени неэмпирическими методами. Полуэмпирические расчеты в настоящее время проводят в валентных приближениях. В этих приближениях расчет проводится только для валентных электронов, а электроны внутренних оболочек включают в остов молекулы; используют минимальный базис; пренебрегают значительной частью кулоновских интегралов (3.26). Последнее упрощение является наиболее существенным и позволяет значительно упростить расчет. Неточность расчета при этом можно частично компенсировать за счет удачного подбора параметров.

Наиболее простым, в формальном отношении, и одновременно дающий хорошие результаты в некоторых случаях, является «расширенный метод Хюккеля (PMX)» был предложен Р. Хоффманом в 1963 году, поэтому в литературе его нередко называют методом Хоффмана [Минкин и др., 1979]. PMX сохраняет основные допущения простого метода Хюккеля, но включает в рассмотрение все валентные орбитали как  $\pi$ - так и  $\sigma$ -типа.

Формально уравнения PMX совпадают с уравнениями Рутаана:

$$\sum c_{i\mu} (F_{\mu\nu} - \epsilon S_{\mu\nu}) = 0 \quad (3.27)$$

$$|F_{\mu\nu} - \epsilon S_{\mu\nu}| = 0 \quad (3.28)$$

Однако в этих уравнениях матричные элементы  $F_{\mu\nu}$  не вычисляются точно, а заменяются эмпирическими параметрами или аппроксимируются специально подобранными соотношениями, включающими эти параметры. Так, диагональные матричные элементы  $F_{\mu\nu}$  полагаются равными потенциалам ионизации соответствующих валентных электронов, взятых с обратным знаком:

$$F_{\mu\mu} = -I_{\mu} \quad (3.29)$$

Для вычисления недиагональных матричных элементов  $F_{\mu\nu}$  предложено несколько формул.

1) Вольфсберга — Гельмгольца:

$$F_{\mu\nu} = 0.5K(F_{\mu\mu} + F_{\nu\nu})S_{\mu\nu} \quad (3.30)$$

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

где обычно  $K=1.75$ ;

2) Кьюсака

$$F_{\mu\nu} = 0,5(2 - |S_{\mu\nu}|)(F_{\mu\mu} + F_{\nu\nu})S_{\mu\nu} \quad (3.31)$$

3) Бальхаузена — Грея

$$F_{\mu\nu} = K(F_{\mu\mu}F_{\nu\nu})^{1/2}S_{\mu\nu} \quad (3.32)$$

Наиболее часто применяются формулы (3.30) и (3.31). В этих формулах интеграл перекрывания  $S_{\mu\nu}$  вычисляется точно со слэтеровскими АО, в которых экспоненты радиальных частей могут выбираться из различных источников. Учет интеграла перекрывания – важное отличие РМХ от простого метода Хюккеля. Поскольку интегралы  $S_{\mu\nu}$  зависят от расстояния между атомными центрами и их относительной ориентации, в РМХ в явном виде включается зависимость энергетических характеристик и электронных распределений от молекулярной геометрии.

Ионизационные потенциалы валентных электронов в атоме выбираются из экспериментальных данных.

Полная энергия молекулы с закрытой электронной оболочкой вычисляется как удвоенная сумма энергий занятых МО:

$$E = 2 \sum_{i=1}^{\text{зан.}} \varepsilon_i \quad (3.33)$$

В формуле полной энергии (3.33) не учитываются члены межэлектронного и межъядерного взаимодействий.

Для описания распределения электронной плотности в молекулах (нонах, радикалах) в методах расчета, учитывающих интеграл перекрывания  $S_{\mu\nu}$ , необходимо использовать формулы для нахождения электронного заряда на атоме и порядка связи между атомами. В общем случае Маллиkenом предложены формулы для вычисления электронной заселенности орбитали на атоме А (орбитальная заселенность)

$$P_{\mu\mu} = 2 \sum_{i=1}^{\text{зан.}} \left( c_{i\mu}^2 + \sum_{\nu \in A} c_{i\mu} c_{i\nu} S_{\mu\nu} \right), \mu \in A \quad (3.34)$$

и полной электронной заселенности атома А (полная атомная заселенность)

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

$$P_A = 2 \sum_{i=1}^{\text{зан.}} \left( \sum_{\mu \in A} c_{i\mu}^2 + \sum_{\mu \in A} \sum_{\nu \in A} c_{i\mu} c_{i\nu} S_{\mu\nu} \right). \quad (3.35)$$

Для характеристики связывания между двумя АО  $\mu$  и  $\nu$ , принадлежащих соответственно атомам А и В, и между двумя атомами А и В Малликен предложил находить межорбитальную заселенность связи

$$P_{\mu\nu} = 2 \sum_{i=1}^{\text{зан.}} c_{i\mu} c_{i\nu} S_{\mu\nu}, \quad \mu \in A, \nu \in B \quad (3.36)$$

и полную заселенность связи

$$P_{AB} = 2 \sum_{i=1}^{\text{зан.}} \sum_{\mu \in A} \sum_{\nu \in A} c_{i\mu} c_{i\nu} S_{\mu\nu}. \quad (3.37)$$

Полная заселенность связи характеризует прочность связывания между двумя атомами А и В.

Несмотря на сделанные при выводе основных уравнений РМХ серьезные упрощающие допущения, метод имеет вполне определенное обоснование.

Для молекул, имеющих равномерное распределение заряда по всем атомам или, иначе говоря, для молекул, атомы которых не сильно отличаются по электроотрицательности (обычно принимают различие не более 1.4 по шкале Полинга) матричные элементы  $F_{\mu\nu}$  можно представить в виде

$$F_{\mu\nu} \sim \text{const} S_{\mu\nu} \quad (3.38)$$

В этом случае энергия электростатического отталкивания ядер примерно равна энергии межэлектронного взаимодействия, и полная энергия молекулы хорошо аппроксимируется суммой орбитальных энергий всех электронов. Тогда кривая полной энергии молекулы почти "параллельна" кривой удвоенной суммы орбитальных энергий. Следовательно, относительные энергии (например, конформационные энергии) должны удовлетворительно соответствовать величинам  $E$ , вычисляем в согласии с формулой (3.33).

Если же в молекуле атомы отличаются по электроотрицательности и имеется неравномерное распределение электронного заряда, то энергии межэлектронного и ядерного взаимодействия резко отличаются, полную энергию нельзя

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

аппроксимировать формулой (3.33) и в этом случае РМХ часто дает неверные результаты.

Для молекул  $H_2O$ ,  $Li_2O$ ,  $LiOH$  и  $FOH$ , у которых  $\Delta\chi > 1.4$ , результаты расчетов РМХ значительно отличаются от величин, предсказываемых методом *ab initio*, однако для остальных молекул согласие приемлемое.

Вследствие неучета в явном виде межэлектронного и межъядерного взаимодействия, РМХ плохо предсказывает равновесные длины связей даже для молекул с равномерным распределением заряда по атомам, поэтому для оптимизации длин связей РМХ практически не применяется.

Для молекул с неравномерным распределением заряда РМХ приводит к существенным ошибкам и в определении геометрической конфигурации. Так, для молекулы аммиака РМХ предсказывает в качестве устойчивой не пирамидальную, а плоскую форму. В то же время РМХ несомненно является весьма быстрым и недорогим средством (относительное время расчета по РМХ на современных ЭВМ составляет по сравнению с расчетами *ab initio* в минимальном базисе для одинаковых соединений) для конформационных расчетов молекул со слабо поляризованными системами связей.

Так, РМХ правильно воспроизводит относительные энергии этана и циклогексана, зигзагообразную структуру полимерной цепи полиэтилена. Кроме того, чрезвычайно важной положительной стороной РМХ является довольно точное воспроизведение им относительного порядка энергетических уровней и строения МО молекул со слабой поляризацией связей. Это делает РМХ важным средством качественного анализа структурных эффектов, основанного на изучении МО молекул, их реакции на геометрическое искажение и введение заместителей.

Если задача состоит в исследовании взаимодействия иона с молекулой на расстояниях, для которых не происходит перекрывание электронных оболочек иона и атомов молекулы, энергия взаимодействия может быть представлена выражением вида (3.33), в котором заряды на атомах определяются выражением

$$q_i = e \sum_j \left( c_j^{(i)} \right)^2. \quad (3.39)$$

Заряды вида (1.39) называются зарядами на атомах по Малликену [Фудзинага, 1983]. В таком случае пренебрегают эффектами

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

поляризации, т.е. эффектами деформации электронных оболочек в результате взаимного влияния электрических полей взаимодействующих иона и молекулы. Очевидно, что такие эффекты существенны только на близких расстояниях. Тем самым, для расчета энергии электростатического взаимодействия иона и белковой молекулы достаточно получить распределение электростатического потенциала вдоль оси белковой поры по формуле

$$U(\vec{R}) = \sum_{i=1}^N \frac{q_i}{|\vec{R} - \vec{r}_i|}. \quad (3.40)$$

Если требуется получить распределение потенциала на близких расстояниях от белковой молекулы, то обоснованным является использование выражения вида

$$U(\vec{R}) = \sum_A \frac{Z_A}{|\vec{R} - \vec{R}_A|} - \int \frac{\rho(\vec{r}')}{|\vec{r} - \vec{r}'|} d\vec{r}', \quad (3.41)$$

в котором  $Z_A$  – заряд ядра атома  $A$ ,  $\rho(\vec{r})$  – электронная плотность. В приближении МО ЛКАО электронная плотность представляется в виде

$$\rho(\vec{r}') = \sum_{\mu\nu} P_{\mu\nu} \chi_{\mu}(\vec{r}') \chi_{\nu}(\vec{r}').$$

Функция потенциальной энергии в электродиффузионном методе представляется в виде суммы электростатического и неэлектростатического вклада. Для неэлектростатической составляющей потенциала наибольшее распространение получили функции вида (3.9) и (3.10). В работах [Corry et al., 2001a, Moy et al., 2000] данные потенциалы использовались для исследования каналов с различными геометриями полостей, в рамках непрерывного подхода. Электростатический вклад в результирующий потенциал определяется как решение уравнения Пуассона. В качестве зарядов на атомах, используются параметры одного из силовых полей, например AMBER.

В итоге, функция потенциальной энергии иона в поробразующей белковой молекуле полностью определяет динамику иона, как в непрерывном, так и в корпускулярном методе описания ионного транспорта. В обоих методах, данная функция представляется в виде двух аддитивных составляющих: электростатической и неэлектростатической. Электростатическая составляющая обусловлена взаимодействием иона с атомными группами белковых, липидных и водных молекул.



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Неэлектростатическая составляющая вводится для исключения "прилипания" разноименных зарядов и характеризует близкодействующее отталкивание. Для определения функции потенциальной энергии используются параметры электростатических и вандерваальсовых взаимодействий различных силовых полей или квантовохимические расчеты, которые дают возможность интегрально рассматривать все взаимодействия. Данные методы дают, как количественно, так качественно, различные значения зарядов и параметров вандерваальсовых взаимодействий.

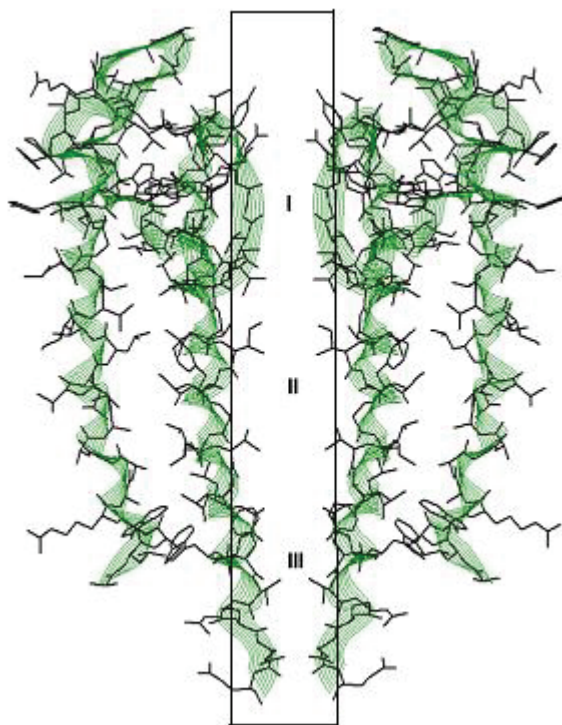


Рис. 3.10. Цилиндр обрезания

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Метод разделения дальних и ближних взаимодействий может быть представлен в виде следующего алгоритма [Марков и Дмитриев, 2005, Мелихов и др., 2003, Дмитриев и др., 2006, Дмитриев и Твердислов, 2005]:

1) строится воображаемый цилиндр, так называемый цилиндр обрезания, радиусом  $R_0$  и осью, совпадающей с осью поворотной симметрии канала (Рис. 3.10);

2) все аминокислоты классифицируются на ближние, атомы которых принадлежат данному цилиндру, и дальние – остальные аминокислоты;

3) энергия  $E_{ic}^q$  рассчитывается квантовохимическим методом для системы ион – ближние аминокислоты,  $E_{ic}^c$  – методом силового поля для дальних аминокислот;

4) рассчитывается результирующая энергия в виде  $E_{ic} = E_{ic}^q + E_{ic}^c$ .

Центральным вопросом таких расчетов является вопрос о расстоянии между ионом и атомами поры канала, на котором возможно разделение результирующей энергии взаимодействия.

Применительно к расчету энергии взаимодействия иона и молекулы канала, целесообразно провести такой расчет в приближении точечных зарядов на атомах отдельных аминокислот, а также квантовохимически в системе ион – соответствующая аминокислота. Вид и характер рассчитанных функций потенциальной энергии  $E = E(r)$ , где  $r$  – расстояние между ионом и аминокислотой, позволит определить координату точки их расхождения. Данное значение можно принять за минимальный радиус цилиндра обрезания.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

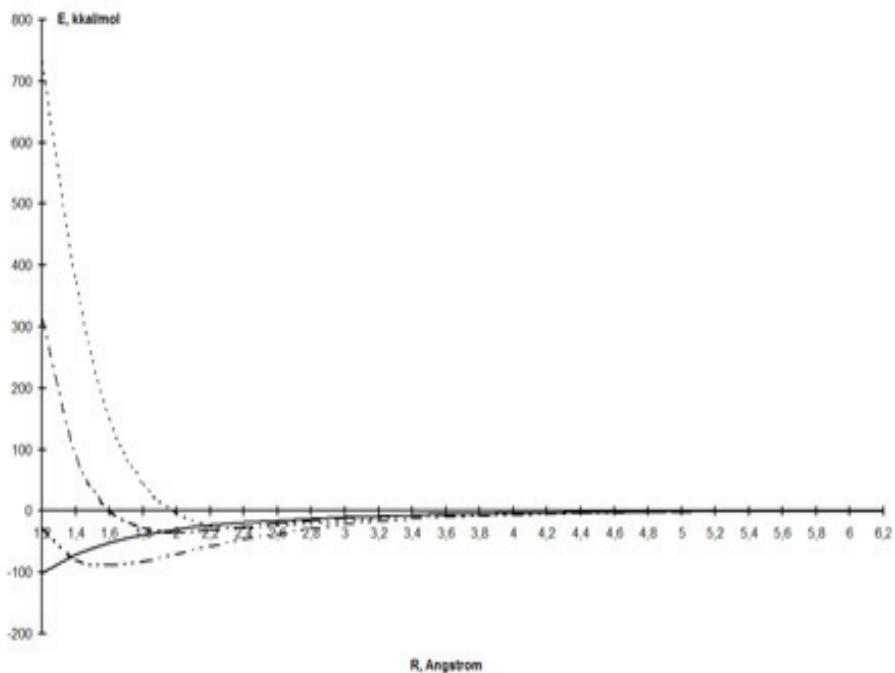


Рис. 3.11. Энергия взаимодействия в системе ион-аминокислота (сплошной линией изображен результат расчета по классической кулоновской схеме)

Для определения координат точки разделения двух функций нами проведены квантовохимические и классические расчеты зависимости энергии взаимодействия от взаимного расстояния в системе ион-аминокислота. Подобные расчеты проведены для всех 20 аминокислот и 3 ионов. Качественно, функции потенциальной энергии совпадают для всех аминокислот и имеют вид представленный на рисунке 3.6.

Рассчитанные квантовохимически, функции потенциальной энергии ионов, имеют вид функции Леннарда-Джонса (потенциал 6–12), рассчитанные в приближении точечных атомных зарядов – гиперболический вид. Наши расчеты показывают, что, в зависимости от аминокислоты, координаты точки расхождения, совпадающие с радиусом

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

цилиндра обреза, зависимостей составляют 3.2-4.2Å. Таким образом, радиус цилиндра обреза должен быть не меньше 4.2Å. Для упрощения расчетов нами принято  $R=5\text{Å}$ .

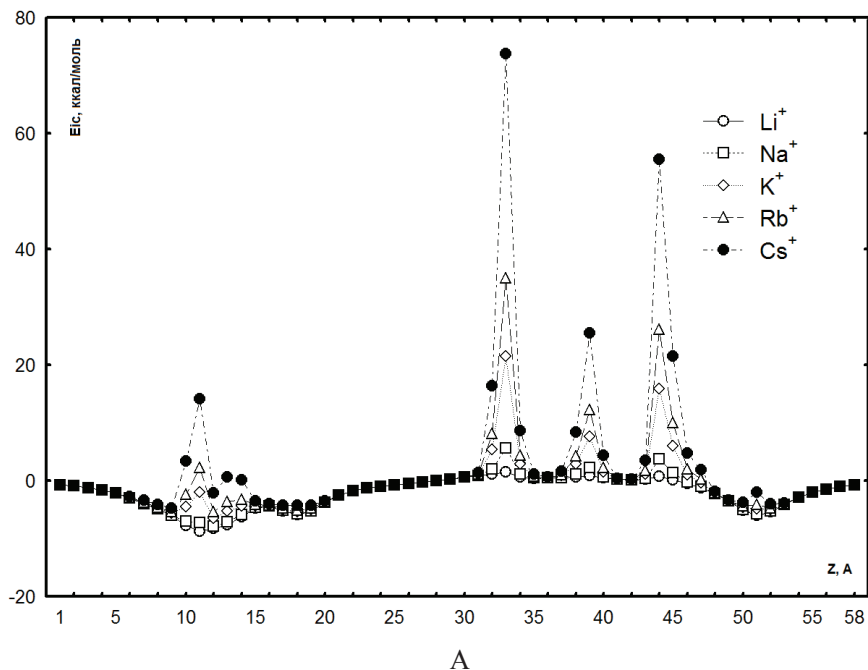
Распределение энергии взаимодействия ионов с близкими аминокислотами рассчитывали квантовохимическим методом Хоффмана в стандартной параметризации [Минкин и др., 1979]. Исследуемый нами канал формируется атомами C, O, N, S и H, электроотрицательности которых составляют 2.5, 3.6, 3.0, 2.5 и 2.1 соответственно, для катионов  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  и  $\text{Cs}^+$  – 1.5, 3.3, 2.6, 2.4 и 1.8, соответственно [Бацанов, 2000]. Таким образом, максимальное значение  $\Delta\chi$  для атомов канала KcsA составляет 1.5 – для несвязанных ковалентными связями катионов  $\text{Li}^+$  и карбонильных кислородов, формирующих пору канала. Следовательно, применение квантовохимического метода Хоффмана для решения поставленных задач является вполне обоснованным.

Для расчета распределения энергии взаимодействия ионов с дальними аминокислотами применяли параметры электростатических взаимодействий (заряды на атомах) силового поля AMBER. Данный выбор обусловлен тем, что результаты расчета методом AMBER хорошо согласуются с результатами квантовохимического расчета распределения потенциала в канале [Дмитриев и др., 2004].

Следует отметить, что предложенная нами схема расчета распределения энергии, в некотором отношении, формально эквивалентна модифицированной технике расчета оптимальной геометрии молекул в приближении «ближних атомов». Речь идет о методе PPPC, в котором сохраняется приближение «ближних атомов», а дальние атомы вносят свой вклад через общий заряд и дипольный момент ячеек, моделирующих неучтенные в явном виде атомы.

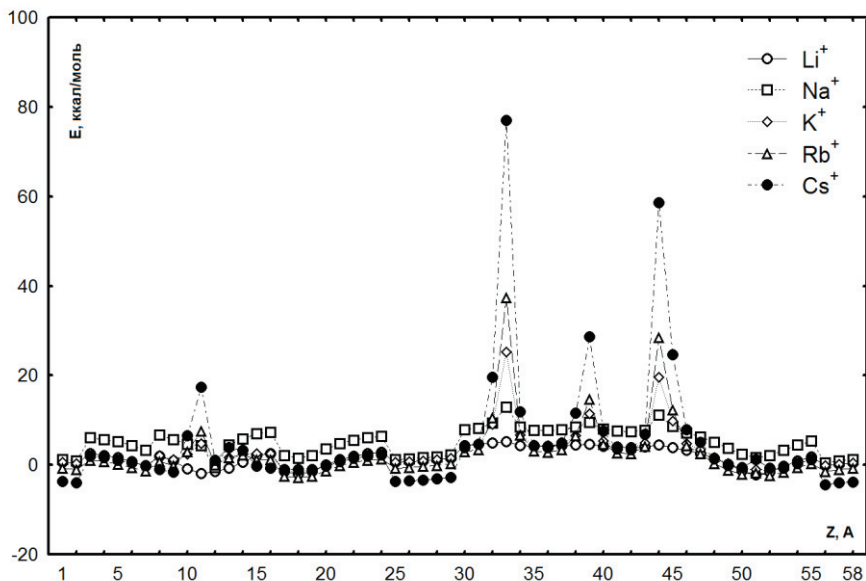
Функции потенциальной энергии ионов  $E(Z) = E_{ic}(Z) + E_{iw}(Z)$ , с рассчитанными методом силового поля AMBER составляющими  $E_{ic}(Z)$ , представлены на рисунке 3.7. Полученные энергетические профили ионов различаются во всех областях поры канала. Причем наиболее существенное различие энергетических профилей катионов наблюдается в области нижней поры канала. В нижней поре канала KcsA существуют энергетические барьеры, причем их высоты для различных ионов находятся в следующей последовательности  $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ . Энергетические барьеры для ионов  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Li}^+$  составляют: 18, 12, 6 ккал/моль.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp



Для ионов цезия и рубидия величины соответствующих энергетических барьеров ионов составляют 75 ккал/моль и 32 ккал/моль, соответственно. В области селективного фильтра канала высоты энергетических барьеров ионов находятся в последовательности  $\text{Cs}^+ > \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+$ . В таком случае канал KcsA имеет расчетный ряд селективности противоположный экспериментальному [Doyle et al., 1998]. Последний вывод является очевидным, т.к. высота энергетического барьера для иона обратно пропорциональна его проницаемости [Eisenberg, 1990, Eisenberg et al., 1995].

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp



Б

Рис. 3.12. Энергетические профили ионов в поре канала KcsA (расчет методом AMBER). (А) Энергия взаимодействия в системе ион – канал. (Б) Результирующая энергия иона

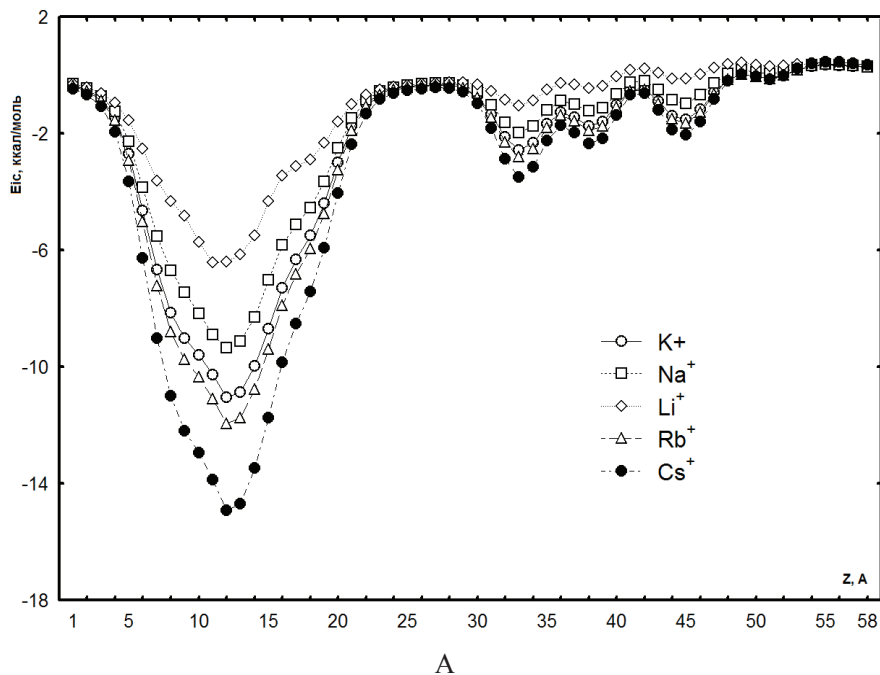
Таким образом, рассчитанные энергетические профили ионов методом силового поля AMBER, во-первых, не объясняют энергетическую предпочтительность дегидратации  $K^+$  по сравнению с другими ионами, а, во-вторых, не объясняют прохождение  $K^+$  через достаточно высокий энергетический барьер нижней поры канала. Данные результаты указывают на ошибочность рассчитанных методом AMBER энергетических профилей ионов, что получит свое дальнейшее подтверждение в результатах расчета функциональных характеристик канала. Аналогичные результаты наблюдаются для распределений энергии катионов, рассчитанных методом силового поля OPLS. Эти результаты также не объясняют эффект энергетической предпочтительности дегидратации  $K^+$  перед другими катионами. Так в области селективного фильтра канала рассчитанные глубины потенциальных ям ионов находятся в следующей последовательности

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

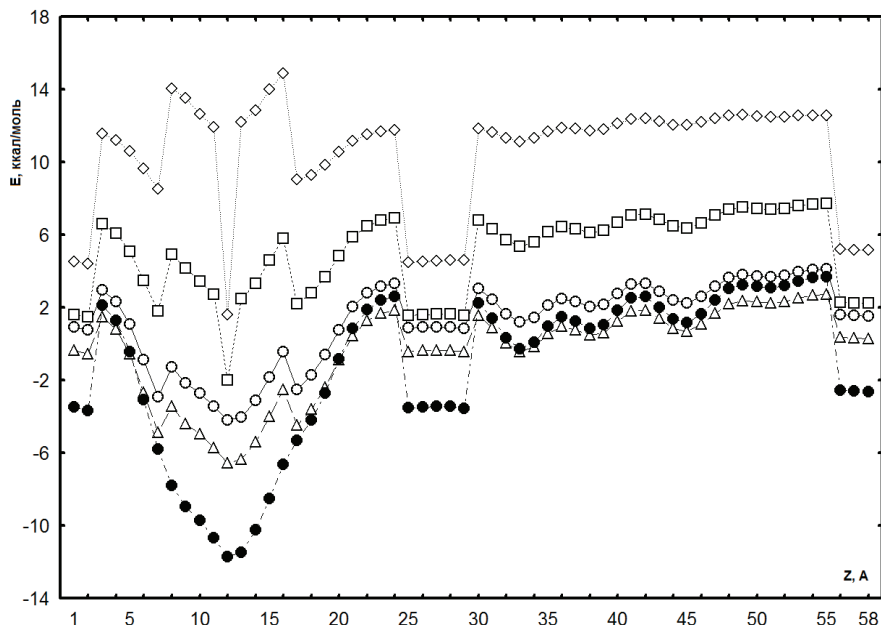
$\text{Li}^+ > \text{Na}^+ \approx \text{K}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+$ . Кроме того, существует достаточно высокий потенциальный барьер для  $\text{K}^+$  в области нижней поры.

При изменении параметров  $\Gamma^*$  силового поля AMBER на кристаллохимические ионные радиусы ( $r_{\text{Li}^+} = 0.76 \text{ \AA}$ ,  $r_{\text{Na}^+} = 1.02 \text{ \AA}$ ,  $r_{\text{K}^+} = 1.38 \text{ \AA}$ ) и реальные ионные радиусы ( $r_{\text{Li}^+} = 0.92 \text{ \AA}$ ,  $r_{\text{Na}^+} = 1.18 \text{ \AA}$ ,  $r_{\text{K}^+} = 1.45 \text{ \AA}$ ) [Бацанов, 2000], глубины потенциальных ям ионов находятся в последовательности  $\text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+$ , что согласуется с результатами расчетов распределений потенциальной энергии катионов в селективном фильтре методом AMBER в стандартной параметризации.

Таким образом, для получения правильных энергетических профилей катионов в канале KcsA необходима полная (по всем атомам), а не только по параметрам катионов, репараметризация силового поля или привлечение квантовохимического метода расчета энергии.



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp



Б

Рис. 3.13. Энергетические профили иона в канале KcsA (Расчет методом ЕНТ/AMBER). (А) Энергия взаимодействия в системе ион – канал. (Б) Результирующая энергия иона

Энергетические профили, рассчитанные методом разделения дальних и ближних взаимодействий (ЕНТ/AMBER), представлены на рисунке 3.8. Данные энергетические профили имеют качественно сходный вид для всех исследуемых ионов и соответствуют пятибарьерной модели канала. При этом наблюдается только количественное расхождение профилей.

Величины энергетических барьеров ионов по абсолютной величине находятся в последовательности  $Li^+ > Na^+ > K^+ > Rb^+ > Cs^+$ . Учитывая, что последовательность энергетических барьеров ионов определяет последовательность ионных токов и рядов селективности, можно прогнозировать согласие расчетных функциональных характеристик канала с экспериментальными.



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Таким образом, метод ЕНТ/AMBER с одной стороны не требует значительных затрат расчетного времени, с другой – дает достоверные, по крайней мере качественные, значения энергий ионов в поре канала.

#### 3.1.3. Результаты расчетов

Стерические напряжения в канале, обусловленные модельной неферментативной модификацией его аминокислот, снимали методами молекулярной динамики в интервале 10 пс и шагом 0.001 пс. При этом, для построения функции потенциальной энергии молекулы мы использовали представление и параметризацию силового поля AMBER. Данный выбор обоснован тем, что силовое поле AMBER было создано (параметризовано) для исследования структуры и динамики белков и нуклеиновых кислот.

Количество Asn, процент Asn и общее количество аминокислот в ионном канале представлены в таблице 3.2.

Таблица 3.2

Количество Asn, процент Asn и общее количество аминокислот в ионных каналах

Канал	Количество Asn	Общее количество	Количество Asn, %
KcsA	24	472	5
KvAP	18	240	7
$\alpha/\beta$	72	1912	4
Kv1.2	132	1684	8
NMDA	24	472	6

В среднем наблюдается практически постоянное (5-8%) процентное содержание Asn в исследуемых ионных каналах. Наибольшее процентное содержание данной аминокислоты находится у потенциал-зависимого калиевого канала Kv1.2 типа *Shaker* (8%), наименьшее – находится у модельного потенциал-зависимого калиевого  $\alpha/\beta$ -канала (4%). Можно предположить, что структурные изменения в каналах, обусловленные снятием их стерического напряжения, прямо пропорциональны процентному содержанию аспартата в каналах.

Зависимости потенциальной энергии природных и модельных изомеров каналов, построенных заменой L-Asna на D-isoAsp,

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

характеризуются наличием множества локальных минимумов, причем по нашим наблюдениям, каждый из них соответствует пору-формирующей конформации молекулы как нативного, так и модифицированного канала. Данные зависимости имеют вид, аналогичный зависимостям соответствующих каналов с полной заменой L-аминокислот на D-аминокислоты.

Таблица 3.3

Наиболее глубокие локальные минимумы, после релаксации молекулярных структур, для природных и модельных изомеров, с частичной изомеризацией, мембранных каналов

Ионный канал		Энергия, ккал/моль
Природный изомер	KcsA	-1360.69
	KvAP <sub>open</sub>	-3479.82
	KvAP <sub>closed</sub>	-3467.18
	$\alpha/\beta$ <sub>open</sub>	-3879.22
	$\alpha/\beta$ <sub>closed</sub>	-3867.34
	Kv1.2 <sub>open</sub>	-3965.11
	Kv1.2 <sub>closed</sub>	-3931.14
Модельный изомер	isoAsp-KcsA	-1260.54
	isoAsp-KvAP <sub>open</sub>	-3359.11
	isoAsp-KvAP <sub>closed</sub>	-3327.01
	isoAsp- $\alpha/\beta$ <sub>open</sub>	-3789.19
	isoAsp- $\alpha/\beta$ <sub>closed</sub>	-3757.34
	isoAsp-Kv1.2 <sub>open</sub>	-3845.12
	isoAsp-Kv1.2 <sub>closed</sub>	-3791.53

Наиболее глубокие потенциальные минимумы, после релаксации молекулярных структур, для природных и модельных изомеров, с

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

частичной изомеризацией, мембранных каналов представлены в таблице 3.3.

Результаты расчета показывают, что не модифицированные ионные каналы энергетически более стабильны, чем модифицированные ионные каналы. Так разность энергий открытых потенциал-зависимых калиевых каналов, для молодого и старого организма, составляют: для KvAP-канала -120 ккал/моль, для  $\alpha/\beta$ -канала -90 ккал/моль, для Kv1.2-канала -140 ккал/моль. Кроме того, если разность значений энергии соответствующих открытых и закрытых не модифицированных потенциал-зависимых каналов может компенсироваться изменением разности потенциалов на концах мембраны, то для модифицированных потенциал-зависимых калиевых каналов такие компенсации весьма затруднительны. Соответствующие разности энергий модифицированных ионных каналов составляют: 32.01 ккал/моль для KvAP-канала, 31.85 ккал/моль для  $\alpha/\beta$ -канала и 53.59 ккал/моль для Kv1.2-канала. Возможно, последний результат указывает на то, что изменения знака разности потенциалов на концах мембраны или недостаточно для перехода потенциал-зависимых калиевых каналов пожилого организма из открытого состояния в закрытое, и наоборот, или требуют большего времени для соответствующего перехода.

## **3.2. Функциональные характеристики модифицированных ионных каналов**

Энергетические профили ионов, явный вид которых не представлен в данной работе, рассчитывали методом ЕНТ/AMBER, по которым, методами теории переходного состояния Эйринга, рассчитывали функциональные характеристики одиночных модельных изомеров каналов.

Как показано в предыдущем параграфе, изменения знака разности потенциалов на концах мембраны или недостаточно для перехода потенциал-зависимых калиевых каналов старого организма из открытого состояния в закрытое, и наоборот, или требуют большего времени для соответствующего перехода. Следовательно, рассмотрим основные функциональные характеристики каналов пожилого организма в открытом состоянии.

### 3.2.1. Методы расчета функциональных характеристик ионных каналов

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Все существующие методы описания ионного транспорта в трансмембранных каналах можно свести к двум основным группам методов [Aidley et al., 1996, Nonner et al., 1999, Roux, 1999, Von Kitzing et al., 1999]: макроскопические и корпускулярно-механические методы.

В макроскопическом подходе используются электродиффузионные уравнения и химико-термодинамические представления (теория переходного состояния). Основой электродиффузионного метода является приближение непрерывно распределенного заряда канала, мембраны и ионов объемной воды. Движение ионов в полости белковой молекулы формально описывается уравнениями диффузии, например, трехмерным стационарным уравнением Пуассона-Нернста-Планка [Moy et al., 2000]:

$$\nabla D_i(\vec{R}) \{ \nabla c_i(\vec{R}) + \beta c_i(\vec{R}) \nabla V_i(\vec{R}) \} = 0 \quad (3.42)$$

Здесь  $D_i(\vec{R})$  – коэффициент диффузии,  $\beta=1/kT$ ,  $c_i(\vec{R})$  – концентрация  $i$ -х ионов,  $V_i(\vec{R})$  – потенциальная энергия, представляемая в виде суммы электростатической и неэлектростатической компоненты, т.е.

$$V_i(\vec{R}) = U(\vec{R}) + z_i e \phi(\vec{R}), \quad (3.43)$$

где  $U(\vec{R})$  – неэлектростатическая потенциальная энергия,  $z_i e$  – заряд иона,  $\phi(\vec{R})$  – электростатический потенциал. Электростатический потенциал является решением уравнения Пуассона

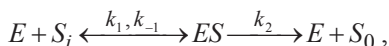
$$\nabla(\epsilon(\vec{R}) \nabla \phi(\vec{R})) = -4\pi(\rho_f(\vec{R}) + \sum z_i e c_i(\vec{R})), \quad (3.44)$$

в котором  $\epsilon(\vec{R})$  – диэлектрическая постоянная,  $\rho_f(\vec{R})$  – плотность фиксированных зарядов (белковой молекулы, мембраны, ионов объемной воды). Использование энергии неэлектростатических взаимодействий [Cardenas et al., 2000, Kurnikova et al., 1999] позволяет избежать "прилипание" разноименно заряженных частиц, например, положительно заряженных ионов и отрицательно заряженной полости белковой молекулы или разноименно заряженных ионов. Решением уравнения (3.42) является зависимость  $c_i = c_i(\vec{R})$  (распределение концентрации), которая дает возможность оценить ионные токи через порообразующие белковые молекулы, а, следовательно, и вольтамперные характеристики белков, которые могут сопоставляться с экспериментальными данными.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Калибровкой диэлектрической постоянной  $\epsilon(\bar{R})$  добиваются согласия полученных данных с экспериментальными вольтамперными характеристиками каналов. Метод Пуассона-Нернста-Планка применялся для моделирования ионной проводимости, и ее сравнения с экспериментальными данными, грамицидинового канала [Cardenas et al., 2000, Kurnikova et al., 1999, O'Connell et al., 1990], калиевого [Corry et al., 2000] и кальциевого канала [Chen et al., 1999], причем для канала ацетилхолинового рецептора авторами [Kuyucak et al., 1998] получено аналитическое решение уравнения Пуассона с граничными условиями Дирихле. Электродиффузионные уравнения для исследования потенциал-независимого канала KcsA использовались авторами [Corry et al., 2000].

Кинетическую теорию переходного состояния Эйринга успешно применяют для анализа работы ионных каналов и других ион-транспортных систем [Lauger, 1973, Lauger, 1984, Krupka et al., 1983, Eisenberg, 1990, Eisenberg et al., 1995]. В основе этого подхода лежит предположение о том, что система может находиться только в нескольких дискретных состояниях. При этом взаимные переходы между двумя состояниями сопряжены переходом системы через промежуточные стадии с более высокой свободной энергией, и константы скоростей переходов зависят от высоты соответствующих энергетических барьеров. Минимумы на кривых изменения свободной энергии соответствуют местам связывания ионов. Рассмотрим применение данного метода для случая, когда имеется одно место связывания и трансмембранное напряжение равно нулю. Тогда такую «реакцию» формально можно представить в виде



где E – каналный белок в «открытом» состоянии,  $S_i$  и  $S_0$  – транспортируемый ион внутри и снаружи, ES – комплекс иона с местом связывания внутри канала. Зная характер изменения свободной энергии (число ям, барьеров и их локализация), можно установить соответствие между этими профилями и вольтамперными характеристиками ионных каналов, т.е. исходным в данном методе является распределение свободной энергии или при определенных условиях потенциала в ионном канале. Кинетическая теория переходного состояния Эйринга применялась для исследования механизмов ионной селективности белковых пор [Laio et al., 1999], механизма функционирования синтетического гидрофобного ионного канала [Qi et al., 1999],

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

фторированного грамицидинового канала [Thompson et al., 2001], натриевого канала [Kurata et al., 1999] и cNG-канала [Seifert et al., 1999]. Константы перехода через энергетические барьеры в канале KcsA рассчитаны в работе [Morais-Cabral et al., 2001].

В корпускулярно-механическом методе описания ионного транспорта рассматривается траектория движения отдельного иона в поле белковой поры, для которого записывается одно из динамических уравнений: уравнение Ньютона или уравнение Ланжевена. Уравнение Ньютона

$$m_i \frac{d^2 \vec{R}}{dt^2} = -\nabla V_i(\vec{R}) \quad (3.45)$$

составляет основу метода молекулярной динамики [Karplus et al., 1990]. Функция потенциальной энергии иона  $V_i = V_i(\vec{R})$  должна быть записана для каждого иона и, по необходимости, должна учитывать взаимодействие иона с атомами белковой молекулы, молекул фосфолипидов и воды, другими ионами. Если необходимо рассматривать динамику атомных групп белковой молекулы [Chiu et al., 1999], то дополнительно учитываются взаимодействия между атомами белковой поры, что приводит к значительному увеличению числа уравнений (3.44).

Альтернативой схемой молекулярной динамики является ланжевенская динамика [Coffey et al., 1996] или ее модификация [Im et al., 2000], в основе которой положено уравнение Ланжевена

$$m_i \frac{d^2 \vec{R}}{dt^2} = -\nabla V_i(\vec{R}) - \gamma_i \frac{d\vec{R}}{dt} + \vec{F}_R(t). \quad (3.46)$$

Здесь  $\gamma_i$  – коэффициент трения,  $\vec{F}_R(t)$  – случайная сила, которая характеризует беспорядочные взаимодействия (столкновения) молекул растворителя с ионом. Добавление данных параметров дает возможность учитывать в неявном виде присутствие растворителя (воды) и тем самым существенно снижать количество уравнений (3.45).

Функция потенциальной энергии  $V_i = V_i(\vec{R})$  в уравнениях (3.45) и (3.46) для ковалентно-несвязанных частиц (атомов, ионов) определяется в виде суммы кулоновской составляющей и вандерваальсовой составляющей

$$V_i(\vec{R}) = U_C(\vec{R}) + U_{VDW}(\vec{R}). \quad (3.47)$$

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Использование энергии  $U_{VDW}(\vec{R})$ , также как в электродиффузионном методе, позволяет избежать "прилипание" разноименно заряженных частиц, например, положительно заряженных ионов и отрицательно заряженной полости белковой молекулы или разноименно заряженных ионов. Решениями уравнений (3.45) и (3.46) являются зависимости  $\vec{R} = \vec{R}(t)$  для каждого иона, которые дают возможность оценить ионные токи через порообразующие белковые молекулы и вольтамперные характеристики белков, которые могут сопоставляться с экспериментальными данными. Корпускулярно-механический метод применялся для модельного исследования ионной проводимости и сравнения с экспериментальными данными для калиевого канала [Shrivastava et al., 2000, Berneche et al., 2000], модельного канала [Zhong et al., 1998, Crozier et al., 2001, Chung et al., 1998], натриевого канала [Smith et al., 1998], аламетицинового канала [Tieleman et al., 1999], а также для исследования движения молекул воды в грамицидиновом канале [Chiu et al., 1999]. Методы молекулярной и броуновской динамики для исследования потенциал-независимого канала KcsA использовались авторами [Aqvist et al., 2000, Guidoni et al., 1974, Shrivastava et al., 2000, Allen et al., 2001, Berneche et al., 2001].

Функция потенциальной энергии молекулярной и ланжевеновой динамики  $V_i = V_i(\vec{R}_i)$  формально эквивалентны друг другу. Для определения явного вида такой функции традиционно принято использовать два ранее описанные подхода: силовые поля молекулярной механики [Кларк, 1990] и расчетные методы квантовой механики молекул [Сигал, 1980а, Сигал, 1980].

Вид энергетических профилей ионов в поре канала, позволяют получить качественные представления о характере движения иона и ионной избирательности канала. В этом случае полезна полуколичественная теория ионной селективности Эйзенмана [Eisenman, 1962, Eisenman, 1963, Eisenman et al., 1983, Eisenman et al., 1975], которая основана на сравнении энергии дегидратации ионов и энергии взаимодействия иона с атомными группами, выстилающими пору канала. Для получения функциональных характеристик канала необходим более детальный количественный анализ энергетических профилей ионов, привлекая либо континуальные методы, либо корпускулярно-механические методы. Результаты расчета функциональных характеристик каналов (ионные токи, проводимость, вольтамперные

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

характеристики, отношение проницаемостей и др.), несомненно, представляют больший интерес, чем сами энергетические профили, т.к. первые сопоставимы с экспериментальными данными.

В нашей работе для оценки функциональных характеристик каналов мы использовали формализм теории абсолютных скоростей реакций Эйринга [Eyring et al., 1946]. Данную теорию, используемую энзимологами, успешно применяют и в случае различных ион-транспортных систем [Lauger, 1973, Lauger, 1984, Hill, 1977, Krupka et al., 1983]. В основе этого подхода лежит предположение о том, что система может находиться в нескольких дискретных состояниях, каждому из которых соответствует стандартное значение электрохимического потенциала. При этом взаимные переходы между двумя состояниями сопряжены с переходом системы через промежуточные стадии с более высокой свободной энергией, и константы скоростей перехода зависят от высоты соответствующих энергетических барьеров. Минимумы на кривых изменения свободной энергии соответствуют местам связывания транспортируемых веществ.

Если рассматривать транспорт ионов как серию последовательных перескоков через энергетические барьеры в канале, то исходя из основных положений теории абсолютных скоростей реакций Эйринга и сформулированных в последнее время основных физических принципов, определяющих прохождение иона через канал, можно вывести уравнение для ионного тока через одиночный канал [Hill, 1977].

Общие физические принципы формулируются следующим образом [Рубин, 1987, Чизмаджев и др., 1982, Чизмаджев, 1981, Маркин и др., 1981, Лайфут, 1987, Корыта, 1983].

– Поступление иона в канал сопровождается замещением воды гидратной оболочки на полярные группы, выстилающие пору канала.

– Особенности взаимодействия иона с молекулярными группами канала учитываются соответствующими профилями потенциальной энергии иона в канале, который представляется рядом последовательных потенциальных ям и барьеров.

– Ион достаточно долго (по сравнению со временем тепловых колебаний) задерживается в каждой потенциальной яме. Перескок иона возможен только в пустую яму.

– Перескоки между ямами совершаются под действием тепловых флуктуаций. Вероятность перескока зависит от приложенного электрического поля.



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Энергетический профиль иона в канале может быть представлен в виде последовательности  $M$  энергетических барьеров разделенных  $M-1$  потенциальными ямами. Если только один ион находится в любой момент времени в канале, то система балансных уравнений может быть представлена в виде

$$\left\{ \begin{array}{l} k_2^- p_2 + k_1^+ [I]_L p_0 - (k_1^- + k_2^+) p_1 = \frac{dp_1}{dt} \\ k_{i+1}^- p_{i+1} + k_i^+ p_{i-1} - (k_i^- + k_{i+1}^+) p_i = \frac{dp_i}{dt} \\ \dots \\ k_{M-1}^+ p_{M-2} + k_M^- [I]_R p_0 - (k_{M-1}^- + k_M^+) p_{M-1} = \frac{dp_{M-1}}{dt} \end{array} \right. , \quad (3.48)$$

где  $[I]_L$  ( $[I]_R$ ) – концентрация иона слева (справа) от канала,  $k_i^+$  ( $k_i^-$ ) – константа скорости перехода из ямы  $i-1$  в яму  $i$  (из ямы  $i$  в яму  $i-1$ ),  $p_i$  ( $i \neq 0$ ) – вероятность того, что ион находится в  $i$ -й яме,  $p_0$  – вероятность того, что канал не заполнен ионами. Константы скорости перехода определяются по формулам

$$k_i^+ = v \times \exp \left[ - \left( E_i - E_{i-1}^{(w)} \right) / RT - zF\phi l_i^+ / RT \right], \quad (3.49a)$$

$$k_i^- = v \times \exp \left[ - \left( E_i - E_i^{(w)} \right) / RT + zF\phi l_i^- / RT \right], \quad (3.49b)$$

где  $E_i$  ( $E_i^{(w)}$ ) – значение результирующей энергии иона в  $i$ -м барьере ( $i$ -й яме),  $l_i^+$  ( $l_i^-$ ) – так называемое, электрическое расстояние между  $i-1$  ямой и  $i$ -м барьером (между  $i$ -й ямой и  $i$ -м барьером),  $v = 6.1 \cdot 10^{12} \text{ c}^{-1}$  – частотный фактор.

В стационарном случае, т.е. когда  $\frac{dp_i}{dt} = 0 \Big|_{i=1,2,\dots,M-1}$ , решается

система однородных линейных алгебраических уравнений, дополненная условием нормировки  $p_0 + p_1 + \dots + p_{M-1} = 1$ .

Ионный ток через канал  $J_I$  или вольтамперная характеристика канала  $J_I = J_I(\phi)$  определяется по формуле

$$J_I = k_M^+ p_{M-1} - k_1^- p_1. \quad (3.50)$$

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Вид функции  $J_I = J_I(\varphi)$  дает возможность оценить проводимость одиночного канала для определенного вида иона по формуле

$$g_I = \frac{dJ_I}{d\varphi}. \quad (3.51)$$

Теория переходного состояния дает возможность объяснить ионную селективность мембранного канала, т.е. способность канала пропускать некоторые ионы лучше, чем другие; ее можно количественно охарактеризовать как отношение проницаемостей  $\frac{P_B}{P_A}$  для сравниваемых ионов  $A$  и  $B$  [Laio et al., 1999]:

$$\frac{P_B}{P_A} = \frac{\sum_{i=1}^M \exp[E_{Ai}/RT] \left(\frac{P_B}{P_A}\right) \exp\left(\sum_{h=i+1}^M l_h^+ - \sum_{h=1}^{i-1} l_h^-\right)}{\sum_{i=1}^M \exp[E_{Bi}/RT] \left(\frac{P_B}{P_A}\right) \exp\left(\sum_{h=i+1}^M l_h^+ - \sum_{h=1}^{i-1} l_h^-\right)} \sqrt{\frac{M_A}{M_B}}, \quad (3.52)$$

где  $M$  – масса иона.

Результаты расчетов методами ЕНТ/AMBER и силового поля AMBER величин ионных токов для одиночного калиевого канала при  $\varphi=60\text{мВ}$ , оцененные по формуле (3.50), расчетные по формуле (3.52) и экспериментальные значения отношений коэффициентов проницаемости приведены в таблице 3.4.

Из таблицы 3.4 видно, что результаты расчета методом ЕНТ/AMBER отношений коэффициентов проницаемости находятся в хорошем соответствии с экспериментальными данными по селективности калиевых каналов [Gay et al., 1978, Nagler et al., 1974, Hille, 1973, Reuter, 1980, 328, Wang et al., 1994, Nagivara et al., 1974]. Напротив, результаты расчета данных величин методом AMBER не только противоречат экспериментальным данным, но и предсказывают существование селективного ряда несвойственного калиевым каналам:  $P_{Li^+} > P_{Na^+} > P_{K^+}$ .

Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Таблица 3.4

Результаты расчетов ионных токов ( $J_X$ ), отношений коэффициентов проницаемостей ( $P_X/P_K$ ) для потенциал-независимого калиевого канала, а также экспериментальные значения  $P_X/P_K$  для калиевых каналов

X	Расчетные значения				Экспериментальные значения $P_X/P_K$
	ЕНТ/AMBER		AMBER		
	$J_X$ , пА	$P_X/P_K$	$J_X$ , пА	$P_X/P_K$	
Li <sup>+</sup>	0,015	0,009	0,041	41,2	<0.09
Na <sup>+</sup>	0,103	0,065	0,083	83,1	<0.07
K <sup>+</sup>	1,580	1,000	0,001	1	1.00
Rb <sup>+</sup>	1,165	0,737	0,0002	0,2	0.25-0.91
Cs <sup>+</sup>	0,002	0,001	0,00007	0,07	<0.18

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

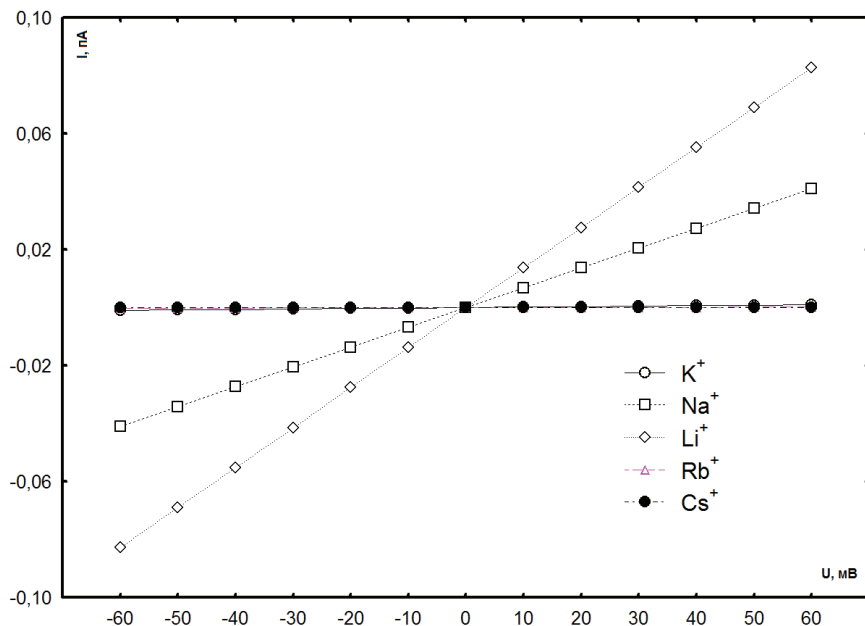


Рис. 3.14. Вольтамперные характеристики канала KcsA (энергетические профили рассчитывали методом AMBER)

Результаты расчета методом ЭНТ/AMBER и AMBER вольтамперных характеристик для потенциал-независимого калиевого канала в условиях симметричных монокатионных растворов ( $[I]_L = [I]_R = 0.4 \text{ M}$ ) представлены на рисунке 3.14 и 3.15, соответственно.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

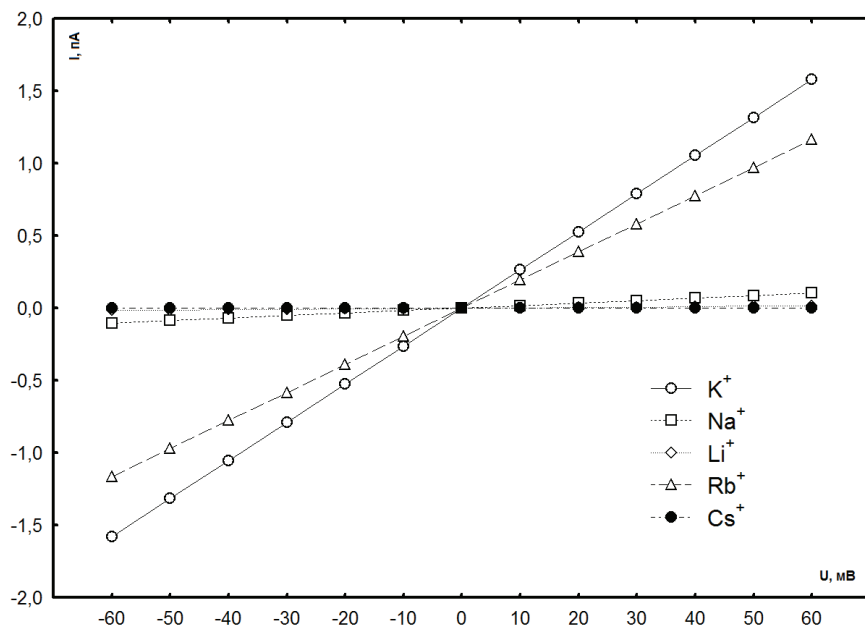


Рис. 3.15. Вольтамперные характеристики канала KcsA (энергетические профили рассчитывали методом ЕНТ/AMBER)

Расчет методом ЕНТ/AMBER показывает существование линейной зависимости между током и напряжением на участке 0-60 мВ, с величиной проводимости одиночного канала для ионов калия 26.34 пСм, для ионов натрия 1.72 пСм, для ионов лития 0.24 пСм, для ионов рубидия 19.42 пСм, для ионов цезия 0.03 пСм, что соответствует экспериментально получаемым значениям [Hille, 1992, Latorre et al., 1983, Schrempf et al., 1995, Heginbotham et al., 1999]. Расчет методом AMBER, также показывает существование линейной зависимости между током и напряжением на участке 0-60 мВ, с величиной проводимости одиночного канала для ионов калия 0.016 пСм, для ионов натрия 1.3 пСм, для ионов лития 0.68 пСм, для ионов рубидия 0.003 пСм, для ионов цезия 0.001 пСм, что полностью противоречит экспериментальным данным. Так значение проводимости для различных типов калиевых каналов для

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

ионов калия меняется от 4 до 270 пСм [Dittrich et al., 1999, Dopico et al., 1999, Hirsch et al., 1999, Lara et al., 1999, Latorre et al., 1989, Noulin et al., 1999, Reid et al., 1999].

#### 3.2.2. Неэмпирический расчет энергетических профилей

Как было показано в предыдущем разделе, метод Хоффмана позволяет с хорошей точностью оценивать энергетические профили катионов в канале KcsA. Возможно, одним из недостатков используемого расчетного алгоритма метода Хоффмана является его необоснованность.

Метод Хоффмана, как и подавляющее большинство полуэмпирических расчетных методов [Сигал, 1980а, Сигал, 1980], основан на валентном приближении, т.е. явном учете только валентных электронов. При этом невалентные электроны совместно с ядром формирует эффективный точечный электростатический заряд в поле которого, движутся валентные электроны атомов молекулы.

В случае исследуемой нами молекулярной системы ион – канал, валентное приближение, на первый взгляд, является не применимым для расчета электронной структуры ионов  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ .

Выход из отмеченного затруднения заложен в используемом нами расчетном алгоритме метода Хоффмана. Ионы рассматриваются как соответствующие атомы в валентном приближении, но при этом атому формально присваивается положительный точечный заряд. В таком случае заряд ядра имеет формальный заряд +2, а не +1.

Не вызывает сомнений, что такой подход негативно отразится на оценке вандэрваальсовых радиусов ионов и атомов, локализованных в области поры канала, и, возможно, на оценке энергетического профиля иона в канале.

Для проверки отсутствия данной ошибки нами проведен расчет энергетических профилей ионов в поре потенциал-независимого калиевого канала KcsA неэмпирическим квантовохимическим методом самосогласованного поля, с последующим сравнением полученных результатов с результатами ЕНТ-расчетов.

Кроме того, сравнение результатов неэмпирических расчетов с полученными ранее результатами расчетов разделением дальних и ближних взаимодействий (ЕНТ/AMBER-расчет) позволит выявить ошибки в ЕНТ/AMBER-расчете энергетических профилей ионов.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Неэмпирические (*ab initio*) методы характеризуются введением базисных функций для молекулярных орбиталей и последующим расчетом всех необходимых интегралов с этими базисными функциями.

Расчеты *ab initio* могут выполняться в приближении Хартри-Фока, подобно расчетам методом самосогласованного поля (ССП), или в приближении Хартри-Фока, учитывающем эффекты корреляции электронов. Расчет *ab initio* исследуемой молекулярной системы мы проводили методом самосогласованного поля.

В методе *ab initio* все интегралы рассчитываются с базисными функциями. При этом в расчете методом СПП матрица Фока (3.25) формируется данными интегралами. В матрице Фока можно выделить две части: одноэлектронную матрицу Гамильтона (H) и двухэлектронную матрицу (G), с матричными элементами.

$$H_{\mu\nu} = \left\langle \mu \left| H^{eff} \right| \nu \right\rangle \quad (3.53)$$

$$G_{\mu\nu} = \sum_{\lambda\sigma} P_{\lambda\sigma} \left[ (\mu\nu|\lambda\sigma) - \frac{1}{2}(\mu\lambda|\nu\sigma) \right] \quad (3.54)$$

Расчет *ab initio* включает расчет следующих интегралов:

1) интегралы перекрывания

$$S_{\mu\nu} = \left\langle \mu \left| \nu \right\rangle; \quad (3.55)$$

2) интегралы кинетической энергии

$$T_{\mu\nu} = \left\langle \mu \left| -\frac{1}{2} \nabla^2 \right| \nu \right\rangle; \quad (3.56)$$

3) интегралы энергии ядерно-электронного притяжения

$$V_{\mu\nu} = \left\langle \mu \left| \frac{Z_A}{r_A} \right| \nu \right\rangle; \quad (3.57)$$

4) интегралы энергии электрон-электронного отталкивания

$$(\mu\nu|\lambda\sigma) = \left\langle \mu\nu \left| \frac{1}{r_{12}} \right| \lambda\sigma \right\rangle. \quad (3.58)$$

Еще одно приближение расчетов *ab initio* – представление многоэлектронной молекулярной волновой функции в виде детерминанта Слэтера (3.21) и представление молекулярных орбиталей в виде линейной комбинации атомно орбитальных базисных функций (приближение МО ЛКАО).

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Уравнение Шредингера для атома водорода имеет точное решение для волновой функции вида  $\exp(-ar)$  (слэтеровские орбитали STO), но с такими функциями аналитически очень сложно рассчитать необходимые многоцентровые двухэлектронные интегралы. В 1950 году С. Бойс предложил использовать гауссовы функции вида  $\exp(-\alpha r^2)$ . С этими функциями, молекулярная орбиталь представляется в виде линейной комбинации орбиталей гауссова типа (GTO). Каждая GTO есть линейная комбинация примитивных гауссовых функций. Введение функций GTO существенно упрощает расчет двухэлектронных интегралов, т.к. многоцентровые интегралы с функциями GTO рассчитываются значительно проще, чем интегралы с функциям STO.

С. Бойс предложил использовать в качестве базисных функций обобщенные гауссовы функции в декартовых координатах  $x_A^l y_A^m z_A^n \exp(-\alpha r_A^2)$ . Выбор различных значений l, m, n дает гауссовы орбитали различного типа.

Нормированные примитивные гауссовы функции для различных электронных состояний имеют следующий вид

$$\phi_{1s}^{GF}(\alpha, r_A) = \left(\frac{2\alpha}{\pi}\right)^{\frac{3}{4}} \exp(-\alpha r_A^2), \quad (3.59)$$

$$\phi_{2p_x}^{GF}(\alpha, r_A) = \left(\frac{128\alpha^5}{\pi^3}\right)^{\frac{1}{4}} x_A \exp(-\alpha r_A^2), \quad (3.60)$$

$$\phi_{2p_y}^{GF}(\alpha, r_A) = \left(\frac{128\alpha^5}{\pi^3}\right)^{\frac{1}{4}} y_A \exp(-\alpha r_A^2), \quad (3.61)$$

$$\phi_{2p_z}^{GF}(\alpha, r_A) = \left(\frac{128\alpha^5}{\pi^3}\right)^{\frac{1}{4}} z_A \exp(-\alpha r_A^2), \quad (3.62)$$

$$\phi_{3d_{xy}}^{GF}(\alpha, r_A) = \left(\frac{2048\alpha^7}{\pi^3}\right)^{\frac{1}{4}} x_A y_A \exp(-\alpha r_A^2) \text{ и т.д.} \quad (3.63)$$



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Выбор системы базисных функций – наиболее важный момент в расчетах *ab initio*. Любые наборы одноэлектронных функций могут быть базисными наборами в приближении МО ЛКАО.

Наиболее простой тип базисных наборов – это наборы STO-nG (атомная орбиталь слэтеровского типа, аппроксимируется  $n$  функциями гауссова типа). Это означает, что каждая атомная орбиталь состоит из суммы  $n$  функций гауссова типа, причем коэффициенты гауссовых функций подобраны таким образом, чтобы их линейные комбинации приближенно описывали поведение орбиталей слэтеровского типа. Из этих базисных наборов наиболее известен минимальный базисный набор STO-3G, хотя первыми были опробованы STO-2G и STO-6G. При проведении тестовых расчетов с использованием базисных наборов STO-nG было показано, что при  $n > 2$  результаты расчетов очень схожи. Минимальные базисные наборы включают только атомные орбитали, которые необходимы для размещения электронов нейтрального атома. Сферическая симметрия атомов и пространственная инвариантность молекул требует включения всех трех  $p$ -орбиталей при появлении хотя бы одного  $p$ -электрона. Минимальный базис элементов второго периода от бора до неона включает пять орбиталей:  $1s$ ,  $2s$ ,  $2p_x$ ,  $2p_y$  и  $2p_z$ . Электроны атомов лития и бериллия могут разместиться на двух орбиталях  $1s$  и  $2s$ . Для согласованного описания всех элементов периодической системы в базисы STO-3G лития и бериллия включают также три  $2s$ -орбитали. Для слэтеровых орбиталей одного типа ( $1s$ ,  $2s$  и т.д.) для любой строки периодической системы аппроксимирующие линейные комбинации  $n$  функций гауссова типа определяются только значением слэтеровой экспоненты, которая играет роль масштабирующего множителя. Исходные комбинации из  $n$  гауссовых функций определены для слэтеровых орбиталей с экспонентой  $\xi$ , равной единице. Чтобы получить наборы STO-nG для значений  $\xi$ , отличных от единицы, необходимо в исходных комбинациях умножить экспоненты гауссовых функций на  $\xi^2$ . Обычно оптимальные значения  $\xi$  слэтеровых экспонент для каждого элемента находят путем минимизации полной энергии атомов в основном состоянии с последующей корректировкой по результатам расчетов малых молекул. Значение  $\xi$  определяет размер орбитали. Этим и объясняется название – масштабирующий множитель. Диффузность и энергия орбитали возрастает с уменьшением  $\xi$ . Высокое значение  $\xi$  указывает на компактность орбитали и ее близость к ядру.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Базис STO-3G включает одну базисную функцию (атомную орбиталь) на атоме водорода (1s), пять функций на атомах второго периода от Li до Ne (1s, 2s, 2p<sub>x</sub>, 2p<sub>y</sub> и 2p<sub>z</sub>) и девять – на атомах третьего периода от Na до Ar (1s, 2s, 2p<sub>x</sub>, 2p<sub>y</sub>, 2p<sub>z</sub>, 3s, 3p<sub>x</sub>, 3p<sub>y</sub> и 3p<sub>z</sub>).

Применительно к нашим расчетам важно отметить, что в рассмотрение в этом методе включены внутренние заполненные оболочки (орбитали остова) и валентные орбитали, тогда как в полуэмпирических методах и используется приближение валентных электронов.

В большинстве случаев метод *ab initio* в базисе STO-3G дает лучшие результаты, чем полуэмпирические методы, тем не менее и ему присущ ряд недостатков. В частности, для него характерна переоценка стабильности малых циклов и  $\pi$ -акцепторной способности электроположительных элементов третьего периода и особенно соединений натрия.

Большинство из недостатков базиса ST-3G, обусловленных его малым размером и простотой, устраняются при использовании более широких валентно-расщепленных (split-valence) базисов, которые в настоящее время практически вытеснили базис STO-3G.

Самый важный недостаток любого минимального базисного набора – отсутствие возможности изменения размеров орбиталей в зависимости от строения молекулы. Этот недостаток минимальных базисов обычно приводит к компромиссным решениям для большинства молекул и ухудшает результаты сравнительных расчетов нейтральных молекул и ионов. Такая же картина наблюдается и при расчетах сильно анизотропных молекул. Например, в молекуле H<sub>2</sub>O орбиталь неподеленной пары должна быть более диффузной, чем орбитали связей ОН [Кларк, 1990].

Увеличение гибкости атомных орбиталей достигается использованием валентно-расщепленных или биэкспоненциальных (double zeta) базисных наборов [Dunning et al., 1981, Wilson et al., 1987]. В этих базисах атомные орбитали составлены из двух частей – внутренней более компактной и внешней более диффузной. При построении молекулярных орбиталей в процедуре ССП коэффициенты каждой из орбиталей этих двух типов можно варьировать независимо. Таким образом, размеры атомных орбиталей, дающих вклад в молекулярную орбиталь, могут изменяться в пределах, заданных размерами компактной и диффузной составляющих. В валентно-расщепленных базисных

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

наборах, как это следует из названия, на компактную и диффузную составляющие разделены только валентные орбитали. В биэкспоненциальных базисах расщеплены как валентные, так и внутренние орбитали остова, т.е. имеют две разные экспоненты.

Среди валентно-расщепленных базисных наборов широкое распространение получил базис 2-31G. Данная аббревиатура означает, что орбитали остова составлены из двух гауссовых функций, а валентные орбитали разделены на две составляющие – компактную, состоящую из трех гауссовых функций, и диффузную, которая представлена одной гауссовой функцией.

Следующим шагом в улучшении базисного набора обычно является добавление d-орбиталей для всех тяжелых атомов. В обычных органических молекулах эти орбитали имеют иное значение, чем валентные d-орбитали в соединениях переходных элементов. В органических молекулах d-орбитали выполняют роль поляризационных функций.

Для сокращения времени расчета мы использовали следующие приближения и модификации метода *ab initio*.

1) Расчет энергетического профиля проводили для одной субъединицы четырех-субъединичного тетрамера канала KcsA с последующей вертикальной трансляцией профиля. Обоснование такого упрощения непосредственно связано с аксиальной симметрией потенциал-независимого калиевого канала KcsA.

2) Присваивали разным атомам исследуемой молекулярной системы ион – канал разные базисные наборы. Так иону и атомам ближних аминокислотных остатков присваивали биэкспоненциальный базис DZVP [Godbout,1992], остальным атомам – валентно-расщепленный базис 3-21G [Dobbs & Nehre, 1987a, 1987b, 1986].

Энергетические профили ионов  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  в канале KcsA рассчитанные методом *ab initio* представлены на рисунках 3.11-3.15. Для ионов  $\text{Li}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$  *ab initio* энергетические профили качественно согласуются с соответствующими ЕНТ/AMBER энергетическими профилями.

Разности высот энергетических барьеров для ионов в канале KcsA, рассчитанных методом *ab initio* ( $E_{abinitio}^i$ ) и методом ЕНТ/AMBER ( $E_{ЕНТ/AMBER}^i$ ) представлены в таблице 3.5.

Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Таблица 3.5

Величина  $E_{ENT/AMBER}^i - E_{ab\ initio}^i$  (ккал/моль)

	Энергетический барьер									
	1 <sub>+</sub>	1 <sub>-</sub>	2 <sub>+</sub>	2 <sub>-</sub>	3 <sub>+</sub>	3 <sub>-</sub>	4 <sub>+</sub>	4 <sub>-</sub>	5 <sub>+</sub>	5 <sub>-</sub>
Li <sup>+</sup>	1,8	0,6	0,8	3,6	4,7	2	1	3,2	3,2	3,4
Na <sup>+</sup>	1,3	0,7	0,5	2,5	0,8	1,6	1,5	1	1	0,7
K <sup>+</sup>	0,5	2	0,6	0,7	1,7	0,8	3	0,8	0,8	0,6
Rb <sup>+</sup>	0,6	1,4	0,6	1,8	1,2	0,7	1,8	0,8	0,8	1,2
Cs <sup>+</sup>	2,1	3,8							2,2	2,3

Анализ представленных в таблице 3.5 данных позволяет сделать следующие выводы:

1. Энергетические барьеры, рассчитанные *ab initio*, меньше соответствующих энергетических барьеров, рассчитанных методом ЭНТ/AMBER.

2. Наибольшее количественное отличие в величинах энергетических барьеров характерно для ионов Li<sup>+</sup> и Cs<sup>+</sup>, наименьшее – для ионов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>.

3. Расчет методом *ab initio* для Cs<sup>+</sup> дает более рельефный энергетический профиль в области селективного фильтра канала.

Результаты расчетов методом *ab initio* величин ионных токов для одиночного калиевого канала при φ=60мВ, оцененные по формуле (3.50), рассчитанные по формуле (3.52) и экспериментальные значения отношений коэффициентов проницаемости приведены в таблице 3.6.

Из таблицы 3.6 видно, что результаты расчета методом ЭНТ/AMBER и методом *ab initio* ионных токов и отношений коэффициентов проницаемости находятся в хорошем соответствии друг с другом и с экспериментальными данными по селективности калиевых каналов [Gay et al., 1978, Hagler et al., 1974, Hille, 1973, Reuter, 1980, 328, Wang et al., 1994, Nagivara et al., 1974].

Таблица 3.6

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Результаты расчетов ионных токов ( $J_X$ ), отношений коэффициентов проницаемостей ( $P_X/P_K$ ) для канала KcsA, а также экспериментальные значения  $P_X/P_K$  для калиевых каналов

X	Расчетные значения				Экспериментальные значения $P_X/P_K$
	ЕНТ/AMBER		<i>ab initio</i>		
	$J_X$ , пА	$P_X/P_K$	$J_X$ , пА	$P_X/P_K$	
Li <sup>+</sup>	0,015	0,009	0,024	0,081	<0.09
Na <sup>+</sup>	0,103	0,065	0,243	0,067	<0.07
K <sup>+</sup>	1,580	1,000	1,756	1	1.00
Rb <sup>+</sup>	1,165	0,737	1,567	0,546	0.25-0.91
Cs <sup>+</sup>	0,002	0,001	0,019	0,009	<0.18

Таким образом, результаты расчетов функциональных характеристик канала KcsA по результатам анализа ЕНТ/AMBER-энергетических профилей ионов согласуются с результатами расчетов *ab initio*.

Энергетические профили ионов Li<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup> рассчитанные методом ЕНТ/AMBER отличаются, как количественно, так и качественно, от рассчитанных методом AMBER профилей. Профили потенциальной энергии взаимодействия в системе ион-канал в области селективного фильтра канала, рассчитанные методом силового поля, содержат энергетические барьеры, величины которых находятся в последовательности Li<sup>+</sup><Na<sup>+</sup><K<sup>+</sup><Rb<sup>+</sup><Cs<sup>+</sup>. Напротив, метод ЕНТ/AMBER в области селективного фильтра предсказывает существование потенциальных ям, глубины которых находятся в последовательности Li<sup>+</sup><Na<sup>+</sup><K<sup>+</sup><Rb<sup>+</sup><Cs<sup>+</sup>. При сложении данного профиля с профилем энергии взаимодействия в системе ион-вода, для ЕНТ/AMBER-профиля наблюдается относительное выравнивание, а для AMBER-профиля увеличение энергетических барьеров. Кроме того, AMBER-профили ионов в области нижней поры, в отличие от ЕНТ/AMBER-профили, характеризуются значительными энергетическими барьерами для всех ионов. В результате, AMBER-энергетический профиль ионов в канале не объясняет калиевую проницаемость канала.

Результаты расчета методом ЕНТ/AMBER отношений коэффициентов проницаемостей находятся в хорошем соответствии с

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

экспериментальными данными по селективности калиевых каналов. Напротив, результаты расчета данных величин методом AMBER не только противоречат экспериментальным данным, но и предсказывают существование селективного ряда несвойственного калиевым каналам.

Результаты расчета методом ЕНТ/AMBER и AMBER вольтамперных характеристик для потенциал-независимого калиевого канала в условиях симметричных монокатионных растворов показывают существование линейной зависимости между током и напряжением на участке 0-60 мВ, с величиной проводимости одиночного канала:

1) по результатам ЕНТ/AMBER-расчета, для ионов калия 26.34 пСм, для ионов натрия 1.72 пСм, для ионов лития 0.24 пСм, для ионов рубидия 19.42 пСм, для ионов цезия 0.03 пСм, что соответствует экспериментально получаемым значениям;

2) по результатам расчета методом AMBER, для ионов калия 0.016 пСм, для ионов натрия 1.3 пСм, для ионов лития 0.68 пСм, для ионов рубидия 0.003 пСм, для ионов цезия 0.001 пСм, что полностью противоречит экспериментальным данным.

Результаты расчетов функциональных характеристик канала KcsA по результатам анализа ЕНТ/AMBER-энергетических профилей ионов согласуются с результатами расчетов *ab initio*.

Таким образом, расчет энергетических профилей методом ЕНТ/AMBER и последующий их анализ методами теории переходного состояния Эйринга позволяет получать достоверные значения функциональных характеристик аксиально-симметричных мембранных каналов.

#### 3.2.3. Результаты расчетов

Результаты расчетов величин ионных токов для одиночных каналов старого организма при  $\varphi=60\text{мВ}$ , расчетные значения отношений коэффициентов проницаемости и их значения для природных каналов представлены в таблице 3.7.

Для всех исследованных isoAsp-каналов наблюдается незначительное (порядка 0.1 пА) увеличение ионных токов, но отношения коэффициентов проницаемостей для различных ионов практически не меняются при замене всех Asp канала на isoAsp. Таким образом, в результате старения организма, происходит увеличение ионных токов потенциал-зависимых калиевых каналов мембраны, при сохранении свойства их калиевой избирательности.

Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Таблица 3.7

Результаты расчетов ионных токов ( $J_X$ ), отношений коэффициентов проницаемостей ( $P_X/P_K$ ) для псевдооткрытого D-Kv1.2-канала и природного открытого Kv1.2-канала

X	Расчетные значения для L-KcsA		Расчетные значения для isoAsp-KcsA	
	$J_X$ , пА	$P_X/P_K$	$J_X$ , пА	$P_X/P_K$
Li <sup>+</sup>	0.015	0.009	0.010	0.007
Na <sup>+</sup>	0.103	0.065	0.145	0.073
K <sup>+</sup>	1.580	1.000	1.989	1.000
Rb <sup>+</sup>	1.165	0.737	1.885	0.847
Cs <sup>+</sup>	0.002	0.001	0.012	0.006
X	Расчетные значения для L-KvAP		Расчетные значения для isoAsp-KvAP	
Li <sup>+</sup>	0.008	0.010	0.010	0.007
Na <sup>+</sup>	0.019	0.024	0.025	0.020
K <sup>+</sup>	0.776	1.000	1.234	1.000
Rb <sup>+</sup>	0.576	0.701	1.019	0.825
Cs <sup>+</sup>	0.005	0.006	0.009	0.007
X	Расчетные значения для L- $\alpha/\beta$		Расчетные значения для isoAsp- $\alpha/\beta$	
Li <sup>+</sup>	0.016	0.079	0.018	0.012
Na <sup>+</sup>	0.041	0.015	0.056	0.038
K <sup>+</sup>	1.030	1.000	1.456	1.000
Rb <sup>+</sup>	0.998	0.905	1.131	0.776
Cs <sup>+</sup>	0.005	0.005	0.008	0.005
X	Расчетные значения для L-Kv1.2		Расчетные значения для isoAsp-Kv1.2	
Li <sup>+</sup>	0.010	0.018	0.029	0.015
Na <sup>+</sup>	0.028	0.049	0.095	0.050
K <sup>+</sup>	0.564	1.000	1.896	1.000
Rb <sup>+</sup>	0.403	0.715	1.453	0.767
Cs <sup>+</sup>	0.003	0.005	0.022	0.012

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Вольтамперные характеристики isoAsp-каналов в условиях симметричных монокатионных растворов ( $[I]_L = [I]_R = 0.04 \text{ M}$ ) качественно аналогичны соответствующим зависимостям D-изомеров. Наблюдается существование линейной зависимости между током и напряжением на участке 0-60 мВ, с величинами проводимостей незначительно отличающимися от проводимостей ионных каналов молодого организма и экспериментальных данных [Shen et al., 1993, Latorre et al., 1983, Schrempf et al., 1995]. Для isoAsp-KcsA-канала проводимости для ионов лития, натрия, калия, рубидия и цезия составляют 0.16 пСм, 2.42 пСм, 33.15 пСм, 31.41 пСм и 0.20 пСм, соответственно; для D-Asn-KvAP-канала – 0.16 пСм, 0.41 пСм, 20.56 пСм, 16.98 пСм и 0.15 пСм; для D-Asn- $\alpha/\beta$ -канала – 0.30 пСм, 0.93 пСм, 24.26 пСм, 18.85 пСм и 0.13 пСм; для D-Asn-Kv1.2-канала – 0.48 пСм, 1.58 пСм, 31.60 пСм, 24.21 пСм и 0.38 пСм.

Таким образом, изменение структуры ионных каналов в следствие неферментативной модификации Asn-остатков приводит к нарушению их структуры и функциональных характеристик. Это обстоятельство может иметь негативное биологическое значение связанное с каналопатологиями [Ashcroft, 2000] – заболеваниями, обусловленными нарушением структуры и механизмов функционирования ионных каналов.

Выделяется также наследственная патология ионных каналов – группа заболеваний, обусловленных мутациями генов, кодирующих ионные каналы. Нарушение ионных каналов наблюдается в различных тканях, но чаще поражается скелетная мускулатура или центральная нервная система. Эти нарушения включают патологию натриевых каналов скелетных мышц, вызывающий гиперкалемический периодический паралич, врожденную парамиотонию и миотонию, усиливающуюся приемом калия, злокачественную гипертермию и болезнь центрального стержня. Патология хлорных каналов скелетных мышц может вызывать миотонию Томсена и Беккера. Патология натриевых нейрональных каналов вызывает генерализованные фибриллярные судороги. Патология нейрональных калиевых каналов может вызывать семейные неонатальные судороги и периодическую атаксию (тип 1). Патология нейрональных кальциевых каналов может вызывать эпизодическую атаксию (тип 2), семейную гемиплегическую мигрень и спинозжечковую атаксию (тип 6).



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Гиперкалемический периодический паралич [Cannon, 1996, Hanna, 1998, Jurkat, 1999] обусловлен мутациями в гене, кодирующем альфа-субъединицу натриевых каналов скелетных мышц. Семейный гипокалемический периодический паралич, болезнь центрального стержня и злокачественная гипертермия [Hanna, 1998, Jurkat, 1999, Ptacek, 1997, Quane, 1993] вызываются мутациями в альфа 1S-субъединице в канале кальциевого входа скелетных мышц.

Большинство случаев гипокалемического периодического паралича и часть случаев со злокачественной гипертермией вызывается мутацией в гене, кодирующем напряжение в вольтах входа кальциевого канала скелетных мышц (CACNA1A).

Врожденная миотония Томсена и Беккера [Hanna, 1998, Jurkat, 1999, Koch, 1992] вызывается мутациями в гене, кодирующем «хлорный канал» скелетной мышцы (CLCN1).

Проведение хлора играет главную роль в детерминации расслабляющего потенциала в сарколемме. Доминантная и рецессивная мутации в CLCN1 ответственны за врожденную миотонию, вызывающуюся проведением хлора и низким порогом деполяризации, ведущим к миотонии.

Эпизодическая атаксия тип 2, семейная гемиплегическая мигрень и спинально-мозжечковая атаксия (тип 6) [Hanna, 1998, Jurkat, 1999, Terwindt, 1998] вызываются мутациями в гене, кодирующем альфа1A-субъединицу кальциевого канала P/Q типа в головном мозге.

Эпизодическая атаксия (тип 1) [Browne, 1995, Hanna, 1998, Jurkat, 1999, Tricacico, 1999] вызывается мутацией гена, кодирующего альфа1-субъединицу нейронального калиевого канала. Замедление калиевых каналов экспрессируется широко, но особенно в корзинчатых клетках мозжечка и в периферических нервах. При эпизодической атаксии (тип 1) выявлена редукция реполяризации при замедлении очищения калиевых каналов. Это вызывает расширение активного потенциала и увеличение освобождения нейротрансмиттеров. В мозжечке нарушается баланс энергией возбуждения и торможения. Происходит дестабилизация двигательного контроля в мышечной ответе при быстром движении и стрессе. В периферических двигательных нервах медленная реполяризация и недостаточная гиперполяризация могут вызывать повторные эпизоды гипертермии.

Семейные доброкачественные неонатальные судороги тип 1 и 2 [Biervert, 1998, Charlier, 1998, Jurkat, 1999, Singh, 1998] вызываются

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

мутациями в гене, кодирующем медленную активность мозга и деактивацию калиевых каналов (KCNQ2 и KCNQ3).

Генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами [Jurkat, 1999, Wallace, 1998]. Это заболевание обусловлено мутацией в гене, кодирующем бета1-субъединицу напряжения в вольтах входа нейронального натриевого канала.

Таким образом, наследственные нарушения ионных каналов, которые поражают нервную систему и сердце лежат в основе заболеваний, ряд из которых имеет четкие клинические признаки.

#### **3.3. Третичная структура модифицированного NR1-центра связывания NMDA-рецептора**

Неферментативная рацемизация играет существенную роль в патогенезе болезней характерных для людей пожилого возраста. Так в [Fujii et al., 2005] отмечено появление D-Asp в белках больных болезнью Альцгеймера, Паркинсона, а также при склеротических изменениях в сердечно-сосудистой системе, при глазной катаракте и т.д. Вместе с тем существуют данные о вовлечении NMDA-рецепторов в патофизиологические процессы при указанных хронических заболеваниях мозга [Giuffra, 1993, Ulas, 1994], поэтому представляет интерес моделирование лигандов хирально модифицированного глицинового центра связывания NMDA-рецептора.

Таким образом, цель данного раздела – исследовать структурно-функциональные особенности нативного и хирально модифицированного NMDA-рецептора.

Для достижения указанной цели нам решались следующие задачи:

- 1) определение устойчивых конфигураций комплексов D-аминокислотных лигандов с нативным и хирально модифицированным глициновым центром связывания NMDA-рецептора;

- 2) определение наиболее эффективных лигандов нативного и хирально модифицированного глицинового центра связывания NMDA-рецептора.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

#### 3.3.1. Молекулярно-динамическая оптимизация структуры белков

Сформулированные задачи решали методами молекулярной динамики [McCammon, 1987]. Метод молекулярной динамики позволяет моделировать детальную микроскопическую картину внутренней подвижности макромолекулы. В его основе лежит расчет классических (ньютоновских) траекторий движения макромолекулы в фазовом пространстве координат и импульсов ее атомов, когда молекула рассматривается как система взаимодействующих классических частиц. Метод молекулярной динамики успешно используется в теоретических исследованиях структуры и динамики биологических макромолекул, жидкостей, газов и других молекулярных систем.

Ниже мы рассмотрим физико-математический аппарат, лежащий в основе *группы методов*, объединённых этим названием.

В методе молекулярной динамики рассчитываются классические (ньютоновские) траектории движения атомов макромолекулы в силовом поле эмпирического атом-атомного потенциала, т. е. моделируется детальная микроскопическая картина внутренней тепловой подвижности макромолекулы в субнаносекундных интервалах времен. Основу метода составляет численное решение классических уравнений Ньютона для системы взаимодействующих частиц:

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i(\vec{r}),$$

где  $\vec{F}_i(\vec{r}) = -\frac{\partial U(\vec{r})}{\partial \vec{r}_i}$  - суммарная сила, действующая на  $i$ -ый атом со стороны остальных частиц,  $U(\vec{r})$  - потенциальная энергия, зависящая от взаимного расположения всех атомов.

Задав координаты и скорости всех частиц в начальный момент времени, численно решают уравнения движения, вычисляя на каждом шаге все силы и новые координаты и скорости частиц. Температура определяется как средняя кинетическая энергия, приходящаяся на одну степень свободы системы:

$$T(t) = \frac{1}{3Nk_B} \sum m_i \vec{v}_i^2$$

Здесь  $\vec{v}$  - скорость,  $N$  - полное число степеней молекулы,  $k_B$  - постоянная Больцмана. В случае изолированной системы  $N=3n-6$ ,

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

поскольку сохраняется ее полный импульс и момент импульса. Кроме того, в этом случае сохраняется полная энергия системы, а температура получается усреднением ее мгновенных значений  $T(t)$  по некоторому интервалу времени.

Потенциальная энергия молекулы задается в виде:

$$U(\vec{r}) = U_b + U_v + U_\phi + U_\omega + U_{LJ} + U_{el} + U_{hb}$$

где слагаемые отвечают следующим типам взаимодействий:  $U_b$  - химическим связям;  $U_v$  - валентным углам;  $U_\phi$  - торсионным углам;  $U_\omega$  - плоским группам;  $U_{LJ}$  - ван-дер-ваальсовым контактам;  $U_{el}$  - электростатике;  $U_{hb}$  - водородным связям.

Указанные слагаемые имеют различный функциональный вид. Валентные длины поддерживаются за счет потенциала:

$$U_b = \frac{1}{2} \sum K_b (r - b_0)^2$$

где суммирование проводится по всем химическим связям,  $b_0$  - обозначение для равновесных валентных длин,  $r$  - текущие длины связей,  $K_b$  - соответствующие силовые константы.

Уравнение, описывающее потенциал валентных связей следует из закона Гука. Это уравнение параболы:

$$U_v = \frac{1}{2} \sum K_v (\vartheta - \vartheta_0)^2$$

где  $\vartheta_0$  - равновесные значения углов,  $\vartheta$  - их текущие значения,  $K_v$  - силовые константы.

Энергия торсионных взаимодействий и потенциалов, отвечающих плоским группам, записываются в одинаковом виде:

$$U_\phi = \sum K_\phi [\cos(n\Phi - \delta) + 1]$$

где  $n$  - кратность торсионного барьера,  $\delta$  - сдвиг фазы, константы  $K_\phi$  определяют высоты потенциальных барьеров двугранных углов  $\Phi$ .

Ван-дер-ваальсовы взаимодействия атомов, разделенных тремя и более валентными связями описываются с помощью потенциалов Леннарда-Джонса:

$$U_{LJ} = \sum \left[ \frac{A}{r_{ij}^{12}} - \frac{B}{r_{ij}^6} \right]$$

Параметры потенциала  $A$  и  $B$  зависят от типов атомов  $i$  и  $j$ , участвующих во взаимодействии;  $r_{ij}$  - расстояние между этими атомами.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Электростатические взаимодействия задаются кулоновским потенциалом:

$$U_{el} = \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon r_{ij}}$$

где  $q_i, q_j$  - парциальные заряды на атомах,  $\epsilon$  - диэлектрическая проницаемость среды.

Водородные связи возникают и исчезают в процессе движения атомов между теми из них, которые имеют донорно-акцепторный статус. Функциональный вид потенциала водородной связи аналогичен потенциалу ван-дер-ваальсовым взаимодействиям:

$$U_{hb} = \sum \left[ \frac{A'}{r_{ij}^{12}} - \frac{B'}{r_{ij}^{10}} \right]$$

Существуют различные наборы параметров для потенциалов взаимодействий. Их значения определяются из учета различных типов экспериментальных данных (спектральные, калориметрические, кристаллографические) и квантовомеханических расчетов.

Время, необходимое для расчета траектории молекулы, можно значительно сократить, уменьшая число степеней свободы. Существует два способа ограничения движений длин валентных связей и углов. В одном случае длины валентных связей и значения валентных углов жестко фиксированы, в другом случае на них накладываются упругие ограничения с очень большой константой упругости. Статистические свойства жестко и упруго ограниченных систем, вообще говоря, различны. При разных формах упругого потенциала получаются статистически разные результаты, один из таких потенциалов соответствует жестко фиксированным валентным связям и углам. При этом, в общем случае, упругие потенциалы статистически предпочтительнее как для валентных связей, так и для валентных углов.

Последние исследования в этой области показали, что колебания валентных углов, по-видимому, связаны с коллективными движениями в молекуле и, из-за плотной упаковки атомов внутри белка небольшие флуктуации валентных углов ( $\pm 4^\circ$ ) играют существенную роль в движениях, включающих другие степени свободы. При фиксации валентных углов амплитуда флуктуаций торсионных углов уменьшается в 2 раза, а конформационные переходы по торсионным углам из одного минимума энергии в другой исчезают совсем.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

В некоторых случаях степени свободы, соответствующие изменениям значений валентных углов, учитываются неявно. Этот учет валентных углов незначительно увеличивает время счета, но значительно увеличивает конформационную подвижность, благодаря чему полученные результаты в большей степени соответствуют экспериментальным данным.

Иногда используют алгоритмы, в которых переменные, соответствующие медленным степеням свободы, постоянны на протяжении некоторого числа шагов. Однако, при таких расчетах происходит довольно быстрое накопление ошибки. Этого недостатка лишены методы MTS (multiple-time-step methods) [Braun, 1987]. В этих методах для вычисления сил, соответствующих быстрым и медленным степеням свободы, используются разные временные интервалы. Время счета при этом сокращается в 4 - 5 раз.

Как правило, в методе молекулярной динамики для ускорения расчетов ван-дер-ваальсовы, водородные и электростатические взаимодействия рассчитываются только между атомами, находящимися на расстоянии меньше, чем радиус обрезания (10-15Å). Недавно был предложен метод PPPC (particle-particle and particle-cell) расчета кулоновских взаимодействий [Saito, 1994]. В методе PPPC каждый атом взаимодействует с ближними атомами путем обычных кулоновских взаимодействий, а с далеко отстоящими ячеекками через общий заряд и дипольный момент этой ячейки. Размеры ячеек возрастают как функции расстояния от атома.

Проблема учёта влияния окружающей среды на конформационную подвижность изучаемых молекул в рамках метода молекулярной динамики решается двумя способами: явным введением в уравнения движения дополнительного потенциала и явным учётом окружения с добавлением в систему молекул окружающей среды. Добавление в систему дополнительных молекул среды существенно увеличивает объём расчётов (пропорционально квадрату числа атомов) и поэтому мало применимо к расчёту молекулярной динамики биологических макромолекул. Однако существует модификация этого подхода, связанная с вводом периодических граничных условий, что позволяет уменьшить объём системы. Дополнительный потенциал в уравнениях движения не может быть универсальным для разных систем и его тип сильно привязан к конкретной задаче.

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Периодические граничные условия позволяют рассматривать сравнительно небольшой "кубик" пространства, в котором расположена изучаемая молекула. Молекулы, расположенные внутри кубика со временем претерпевают конформационные движения и перемещаются в пространстве, причём могут пересечь границы кубика. Суть метода заключается в том, что пространство разбивается на одинаковые кубики, причём предполагается, что содержимое кубиков одинаково и границы кубиков соприкасаются. При пересечении молекулой границы одного кубика, она попадает в другой, но это значит, что в первый кубик с противоположной стороны попадает такая же молекула. При этом моделируется динамика лишь одного такого кубика. Естественно, что размер кубика должен быть достаточно большим для исключения возможности краевых эффектов.

Часто взаимодействие с тепловым резервуаром моделируется дополнительной силой трения:

$$\vec{Q}_\alpha = m_\alpha \lambda(t) \vec{v}_\alpha$$

Коэффициент  $\lambda$  выбирается таким образом, чтобы сила  $\vec{Q}_\alpha$  обеспечила изменение энергии системы по закону:

$$\frac{dE}{dt} = \frac{1}{\tau_E} K - E_K(t)$$

Здесь  $E$  – энергия изолированной системы (при отсутствии взаимодействия с резервуаром сохраняется),  $\tau_E$  – характерное время взаимодействия с резервуаром,  $E_K = \sum m_\alpha \vec{v}_\alpha^2$  – кинетическая энергия системы,  $K = \frac{3}{2} N k_B T_0$  – константа, равная средней кинетической энергии, соответствующей температуре резервуара  $T_0$ .

Уравнения движения метода имеют вид:

$$\begin{aligned} \frac{d\vec{p}_\alpha}{dt} &= -\frac{\partial U}{\partial \vec{x}_\alpha} + m_\alpha \lambda(t) \vec{v}_\alpha \\ m_\alpha \frac{d\vec{x}_\alpha}{dt} &= \vec{p}_\alpha \\ \lambda &= \frac{1}{2\tau_E} \left( \frac{K}{E_K(t)} - 1 \right) \end{aligned}$$

Расчёт траекторий движения в молекулярной динамике по этим уравнениям носит название *WCED* (*weak coupling to an external bath*) [Veendsen, 1984]. Однако, среди специалистов такой метод задания теплового резервуара более известен как метод *термостата*

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

*Берендсена.* Этот метод широко применяется для моделирования молекулярной динамики молекул с большим числом степеней свободы, в частности полипептидов и белков.

В методе *Андерсона* (МА) [Anderesen, 1988] взаимодействие системы с тепловым резервуаром моделируется следующим образом. В определённые моменты времени  $t_k$  движения изолированной системы происходит замена её скоростей  $V$  на новые скорости  $U$ . Скорости  $U$  суть случайные величины, распределённые в соответствии с импульсной частью  $P_M(X, V)$  равновесного распределения Гиббса. Если на систему не наложено геометрических связей, то  $P_M(X, V)$  не зависит от  $X$  и совпадает с распределением Максвелла.

Если система состоит из одной частицы массы  $m$ , то предлагаемая замена скоростей эквивалентна соударению с виртуальным атомом резервуара, который имеет ту же массу  $m$  и скорость  $U$ , выбранную случайно из распределения Максвелла. Но если частица обладает внутренними степенями свободы, то предлагаемая замена не эквивалентна одному соударению.

*Метод минимизации потенциальной энергии* заключается в поиске низкоэнергетических конформаций молекулярной системы с помощью численных методов поиска экстремумов функций многих переменных. При этом предполагается, что нативная конформация находится в области глобального минимума потенциальной энергии. На практике, из-за сложного профиля потенциальной функции поиск глобального минимума превращается в очень сложную вычислительную проблему. Одной из причин этого является то, что в настоящее время не существует метода, который бы гарантировано сходил к глобальному минимуму.

Теория численных методов локальной минимизации функции многих переменных хорошо разработана. Для поиска локальных минимумов потенциальной энергии обычно применяются методы, использующие градиент потенциальной энергии, хотя существуют и другие подходы, например, модифицированный сеточный перебор.

Для поиска глобального минимума используют два основных подхода: использование методов глобальной минимизации и изменение вида целевой функции. В первом подходе используются методы, в принципе позволяющие найти глобальный минимум функции многих переменных за бесконечное время моделирования.



### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

Это означает, что такие методы обладают возможностью выходить из локальных минимумов и преодолевать энергетические барьеры.

Для второго подхода характерно изменение самих потенциалов взаимодействия, введение дополнительных членов в целевую функцию или переход на новую модель молекулярной системы. Последний способ применяется очень интенсивно в последнее время и считается весьма перспективным. Идея его заключается в фиксации длин связей и валентных углов и описании конформационных превращений молекулы только за счет изменения торсионных углов. Такой подход позволяет существенно уменьшить размерность задачи и сократить требуемые вычислительные затраты. Хотя в некоторых случаях было показано, что минимизация в декартовых и внутренних координатах приводит к разным конформациям, однозначного ответа на вопрос об адекватности результатов, полученных при моделировании на различных молекулярных моделях, не было получено.

Метод минимизации потенциальной энергии применяется для решения как практических задач (например, уточнение структур по данным рентгеноструктурного анализа и двумерной ЯМР спектроскопии), так и теоретических проблем (например, для исследования сворачивания белков и предсказания структур фермент-субстратных комплексов).

#### 3.3.2. Результаты расчетов

NMDA-рецептор представляет собой лиганд-активируемый ионный канал, включающий семь различных центров связывания. Наиболее изученным является глициновый центр связывания NR1, который соответствует возбуждающей аминокислоте Gly. Существуют экспериментальные данные по атомной структуре центра и структуре D-аминокислот, выступающих в качестве лигандов [Furukawa et al., 2003].

Методом молекулярной динамики, используя силовое поле Amber96 [Kollman et al., 1997], нами проведено исследование связывания D-аминокислотных лигандов с нативным и хирально модифицированным центром связывания NR1 рецептора. При проведении численного моделирования молекулярной динамики центра связывания мы использовали компьютерную программу HyperChem7. Координаты атомов центра связывания NR1 нативного рецептора брали из Банка

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

белковых структур (Protein Data Bank, Brookhaven National Laboratory, USA). Код структуры центра связывания NR1 рецептора в комплексе с глицином – 1PB7. Для моделирования связывания центра NR1 с другими аминокислотными лигандами, перед проведением молекулярно-динамического моделирования, проводили замену Gly на другие D-аминокислоты. При этом единственным требованием такой замены являлось совпадения центра масс тестируемых аминокислотных лигандов. Выбор D-энантиомеров аминокислот обусловлен результатами кристаллографических исследований молекулярных основ стереоспецифичности связывания лигандов [Furukawa et al., 2003], согласно которым, прежде всего, D-аминокислоты являются наиболее эффективными лигандами центра связывания NR1.

Стерические напряжения в комплексе лиганд – центр связывания, обусловленные заменой структурно нестабильных L-аминокислот соответствующими D-аминокислотами центра связывания и заменой Gly другими D-аминокислотными лигандами, снимали методом молекулярной динамики. Применялись следующие параметры моделирования: интервал – 10 пс, шаг – 0.001 пс. При численном интегрировании динамических уравнений производные по времени заменялись конечными центральными разностями с использованием двухшагового алгоритма интегрирования, постоянной температуры интегрирования  $T = 310$  К и времени температурной релаксации 0.1 пс. Для согласования с распределением скоростей Максвелла-Больцмана начальные значения импульсов атомов задавались нормально распределенными случайными числами. Потенциальная энергия включала следующие аддитивные составляющие [Kollman et al., 1997]: энергия деформации валентных связей и валентных углов, энергия внутреннего вращения, энергия вандерваальсовых взаимодействий, энергия электростатических взаимодействий и энергия водородных связей. При этом устойчивое состояние (равновесная конфигурация) комплекса лиганд – центр связывания соответствует наиболее глубокому из локальных минимумов функции потенциальной энергии.

До проведения молекулярно-динамического моделирования, мы проводили хиральную модификацию центра связывания заменой всех его L-Asn и L-Asp, как структурно нестабильных аминокислот, на остатки D-Asp.

На диаграмме представлены равновесные энергии связывания D-аминокислотных лигандов с нативным и хирально модифицированным

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

центром связывания. Для не представленных на диаграмме аминокислот характерно значительное стерическое напряжение в активном центре.

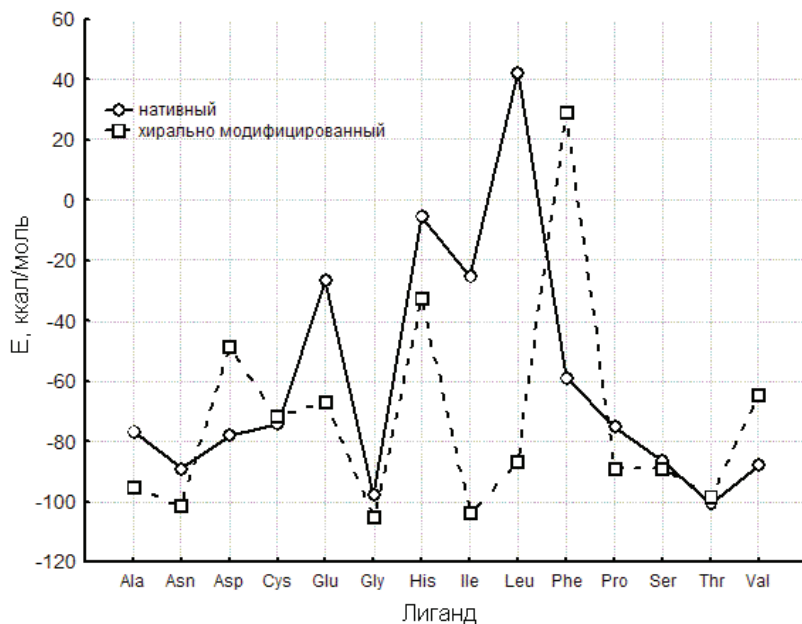


Рис. 3.16. Равновесные энергии связывания D-аминокислотных лигандов с не модифицированным и модифицированным NR1-центром связывания

Значения равновесной энергии связывания Gly, D-Ser, D-Asn, D-Thr и центра связывания нативного рецептора принадлежат интервалу 80–100 ккал/моль, следовательно, данные лиганды наиболее прочно связываются с центром связывания. Данный результат согласуется с результатами кристаллографических исследований молекулярных основ стереоспецифичности связывания Gly и D-Ser [Furukawa et al., 2003] и дает возможность использовать молекулярно-динамическое моделирование силовым полем Amber96 в исследовании хирально

### Глава 3. Математические модели структурно-функциональных зависимостей ионных каналов с остатками isoAsp

модифицированного центра связывания. Другие аминокислоты менее прочно связываются с NR1, а для D-Leu характерно отталкивание.

Неферментативная рацемизация аминокислот остатков центра связывания NR1 приводит к увеличению количества D-аминокислотных лигандов, равновесная энергия связывания которых, принадлежит интервалу 80–100 ккал/моль. Это Gly, D-Ala, D-Asn, D-Ile, D-Leu, D-Pro, D-Ser, D-Thr. Отличительной особенностью данной совокупности аминокислот, является появление алифатических неполярных аминокислот D-Ala, D-Leu, D-Ile и D-Pro в качестве лигандов.

К настоящему времени экспериментально установлено, что патогенез болезней характерных для людей пожилого возраста связан с неферментативной модификацией аминокислотных остатков белков, вовлеченных в патофизиологические процессы при данных заболеваниях [Masters et al., 1977, Man, 1983, Shapiro, 1991, Orpiszewski, 2000]. Вследствие этого данные аминокислоты можно рассматривать в качестве эффективных лигандов центра связывания NR1 рецептора в патологии, обусловленной выше указанными заболеваниями.

Полученные в этом разделе результаты позволяют сделать следующие выводы:

1) из всех возможных комбинаций аминокислот, наиболее стабильными являются молекулярные комплексы NR1 центра связывания нативного рецептора с лигандами Gly, D-Ser, D-Asn и D-Thr;

2) из всех возможных комбинаций аминокислот, наиболее стабильными являются молекулярные комплексы хирально модифицированного NR1 центра связывания рецептора с лигандами Gly, D-Ala, D-Asn, D-Ile, D-Leu, D-Pro, D-Ser и D-Thr;

3) для NMDA-рецептора в патологии обусловленной НРА характерно наличие дополнительных алифатических аминокислотных лигандов D-Ala, D-Leu, D-Ile и D-Pro.

## Заключение

Аккумуляция isoAsp в белках организма является существенным процессом не только для очень медленно обновляющихся белков, таких как структурные белки, но и для медленно обновляющихся белков, время жизни которых превышает время реакции образования isoAsp из Asn. В таких белках наблюдается отличное от нуля содержание isoAsp не меняющееся на протяжении жизни организма. Такое, даже не значительное содержание остатков isoAsp в активных центрах белков-ферментов может существенно повлиять на механизмы их функционирования.

Увеличение времени обновления белков с возрастом организма приводит к увеличению содержания остатков isoAsp в данных белках с возрастом, стремясь к предельному значению, равному содержанию Asn в этих белках.

В ходе старения организма мембранные ионные каналы, в следствии неферментативной модификации их Asn-остатков, становятся энергетически менее стабильными, чем не модифицированные каналы. При этом наблюдается незначительное увеличение ионных токов и проводимостей, и сохранение отношений коэффициентов проницаемостей для различных ионов. Переход модифицированных каналов из открытого состояния в закрытое состояние при изменении разности потенциалов на концах мембраны является относительно медленным, по сравнению с данным переходом для не модифицированных каналов.

Модельная неферментативная модификация аминокислотных остатков центра связывания NMDA-рецептора в патологии, обусловленной болезнями пожилого возраста, приводит к увеличению количества D-аминокислот, равновесная энергия связывания которых, принадлежит интервалу 80–100 ккал/моль – Gly, D-Ala, D-Asn, D-Ile, D-Leu, D-Pro, D-Ser, D-Thr. Отличительной особенностью данной совокупности аминокислот, является появление алифатических неполярных аминокислот D-Ala, D-Ile и D-Pro в качестве лигандов. Указанные аминокислоты можно рассматривать как эффективные лиганды NR1 центра связывания рецептора в патологии, обусловленной заболеваниями пожилого возраста.

При этом из всех возможных комбинаций аминокислот, наиболее стабильными являются молекулярные комплексы NR1 центра связывания не модифицированного рецептора с лигандами Gly, D-Ser, D-Asn и D-Thr;

## Заключение

модифицированного NR1 центра связывания рецептора – с лигандами Gly, D-Ala, D-Asn, D-Ile, D-Leu, D-Pro, D-Ser и D-Thr.

За рамками данной работы осталась весьма актуальная проблема эволюционной фиксации аминокислот и нуклеиновых кислот гомохиральности строго определенного типа, последствия загрязнения организма «неприродными» изомерами и, прежде всего, проблема хиральной безопасности биосферы. Кратко отметим, что под экологической безопасностью в настоящее время понимается защищенность населения и экосистем от негативных последствий природных и техногенных катастроф, а также антропогенного воздействия на качество окружающей среды. В связи с тем, что многие органические вещества природного и техногенного происхождения имеют энантиомерные формы, существенно различающиеся по эффектам воздействия на организмы, вплоть до токсического и мутагенного, проблема «хиральной чистоты биосферы», являясь по принадлежности экологической, по существу имеет биофизическую, или, шире, биогеофизическую и биогеохимическую основу.

Область применения хиральных соединений чрезвычайно широка: от фармацевтических препаратов до сельского хозяйства и производства оптических кабелей. Традиционный химический синтез органических соединений, не включающий участие хиральных катализаторов, приводит к образованию рацемических смесей, содержащих равное количество D- и L-энантиомеров. Но и при их разделении и очистке, при хирально-специфическом синтезе, трансформации хиральных соединений в искусственных и природных условиях образуются токсические хиральные продукты.

Развитые биофизикой и смежными науками подходы могут быть чрезвычайно полезны не только для понимания механизмов взаимодействия хиральных соединений с биологическими системами разного уровня организации, но и для развития методов и направленности экологического мониторинга в решении данной проблемы.

## Список литературы

1. Adcock C., Smith G.R., Sansom M.S.P. Electrostatics and the Ion Selectivity of Ligand-Gated Channels // *Biophys. J.* 1998. V. 75. P. 1211-1222.
2. Aidley D.J., Stanfield P.R. Ion channels. Molecules in action. Cambridge University Press, 1996. 307 p.
3. Allen T.W., Chung S.H. Brownian dynamics study of an open-state KcsA potassium channel // *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. V. 1515. P. 83-91.
4. Allen T.W., Kuyucak S., Chung S.H. Molecular Dynamics Study of the KcsA Potassium Channel // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 2502-2516.
5. Anderson D.G., Shirts R.B., Cross T.A., Busath D.D. Noncontact Dipole Effects on Channel Permeation. V. Computed Potentials for Fluorinated Gramicidin // *Biophys. J.* 2001. V. 81. P. 1255-1264.
6. Aqvist J., Luzhkov V. Ion permeation mechanism of the potassium channel // *Nature.* 2000. V. 404. P. 881-884.
7. Armstrong N., Gouaux E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core // *Neuron.* 2002. V. 28. P. 165-181.
8. Armstrong N., Sun Y., Chen G.-Q., Gouaux E. Structure of a glutamate receptor ligand binding core in complex with kainite // *Nature.* 1998. V. 395. P. 913-917.
9. Arseniev A.S., Barsukov I.L., Bystrov V.F., Lomize A.L., Ovchinnikov Y.A. <sup>1</sup>H-NMR Study of Gramicidin A Transmembrane Ion Channel // *FEBS Letters.* 1985. V. 186. P. 168-174.
10. Ashcroft F.M. Ion Channels and Disease. San Diego: Academic Press, 2000. 293 c.
11. Aswad D.W. Determination of D- and L-aspartate in amino acid mixtures by high-performance liquid chromatography after derivatization with a chiral adduct of o-phthaldialdehyde. – *Analyt. Biochem.*, 1984, v. 137, p. 405–409.
12. Aswad D.W., Paranandi M.V., Schurter B.T. Isoaspartate in peptides and proteins: formation, significance, and analysis // *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2000, V. 21, P. 1129–1136.
13. Aswad, D.W. Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins. CRC Press, Boca Raton, FL, 1995
14. Bada J.L. In vivo racemization in mammalian proteins // *Methods Enzymol.* 1984, V. 106, P. 98–115.

## Список литературы

15. Bada J.L., Protsch R. Racemization reaction of aspartic acid and its use in dating fossil bones // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, V. 70, P. 1331–1334.
16. Bailey A.J. Molecular mechanisms of ageing in connective tissues // Mech. Ageing Dev., 2001, V. 122, P. 735–755.
17. Baker O.S., Larsson H.P., Mannuzzu L.M., Isacoff E.Y. Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in Shaker K<sup>+</sup> channel gating // Neuron. 1998. V. 20. P. 1283-1294.
18. Balbuena P.B., Seminario J.M. Molecular Dynamics. V. 7. USA: Elsevier, 1999. 970 p.
19. Berneche S., Roux B. Energetic of ion conduction through the K<sup>+</sup> channel // Nature. 2001. V. 414. P. 73-77.
20. Berneche S., Roux B. Molecular Dynamics of the KcsA K<sup>+</sup> Channel in a Bilayer Membrane // Biophys. J. 2000. V. 78. P. 2900-2917.
21. Bertrand D., Galzi J.L., Hussy N. Mutations in the Channel Domain of a Neuronal Nicotinic Receptor Convert Ion Selectivity from Cationic to Anionic // Nature. 1992. V. 359. P. 500-505.
22. Bezanilla F. Voltage sensor movements // J. Gen. Physiol. 2002. V. 120. P. 465-473.
23. Bharathi, Rao K.S.J., Stein R. First evidence on induced topological changes in supercoiled DNA by an aluminium D-aspartate complex. – J. Biol. Inorg. Chem., 2003, v. 8, p. 823–830.
24. Bhattacharyya S.K., Banerjee A.B. // Can. J. Microbiol. 1969. V. 15. P. 1107-1113.
25. Biervert C., Schroeder B.C., Kubisch C., Berkovic S.F., Propping P., Jentsch T.J., Steinlein O.K. A potassium channel mutation in neonatal human epilepsy // Science. 1998. V. 279. V. 403–406.
26. Blumberg P.M., Sfrominger J.L. // Bacteriol. Rev. 1974. V. 38. P. 291-302.
27. Bogusz S., Boxer A., Busath D.  $\beta$ -barrel structure for the voltage-activated potassium channel // Protein Engineering. 1992. V. 5. P. 285-293.
28. Booth T.D., Wahnou D., Wainer I.W. Is chiral recognition a three-point process? // Chirality. 1997. V. 9. P. 96-98.
29. Borhani D.W., Harter T.M., Petrash J.M. The crystal structure of the aldose reductase. NADPH binary complex // J. Biol. Chem. 1992. V. 267. P. 24841-24847.



## Список литературы

30. Brady J.D., Ju J., Robins S.P. Isoaspartyl bond formation within N-terminal sequences of collagen type I: implications for their use as markers of collagen degradation // *Clin. Sci.*, 1999, V. 96, P. 209–215.
31. Braun W. Local Deformation Studies of Chain Molecules: Differential Conditions for Changes of Dihedral Angles // *Biopolymers*. 1987. V. 26. P. 1691-1704.
32. Brennan T.V., Clarke S. Spontaneous degradation of polypeptides at aspartyl and asparaginyl residues-effects of the solvent dielectric // *Protein Sci.*, 1993, V. 2, P. 331–338.
33. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy Minimization and Dynamics Calculations // *J. Comput. Chem.* 1983. V. 4. P. 187-217.
34. Brooks III, Karplus C.M., Pettit B.M. Proteins: a theoretical perspective of dynamics, structure and thermodynamics. New York: John Willey & Sons, 1988. 543 p.
35. Brown R.H. Ion channel mutations in periodic paralysis and related myotonic diseases // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1993. V. 707. P. 305-316.
36. Browne D.L., Brunt E.R., Griggs R.C., Nutt J.G., Gancher S.T., Smith E.A., Litt M. Identification of two new KCNA1 mutations in episodic ataxia/myokomia families // *Hum Mol Genet*. 1995. V. 4. P. 1671–1672.
37. Browne D.L., Gancher S.T., Nutt J.C., Brunt E.R.P., Smith E.A. Episodic ataxia/myokomia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene // *KCNA1. Nature Genetics*. 1994. V. 8. P. 136-140.
38. Brunauer L.S., Clarke S., Age-dependent accumulation of protein residues which can be hydrolyzed to d-aspartic acid in human erythrocytes // *J. Biol. Chem.*, 1986, V. 261, P. 12538–12543.
39. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA // *Nature*, 2000, v. 403, p. 859–866.
40. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. – *Nature*, 2000, v. 403, p. 859–866.
41. Busath D.D. The Use of Physical Methods in Determining Gramicidin Channel Structure and Function // *Annual Review of Physiology*. 1993. V. 55. P. 473-501.

## Список литературы

42. Butler A., Wei A., Baker K., Salkoff L. A family of putative potassium channel genes in *Drosophila* // *Science*. 1989. V. 243. P. 943-947.
43. Bycroft B.W. *Comprehensive Organic Chemistry*. Vol. 5. Oxford: Pergamon Press, 1979. p. 241.
44. Cannon S.C. Sodium channel detects in myotonia and periodic paralysis // *Annu Rev Neurosci*. 1996. V. 19. P. 141–164.
45. Capasso S. Estimation of the deamidation rate of asparagine side chains // *Peptide Res.*, 2000, V. 55, P. 224–229.
46. Capasso S., Di Cerbo P. Kinetic and thermodynamic control of the relative yield of the deamidation of asparagine and isomerization of aspartic acid residues // *J. Peptide Res.*, 2000, V. 56, P. 382–387.
47. Capasso S., DiDonato A., Esposito L., Sica F., Sorrentino G., Vitagliano L., Zagari A., Mazzarella L. Deamidation in proteins: The crystal structure of bovine pancreatic ribonuclease with an isoaspartyl residue at position 67 // *J. Mol. Biol.*, 1996, V. 257, P. 492–496.
48. Capasso S., Mazzarella L., Sica F., Zagari A., Salvadori S. Spontaneous cyclization of the aspartic acid side chain to the succinimide derivative // *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, 1992, V. 12, P. 919–921.
49. Capasso S., Mazzarella L., Zagari A. Deamidation via cyclic imide of asparaginyl peptides: dependence on salts, buffers and organic solvents // *Peptide Res.*, 1991, V. 4, P. 234–238.
50. Capasso S., Salvadori S. Effect of the three-dimensional structure on the deamidation reaction of ribonuclease A // *J. Peptide Res.*, 1999, V. 54, P. 377–382.
51. Cardenas A.E., Coalson R.D., Kurnikova M.G. Three-Dimensional Poisson-Nernst-Planck Theory Studies: Influence of Membrane Electrostatics on Gramicidin A Channel Conductance // *Biophys. J.* 2000. V. 79. P. 80-93.
52. Certain P.R., Bruch L.W. *International review of science, Phys. Chem. Series 1*. V. 1. Ch. 4. Butterworth. L., 1972. 450 p.
53. Chandy K.G., Douglas J., Gutman G.A., Jan L., Joho R., Kalzmavek L., MacKinnon D., North R.A., Numa S., Philipson L., Ribera A.B. Simplified gene nomenclature // *Nature*. 1991. V. 352. P. 26.
54. Charlier C., Singh N.A., Ryan S.G., Lewis T.B., Reus B.E., Leach R.J., Leppert M. A pore mutation in a novel KQT-like potassium channel gene in an idiopathic epilepsy family // *Nat Genet*. 1998. V. 18. P. 53–55.

## Список литературы

55. Chazin W.J., Kossiakoff A.A. The role of secondary and tertiary structures in intramolecular deamidation of proteins. In: Aswad, D.W. (Ed.), *Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1995. pp. 193–206.
56. Chen D.P., Xu L., Tripathy A., Meissner G., Eisenberg B. Selectivity and Permeation in Calcium Release Channel of Cardiac Muscle: Alkali Metal Ions // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 1346-1366.
57. Chiu S.W., Subramanian S., Jakobsson E. Simulation Study of a Gramicidin/Lipid Bilayer System in Excess Water and Lipid. I. Structure of the Molecular Complex // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 1929-1938.
58. Choi K.L., Mossman C., Aube J., Yellen G. The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channel // *Neuron*. 1993. V. 10. P. 533-541.
59. Chung S.H., Hoyles M., Allen T., Kuyucak S. Study of Ionic Currents across a Model Membrane Channel Using Brownian Dynamics // *Biophys. J.* 1998. V. 75. P. 793-809.
60. Clarke S. Propensity for spontaneous succinimide formation from aspartyl and asparaginyl residues in cellular proteins // *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1987, V. 30, P. 808–821.
61. Clementy E. *Computational aspects for large chemical systems*. Berlin: Springer Verlag, 1980. 184 p.
62. Clementy E., Habitz P. // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 78. P. 6841-6848.
63. Cloos P.A.C., Fledelius C. Collagen fragments in urine derived from bone resorption are highly racemized and isomerized: a biological clock of protein aging with clinical potential // *Biochem. J.* 2000, V. 345, P. 473–480.
64. Coffey W.T., Kalmykov Y.P., Wladron J.T. *The Langevin Equation, with Applications in Physics, Chemistry, and Electrical Engineering*. New Jersey: World Scientific, 1996. 480 p.
65. Collins M.J., Waite E.R., van Duin A.C.T. Predicting protein decomposition: the case of aspartic-acid racemization kinetics // *Philos. Trans. R. Soc. London 354 (Ser. B)*, 1999, P. 51–64.
66. Conway B.E. *Ionic hydration in chemistry and Biophysics*. New York: Elsevier Science, 1981. 301 p.
67. Copeland R.A. *Enzymes: a practical introduction to structure, mechanisms and data analysis*. New York: John Wiley & Sons, 2000. p. 149-150.

## Список литературы

68. Cornell W.D., Cieplak P., Bayly C.I., Gould I.R., Merz K.M., Ferguson D.M., Spellmeyer D.C., Fox T., Caldwell J.W., Kollman P.A. A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins and Nucleic Acids // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 5179-5197.
69. Corrigan J.J., Srinivasan N.G. // *Biochem.* 1966. V. 5. P. 1185-1195.
70. Corry B., Allen T.W., Kuyucak S., Chung S.H. Mechanism of Permeation and Selectivity in Calcium Channels // *Biophys. J.* 2001. V. 80. P. 195-214.
71. Corry B., Allen T.W., Kuyucak S., Chung S.H. Mechanism of Permeation and Selectivity in Calcium Channels // *Biophys. J.* 2001. V. 80. P. 195-214.
72. Corry B., Kuyucak S., Chung S. Tests of Continuum Theory as Models of Ion Channels. II. Poisson-Boltzmann Theory versus Brownian Dynamics // *Biophys. J.* 2000. V. 78. P. 2364-2381.
73. Covarrubias M., Wei A., Salkoff L. Shaker, Shal, Shab and Shaw express independent K<sup>+</sup> current systems // *Neuron.* 1991. V. 7. P. 763-773.
74. Cowan S.W., Schirmer T., Rummel G., Steiert M., Ghosh R., Paupit R.A., Rosenbusch J.P. Crystal Structure Explain Functional Properties of Two E. Coli Porins // *Nature.* 1992. V. 358. P. 727-733.
75. Creighton T.E. *Proteins.* New York: John Willey & Sons, 1993. 505 p.
76. Crozier P.S., Henderson D., Rowley R.L., Busath D.D. Model Channel Ion Currents in NaCl-Extended Simple Point Charge Water Solution with Applied-Field Molecular Dynamics // *Biophys. J.* 2001. V. 81. P. 3077-3089.
77. Cull-Candy S., Brickley S. and Farrant M. NMDA receptor subunits: diversity, development and disease // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001. V. 11. P. 327-335.
78. Curran M.E., Splawski I., Timothy K.W., Vincent G.M., Green E.D., Keating M.T. A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause cause long QT syndrome // *Cell.* 1995. V. 80. P. 795-803.
79. David C.L., Orpizewski J., Zhu X.C., Reissner K.J., Aswad D.W. Isoaspartate in chondroitin sulfate proteoglycans of mammalian brain // *J. Biol. Chem.*, 1998, V. 273, P. 32063–32070.
80. Davies J.S. In: *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids. Peptides. Proteins.* Vol. 4. New York, Dekker, 1977, p. 1.
81. de Marco C. // *Enzymologia.* 1969. V. 36. P. 111-120.

## Список литературы

82. DeVry C.G., Clarke S. Polymorphic forms of the protein L-isoaspartate (D-aspartate) *O*-methyltransferase involved in the repair of age-damaged proteins // *J. Hum. Genet.*, 1999, V. 44, P. 275–288.
83. Di Salvo M.L., Delle Fratte S., Maras B., Bossa F., Wright H.T., Schirch V. Deamidation of asparagine residues in a recombinant serine hydroxymethyltransferase // *Arch. Bioch. Biophys.*, 1999, V. 372, P. 271–279.
84. Dittrich M., Daut J. Voltage-dependent K<sup>+</sup> current in capillary endothelial cells isolated from guinea pig heart // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. 119-127.
85. Dmitriev A., Isaeva G., Isaev P. Analysis of residuals: statistical method in QSAR studies // *Abstracts of the 7th Scandinavian Symposium on Chemometrics. – 2001. – V.3. – P.20-22.*
86. Dmitriev A.V., Baryshnikov V.G., Markov I.V., Tverdislov V.A. Band and point statistical estimation of channelforming polypeptides potential / *Progress in Chemometrics Research*. 2005. USA, NY: Nova Science Publishers, P.30-45.
87. Dobbs K.D., Hehre W.J. Molecular orbital theory of the properties of inorganic and organometallic compounds. 4. Extended basis sets for third- and fourth-row, main group elements // *J. Comput. Chem.* 1986. V. 7. P. 359-378.
88. Dobbs K.D., Hehre W.J. Molecular orbital theory of the properties of inorganic and organometallic compounds. 5. Extended basis sets for first-row transition metals // *J. Comput. Chem.* 1987. V. 8. P. 861-879.
89. Dobbs K.D., Hehre W.J. Molecular orbital theory of the properties of inorganic and organometallic compounds. 6. Extended basis sets for second-row transition metals // *J. Comput. Chem.* 1987. V. 8. P. 880-893.
90. Dopico A.M., Widmer H., Wang G., Lemos J.R., Treistman S.N. Rat supraoptic magnocellular neurons show distinct large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel subtypes in cell bodies versus nerve endings // *J. Physiol. (London)*. 1999. V. 519. P. 101-114.
91. Doyle D.A., Morais C.J., Pfuetzer R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity // *Science*. 1998. V. 280. P. 69-77.
92. Dunlop D. S., Neidle A., McHale D., Dunlop D. M., Lajtha A. The presence of free D-aspartic acid in rodents and man // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. V. 141. P. 27.

## Список литературы

93. Dunning J.T.H., Hay P.J. Gaussian basis set for molecular calculation / *Methods of electronic structure theory. Modern theoretical chemistry.* Schaefer H.F. (Ed.) V. 3. Plenum Press. New York, 1977. pp. 1–27.
94. Eisenberg R.S. Channels as Enzymes // *J. Memb. Biol.* 1990. V. 115. P. 1-12.
95. Eisenberg R.S., Klosek M.M., Schuss Z. Diffusion as a Chemical Reaction: Stochastic Trajectories between Fixed Concentrations // *J. Chem. Phys.* 1995. V. 102. P. 1767-1780.
96. Eisenman G. Cation selective electrodes and their mode of operation // *Biophys. J.* 1962. V. 2. P. 259-323.
97. Eisenman G. The influence of Na, K, Li, Rb and Cs on cellular potentials and related phenomena // *Bol. Inst. Estud. Med. Biol.* 1963. V. 21. P. 155-183.
98. Eisenman G., Horn R. Ionic selectivity revisited: The role of kinetic and equilibrium processes in ionic permeation through channels // *J. Membr. Biol.* 1983. V. 76. P. 197-225.
99. Eisenman G., Krasne S. The ionic selectivity of carrier molecules, membranes and enzymes / *MTP International Review of Science.* V. 2. London: Butterworths, 1975. p. 27-59.
100. Eyring H., Lumry R., Woodbury J.W. Some applications of modern rate theory to physiological systems // *Record of Chemical Progress.* 1946. V. 100. P. 100-114.
101. Fabian H., Szendrei G.I., Mantsch H.H., Greenberg B.D., Otvos L. Synthetic posttranslationally modified human  $\alpha$ -beta peptide exhibits a markedly increased tendency to form beta-pleated sheets in vitro // *Eur. J. Biochem.*, 1994, V. 221, P. 959–964.
102. Feller S.E., Yin D., Pastor R.W., MacKerell A.D. Molecular Dynamics Simulation of Unsaturated Lipids at Low Hydration: Parametrization and Comparison with Diffraction Studies // *Biophys. J.* 1997. V. 73. P. 2269-2279.
103. Fisher G.H., Garcia N.M., Payan I.L., Cadilla-Perzrios R., Sheremata W.A., Man E.H. D-aspartic acid in purified myelin and myelin basic protein // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1986, P. 683–687.
104. Fledelius C., Johnsen A.H., Cloos A.C., Bonde M., Qvist P. Characterization of urinary degradation products derived from type I collagen: Identification of a beta-isomerized Asp–Gly sequence within the C-terminal telopeptide ( $\alpha$ 1) region // *J. Biol. Chem.*, 1997, V. 72, P. 9755–9763.

## Список литературы

105. Fu D., Libson A., Miercke L.J.W., Weitzman C., Nollert P., Krucinski J., Stroud R.M. Structure of a glycerol conducting channel and the basis for its selectivity // *Science*. 2000. V. 290. P. 481-486.
106. Fu S.-J., Fan C.-C., Song H.-W., Wei F.-Q. Age estimation using a modified HPLC determination of ratio of aspartic acid in dentin // *Forensic Sci. Int.*, 1995, V. 73, P. 35–40.
107. Fujii N, Momose Y., Harada K. Kinetic studies of racemization of aspartyl residues in model peptides of  $\alpha$ A-crystallin. – *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1996, v. 48, p. 118–122.
108. Fujii N, Satoh K, Harada K., Ishibashi K. Simultaneous stereoinversion and isomerization at specific aspartic acid residues in  $\alpha$ A-crystallin from human lens. – *J. Biochem.*, 1994, v. 116, p. 663–669.
109. Fujii N. D-Amino Acid in Elderly Tissues // *Biol. Pharm. Bull.* 2005. V. 28(9). P. 1585-1589.
110. Fujii N., Momose Y., Harada K. Kinetic study of racemization of aspartyl residues in model peptides of  $\alpha$ A-crystallin // *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1996, V. 48, P. 118–122.
111. Fujii N., Momose Y., Ishibashi Y., Uemura T., Takita M., Takehana M. Specific racemization and isomerization of the aspartyl residue of  $\alpha$ A-crystallin due to UV-B irradiation // *Exp. Eye Res.*, 1997, V. 65, P. 99–104.
112. Fujii N., Momose Y., Ishii N., Takita M., Akaboshi M., Kodama M. The mechanism of simultaneous stereoinversion, racemization, and isomerization at specific aspartyl residues of aged lens protein // *Mech. Ageing Develop.*, 1999, V. 107, P. 347–358.
113. Fujii N., Shimo-Oka T., Ogiso M., Momose Y., Kodama T., Kodama M., Akaboshi M. Localization of biologically uncommon d-beta-aspartate- containing alpha A-crystallin in human eye lens // *Mol. Vis.*, 2000, V. 6, P. 1–5.
114. Fujii N., Tajima S., Tanaka N., Fujimoto N., Takata T., Shimo-Oka T. The presence of d-beta-aspartic acid-containing peptides in elastic fibers of sun-damaged skin: a potent marker for ultraviolet-induced skin aging // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 294. P. 1047–1051.
115. Fujii N., Takemoto L.J., Momose Y., Matsumoto S., Hiroko K., Akaboshi M. Formation of four isomers at the Asp-151 residue of aged human  $\alpha$ A-crystallin by natural aging // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1999, V. 265, P. 746–751.

## Список литературы

116. Fujii N., Tamanoi I., Muraoka S., Joshima H., Kashima M., Harada K. D-aspartic acid in aged mouse skin and lens // *J. Radiation Res.*, 1987, V. 28, P. 117–125.
117. Furukawa H., Gouaux E. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core // *EMBO J.* 2003. V. 22. P. 2873-2875.
118. Galletti P., Ingrosso D., Manna C., Clemente G., Zappia V. Protein damage and methylation-mediated repair in the erythrocyte // *Biochem. J.*, 1995, V. 306, P. 313–325.
119. Gandhi C.S., Isacoff E.Y. Molecular models of voltage sensing // *J. Gen. Physiol.* 2002. V. 120. P. 455-463.
120. Gay L.A., Stanfield P.R. The selectivity of the delayed potassium conductance of frog skeletal muscle fibres // *Pflugers Arch.* 1978. V. 378. P. 177-179.
121. Geiger T., Clarke S. Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides // *J. Biol. Chem.*, 1987, V. 262, P. 785–794.
122. George J.C., Bada J., Zeh J., Scott L., Brown S.E., O'Hara T., Suydam R. Age and growth estimates of bowhead whales (*Balaena mysticetus*) via aspartic acid racemization // *Can. J. Zool. Rev. Can. Zool.*, 1999, V. 77, P. 571–580.
123. Gineyts E., Cloos P.A.C., Borel O., Grimaud L., Delmas P.D., Garnero P. Racemization and isomerization of type I collagen C-telopeptides in human bone and soft tissues: assessment of tissue turnover // *Biochem. J.*, 2000, V. 345, P. 481–485.
124. Giuffra M.E., Sethy V.H., Davis T.L. // *Mov. Disord.* 1993. V. 8. P. 147–150.
125. Glasstone S.K., Laidler K.J., Eyring H. *The theory of Rate Processes.* New York: McGraw-Hill, 1941. 403 p.
126. Gray C.G., Gubbins K.E. *Theory of molecular fluids.* Oxford: Clarendon Press, 1984. V. 1. 626 p.
127. Grayson P., Tajkhorshid E., Schulten K. Mechanisms of selectivity in channels and enzymes studied with interactive molecular dynamics // *Biophys. J.* 2003. V. 85. P. 36-48.
128. Groenen P.J.T.A., van den Ijssel P.R.L.A., Voorter C.E.M., Bloemendal H., de Jong W.W. Site-specific racemization in aging  $\alpha$ -crystallin // *FEBS Lett.*, 1999, V. 269, P. 109–112.



## Список литературы

129. Guardia E., Rey R., Padro J.A. Na<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>-Cl<sup>-</sup> Ion Pairs in Water: Mean Force Potentials by Constrained Molecular Dynamics // *J. Chem. Phys.* 1991. V. 95. P. 2823-2831.
130. Guidoni L., Torre V., Carloni P. Potassium and Sodium Binding to the Outer Mouth of the K<sup>+</sup> channel // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 8599-8604.
131. Guidoni L., Torre V., Carloni P. Water and potassium inside the KcsA K<sup>+</sup> channel // *FEBS Lett.* 2000. V. 477. P. 37-42.
132. Hagivara S., Takanashi K. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell // *J. Membr. Biol.* 1974. V. 18. P. 61-80.
133. Hagler A.T., Lifson S., Huler E. Peptides, Polypeptides and Proteins. Eds. E.R. Blout. New York: Willey, 1974. 323 p.
134. Hamase K., Homma H., Takigawa Y., Fukushima T., Santa T., Imai K. Regional distribution and postnatal changes of D-amino acids in rat brain // *Biochem. Biophys. Acta.* 1997. V. 1334. P. 214.
135. Hanna M.G., Wood N.V., Kullmann D.M. Ion channels and neurological disease: DNA based diagnosis is now possible. and ion channels may be important in common paroxysmal disorders // *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998. V. 65. P. 427-431.
136. Hardeland U., Bentele M., Jiricny J., Schar P. Separating substrate recognition from base hydrolysis in human thymine DNA glycosylase by mutational analysis. – *J. Biol. Chem.*, 2000, v. 275, p. 33449–33456.
137. Hashimoto A., Oka T. Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery // *Prog. Neurobiol.* 1997. V. 52. P. 325.
138. Heginbotham L., LeMasurier M., Kolmakova-Partensky L., Miller C. Single *Streptomyces lividans* K<sup>+</sup> channels: functional asymmetries and sidedness of proton activation // *J. Gen. Physiol.* 1999. V. 114. P. 551-559.
139. Helfand E. Flexible as Rigid Constraints in Statistical Mechanics // *J. Chem. Phys.* 1979. V. 71. P. 5000-5007.
140. Helfman P.M., Bada J.L. Aspartic acid racemisation in dentine as a measure of ageing // *Nature*, 1976, V. 262, P. 279-281.
141. Helfman P.M., Bada J.L. Aspartic acid racemization in tooth enamel from living humans // *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, V. 72, P. 2891-2894.

## Список литературы

142. Helfman P.M., Bada J.L., Shou M.-Y. Considerations on the role of aspartic acid racemization in the aging process // *Gerontology*, 1977, V. 23, P. 419–425.
143. Hienmann S.H., Terlau H., Stuhmer W., Imoto K., Numa S. Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations // *Nature*. 1992. V. 356. P. 441-443.
144. Hill T.L. Free energy transduction in biology. New York: Academic Press, 1977. 365 p.
145. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed. Sunderland: Sinauer Associates, 1992. 487 p.
146. Hille B. Potassium channels in myelinated nerve. Selective permeability to small cations // *J. Gen. Physiol.* 1973. V. 61. P. 669-686.
147. Hindley J. DNA Sequencing. V. 10. USA: Elsevier, 1983. 384 p.
148. Hipkiss A.R. On the «struggle between chemistry and biology during aging» – implications for DNA repair, apoptosis and proteolysis, and a novel route of intervention. – *Biogerontology*, 2001, v. 2, p. 173–178.
149. Hirsch J.R., Weber G., Kleta I., Schlatter E. A novel cGMP-regulated K<sup>+</sup> channel in immortalized human kidney epithelial cells // *J. Physiol. (London)*. 1999. V. 519. P. 645-655.
150. Hirschberg B., Maylie J., Adelman J.P., Marrion N.V. Gating properties of single SK channels in hippocampal CA1 pyramidal neurons // *Biophys. J.* 1999. V. 77. P. 1905-1913.
151. Hoepflich P.D. // *J. Biol. Chem.* 1965. V. 240. P. 1654-1663.
152. Honorio K.M., Da Silva A.B.F. An AM1 study on the electron-donating and electron-accepting character of biomolecules // *Int. J. Quant. Chem.* 2003. V 95. P. 126-132.
153. Horn R. Coupled movements in voltage-gated ion channels // *J. Gen. Physiol.* 2002. V. 120. P. 449-453.
154. Hymphreys D.D., Friesner R.A., Berne B.J. A Multiple-Time-Step Molecular Dynamics Algorithm for Macromolecules // *J. Phys. Chem.* 1994. V. 98. P. 6885-6892.
155. Im W., Seefeld S., Roux B. A Grand Canonical Monte Carlo - Brownian Dynamics Algorithm for Simulating Ion Channels // *Biophys J.* 2000. V. 79. P. 788-801.
156. Inaba M., Gupta K.C., Kuwabara M., Takahashi T., Benz E.J., Maede Y. Deamidation of human erythrocyte protein 4.1: possible role in ageing // *Blood*, 1992, V. 79, P. 3355–3361.

## Список литературы

157. Ingrosso D., D'Angelo S, di Carlo E. et al. Increased methyl esterification of altered aspartyl residues in erythrocyte membrane proteins in response to oxidative stress. – *Eur. J. Biochem.*, 2000, v. 267, p. 4397–4405.
158. Ingrosso D., Perna A.F. D-amino acids in aging erythrocytes // *EXS*. 1998. V. 85. P. 119-141.
159. Ingrosso D., Perna A.F. D-amino acids in aging erythrocytes // *EXS*, 1998, V. 85, P. 119–141.
160. Isacoff E.Y., Jan Y.N., Jan L.Y. Putative receptor for the cytoplasmic inactivation of the Shaker K<sup>+</sup> channel // *Nature*. 1991. V. 353. P. 86-90.
161. Isacoff E.Y., Jan Y.N., Jan L.Y. Evidence for the formation of heteromultimeric potassium channel in *Xenopus* oocytes // *Nature*. 1990. V. 345. P. 530-534.
162. Jez J.M., Flynn T.G., Penning T.M. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily // *Biochem. Pharmacol.* 1997. V. 54. P. 639-647.
163. Jiang Y. Crystal Structure and Mechanism of a Calcium-Gated Potassium Channel // *Nature*. 2002. V. 417. P. 515-520.
164. Jiang Y. The Open Pore Conformation of Potassium Channel // *Nature*. 2002. V. 417. P. 523-526.
165. Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel // *Nature*. 2003. V. 423. P. 33-41.
166. Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A., MacKinnon R. The principle of gating charge movement in a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel // *Nature*. 2003. V. 423. P. 42-48.
167. Johnson B.A., Aswad D.W. Identification and topography of substrates for protein carboxyl methyltransferase in synaptic membranes and myelin-enriched fractions of bovine and rat brain // *J. Neurochem.*, 1985, V. 45, P. 1119–1127.
168. Johnson B.A., Ngo S.Q., Aswad D.W. Widespread phylogenetic distribution of a protein methyltransferase that modifies L-isopartyl residues // *Biochem. Int.*, 1991, V. 24, P. 841–847.
169. Jurkat R.K., Lerche H., Mitrovic N., Lehmann H.F. Teaching course: ion channelopathies in neurology // *J Neurol.* 1999. V. 246. P. 758–763.
170. Kagan R.M., McFadden H.J., McFadden P.N., Oconnor C., Clarke S. Molecular phylogenetics of a protein repair methyltransferase //

## Список литературы

- Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol., 1997, V. 117, P. 379–385.
171. Kagan R.M., Niewmierzycka A., Clarke S. Targeted gene disruption of the *Caenorhabditis elegans* L- isoaspartyl protein repair methyltransferase impairs survival of dauer stage nematodes // Arch. Biochem. Biophys., 1997, V. 348, P. 320–328.
172. Karin N.J., Cook J.S. Turnover of the catalytic subunit of Na, K-ATPase in HTC cells // J. Biol. Chem. 1986. V. 261. P. 10422–10428.
173. Karplus M., Petsko G.A. Molecular dynamics simulations in biology // Nature. 1990. V. 347. P. 631-639.
174. Kebarle P. Modern aspects of electrochemistry. V. 11. Eds. Conway B.E. and Bockris J.O.M. New York: Plenum Publishing, 1974. 503 p.
175. Kemp J.A., McKernan R.M. NMDA receptor pathways as drug targets // Nat. Neurosci. 2002. V. 5. P. 1039-1042.
176. Kenessey A., Yen S.H., Liu W.K., Yang X.R., Dunlop D.S. Detection of d-aspartate in tau-proteins associated with Alzheimer paired helical filaments // Brain Res., 1995, V. 675, P. 183–189.
177. Kim E., Lowenson J.D., McacLaren D.C., Clarke S., Young S.G. Deficiency of protein-repair enzyme results in the accumulation of altered proteins, retardation of growth and fatal seizures in mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, V. 94, P. 6132–6137.
178. Kinzel V., König N., Pipkorn R., Bossemeyer D., Lehmann W.D. The amino terminus of PKA catalytic subunit-A site for introduction of posttranslational heterogeneities by deamidation: D-Asp2 and D-isoAsp2 containing isozymes // Protein Sci., 2000, V. 9, P. 2269–2277.
179. Kiss T. In: Biocoordination chemistry: Coordination equilibria in biologically active systems. Ed. K.Burger. – Ellis Horwood (Publ.), New York, 1990, pp. 57–134.
180. Koçak H., Öner P., Özta B. Comparison of the activities of  $na^+$ ,  $k^+$ -atpase in brains of rats at different ages. – Gerontology, 2002, v. 46, no. 5, p. 279–281.
181. Koch M.C., Steinmeyer K., Lorenz C., Ricker K., Wolf F., Otto M., Zoll B., Lehmann H.F., Grzeschik K.H., Jentsch T.J. The skeletal muscle chloride channel in dominant and recessive human myotonia // Science. 1992. V. 257. P. 797-800.
182. Köhler M., Burnashev N., Sakmann B., Seeburg P. H. Determinants of  $ca^{2+}$  permeability in both TM1 and TM2 of high affinity kainate

## Список литературы

- receptor channels: Diversity by RNA editing // *Neuron*. 1993. V. 10. P. 491-500.
183. Kohr G., Eckardt S., Luddens H., Monyer H., Seeburg P.H. NMDA receptor channels: subunit-specific potentiation by reducing agents // *Neuron*. 1994. V. 12. P. 1031-1040.
184. Kollman P., Dixon R., Cornell W., Fox T., Chipot C., Pohorille A. The Development/Application of a "Minimalist" Organic/Biochemical Molecular Mechanic Force Field using a Combination of ab Initio Calculations and Experimental Data. Computer Simulation of Biomolecular Systems. Eds. W. F. van Gunsteren, P. K. Weiner, A. J. Wilkinson. 1997. V. 3. P. 83-96.
185. Kossiakoff A.A. Tertiary structure is a principal determinant to protein deamidation // *Science*, 1988, V. 240, P. 191–194.
186. Kraus J.E., McNamara J.O. Clinical relevance of defects in signalling pathways // *Cur. Opin. Neur.* 1995. V. 5. P. 358-366.
187. Kröner D., Klaumünzer B. Laser-operated chiral molecular switch: quantum simulations for the controlled transformation between achiral and chiral atropisomers. – *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2007, v. 9, p. 5009–5017.
188. Krupka R.M., Deves R. Kinetics of inhibition of transport systems // *Int. Rev. of Cyt.* 1983. V. 84. P. 303-352.
189. Kuhn J., Somerville R.L. Uptake and utilization of aromatic D-amino acids in *Escherichia coli* K12 // *Biochem. et Biophys. Acta.* 1974. V. 332. P. 298-400.
190. Kuhn W. *Advances in Enzymology*. V. 20. New York, 1958. p. 1.
191. Kuhn W. Katalytische Erzeugung optisch aktiver Stoffe und chemische Notwendigkeit eines einseitigen Ablaufs biochemischer Vorgänge // *Angew. Chem.*, 1936, V. 49, P. 215–219.
192. Kuhn W. Mögliche Beziehungen der optischen Aktivität zum Problem des Alterns // *Experientia*, 1955, V. 11, P. 429–436.
193. Kuhn W. Possible relation between optical activity and aging // *Adv. Enzymol.*, 1958, V. 20, P. 1–29.
194. Kurata Y., Sato R., Hisatome I., Imanishi S. Mechanisms of Cation Permeation in Cardiac Sodium Channel: Description by Dynamics Pore Model // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 1885-1904.
195. Kurnikova M.G., Coalson R.D., Graf P., Nitzan A. A Lattice Relaxation Algorithm for Three-Dimensional Poisson-Nernst-Planck Theory with Application to Ion Transport through the Gramicidin A Channel // *Biophys. J.* 1999. V 76. P. 642-656.

## Список литературы

196. Kuyucak S., Hoyles M., Chung S.H. Analytical Solutions of Poisson's Equation for Realistic Geometrical Shapes of Membrane Ion Channels // *Biophys. J.* 1998. V. 74. P. 22-36.
197. Kvenvolden K.A., Lawless J., Pering K., Peterson E., Flores J., Ponnampertuma C., Kaplan I.R., Moore C. Evidence for extraterrestrial amino acids and hydrocarbons in the Murchinson meteorite // *Nature*, 1970, V. 228, P. 923–926.
198. Kyte J., Doolittle R.F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein // *Journal Molecular Biology.* 1982. V. 157. P. 105-132.
199. Laio A., Torre V. Physical Origin of Selectivity in Ionic Channels of Biological Membrane // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 129-148.
200. Lara J., Acevedo J.J., Onetti C.G. Large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channels in secretory neurons // *J. Neurophysiol.* 1999. V. 82. P. 1317-1325.
201. Larsson H.P., Baker O.S., Dhillon D.S., Isacoff E.Y. Transmembrane movement of the Shaker K<sup>+</sup> channel S4 // *Neuron.* 1996. V. 16. P. 387-397.
202. Latorre R., Miller C. Conduction and selectivity in potassium channel // *J. Membr. Biol.* 1983. V. 71. P. 11-30.
203. Latorre R., Oberhauser A., Labarca P., Alvarez O. Varieties of calcium-activated potassium channels // *Annu. Rev. Physiol.* 1989. V. 51. P. 385-399.
204. Laube B., Hirai H., Sturgess M., Betz H., Kuhse J. Molecular determinants of agonist discrimination by NMDA receptor subunits: analysis of the glutamate binding site on the NR2B subunit // *Neuron.* 1997. V. 18. P. 493-503.
205. Lauger P. Ion transport through pores: a rate theory analysis // *Biochim. Biophys. Acta.* 1973. V. 311. P. 423-441.
206. Lauger P. Thermodynamic and kinetic properties of electrogenic ion pumps // *Biochim. Biophys. Acta.* 1984. V. 779. P. 307-341.
207. Lehmann W.D., Schlosser A., Erben G., Pipkorn R., Bossemeyer D., Kinzel V. Analysis of isoaspartate in peptides by electrospray tandem mass spectrometry // *Protein Sci.*, 2000, V. 9, P. 2260–2268.
208. Lehrman S.R., Hamlin D.M., Lund M.E., Walker G.A. Identification and characterization of an anti-isoaspartic acid monoclonal antibody // *J. Protein Chem.*, 1992, V. 11, P. 657–663.
209. Letokhov V.S. // *Physics Letters.* 1975. V. 53A. P. 275.

## Список литературы

210. Levitt D.G. Modeling of Ion Channels // *J. Gen. Physiol.* 1999. V. 113. P. 789-784.
211. Li M., Jan Y.N., Jan L.Y. Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel // *Science.* 1992. V. 257. P. 1225-1230.
212. Lian J.B., Gundberg C.M. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications // *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 1988, V. 226, P. 267–291.
213. Liman E.R., Tytgat J., Hess P. Subunit stoichiometry of a mammalian K<sup>+</sup> channel determined by construction of multimeric cDNAs // *Neuron.* 1992. V. 9. P. 861-871.
214. Lipton S.A., Choi Y.-B., Takahashi H., Zhang D., Li W., Godzik A., Bankston L.A. Cysteine regulation of protein function exemplified by NMDA-receptor modulation // *Trends Neurosci.* 2002. V. 25. P. 474-480.
215. Long S.B., Campbell E.B., MacKinnon R. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K<sup>+</sup> Channel // *Science.* 2005. V. 309. P. 897-903.
216. Long S.B., Campbell E.B., MacKinnon R. Voltage Sensor of Kv1.2: Structural Basis of Electromechanical Coupling // *Science.* 2005. V. 309. P. 903-908.
217. Lowenson J., Clarke S. Does the chemical instability of aspartyl and asparaginyl residues in proteins contribute to erythrocyte aging? // *Blood Cells*, 1988, V. 14, P. 103–117.
218. Lowenson J.D., Clarke S. Recognition of d-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-Isoaspartyl/D-Aspartyl Protein Methyltransferase-implications for the repair hypothesis // *J. Biol. Chem.*, 1992, V. 267, P. 5985–5995.
219. Lowenson J.D., Kim E., Young S.G., Clarke S. Limited accumulation of damaged proteins in L-Isoaspartyl (D-Aspartyl) O-Methyltransferase-deficient mice // *J. Biol. Chem.*, 2001, V. 276, P. 20695–20702.
220. Lura R., Schirch V. Role of peptide conformation in the rate and mechanism of deamidation of asparaginyl residues // *Biochemistry US*, 1988, V. 27, P. 7671–7677.
221. MacDermott A.J., Tranter G.E., Trainor S. // *J. Chem. Phys.* 1992. V. 194. P. 152.

## Список литературы

222. MacKerell A.D., Wiorkeiwicz-Kuczera J., Karplus M. An All-Atom Empirical Energy Function for the Simulation of Nucleic Acids // *J. Am. Chem. Soc.* 1995. V. 117. P. 11946-11975.
223. MacKerell A.D., Wiorkeiwicz-Kuczera J., Karplus M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins // *J. Phys. Chem. B.* 1998. V. 102. P. 3586-3616.
224. MacKinnon R. Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel // *Nature.* 1991. V. 350. P. 232-235.
225. MacKinnon R., et al // *Science.* 1998. V. 280. P. 106-109.
226. Madden D.R. The structure and function of glutamate receptor ion channels // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. P. 91-101.
227. Man E.H., Sandhouse M.E., Burg J., Fisher G.H. Accumulation of D-aspartic acid with age in the human brain // *Science*, 1983, V. 220, P. 1407-1408.
228. Manning J.M., Soper T.S. Enzyme activated Irreversible Inhibitors. Amsterdam: Elsevier, 1978. p. 163.
229. Margenau H., Kestner N.R. Intermolecular forces. 2nd ed. L.: Pergamon Press, 1971. 560 p.
230. Maroudas A., Bayliss M.T., Uchitel-Kaushansky N., Schneidermann R., Gilav E. Aggregan turnover in human articular cartilage: Use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1998, V. 350, P. 61-71.
231. Maroudas A., Palla G., Gilav E. Racemization of aspartic acid in human articular cartilage // *Connect. Tissue Res.*, 1992, V. 28, P. 161-169.
232. Masaki R., Yamamoto A., Tashiro Y. Cytochrome P-450 and NADPH-cytochrome P-450 reductase are degraded in the autolysosomes in rat liver // *J. Cell. Biol.* 1987. V. 104. P. 1207-1215.
233. Masters P.M. Amino acid racemization in structural proteins. Proc Conf. Non-lethal Biological Markers of Physiological Aging, 19-20 June 1981 (NIH Publication 82-2221), 1982, P. 120-137.
234. Masters P.M., Bada J.L., Zigler J.S. Aspartic acid racemization in heavy molecular weight crystallins and water-insoluble protein from normal human lenses and cataracts // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1978, V. 75, P. 1204-1208.
235. Masters P.M., Bada J.L., Zigler Jr. J.S. Aspartic acid racemisation in the human lens during ageing and in cataract formation // *Nature.* 1977. V. 268. P. 71-73.



## Список литературы

236. Matsu'ura S., Ueta N. Fraction dependent variation of aspartic acid racemization age of fossil bone // *Nature*, 1980, V. 286, P. 883–884.
237. Mazur A.K., Abagyan R.A. New Methodology for Computer-Aided Modeling of Biomolecular Structure and Dynamics. Non-cyclic Structure // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 1989. V. 6. P. 815-832.
238. McFadden P.N., Clarke S. Conversion of isoaspartyl peptides to normal peptides: Implications for the cellular repair of damaged proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, V. 84, P. 2595–2599.
239. McFadden P.N., Clarke S. Methylation of D-aspartyl residues in erythrocytes: Possible step in the repair of aged membrane proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, V. 79, P. 2460–2464.
240. McKerrow J.H. Non-enzymatic, post-translational, amino acid modifications in ageing // *A brief review. Mech. Ageing Dev.*, 1979, V. 10, P. 371–377.
241. Meister S. In: *Biochemistry of the Amino Acids*. Vol. 1, 2. New York - London, Academic Press. 1965. p. 113, 220, 297, 357, 619, 671.
242. Micskei K., Hajdu C., Patonay T., Zucchi C., Caglioti L., Palyi G. Transfer of the chiral information of natural amino acids in biomimetic organic syntheses. – In: *Progress in biological chirality*. – Eds.: G.Palyi, C.Zucchi, G.Caglioty – Elsevier (2004), pp. 221–235.
243. Miyazaki J., Nakanishi S., Jingami H. Expression and characterization of a glycine-binding fragment of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 // *Biochem. J.* 1999. V. 340. P. 687-692.
244. Mizuno A., Fujii N., Akaboshi M., Momose Y., Shimo-oka T. Changes of secondary structure detected by laser Raman spectroscopy in model peptides of human alpha A-crystallin due to substitution of D-aspartyl residues for L-aspartyl residues // *Jpn. J. Ophthalmol.*, 2000, V. 44, P. 354–359.
245. Molnar S.P., King J.W. Theory and applications of the integrated molecular transform and the normalized molecular moment structure descriptors: QSAR and QSPR paradigms // *Int. J. Quant. Chem.* 2001. V. 85. P. 662-675.
246. Morais-Cabral J.H., Zhou Y., MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K<sup>+</sup> selectivity filter // *Nature*. 2001. V. 414. P. 27-42.
247. Mornstad H., Pfeiffer H., Teivens A. Estimation of dental age using HPLC-technique to determine the degree of aspartic acid racemization // *J. Forensic Sci.*, 1994, V. 39, P. 1425–1431.

## Список литературы

248. Moy G., Corry B., Kuyucak S., Chung S.H. Tests of Continuum Theories as Models of Ion Channels. I. Poisson-Boltzmann Theory versus Brownian Dynamics // *Biophys. J.* 2000. V. 78. P. 2349-2363.
249. Murray R.K. Harper's Biochemistry. 24th ed. Appleton & Long, 1996. p. 25.
250. Najbauer J., Orpizewski J., Aswad D.W. Molecular aging of tubulin: Accumulation of isoaspartyl sites in vitro and in vivo // *Biochemistry*, 1996, V. 35, P. 5183–5190.
251. Nakamura T., Sadakane Y., Fujii N. Kinetic study of racemization of aspartyl residues in recombinant human  $\alpha$ A-crystallin // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1764. P. 800–806.
252. Narasimhan S., Swarnalakshmi S., Balakumar R., Velmathi S. Novel chiral switching ligands for enantioselective asymmetric reductions of prochiral ketones – *Molecules*, 2001, v. 6, p. 988–995.
253. Narasimhan S., Velmathi S. Effect of microwaves in the chiral switching asymmetric Michael reaction. – *Molecules*, 2003, v. 8, p. 256–262.
254. Neuberger A. Stereochemistry of Amino Acids. In: Anson, M.L., Edsall, J.T., (Eds.), *Advances In Protein Chemistry*, Vol. IV., 1948, pp. 297–83.
255. Newman J.S. *Electrochemical Systems*. New Jersey: Prentice-Hall, 1991. 560 p.
256. Niewmierzycka A., Clarke S. Do damaged proteins accumulate in *Caenorhabditis elegans* Lisoaspartate methyltransferase (pcm-1) deletion mutants? // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, V. 364, P. 209–218.
257. Noguchi S., Miyawaki K., Satow Y. Succinimide and isoaspartate residues in the crystal structures of hen egg-white lysozyme complexed with tri-*N*-acetylchitotriose // *J. Mol. Biol.*, 1998, V. 278, P. 231–238.
258. Nonner W., Chen D.P., Eisenberg B. Progress and Prospects in Permeation // *J. Gen. Physiol.* 1999. V. 113. P. 773-782.
259. Noulin J.F., Brochiero E., Lapointe J.Y., Laprade R. Two types of K<sup>+</sup> channels at the basolateral membrane of proximal tubule: inhibitory effect of taurine // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. P. 290-297.
260. O'Connel A.M., Koeppe R.E., Andersen O.S. Kinetics of Gramicidin Channel Formation in Lipid Bilayers: Transmembrane Monomer Association // *Proceeding of the National Academy of Sciences USA.* 1990. V. 91. P. 1495-1499.

## Список литературы

261. Ogino T., Ogino H., Nagy B. Application of aspartic acid racemization to forensic odontology: post mortem designation of age of death // *Forensic Sci. Int.*, 1985, V. 29, P. 259–267.
262. Ohtani S. Estimation of age from dentin by using the racemization reaction of aspartic acid // *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1995, V. 16, P. 158–161.
263. Ohtani S. Rate of aspartic acid racemization in bone // *Am. J. Forensic Med. Pathol.*, 1998, V. 19, P. 284–287.
264. Ohtani S., Matsushima Y., Kobayashi Y., Kishi K. Evaluation of aspartic acid racemization ratios in the human femur for age estimation // *J. Forensic Sci.*, 1998, V. 43, P. 949–953.
265. Ohtani S., Matsushima Y., Ohhira H., Watanabe A. Age-related changes in D-aspartic acid of rat teeth // *Growth Dev Aging*. 1995. V. 59(1-2) P. 55-61.
266. Ohtani S., Sugimoto H., Sugeno H., Yamamoto S., Yamamoto K. Racemization of aspartic acid in human cementum with age // *Arch. Oral Biol.*, 1995, V. 40, P. 91–95.
267. Ohtani S., Yamamoto T., Matsushima Y., Kobayashi Y. Changes in the amount of d-aspartic acid in the human femur with age // *Growth Develop. Aging*, 1998, V. 62 (4), P. 141–144.
268. Ohtani S., Yamamoto T., Sugimoto H., Sashima M., Satoh M. Age-related changes in the D-aspartic acid content of the teeth of the senescence-accelerated mouse // *Arch. Oral Biol.* 2000. V. 45(1) P. 13-18.
269. Okazaki S., Touhara H., Nakanishi K. Computer experiments of aqueous solutions. V. Monte Carlo calculation on the hydrophobic interaction in 5 mol % methanol solution // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 890-894.
270. Orpiszewski J., Benson M.D. Induction of beta-sheet structure in amyloidogenic peptides by neutralization of aspartate: A model for amyloid nucleation // *J. Mol. Biol.*, 1999, V. 289, P. 413–428.
271. Orpiszewski J., Schormann N., Kluge-Beckerman B., Liepnieks J.J., Benson M.D. Protein aging hypothesis of Alzheimer disease // *FASEB J.* 2000, V. 14. P. 1255–1263.
272. Papazian D.M., Schwartz T.L., Tempel B.L., Jan Y.N., Jan L.Y. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila* // *Science*. 1987. V. 237. P. 749-753.

## Список литературы

273. Paranandi M.V., Aswad D.W. Spontaneous alterations in the covalent structure of synapsin I during in vitro aging // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. V. 212. P. 442–448.
274. Payan I.L., Chou S.J., Fisher G.H., Man E.H., Emory C., Frey W.H. Altered aspartate in alzheimer neurofibrillary tangles // *Neurochemical Res.* 1992. V. 17. P. 187–191.
275. Perez-Garcia M.T., Lopez-Lopez J.R., Gonzalez C. Kv1.2 subunit coexpression in HEK293 cells confers O<sub>2</sub> sensitivity to Kv4.2 but not to Shaker channels // *J. Gen. Physiol.* 1999. V. 113. P. 897-907.
276. Perez-Otano I., Schulteis C.T., Contractor A., Lipton S.A., Trimmer J.S., Sucher N.J., Heinemann S.F. Assembly with the NR1 subunit is required for surface expression of NR3A-containing NMDA receptors // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. P. 1228-1237.
277. Perna A.F., Daniello A., Lowenson J.D., Clarke S., DeSanto N.G., Ingrosso D. D-Aspartate content of erythrocyte membrane proteins is decreased in uremia: Implications for the repair of damaged proteins // *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997. V. 8. P. 95–104.
278. Pfeiffer H., Mornstad H., Teivens A. Estimation of chronological age using the aspartic-acid racemization method.1. On human rib cartilage. *Int. J. Legal Med.*, 1995, 108, 19–23.
279. Pfeiffer H., Mornstad H., Teivens A. Estimation of chronological age using the aspartic-acid racemization method. 2. On human cortical bone // *Int. J. Legal Med.* 1995. V. 108. P. 24–26.
280. Pongs O. Molecular biology of voltage-dependent potassium channels // *Physiological Reviews.* 1992. V. 72. P. 69-88.
281. Potter S.M., Henzel W.J., Aswad D.W. In vitro aging of calmodulin generates isoaspartate at multiple Asn–Gly and Asp–Gly sites in calcium-binding domains II, III and IV // *Protein Sci.* 1993. V. 2. P. 1648–1663.
282. Powell J.T., Vine N., Crossman M. On the accumulation of d-aspartate in elastin and other proteins of the ageing aorta // *Atherosclerosis.* 1992. V. 97. P. 201–208.
283. Powell J.T., Vine N., Crossman M. On the accumulation of D-aspartate in elastin and other proteins of the aging aorta // *Atherosclerosis.* 1992. V. 97. P. 201–208.
284. Powell M.F. Peptide stability in aqueous parenteral formulations-prediction of chemical-stability based on primary sequence // *ACS Symp. Ser.* 1994. V. 567. P. 100–117.

## Список литературы

285. Ptacek L.J. Channelopathies: ion channel disorders of muscle as a paradigm for paroxysmal disorders of the nervous system // *Neuromuscul Disord.* 1997. V. 7. P. 250–255
286. Qi Z., Sokabe M., Donowaki K., Ishida H. Structure-Function of de Novo Synthetic Hydrophobic Ion Channel // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 631-641.
287. Qiu X.Q., Jakes K.S., Kienker P.K., Finkelstein A., Slatin S.L. Major transmembrane movement associated with colicin Ia channel gating // *J. Gen. Physiol.* 1996. V. 107. P. 313-328.
288. Quan Z., Liu Y.M. Capillary electrophoretic separation of glutamate enantiomers in neural samples. – *Electrophoresis.* 2003, v. 24, No. 6, p. 1092–1096.
289. Quane K.A., Healy J.M., Keatins K.E., Manning B.M., Couch F.J., Palmucci L.M., Doriguzzi C., Fagerlund T.H., Berg K., Ordine H. Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia // *Nat Genet.* 1993. V. 5. P. 51–55
290. Quist A., Doudevski I., Lin H. et al. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. – *PNAS*, 2005, v. 102, no. 30, p. 10427–10432.
291. Radkiewicz J.L., Zipse H., Clarke S., Houk K.N. Accelerated racemization of aspartic acid and asparagine residues via succinimide intermediates: An ab initio theoretical exploration of mechanism // *J. Am. Chem. Soc.* 1996. V. 118. P. 9148–9155.
292. Radkiewicz J.L., Zipse H., Clarke S., Houk K.N. Neighboring side chain effects on asparaginyl and aspartyl degradation: An ab initio study of the relationship between peptide conformation and backbone NH acidity // *J. Am. Chem. Soc.* 2001. V. 123. P. 3499–3506.
293. Rattan S.I.S., Derventzi A., Clark B.F.C. Protein synthesis, posttranslational modifications, and aging // *Ann. New York Acad. Sci.* 1992. V. 663. P. 48–62.
294. Reid G., Scholz A., Gostock H., Vogel W. Human axons contain at least five types of voltage-dependent potassium channels // *J. Physiol. (London).* 1999. V. 518. P. 689-696.
295. Rettig J., Heinemann S.H., Wunder F., Lorra C., Parcej D.N., Dolly J.O., Pongs O. (1994). Inactivation properties of voltage-gated K1 channels altered by presence of beta-subunit // *Nature.* 1994. V. 369. P. 289-294.

## Список литературы

296. Reuter H., Stevens C.F. Ion conductance and ion selectivity of potassium channels in snail neurons // *J. Membr. Biol.* 1980. V. 57. P. 103-118.
297. Ritz S., Schutz H.W. Aspartic acid racemization in intervertebral discs as an aid to post mortem estimation of age at death // *J. Forensic Sci.* 1993. V. 38. P. 633-640.
298. Ritz S., Schutz H.W., Peper C. Postmortem estimation of age at death based on aspartic acid racemization in dentin: its applicability for root dentin // *Int. J. Legal Med.* 1993. V. 105. P. 289-293.
299. Ritz S., Turzynski A., Schutz H.W. Estimation of age at death based on aspartic acid racemization in non-collagenous bone proteins // *Forensic Sci. Int.* 1994. V. 69. P. 149-159.
300. Ritz S., Turzynski A., Schutz H.W., Hollmann A., Rochholz G. Identification of osteocalcin as a permanent aging constituent of the bone matrix: Basis for an accurate age at death determination // *Forensic Sci. Int.* 1996. V. 770. P. 13-26.
301. Ritz-Timme S. Lebensaltersbestimmung aufgrund des Razemisierungsgrades von Asparaginsäure. Grundlagen, Methodik, Möglichkeiten, Grenzen, Anwendungsbereiche. In: Berg, S., Brinkmann, B. (Eds.), *Arbeitsmethoden der Medizinischen und Naturwissenschaftlichen Kriminalistik*, Band 23. Schmidt-Römhild, Lubeck, 1995.
302. Ritz-Timme S., Collins M.J. Racemization of aspartic acid in human proteins // *Ageing Research Reviews.* 2002. V. 1. P. 43-59.
303. Robinson A.B., McKerrow J.H., Cary P. Controlled deamidation of peptides and proteins: An experimental hazard and a possible biological timer // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1970. V. 66. P. 753-757.
304. Robinson N.E., Robinson A.B. Molecular clocks // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001. V. 98. P. 944-949.
305. Robinson N.E., Robinson A.B. Prediction of protein deamidation rates from primary and three-dimensional structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001. V. 98. P. 4367-4372.
306. Roher A.E., Lowenson J.D., Clarke S., Wollcow C., Wang R., Cotter R.J., Reardon I.M., Zurcher-Neely H.A., Heinrikson R.L., Ball M.J., Greenberg B.D. Structural alteration in the peptide backbone of amyloid core protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. P. 3072-3083.

## Список литературы

307. Rosenberger R.F. Senescence and the accumulation of abnormal proteins // *Mutat. Res.* 1991. V. 256. P. 255–262.
308. Roux B. On the Potential Functions Used in Molecular Dynamics Simulations of Ion Channels // *Biophys. J.* 2002. V. 82. P. 1681–1684.
309. Roux B. Theories of Ion Permeation: A Chaser // *J. Gen. Physiol.* 1999. V. 114. P. 605–608.
310. Ruppertsberg J.P., Schroter K.H., Sakmann B., Stocker M., Sewing S., Pongs O. Heteromultimeric channels formed by rat brain potassium channel proteins // *Nature.* 1990. V. 345. P. 535–537.
311. Ruta V., Jiang Y., Lee A., Chen Y., MacKinnon R. Functional Analysis of an Archaeobacterial Voltage-Dependent K<sup>+</sup>-Channel // *Nature.* 2003. V. 422. P. 180–185.
312. Sah R., Schwartz-Bloom R.D. Optical imaging reveals elevated intracellular chloride in hippocampal pyramidal neurons after oxidative stress. – *J. Neurosci.*, 1999, v. 19, no. 21, p. 9209–9217.
313. Saito M. Molecular Dynamics Simulations of Proteins in Solutions: Artifacts Caused by the Cutoff Approximation // *J. Comp. Chem.* 1994. V. 101. P. 4055–4061.
314. Sajdok J., Kozak A., Zidkova J., Kotrba P., Pilin A., Kas J. Protein modification during aging of organism // *Chemicke Listy.* 2001. V. 95. P. 98–101.
315. Salkoff L. Genetic and voltage-clamp analysis of a *Drosophila* potassium channel // *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology.* 1983. V. 48. P. 221–231.
316. Salkoff L., Baker K., Butler A., Covarrubias M., Pak M.D., Wei A. An essential “set” of K<sup>+</sup> channels conserved in flies, mice, and humans // *Trends in Neurosciences.* 1992. V. 15. P. 161–166.
317. Sandmeier E., Hunziker P., Kunz B., Sack R., Christen P. Spontaneous deamidation and isomerization of Asn108 in prion peptide 106–126 and in full-length prion protein // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1999. V. 261. P. 578–583.
318. Sanguinetti M.C., Jiang C., Curran M.E., Keating M.T. A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the I<sub>Kr</sub> potassium channel // *Cell.* 1995. V. 81. P. 299–307.
319. Sarkadi L.S. Occurrence of D-amino acids in food. – In: *Progress in biological chirality.* G Palyi, C.Zucchi, L.Caglioti, eds. – 2004. – Elsevier Ltd. – 429 pp. – P. 339–354.

## Список литературы

320. Sarkadi L.S. Occurrence of D-amino acids in food. – In: Progress in biological chirality. G Palyi, C.Zucchi, L.Caglioti, eds. – 2004. – Elsevier Ltd. –429 pp. – P. 339–354.
321. Sawai H. Selection in the abiotic synthesis of RNA using metal ion catalyst and template. – In: Progress in biological chirality. – Eds.: G.Palyi, C.Zucchi, G.Caglioty – Elsevier (2004), pp. 221–235.
322. Schmidt J.W., Catterall W.A. Palmitoylation, sulfation, and glycosylation of the  $\alpha$ -subunit of the sodium channel // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262, P. 13713–13723.
323. Schrempf H., Schmidt O., Kummerlen R., Hinnah S., Muller D. Wagner R. A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segment from *Streptomyces lividans* // *EMBO J.* 1995. V. 14. P. 5170-5178.
324. Schulz G.E. Bacterial Porins: Structure and Function // *Current Opinion in Cell Biology.* 1993. V. 5. P. 701-707.
325. Scolnik Y., Portnaya I., Cogan U., Tal S. et al. Subtle differences in structural transitions between poly-L- and poly-D-amino acids of equal length in water // *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, v. 8, p. 333–339.
326. Scolnik Y., Portnaya I., Cogan U., Tal S. et al. Subtle differences in structural transitions between poly-L- and poly-D-amino acids of equal length in water. – *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2006, v. 8, p. 333–339.
327. Seifert R., Eismann E., Ludwig J., Baumann A., Kaupp B.U. Molecular Determinants of a Ca<sup>2+</sup>-Binding Site in the Pore of Cyclic Nucleotide-Gated Channels: S5/S6 Segments Control Affinity of Intrapore Gentamates // *EMBO J.* 1999. V. 18. P. 119-130.
328. Shapira R., Jen Chou C.H. Differential racemization of aspartate and serine in human myelin and basic protein // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1987. V. 146. P. 1342–1349.
329. Shapira R., Wilkinson K.D., Shapira G. Racemization of individual aspartate residues in human myelin basic protein // *J. Neurochemistry.* 1988. V. 50. P. 649–654.
330. Shapiro S.D., Endicott S.K., Province M.A., Pierce J.A., Campbell E.J. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of d-aspartate and nuclear weaponsrelated radiocarbon // *J. Clin. Invest.* 1991. V. 87. P. 1828–1834.
331. Shen N.V., Chen X., Boyer M.M., Pfaffinger P.J. Deletion analysis of K<sup>+</sup> channel assembly // *Neuron.* 1993. V. 11. P. 67-76.



## Список литературы

332. Shen N.V., Pfaffinger P.J. Molecular recognition and assembly sequences involved in the subfamily-specific assembly of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel subunit proteins // *Neuron*. 1995. V. 14. P. 625-633.
333. Sheng M., Liao Y.J., Jan Y.N., Jan L.Y. Presynaptic A-current based on heteromultimeric K<sup>+</sup> channels detected in vivo // *Nature*. 1993. V. 365. P. 72-75.
334. Shimizu T., Watanabe A., Ogawara M., Mori H., Shirasawa T. Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease // *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000. V. 381. P. 225-234.
335. Shrivastava I.H., Sansom M.S.P. Simulations of Ion Permeation Through a Potassium Channel: Molecular Dynamics of KcsA in a Phospholipid Bilayer // *Biophys. J.* 2000. V. 78. P. 557-570.
336. Sigworth F.J. Voltage Gating of Ion Channels // *Q. Review of Biophysics*. 1994. V. 27. P. 1-40.
337. Singh N.A., Charlier C., Stauner D., DuPont B.R., Leach R.J., Metis R., Ronen G.M., Bjerre I., Qiiattlebaum T., Murphy J.V. A novel potassium channel gene. KCNQ2 is mutated in an inherited epilepsy of newborns // *Nat Genet*. 1998. IS. P. 25-29
338. Slatin S.L., Qiu X.Q., Jakes K.S., Finkelstein A. Identification of a translocated protein segment in a voltage-dependent channel // *Nature*. 1994. V. 371. P. 158-161.
339. Slesinger P.A., Jan Y.N., Jan L.Y. The S4-S5 loop contributes to the ion-selective pore of potassium channel // *Neuron*. 1993. V. 11. P. 739-749.
340. Smith G.R., Sansom M.S.P. Dynamic Properties of Na<sup>+</sup> Ions in Models of Ion Channels: A Molecular Dynamics Study // *Biophys. J.* 1998. V. 75. P. 2767-2782.
341. Stadtman E.R., Levine R.L. Protein oxidation // *Ann. New York Acad. Sci.* 2000. V. 899. P. 191-208.
342. Stephenson R.C., Clarke S. Succinimide formation from aspartyl and asparaginyll peptides as a model for the spontaneous degradation of proteins // *J. Biol. Chem.* 1989. V. 264. P. 6164-6170.
343. Stocker M., Stuhmer W., Wittka R., Wang S., Muller R., Ferrus A., Pongs O. Alternative Shaker transcripts express either rapidly inactivating or noninactivating K<sup>+</sup> channels // *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*. 1990. V. 87. P. 8903-8907.
344. Strong M., Chandy K.G., Gutman G.A. Molecular evolution of voltage-sensitive ion channel genes: on the origins of electrical excitability // *Mol. Biol. Evol.* 1993. V. 10. P. 221-242.

## Список литературы

345. Sundaresan V., Abrol R. Biological Chiral Recognition: The Substrate's Perspective // *Chirality*. 2005. V. 17. P. 30-39.
346. Sundaresan V., Abrol R. Towards a general model for protein-substrate stereoselectivity // *Prot. Sci.* 2002. V. 11. P. 1330-1339.
347. Swartz K.J., MacKinnon R. Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels // *Neuron*. 1997. V. 18. P. 675-682.
348. Syganow A., Kitzing E. (In)validity of the Constant Field and Constant Currents Assumptions in Theories of Ion Transport // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 768-771.
349. Szymanska G., Leszyk J.D., O'Connor C.M. Carboxyl methylation of deamidated calmodulin increases its stability in *Xenopus* oocyte cytoplasm —Implications for protein repair // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 28516–28523.
350. Takats Z., Nanita S.C., Cooks R.G. Serine Octamer Reactions: Indicators of Prebiotic Relevance // *Angewandte Chemie Int. Edition*. 2003. V. 42. P. 3521-3523.
351. Tamkun M.M., Fambrough D.M. The Na/K-ATPase of chick sensory neurons: studies on biosynthesis and intracellular transport // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 1009–1019.
352. Tempel B.L., Pappasian D.M., Schwarz T.L., Jan L.Y., Jan Y.N. Sequence of a Probable Potassium Channel Component Encoded at Shaker locus of *Drosophila* // *Science*. 1987. V. 237. P. 770-775.
353. Terwindt G.M., Ophoff R.A., Haan J., Sandkuijl L.A., Franis R.R., Ferrari M.D. Migraine, ataxia and epilepsy: a challenging spectrum of genetically determined calcium channelopathies. Dutch Migraine Genetics Research Group // *Eur J Hum Genet*. 1998. V. 6. P. 297–307.
354. Thompson N., Thompson G., Cole C.D., Cotten M., Cross T.A., Busath D.D. Noncontact Dipole Effects on Channel Permeation. IV. Kinetic Model of 5F-Trp13 Gramicidin A Currents // *Biophys. J.* 2001. V. 81. P. 1245-1254.
355. Thornally P.J. The clinical significance of glycation // *Clin. Lab.* 1999. V. 45. P. 263–273.
356. Tieleman D.P., Berendsen H.J.C., Sansom M.S.P. An Alamethicin Channel in a Lipid Bilayer: Molecular Dynamics Simulations // *Biophys. J.* 1999. V. 76. P. 1757-1769.
357. Tikhonova I.G., Baskin I.I., Palyulin V.A., Zefirov N.S. A spatial model of the glycine site of the NR1 subunit of NMDA receptor ligand docking // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2002. V. 382. P. 67-70.

## Список литературы

358. Tomiyama T., Asano S., Furiya Y., Shirasawa T., Endo N., Mori N. Racemization of Asp23 residue affects the aggregation properties of Alzheimer amyloid protein analogues // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 10205–10208.
359. Tricarico D., Servidei S., Tonali P., Jurkal R.K., Camerino D.C. Impairment of skeletal muscle adenosine triphosphate-sensitive K<sup>+</sup> channels in patients with hypokalemic periodic paralysis // *J. Clin. Invest.* 1999. V. 103. P. 675 – 682.
360. Ulas J., Wiehmuller F.B., Brunner I.C. // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. P. 6317–6324.
361. van den Oetelaar P.J., van Beijsterveldt L.E., van Beckhoven J.R., Hoenders H.J. Detection of aspartic acid enantiomers by chiral capillary gas chromatography. Determination of in vivo racemization and reduction of metal-induced background // *J. Chromatogr.* 1986, V. 368, No. 1, P. 135–143.
362. van den Oetelaar P.J., van Beijsterveldt L.E., van Beckhoven J.R., Hoenders H.J. Detection of aspartic acid enantiomers by chiral capillary gas chromatography. Determination of in vivo racemization and reduction of metal-induced background. – *J. Chromatogr.* 1986, v. 368, No. 1, p. 135–143.
363. Van Duin A.C.T., Collins M.J. The effects of conformational constraints on aspartic acid racemization // *Org. Geochem.* 1998. V. 29. P. 1227–1232.
364. Van Gunsteren W.F., Berendsen H.J.C. Algorithms for Macromolecular Dynamics and Constraint Dynamics // *Mol. Phys.* 1977. V. 34. P. 1311-1327.
365. Van Gunsteren W.F., Karplus M. Effects of Constraints, Solvent and Crystal Environment on Protein Dynamics // *Nature.* 1981. V. 293. P. 677-678.
366. van Leeuwen F.W., Fischer D.F., Kamel D. et al. Molecular misreading: a new type of transcript mutation expressed during aging // *Neurobiol Aging*, 2000, v. 21, No. 6, P. 879–891.
367. van Leeuwen F.W., Fischer D.F., Kamel D. et al. Molecular misreading: a new type of transcript mutation expressed during aging. – *Neurobiol Aging*, 2000, v. 21, No. 6, p. 879–891.
368. Vandenoetelaar P.J.M., Hoenders H.J. Racemization of aspartyl residues in proteins from normal and cataractous human lenses—an aging process without involvement in cataract formation // *Exp. Eye Res.* 1989. V. 48. P. 209–214.

## Список литературы

369. Verzijl N., De Groot J., Thorpe S.R., Bank R.A., Shaw J.N., Lyons T.J., Bijlsma J.W.J., Lafeber F., Baynes J.W., Te Koppele J.M. Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 39027–39031.
370. Visick J.E., Cai H., Clarke S. The L-isoaspartyl protein repair methyltransferase enhances survival of aging *Escherichia coli* subjected to secondary environmental stresses // *J. Bacteriol.* 1998. V. 180. P. 2623–2629.
371. Von Kitzing E. Forces Determining Ion Permeation // *J. Gen. Physiol.* 1999. V. 114. P. 593-595.
372. Waite E.R., Collins M.J. The interpretation of aspartic acid racemization data of dentine proteins. In: Goodfriend, G.A., Collins, M.J., Fogel, M.L., Macko, S.A., Wehmiller, J.F. (Eds.), *Perspectives in Amino Acid and Protein Geochemistry*. Oxford University Press, New York, 2000, pp. 182–194.
373. Wallace B.A. Gramicidin Channels and Pores // *Annual Review of Biophysics.* 1990. V. 19. P. 127-157.
374. Wallace R.H., Wang D.W., Singh R., Scheffer I.E., George J., Phillips H.A., Saar K., Reis A., Johnson E.W., Sutherland G.R. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na<sup>+</sup>-channel beta1 subunit gene SCN1B // *Nat Genet.* 1998. V. 19. P. 366–370.
375. Wang H., Kunkel D.D., Martin T.M., Schwartzkroin P.A., Tempel B.L. Heteromultimeric K<sup>+</sup> channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons // *Nature.* 1993. V. 365. P. 75-79.
376. Wang J., Best P.M. Characterization of the potassium channel from frog skeletal muscle sarcoplasmic reticulum membrane // *J. Physiol.* 1994. V. 477. P. 279-290.
377. Ward W.F. The relentless effects of the aging process on protein turnover // *Biogerontology*, 2000, v. 1, p. 195–199.
378. Ward W.F. The relentless effects of the aging process on protein turnover. – *Biogerontology*, 2000, v. 1, p. 195–199.
379. Warmke J.W., Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals // *Proc. Nat. Ac. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 3438-3442.
380. Watanabe A., Takio K., Ihara Y. Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments — Unusual properties of the microtubule-binding domain of tau // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 7368–7378.

## Список литературы

381. Weber D.J., McFadden P.N. Injury-induced enzymatic methylation of aging collagen in the extracellular matrix of blood vessels // *J. Protein Chem.* 1997. V. 16. P. 269–281.
382. Wei A., Covarrubias M., Butler A., Baker K., Pak M., Salkoff L. K<sup>+</sup> current diversity is produced by an extended gene family conserved in *Drosophila* and the mouse // *Science*. 1990. V. 248. P. 599-603.
383. Weimar W.R., Neims A.H. // *J. Neurochem.* 1977. V. 29. P. 649-663.
384. Weiss M.S., Abele U., Weckesser J., Welte W., Schulz G.E. Molecular Architecture and Electrostatic Properties of a Bacterial Porin // *Science*. 1991. V. 254. P. 1627-1630.
385. Weiss M.S., Wacker T., Weckesser J., Welte W., Schulz G.E. The Three-Dimensional Structure of Porin from *Rhodobacter capsulatus* at 3Å Resolution // *FEBS Letters*. 1990. V. 267. P. 268-272.
386. White A., Handler P., Smith E.L. *Principles of Biochemistry*. New York, 1968. p. 248.
387. Williams K., Chao J., Kashiwagi K., Masuko T., Igarashi K. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors by glycine: role of an aspartate residue in the M3-M4 loop of the NR1 subunit // *Mol. Pharmacol.* 1996. V. 50. P. 701-708.
388. Wilson S. Basis sets / Ab initio methods in quantum chemistry. Part I. Advances in chemical physics. V. 67. Wiley-Interscience. Chichester, 1987. pp. 439–500.
389. Wolosker H., Sheth K. N., Takahashi M., Mothet J.-P., Brady R. O., Jr., Ferris C. D., Snyder S. H. Purification of serine racemase: Biosynthesis of the neuromodulator D-serine // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 721.
390. Wong J.T. A coevolution theory of the genetic code // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 1909-1912.
391. Wood M.W., VanDongen H.M.A., VanDongen A.M.J. A mutation in the glycine binding pocket of the N-methyl-D-aspartate receptor NR1 subunit alters agonist efficacy // *Mol. Brain Res.* 1999. V. 73. P. 189-192.
392. Wright H.T. Amino acid abundance and sequence data: clues to the biological significance of nonenzymatic asparagine and glutamine deamidation in proteins. In: Aswad, D.W. (Ed.), *Deamidation and Isoaspartate Formation in Peptides and Proteins*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1995, pp. 229–252.

## Список литературы

393. Wright H.T. Nonenzymatic deamidation of asparaginyl and glutaminyl residues in proteins // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1991. V. 26. P. 1–52.
394. Xie M.L., Schowen R.L. Secondary structure and protein deamidation // *J. Pharm. Sci.* 1999. V. 88. P. 8–13.
395. Yamamoto A., Takagi H., Kitamura D., Tatsuoka H., Nakano H., Kawano H., Kuroyanagi H., Yahagi Y., Kobayashi S., Koizumi K., Sakai T., Saito K., Chiba T., Kawamura K., Suzuki K., Watanabe T., Mori H., Shirasawa T. Deficiency in protein L-isoaspartyl methyltransferase results in a fatal progressive epilepsy // *J. Neurosci.* 1998. V. 18. P. 2063–2074.
396. Yusaf S.P., Wray D., Sivaprasadarao A. Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel // *Pflugers Arch.* 1996. V. 433. P. 91–97.
397. Zelikovich L., Libman J., Shanzer A. Molecular redox switches based on chemical triggering of iron translocation in triple-stranded helical complexes. – *Nature*, 2002, v. 374, p. 790–792.
398. Zhao Z.Y., Chang D.C. Ion selectivity of delayed rectifier K<sup>+</sup>-channel in squid axon // *Biophys. J.* 1987. V. 51a. P. 52.
399. Zheng F., Errenger K., Low C.M., Banke T.G., Lee C.J., Conn P.J., Traynelis S.F. Allosteric interaction between the amino terminal domain and the ligand-binding domain of NR2A // *Nat. Neurosci.* 2001. V. 4. P. 894–901.
400. Zhong Q., Jiang Q., Moore P.B., Newns D.M., Klein M.L. Molecular Dynamics Simulation of a Synthetic Ion Channel // *Biophys. J.* 1998. V. 74. P. 3–10.
401. Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup>-channel – Fab complex at 2.0 angstrom resolution // *Nature*. 2001. V. 414. P. 43–48.
402. Zioupos P., Currey J.D., Hamer A.J. The role of collagen in the declining mechanical properties of aging human cortical bone // *J. Biomed. Mater. Res.* 1999. V. 45. P. 108–116.
403. Аветисов В.А., Гольданский В.И. Физические аспекты нарушения зеркальной симметрии биоорганического мира // *Успехи физических наук.* 1996. Т. 166. №8. С. 873–891.
404. Альберт Э. Избирательная токсичность. М.: Мир, 1971. с. 25, 50.
405. Бараш Ю.С. Силы Ван-Дер-Ваальса. М.: Наука, 1988. 344 с.
406. Барышников В.Г., Дмитриев А.В., Пухов Н.М. Моделирование электростатического поля каналобразующих пептидов полем

## Список литературы

- заряженной цилиндрической поверхности // Биохимическая физика: тезисы докладов 2-й ежегодной молодежной конференции ИБХФ-ВУЗы. - Москва: Изд-во ИБХФ РАН, 2002. - С.3.
407. Бацанов С.С. Структурная химия. Факты и зависимости. М.: Диалог-МГУ, 2000. 292 с.
408. Бредов М.М., Румянцев В.В., Топтыгин И.Н. Классическая электродинамика. М.: Наука, 1985. 400 с.
409. Бурштейн К.Я., Шорыгин П.П. Квантовохимические расчеты в органической химии и молекулярной спектроскопии. М.: Наука, 1989. 104 с.
410. Вейль Г. Симметрия. М: Наука, 1968. 200 с.
411. Вересов В.Г. Исследования структурного состояния воды в малонил-бисдезформилграмидиновом канале методом Монте-Карло // Биологические мембраны. 1986. Т. 3. С. 1062-1072.
412. Геннис Р. Биологические мембраны. Молекулярная структура и функции. М.: Мир, 1997, 624 с.
413. Гершфельдер Дж., Кэртисс Ч., Бэрд Р. Молекулярная теория газов и жидкостей. М.: ИЛ, 1961. 650 с.
414. Гладик Ж. Биофизика. М.: Мир, 1983. 72 с.
415. Гольданский В.И., Кузьмин В.В. Спонтанное нарушение зеркальной симметрии в природе и происхождение жизни // Успехи физических наук. 1989. Т. 157. №1. С. 3-50.
416. Грибов Л.А., Муштакова С.П. Квантовая химия. М.: Гардарики, 1999. 390 с.
417. Джаффе Г., Орчин М. Симметрия в химии. М.: Мир, 1967. 300 с.
418. Дмитриев А.В., Барышников В.Г. О движении ионов в порообразующих белковых молекулах // Молекулярное моделирование: тезисы докладов 3-й Всероссийской конференции. - Москва: Изд-во ГЕОКХИ РАН, 2003. С. 10-11.
419. Дмитриев А.В., Барышников В.Г., Лузянин С.Е. Возможности и ограничения одномерной модели движения ионов в каналах биологических и модельных мембран // Биология – наука 21-го века: Тезисы докладов 6-й Пущинской конференции молодых ученых. – Пущино: Изд-во ПНЦ, 2002. С. 36.
420. Дмитриев А.В., Барышников В.Г., Лузянин С.Е. О конфигурациях электростатического поля в ионных каналах мембран // Биохимическая физика: тезисы докладов 2-й ежегодной

## Список литературы

- молодежной конференции ИБХФ-ВУЗы. - Москва: Изд-во ИБХФ РАН, 2002. - С.3.
421. Дмитриев А.В., Барышников В.Г., Марков И.В., Твердислов В.А. О механизмах ионной избирательности калиевого канала // 3-й Съезд биофизиков России: тезисы докладов. Воронеж: Изд-во ВГУ, 2004. с. 209-210.
422. Дмитриев А.В., Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н., Исаева Г.А., Исаев П.П. Влияние внешней среды на структурируемость HNSH-конформера грамицидина А // Молекулярная физика неравновесных систем: Материалы 3-й Всероссийской научной конференции. – Иваново: Изд-во ИГХТУ, 2001. – С.52-56.
423. Дмитриев А.В., Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н., Ткаченко К.Н., Исаева Г.А., Исаев П.П. Механизм местной анестезии: модельные взаимодействия в системе анестетик-мелиттин // Труды молодых ученых России: Сборник материалов 3-го Всероссийского медицинского конгресса. – Ижевск: Изд-во Экспертиза, 2000. – С.16-18.
424. Дмитриев А.В., Исаев П.П. Представление молекулы мембранного канала в системе координат с поворотной осью симметрии // Вестник КГУ им. Н.А. Некрасова. – 2005. – Т.5. – №7. – С.4-7.
425. Дмитриев А.В., Исаев П.П. Сравнительный анализ методов расчета потенциала димера грамицидина А // Биохимическая физика: тезисы докладов 2-й ежегодной молодежной конференции ИБХФ-ВУЗы. - Москва: Изд-во ИБХФ РАН, 2002. - С.4.
426. Дмитриев А.В., Исаев П.П. Физическое объяснение водной проницаемости аквапорина AP1 // Вестник КГУ им. Н.А. Некрасова. 2005. Т. 5. №4. С. 17–20.
427. Дмитриев А.В., Исаев П.П., Твердислов В.А. Влияние изомеризации аминокислотных остатков на структуру аквапорина // Журнал структурной химии. – 2006. – Т.47. – №3. – С. 100-120.
428. Дмитриев А.В., Исаев П.П., Твердислов В.А. Разделение дальних и ближних взаимодействий в расчетах распределения энергии ионов в мембранных каналах // Журнал структурной химии. – 2006. – Т.47. – №2. – С.255-259.
429. Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Исаев П.П. Влияние эффектов запаздывания на электростатические взаимодействия в системе анестетик-мембрана // Биология – наука 21-го века: Тезисы



## Список литературы

- докладов 5-й Пуцинской конференции молодых ученых. – Пушино: Изд-во ПНЦ, 2001. – С.124.
430. Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Исаев П.П. Математическое моделирование межмолекулярных взаимодействий в системе анестетик-биомембрана // Биохимическая физика на рубеже столетий: Тезисы докладов международной конференции. – Москва: Изд-во Института биохимфизики РАН, 2000. – С.42.
431. Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Исаев П.П. Статистическое обоснование полуэмпирических расчетов дипольных моментов // 4-й Сибирский конгресс по прикладной и индустриальной математике: Тезисы докладов. – Новосибирск: Изд-во Ин-та математики, 2000. – Т.3. – С.56.
432. Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Исаев П.П., Барышников В.Г., Ласточкин А.В. Уровни энергии и волновые функции иона в грамицидиновых каналах // Биофизика. 2002. Т. 47. №5. С. 864-868.
433. Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Исаев П.П., Лузянин С.Е. Исследование ионных потоков через границу раздела раствор/мембрана // Конденсированные среды и межфазные границы. 2002. Т. 5. №3. С. 35-40.
434. Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Исаев П.П., Слукина Ю.Л. Квантово-механическая модель движения иона в грамицидиновом канале мембраны // Компьютерное обеспечение химических исследований: Тезисы докладов Международного симпозиума. – Москва: Изд-во ИОХ РАН, 2001. – С.49-50.
435. Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Николаевский В.А., Исаев П.П. Совместное использование процедуры ридж-регрессии и выбора «наилучшего» подмножества предикторов в QSAR-исследованиях // Органическая химия на пороге третьего тысячелетия – итоги и перспективы: Материалы 2-й Региональной научной конференции по органической химии. – Липецк: Изд-во ЛГПУ, 2000. – С.87-89.
436. Дмитриев А.В., Исаева П.П., Исаев П.П. Квантово-статистическое исследование распределения молекул анестетиков около поверхности биомембраны // Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины: Тезисы докладов 2-й Конференции молодых ученых России с международным участием. – Москва: Изд-во ММА им. И.М. Сеченова, 2001.

## Список литературы

437. Дмитриев А.В., Исаева П.П., Исаев П.П. Квантово-статистическое исследование распределения молекул анестетиков около поверхности биомембраны // *Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины: Тезисы докладов 2-й Конференции молодых ученых России с международным участием.* – Москва: Изд-во ММА им. И.М. Сеченова, 2001.
438. Дмитриев А.В., Марков И.В., Барышников В.Г., Твердислов В.А. Об использовании приближенных силовых полей для расчета распределения электростатического потенциала мембранных каналов // *Журнал структурной химии.* 2005. Т. 46. №5. С. 624-628.
439. Дмитриев А.В., Марков И.В., Барышников В.Г., Твердислов В.А. Распределение энергии и ионная избирательность бактериального калиевого канала // *Биофизика.* – 2006. – Т.51. – №4. – С.1006-1011.
440. Дмитриев А.В., Марков И.В., Твердислов В.А. Моделирование третичной структуры функционально эквивалентных изомеров трансмембранных белков // 4-я Всероссийская конференция "Молекулярное моделирование": тезисы докладов. Москва, 2005. С. 35-37.
441. Дмитриев А.В., Марков И.В., Твердислов В.А. Рацемизация бактериального калиевого канала и хиральная безопасность биосферы // *Технологии живых систем.* – 2006. – Т.3. - №1. – С.5-8.
442. Дмитриев А.В., Твердислов В.А. Исследование ионной избирательности потенциал-зависимого калиевого канала // *Журнал структурной химии.* – 2006. – Т.47. – №4. – С.557-565.
443. Дмитриев А.В., Твердислов В.А. О возможности существования и структурных особенностях зеркального антипода природной клетки // *Препринт Физ. ф-та МГУ им. М.В. Ломоносова.* 2005. 50 с.
444. Дмитриев А.В., Твердислов В.А. О методах расчета распределения потенциала в белковых порах // *Биофизика.* 2004. – Т.49. – №3. – С.506-510.
445. Жаворонковс А.А. Взаимодействие ионов и хиральных соединений в модельных и биологических системах / *Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук.* М. МГУ, 2008. 134 с.

## Список литературы

446. Жидомиров Г.М., Багатурьянц А.А., Абронин И.А. Прикладная квантовая химия. Расчеты реакционной способности и механизмов химических реакций. М.: Химия, 1979. 296 с.
447. Зайнутдинов А.В., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Компьютерная программа моделирования равновесной геометрии молекул аминокислот // Биохимическая физика: тезисы докладов 2-й ежегодной молодежной конференции ИБХФ-ВУЗы. - Москва: Изд-во ИБХФ РАН, 2002. - С.5.
448. Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н., Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Моделирование равновесной геометрии аминокислот во внешнем электростатическом поле // Компьютерное обеспечение химических исследований: Тезисы докладов Международного симпозиума. – Москва: Изд-во ИОХ РАН, 2001. – С.59-60.
449. Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н., Ткаченко К.Н., Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Исаев П.П. Квантово-статистическое исследование влияния анизотропии поляризуемости на биологическую активность // Биология – наука 21-го века: Тезисы докладов 5-й Пущинской конференции молодых ученых. – Пущино: Изд-во ПНЦ, 2001. – С.327.
450. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Анализ количественных соотношений структура - анестезирующая активность ацетанилидов с применением регрессионных и квантово-химических методов // Химико-фармацевтический журнал. 2001. Т. 35. №6. С.54-56.
451. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Взаимодействие местных анестетиков с модельными ионными каналами // Биофизика. 2002. Т.47. №3. С. 506-511.
452. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Влияние вязкости растворителя на молекулярную динамику грамицидинового канала // Известия вузов. Серия Химия и химическая технология. 2001. Т. 44. №6. С. 560-568.
453. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Исследование зависимостей «структура-активность» с использованием самосогласованных свойств изменения статистических критериев // Математическое моделирование и компьютерные технологии: Тезисы докладов 3-го Всероссийского симпозиума. – Кисловодск: Изд-во КИЭП, 1999. – 1999. – Т.1. – С.64-65.

## Список литературы

454. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Исследование зависимостей «структура-активность» с использованием самосогласованных свойств изменения статистических критериев // 3-й Сибирский конгресс по прикладной и индустриальной математике: Тезисы докладов. – Новосибирск: Изд-во Института математики, 1998. – Т.3. – С.135.
455. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Математическое моделирование межмолекулярных взаимодействий в системе анестетик-биомембрана // Вестник КГУ им. Н.А. Некрасова. 2000. Т. 2. №2. С. 50-55.
456. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Механизм местной анестезии: ориентационные эффекты на дальних расстояниях // Биофизика. 2000. Т.45. №6. С. 1066-1071.
457. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Моделирование поляризационных взаимодействий в системе спирт – биомембрана // Известия вузов. Сер. Химия и хим. технология. 2003. Т. 46. №6. С. 101-103.
458. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Моделирование растворимости местных анестетиков ряда фенилпропиофенона // Современные проблемы информатизации: Тезисы докладов 5-й Республиканской электронной научной конференции. – Воронеж, 2000. – С.21.
459. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П. Поляризационные взаимодействия в системе анестетик-биомембрана: активность производных ацетанилида // Журнал физической химии. 2001. Т. 75. №10. С. 1716-1720.
460. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П., Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н. Влияние внешней среды на равновесную геометрию грамицидинового канала // Математика. Компьютер. Образование: Тезисы докладов 8-й Международной конференции. – Москва: Изд-во Прогресс-Традиция, 2001. – С.285.
461. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П., Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н., Ткаченко К.Н. Математическое моделирование взаимодействий местных анестетиков с грамицидиновыми каналами биомембраны // Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии: Тезисы докладов 4-я Международной научно-технической конференции. – Владимир: Изд-во Ин-та оценки природ. ресурсов, 2000. – С.47-52.

## Список литературы

462. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П., Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н. Математическое моделирование электростатических взаимодействий в системе анестетик-биомембрана // Математика. Образование. Экология. Гендерные проблемы: Тезисы докладов Международной конференции. – Воронеж: Изд-во ВГУ, 2000. – С.54-55.
463. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П., Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н. Обоснование зависимостей «структура-активность» по данным анализа остатков // Математика. Компьютер. Образование: Тезисы докладов 7-й Международной конференции. – Москва: Изд-во Прогресс-Традиция, 2000. – С.140-141.
464. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П., Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н. Обоснование корреляционных зависимостей «структура-активность» по данным анализа остатков // Математика. Компьютер. Образование: Сборник научных трудов 7-й Международной конференции. Часть 2. – Москва: Изд-во Прогресс-Традиция, 2000. – С.652-657.
465. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Исаев П.П., Зайнутдинов А.В., Рожков А.Н. Влияние базиса на точность оценки дипольного момента молекулы ацетанилида // Журнал структурной химии. 2001. Т. 42. №6. С. 1222-1225.
466. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Казак Е.В., Кузьмина Р.В., Исаев П.П. Математическое моделирование физиологического отклика в системе анестетик-мембрана // XVIII Съезд физиологического общества им. И.П. Павлова: Тезисы докладов. – Казань: Изд-во КГМУ, 2001. – С.104-105.
467. Исаева Г.А., Дмитриев А.В., Николаевский В.А., Исаев П.П. Дескрипторы молекулярной формы в исследованиях местноанестезирующей активности производных фенилпропиофенона // Прикладные информационные аспекты медицины. 2000. Т. 3. №2. С. 46-50.
468. Исаева Г.А., Исаев В.П., Дмитриев А.В. Квантово-химическое исследование проводимости ионных каналов биологических мембран // Молекулярная биология, химия и физика гетерогенных систем: Материалы 7-й Международной конференции, Москва-Плес. 2003. – Иваново: Изд-во ЮНОНА, 2003. С.49-54.

## Список литературы

469. Исаева Г.А., Исаев П.П., Дмитриев А.В., Ласточкин А.В., Марков И.В. Картирование устья грамицидиновых ионных каналов мембраны анестетиками ряда фенилпропиофенона // Биоинформатика и компьютерное конструирование лекарств: тезисы докладов 8-го Всероссийского симпозиума. – 2002. – С.25-26.
470. Исаева Г.А., Шмелев Р.В., Исаев П.П., Дмитриев А.В., Лапшина Н.П. Моделирование биологической активности местноанестезирующих и антиаритмических препаратов // 3-й Съезд биофизиков России: тезисы докладов. Воронеж: Изд-во ВГУ, 2004. с. 525-526.
471. Каплан И.Г. Введение в теорию межмолекулярных взаимодействий. М.: Наука, 1982. 312 с.
472. Кларк Т. Компьютерная химия: пер. с англ. М.: Мир, 1990. 383 с.
473. Компьютеры и суперкомпьютеры в биологии / Под ред. В.Д. Лахно и М.Н. Устинина. Москва-Ижевск: Институт компьютерных исследований, 2002. 500 с.
474. Корята И. Ионы, электроды, мембраны. М.: Мир, 1983. 264 с.
475. Лайфут Э.И. Явления переноса в живых системах. М.: Мир, 1977. 520 с.
476. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Квантовая механика (нерелятивистская теория). М.: Наука, 1989. 768 с.
477. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теория поля. М.: Наука, 1973. 504 с.
478. Ленинджер А. Биохимия. М.: Мир, 1974. с. 869, 655, 661.
479. Лузянин С.Е., Дмитриев А.В., Исаева Г.А., Исаев П.П. Теоретическое и экспериментальное исследование ионных потоков через мембрану // Биология – наука 21-го века: Тезисы докладов 6-й Пущинской конференции молодых ученых. – Пущино: Изд-во ПНЦ, 2002.
480. Лузянин С.Е., Марков И.В., Дмитриев А.В., Исаев П.П. О влиянии молекул анестетика на электростатическое поле мембранных каналов // Биохимическая физика: тезисы докладов 2-й ежегодной молодежной конференции ИБХФ-ВУЗы. - Москва: Изд-во ИБХФ РАН, 2002. - С.4.
481. Лурия С.Е., Дарнелл Дж. Общая вирусология. М.: Мир, 1967. с. 367.
482. Маркин В.С., Пастушенко В.Ф., Чизмаджев Ю.А. Теория возбудимых сред. М.: Наука, 1981. 275 с.

## Список литературы

483. Марков И.В., Дмитриев А.В. Предсказание первичной и третичной структуры D-изомеров модельных белков функционально эквивалентных природным мембранным белкам // Международная конференция «Ломоносов-2005»: тезисы докладов. Москва, 2005. – С.42-44.
484. Марков И.В., Дмитриев А.В. Разделение дальних и ближних взаимодействий в расчетах распределения энергии в аксиально-симметричных мембранных каналах // Международная конференция «Ломоносов-2005»: тезисы докладов. Москва, 2005. – С.40-41.
485. Межмолекулярные взаимодействия: от двухатомных молекул до биополимеров / Под ред. Б. Пюльмана. М.: Мир, 1981. 592 с.
486. Мелихов Н.Д., Шмелев Р.В., Дмитриев А.В., Барышников В.Г. О распределении молекулярного электростатического потенциала в полости порообразующих белков // Молекулярное моделирование: тезисы докладов 3-й Всероссийской конференции. - Москва: Изд-во ГЕОКХИ РАН, 2003. С. 28.
487. Мембраны: ионные каналы / Сб. статей. Под ред. Ю.А. Чизмаджева. М.: Наука, 1981. 320 с.
488. Минкин В.И., Симкин Б.Я., Миняев Р.М. Теория строения молекул (электронные оболочки): учебное пособие для университетов. М.: ВШ, 1979. 407 с.
489. Миронов С.Л. Сравнение структуры селективных фильтров кальциевого и натриевого каналов в возбудимых мембранах // ДАН СССР. 1983. Т. 268. №9. С. 731-735.
490. Наточин Ю.В. Физико-химические детерминанты физиологической эволюции: от протоклетки к человеку // Российский физиологический журнал. 2006. Т. 92. С. 57-72.
491. Николлс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. / Пер. с англ. П.М. Балабана и др. М.: Изд-во Едиториал УРСС, 2003. 600 с.
492. Петрашень М.И., Трифонов Е.Д. Применение теории групп к квантовой механике. М.: Наука, 1967. 400 с.
493. Полуэмпирические методы расчета электронной структуры. Т. 1. под ред. Дж. Сигала: пер. с англ. М.: Мир, 1980. 350 с.
494. Полуэмпирические методы расчета электронной структуры. Т. 2. под ред. Дж. Сигала: пер. с англ. М.: Мир, 1980. 370 с.
495. Рис Э., Стернберг М. Введение в молекулярную биологию: от клеток к атомам. М.: Мир, 2002. 350 с.

**Дмитриев А.В., Марков Н.В.**

**МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ  
НЕФЕРМЕНТАТИВНОЙ МОДИФИКАЦИИ  
БЕЛКОВ ЖИВЫХ ОРГАНИЗМОВ**

Сдано в набор 15.12.2014.

Гарнитура «Таймс».

Формат 60x84/16. Бумага офсетная.

Тираж 500 экземпляров. Заказ 82.

Отпечатано в ООО «ИПЦ „Маска“»

Москва, Научный проезд, 20.

Тел. 8 495 510-32-98

[www.maska.su](http://www.maska.su), [info@maska.su](mailto:info@maska.su)